

Variabilidade genética e análise de genes *cryI* em isolados de *Bacillus thuringiensis* nocivos à *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

V. B. BERGAMASCO, J. X. CORDEIRO, J. F. GONÇALVES, R. A. POLANCZYK, J. A. D. SENA, M. V. F. LEMOS

O presente trabalho objetivou analisar a variabilidade genética de 30 isolados de *Bacillus thuringiensis* usando a técnica RAPD-PCR. Além da correlação entre estes resultados e os dos bioensaios conduzidos com larvas de *Spodoptera frugiperda* com os isolados filogeneticamente relacionados com as linhagens padrão foi possível a identificação dos genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* e *cryID* por PCR. Estes resultados permitiram a predição da atividade de controle de um particular isolado considerando as relações filogenéticas entre os mesmos. Foi observado para a maioria dos isolados assim como para as linhagens padrão, a presença de dois ou mais genes *cryI*, que pode indicar um sinergismo entre eles, de modo a elevar o nível de efetividade das proteínas Cry. A ação combinada das proteínas cristal codificadas pelos genes *cryIAa*, *cryIAb* e *cryIAc*, caracteriza uma forte atividade de controle contra larvas de *S. frugiperda* descrita na literatura e baseado neste tipo de padrão de co-expressão a presença de genes *cryIAa* e *cryIB* nos isolados que controlam 100% poderá indicar que tal tipo de sinergismo se caracteriza como uma alternativa promissora no controle de *S. frugiperda*. A técnica RAPD-PCR possibilitou a detecção eficiente de genes *cry* por predição da ação, o que também permitiu observar as similaridades entre os sítios geográficos de coleta destes isolados e associar estas informações com o predomínio de um tipo particular de praga.

V. B. BERGAMASCO, vbbergamasco@hotmail.com. J. X. CORDEIRO, julianabiounesp@yahoo.com.br. J. F. GONÇALVES, gonferja@yahoo.com.br. R. A. POLANCZYK, rapolanc@yahoo.com.br. J. A. D. SENA, janete@fcav.unesp.br. M. V. F. LEMOS, mvictor@fcav.unesp.br. FCAV-UNESP, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, CEP: 14884-900, Jaboticabal-SP, Brasil.

Palavras-chave: Controle microbiano, bioensaio, RAPD, PCR.

INTRODUÇÃO

O aumento da produção agrícola para atender à crescente demanda por alimentos tem impactos diretos sobre o agroecossistema, pois está ligado ao uso intenso de insumos visando diminuir as perdas causadas principalmente pelos insetos-praga, como a *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho). No Brasil, estima-se que esta lagarta

seja responsável por mais de 25% dos prejuízos causados por pragas ao milho e pela maior parte dos 38,3 milhões de dólares gastos com pulverizações de inseticidas, resultando no prejuízo anual de aproximadamente 250 milhões de dólares (WAQUIL & VILELLA, 2003).

A lagarta-do-cartucho possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a região central dos EUA até a Argentina e em algumas

ilhas a oeste da Índia (BERTELS, 1970). Este inseto é de difícil controle devido à sua ampla gama de hospedeiros e sua grande capacidade de dispersão durante o período de cultivo. Esta praga ataca algodão, alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, batata-doce, cana-de-açúcar, hortaliças, milho, soja e trigo, sendo mais comum em gramíneas. No milho, a referida praga causa perda de 20% na produção de grãos, quando o desfolhamento ocorre próximo à floração (CRUZ, 1980). Dentre as dificuldades de controle deste inseto, existem casos de relatos de evolução da resistência desta praga aos inseticidas químicos.

Buscando um controle mais eficiente, não poluente e específico à *S. frugiperda*, iniciou-se os estudos utilizando *B. thuringiensis*, que atualmente no Brasil e em outros países tem demonstrado o potencial desse controle biológico. O *B. thuringiensis* apresenta atividade de controle específica às diversas ordens de insetos e a alguns nematóides. Sua ação é devido a produção de proteínas Cry ou delta-endotoxinas codificadas pelos genes *cry*. Uma variedade desta bactéria pode conter desde uma até várias cópias de um mesmo ou de diferentes genes *cry*, onde as diferentes combinações de genes caracterizam perfis de toxicidade distintos, devido à contribuição de cada um deles para diferentes níveis de toxicidade. A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que as mesmas possuem. Devido a sua alta especificidade, seu uso não causa danos aos organismos não alvos e nem à fauna, em geral (ESCUDEIRO, 2006).

Diferentes toxinas se ligam a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a especificidade das mesmas. Algumas das proteínas Cry apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, como por exemplo, a Cry1Ba contra lepidópteros e coleópteros (PRAÇA *et al.*, 2004). Além das toxinas cristais, várias cepas também produzem outras endotoxinas, como as Cyt (PEREZ *et al.*, 2005), Vip (SELVAPANDIYAN *et al.*, 2001) e Parasporina (KITADA *et al.*, 2006).

Diante disto a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) tem sido usada para caracterização de genes que codificam a proteína Cry e para a análise da coleção de *B. thuringiensis*. Esta técnica foi introduzida por CAROZZI *et al.* (1991) para identificar genes *cry*. É uma eficiente estratégia para identificar seqüências de genes *cry* presentes nos isolados de *B. thuringiensis*, para amplificar fragmentos de DNA por meio de iniciadores específicos ou gerais. Por meio desta técnica é possível utilizar oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada subtipo de gene *cry*, previamente descritos, para identificar genes contidos em novas linhagens, aumentando as chances de identificar novos isolados de *B. thuringiensis* com potencialidades entomopatogênicas diferentes das atualmente conhecidas, apresentando como uma prioridade em vários centros de pesquisa a comprovação da eficiência desses novos isolados que podem ser utilizados para a geração de bioinseticidas mais efetivos no controle de pragas.

Aliada a esta técnica a análise da variabilidade genética através da utilização do RAPD-PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) em novos isolados é um método útil para estabelecer a identificação e as similaridades entre os isolados de regiões diferentes. Essa técnica é utilizada para determinar a persistência da bactéria no ambiente e a predição da atividade tóxica de uma linhagem por intermédio de relações filogenéticas entre os isolados, muitas vezes evidenciando a presença de genes e direcionando os trabalhos de bioensaio (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004).

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo a análise da variabilidade genética de novos isolados de *B. thuringiensis* por meio da técnica de RAPD-PCR, além da realização de bioensaios contra *S. frugiperda* entre os isolados filogeneticamente mais próximos à linhagem padrão e da identificação de diferentes genes *cry1* por PCR, visando a predição da atividade tóxica de uma linhagem por intermédio de relações filogenéticas entre os isolados.

Quadro 1. Local de coleta das amostras de solo e seus respectivos isolados de *B. thuringiensis*.

Local de coleta	Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Campinas	188, 190, 191, 193 e 194
Capão Bonito	56, 60, 72, 80 e 90
Itapeva	117
Ourinhos	129 e 136
São Paulo	157, 158, 160, 168, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 177, 179, 180, 181, 182, 184 e 186

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *Bacillus thuringiensis*

Foram utilizados 30 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de amostras de solo coletadas em lavouras de milho de municípios localizados no estado de São Paulo, onde a *S. frugiperda* era a praga dominante, assim como as linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, como controles positivos para a ordem Lepidoptera. Os isolados utilizados foram listados de acordo com a sua numeração e o local de coleta (Quadro 1). Os mesmos foram estocados na forma de fitas de papel filtros impregnadas com uma suspensão de esporos mantidas a 10°C. Os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido, denominado Ágar Nutriente, incubadas a 30°C por 16 h.

Extração de DNA

O DNA de cada um dos isolados foi obtido utilizando-se o InstaGene Matrix kit (BioRad Laboratories), seguindo-se as instruções do fabricante.

Reações de RAPD-PCR

O procedimento para reações de amplificação do DNA, bem como a análise de PCR com oligonucleotídeos iniciadores inespecíficos encontram-se descritos em WILLIAMS *et al.* (1990). Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) inespecíficos utilizados neste trabalho são da coleção da University of British Columbia e suas respectivas seqüências estão especificadas no Quadro 2.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 2 µl

da suspensão da extração de DNA (40 ng), 0,5 mM de dNTPs; 2,0 mM de MgCl₂; 3,0 µl de iniciador (1 mM); 2,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,0 µl da solução tampão de PCR 10X (KCl 50mM, TRIS-HCl 200mM, pH 8,4) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl). Em todas as reações de amplificação por RAPD-PCR utilizou-se um controle negativo no qual a quantidade de DNA total foi substituída por água grau Milli-Q previamente esterilizada.

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores inespecíficos usados nas reações de RAPD-PCR.

Iniciadores	Seqüências
202	3' GAGCACTTAC 5'
214	3' CATGTCCTTG 5'
215	3' TCACACGTGC 5'
218	3' CTCAGCCCAG 5'
219	3' GTGACCTCAG 5'
221	3' CCCGTC AATA 5'
223	3' GATCCATTGC 5'
225	3' CGACTCACAG 5'
226	3' GGG CCT CTAT 5'
228	3' GCTGGGCCGA 5'
230	3' CGTCGCCCAT 5'
259	3' GGTACGTACT 5'
260	3' TCTCAGCTAC 5'
265	3' CAGCTGTTC A 5'
266	3' CCACTCACCG 5'
269	3' CCAGTTCGCC 5'
270	3' TGC GCGCGGG 5'
272	3' AGCGGGCCAA 5'
273	3' AATGTCGCCA 5'
291	3' AGCTGAAGAG 5'

As reações foram conduzidas em um termociclador automático PTC-100 (MJ Resercher) e o programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação de 5 min a 94°C e seguido por 37 ciclos compostos por uma etapa de 1 min a 94°C; pareamento de 2 min a 32°C e uma extensão final de 2 min a 72°C por 2 min. Ao final dos 37 ciclos foi feita uma extensão extra a 75°C por 5 min e posteriormente mantida a temperatura de 10°C.

Após as amplificações, 16 µl de cada amostra foram misturados a 4 µl de tampão (azul bromofenol a 0,5% em glicerol 50%) e aplicados em géis de agarose 1,5% (p:v) em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM Com pH 8,3) corados com brometo de etídeo (0,5 mg/ml) em cubas de eletroforese horizontal (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Em todos os géis, marcadores de tamanho molecular 1kb DNA ladder® foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados. Os géis foram visualizados e registrados em fotodocumentador (Gel Doc 2000 – Bio-Rad).

Bioensaios

Os testes de suscetibilidade foram realizados por meio de bioensaios com lagartas de primeiro instar de *S. frugiperda*. Os isolados de *B. thuringiensis* utilizados foram os que se apresentaram mais próximos do padrão, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, no dendrograma obtido pela técnica de RAPD-PCR. Esta variedade também foi usada como padrão nos bioensaios, assim como a *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, outro controle positivo para a ordem Lepidoptera.

Para os bioensaios, os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivadas meio de cultura NA (Nutriente Agar) composto por 25 g/L de meio Nutrient Broth e 15 g/L de ágar Technical, pH 6,8, que foi esterilizado em autoclave. As placas de Petri foram esterilizadas em estufas por 2 h à 120°C. Após a esterilização do meio de cultura, o mesmo foi distribuído em placas de Petri e os isolados de *B. thuringiensis* foram repicados com o auxí-

lio de uma alça de platina esterilizada. Após 48 h de cultivo em B.O.D. a 30°C, o conteúdo das placas foi raspado e transferido para tubos tipo Falcon (50 ml) e o volume completado para 20 ml de água destilada. Estes tubos foram centrifugados a 1301 x g por 30 min, onde se retirou a cada centrifugação o material suspenso, adicionando-se novamente 20 ml de água. Esta operação foi repetida por três vezes para eliminação do resto de cultura e toxinas indesejáveis, adicionando por último 10 ml de água destilada. Após homogeneização em vortex, foi feita a quantificação sempre numa média de 3x10⁸ esporos/ml na leitura em câmara de Neubauer. Foi utilizada uma solução de esporos/cristais para cada isolado.

Nos tratamentos do bioensaio, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial semi-sólida (BARRETO *et al.*, 1999), preparada em forma de alumínio esterilizada, permanecendo no fluxo laminar até solidificar. Depois de cortada em cubos de 1 cm³, foi esterilizada em luz germicida e para os bioensaios, esses cubos foram banhados com 1 ml de solução de esporos/cristais para cada isolado. Cada cubo foi inserido em um gerbox (2,0 X 6,0 cm), onde foram colocadas 10 larvas de primeiro instar de *S. frugiperda*. O delineamento foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos (isolados e testemunha) e 5 repetições, sendo que para a testemunha utilizou-se água destilada. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada nas seguintes condições: Temperatura: (25 ± 1°C), fotoperíodo: (14 h), UR: (70 ± 5%) e foram avaliados após 96 h da inoculação pela quantificação de lagartas mortas por ação do *B. thuringiensis*, cuja porcentagem de mortalidade de cada tratamento foi calculada. Todas as lagartas mortas foram observadas em microscópio óptico para a comprovação de que a presença de esporos foi causadora da morte.

Amplificação de genes *cryI* por PCR

Para a identificação dos genes *cryI* nos isolados, foram utilizados seis pares de iniciadores específicos obtidos da coleção do

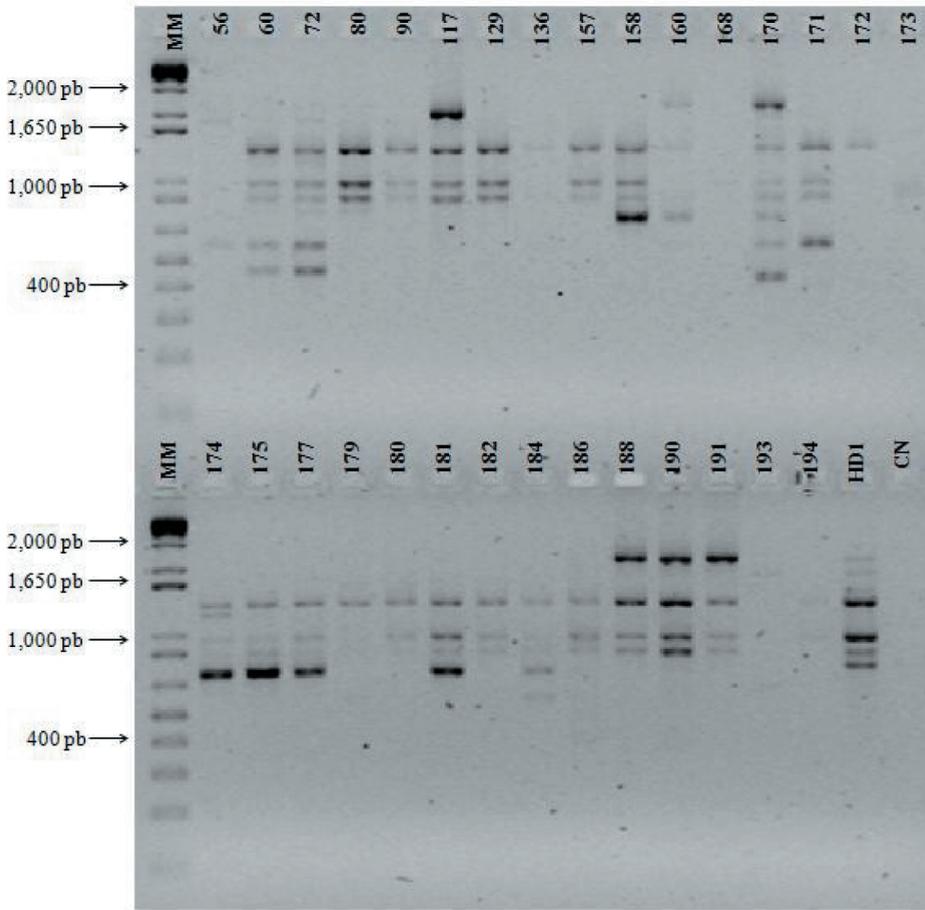


Figura 1. Perfis eletroforéticos de *B. thuringiensis* obtidos com o primer 259. Os números indicam as linhagens analisadas. MM: marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder®. HD1: controle positivo para Lepidoptera. CN: controle negativo.

LGBBA (Quadro 3). As reações de amplificação para os pares de iniciadores utilizados foram conduzidas em um volume total de 20 ml contendo: 2 µl da suspensão da extração de DNA (40 ng), 250 mM de uma solução de dNTP; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada um dos iniciadores; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (GIBCO-BRL); 2,0 µl de solução tampão de PCR (1X) e água destilada grau Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl).

Todas as reações de amplificação foram feitas utilizando três controles: duas linhagens padrão para ordem Lepidoptera (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137) e como controle negativo utilizou-se a água Milli-Q previamente esterilizada no lugar do DNA molde.

As reações de PCR foram realizadas utilizando um aparelho termociclador, onde foi utilizado o seguinte programa: um passo único de desnaturação de 5 min a 92°C e 30

Quadro 3. Sequências nucleotídicas dos iniciadores utilizados para a amplificação de genes *cryI* de *B. thuringiensis*.

Iniciadores	Pares de bases amplificados	Sequências
<i>cryIAa</i>	426 pb	F 5' TATTCCTTGTCGCTAACGC 3' R 5' CCAAACACTGAAACATCTCTC 3'
<i>cryIAb</i>	799 pb	F 5' GAGATGTTTCAGTGTGGAC 3' R 5' GTCCCGTCAAGAACAGATAG 3'
<i>cryIAc</i>	712 pb	F 5' GGTGCTGGATTGTGTAGG 3' R 5' TTCTTCTATGCCCTGAGCC 3'
<i>cryIB</i>	465 pb	F 5' AACAAACGAGAGATTATCCG 3' R 5' CGTTCTGTGTTTCTGGTGG 3'
<i>cryIC</i>	393 pb	F 5' TGGTCAACTACAAGGGAAG 3' R 5' TCTACTCCTTCAACACCACG 3'
<i>cryID</i>	670 pb	F 5' GAAGGGAAGGAAATACAGAGC 3' R 5' GTTATTGGAGTGAAGAGTGTG 3'

ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 92°C por 1 min; pareamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e ao final dos ciclos uma extensão extra a 72°C por 10 min. Ao fim de cada programa foi adicionado um passo único para manutenção da amostra a 10°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, 4 ml de tampão de amostra foram adicionados a um volume de 16 ml de cada amostra e aplicados em géis de agarose 1,5% (p:v), contendo brometo de etídeo (0,5 mg/ml) e submetidos a eletroforese horizontal por 2 horas a uma corrente elétrica de 75 V, conduzida em tampão TEB 1X, também adicionado de brometo de etídeo (0,5 mg/ml). Foi aplicada também uma amostra de marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder®, que serviu como referência de migração eletroforética para cálculo do peso molecular dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e documentados em um equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

RESULTADOS

A partir das análises da variabilidade genética por RAPD-PCR, foram obtidos diferentes perfis eletroforéticos entre os iso-

lados analisados utilizando-se os primers (Quadro 2) nas reações de PCR. Pode-se observar por meio do eletroforograma apresentado (Figura 1), que houve a amplificação de bandas polimórficas utilizando o primer 259, como também não foi possível identificar qualquer padrão de bandas nos isolados 56, 172, 173, 193, 194. Contudo, a utilização do primer 259 revelou a variabilidade genética existente nos demais isolados analisados neste estudo. Resultados diferentes foram obtidos com o restante dos primers, onde foram identificadas muitas bandas polimórficas, que variam de 400 a 2000 pb, totalizando 188 bandas polimórficas.

Os resultados das amplificações de todos os primers foram utilizados para a montagem de uma matriz binária correlacionando os dados relativos à presença ou ausência de bandas de mesmo tamanho molecular nos géis de eletroforese. Esta matriz serviu para a construção de um dendrograma pelo "software" FREETREE versão 0.9.1.50, onde os dados obtidos foram tratados como caracteres discretos, analisados pelo Coeficiente de Similaridade Genética de Jaccard e agrupados pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method for Arithmetic Averages). A visualização desse agrupamento foi possibilitada com o auxílio do "software" TREEVIEW, que permitiu o

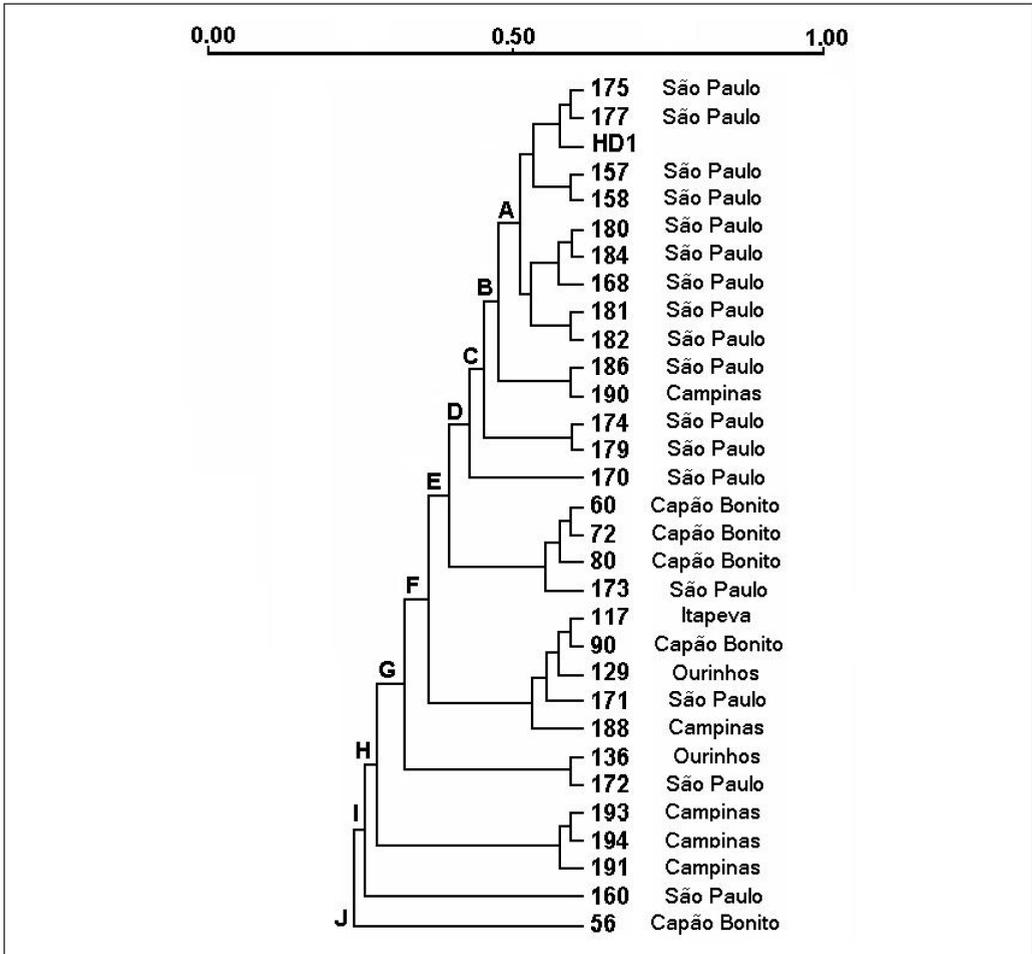


Figura 2. Dendrograma obtido pela análise de RAPD-PCR dos isolados de *B. thuringiensis* e seus respectivos locais de coleta.

agrupamento dos biotipos, de forma tanto mais similar quanto mais coincidentes fossem os fragmentos de mesmo peso molecular, o que gerou o dendrograma (Figura 2), que permitiu as análises de distância genética entre os isolados.

A análise do dendrograma permitiu identificar 10 agrupamentos principais, onde o menor coeficiente de similaridade foi de 35,3% e o maior de 58,5%. Desta forma, verificou-se uma grande variabilidade entre os isolados.

O grupo A correspondeu a grande número de linhagens com as maiores porcentagens de similaridade, agrupando 9 isolados com a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, apresentando 58,5% de similaridade genética em relação aos demais isolados. Este grupo correspondeu aos 9 isolados que foram coletados no município de São Paulo, confirmando o agrupamento pela procedência geográfica dos mesmos, assim como verificado na maioria dos outros grupos.

Quadro 4. Genes *cryI* identificados em isolados de *B. thuringiensis* e suas médias de mortalidade em lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).

Isolados	Genes <i>cryI</i> identificados	% de mortalidade \pm EP
157	<i>cryIAa</i> , <i>cryIB</i>	100,00 \pm 0,00 A
158	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cryIB</i>	100,00 \pm 0,00 A
168	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAc</i>	80,00 \pm 5,48 A
175	<i>cryIAa</i>	54,00 \pm 10,77 BC
177	<i>cryIAa</i>	44,00 \pm 6,78 CD
180	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i>	78,00 \pm 8,00 AB
184	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i> , <i>cryIB</i>	100,00 \pm 0,00 A
HD137	<i>cryIAa</i> , <i>cryIB</i> , <i>cryIC</i> , <i>cryID</i>	100,00 \pm 0,00 A
HD1	<i>cryIAa</i> , <i>cryIAb</i> , <i>cryIAc</i>	100,00 \pm 0,00 A
Testemunha		0,00 \pm 0,00 D

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Diante disto, em relação ao grupo A, as linhagens agrupadas com a linhagem padrão lepidoptera-específica (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1) que mais se aproximaram (157, 158, 168, 175, 177, 180 e 184) foram submetidas a bioensaios com *S. frugiperda*, praga comumente encontrada na localidade de isolamento das cepas, comparados a mais um padrão para esta ordem (*B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137).

Nos bioensaios, os tratamentos foram avaliados após 96 h da inoculação e após esse período foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*. Segundo POLANCZYK (2004), o pico de mortalidade de *S. frugiperda* ocorre três dias após a aplicação dos tratamentos de *B. thuringiensis*, sendo necessária a quantificação das lagartas mortas no quarto dia do experimento, pois após esse período pode haver mortalidade pela falta de alimento, alterando os resultados.

Para a análise estatística nos bioensaios, os dados de porcentagens de mortalidade foram submetidos à análise de variância, cujo modelo matemático proposto inclui o efeito fixo de linhagens. Foram verificadas as pressuposições de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância dos grupos (linhagens). Testes de comparação de médias entre as linhagens foram realizados após verificado o efeito do grupo sobre a

porcentagem de mortalidade. Para a comparação das médias, foi utilizado o teste de Tukey a 5%, para estabelecer a diferença mínima significativa entre as médias de mortalidade das linhagens, pelo Sistema de Análise Estatística (SANEST).

Pela análise do Quadro 4, os isolados HD1, HD137, 157, 158, 184 e 168 não diferenciaram estatisticamente um do outro, sendo que os cinco primeiros causaram 100% de mortalidade. O isolado 180 não diferenciou dos citados acima e nem do 175. O 175 não diferenciou do 180 e nem do 177. Todos os isolados foram patogênicos para *S. frugiperda* sendo que o 177 não diferenciou-se da testemunha.

Todos os produtos da PCR com oligonucleotídeos específicos (Figura 3) foram analisados pela ausência e presença da banda com peso molecular do gene na eletroforese em gel de agarose, pois cada gene *cry* produz um produto com um único peso molecular, podendo variar de acordo com o iniciador utilizado.

Com a comparação dos genes *cryI* identificados nos isolados e suas médias de mortalidade (Quadro 4), identificou-se uma variedade de combinações de genes nos isolados analisados que, nos bioensaios com *S. frugiperda*, demonstraram perfis de toxicidades distintos. Nenhum dos isolados amplificaram os genes *cryIC* e *cryID*, havendo ape-

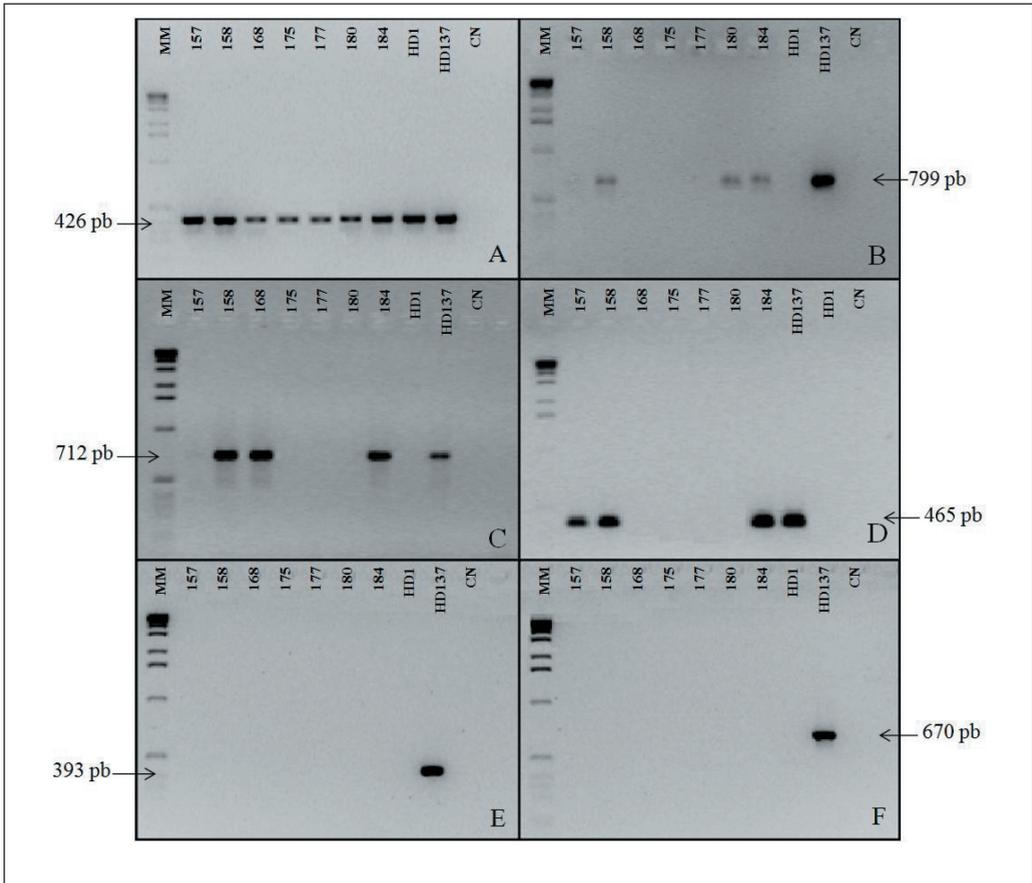


Figura 3. Amplificação do material genético correspondente às subclasses do gene *cryI*. A: *cryIAa*, B: *cryIAb*, C: *cryIAc*, D: *cryIB*, E: *cryIC*, F: *cryID*. Os números se referem às linhagens de *B. thuringiensis* analisadas. MM: marcador de tamanho molecular 1kb DNA ladder®. HD1 e HD137: controles positivos para Lepidoptera. CN: controle negativo.

nas amplificação na linhagem padrão para esses genes (*B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137). Nos isolados que apresentaram menores médias de mortalidade (175 e 177) foi identificado apenas o gene *cryIAa*. Naqueles que apresentaram mortalidade medianas (180 e 168), dois genes foram identificados, sendo um deles o gene *cryIAa* e o outro *cryIAb* ou o gene *cryIAc*. Já nos isolados mais efetivos (157, 158 e 184) assim como os padrões, com médias de mortalidade altas, notou-se a presença de dois ou mais genes *cryI*.

DISCUSSÃO

A técnica de RAPD-PCR mostrou-se eficaz na predição do conteúdo de genes *cry* e da especificidade dos isolados analisados, pois houve a seleção de isolados com potenciais patogênicos à praga dominante da região de onde foram isolados. A similaridade genética das linhagens-padrão com os isolados 175 e 177, que apresentaram menores taxas de mortalidade no bioensaio, indicaram uma relação com a especificidade da cepa, mas não a eficiência.

Trabalhando com caracterização molecular e fenotípica de *B. thuringiensis*, HANSEN (1996), ao utilizar a técnica de RAPD, observou que isolados daquela bactéria outrora indistinguíveis, poderiam ser distinguidos por este método. Um dos isolados estudados por HANSEN era um serovar *israelensis*, mas nenhum gene codificado para atividade em dípteros podia ser detectado, e a análise RAPD revelou que as “fingerprints” (impressões digitais) desse isolado *israelensis* desviavam das do isolado *israelensis* ONR604.

A utilização da técnica de RAPD-PCR resultou na verificação de uma grande variabilidade genética entre os isolados, como observado também por VILAS-BÔAS & LEMOS (2004), que utilizou esta técnica para diferenciação de isolados que não puderam ser diferenciados por outros métodos como ribotipagem e perfil plasmidial, resultando numa grande variabilidade genética existente na população avaliada.

Neste contexto, a análise da variabilidade genética pela utilização de marcadores moleculares RAPD em novos isolados é um método útil para se estabelecer a identificação e as similaridades entre os isolados de regiões diferentes. A proximidade filogenética dos isolados do município de São Paulo com os padrões e as médias de mortalidade a praga dominante nessa região, comprovam que a proximidade filogenética está relacionada com a localidade de coleta das cepas e com os níveis de toxicidade apresentados por elas à praga dominante na região de onde foram isoladas. BERNHARD *et al.* (1997) encontraram correlação entre origem das amostras utilizadas no isolamento de *B. thuringiensis* e atividade bioinseticida.

Os dados do bioensaio comprovaram a toxicidade dos isolados a praga mais comum do local de isolamento das cepas, o que demonstra a interação específica do patógeno ao hospedeiro. A maior prova dessa relação é a alta mortalidade dos isolados 157, 158, 184, com médias idêntica a do padrão para a ordem Lepidoptera. Existe a hipótese que esse patógeno tenha algum

tipo de relação simbiótica, talvez com as plantas, para explicar a produção de toxinas tão específicas e eficientes (ARONSON & SHAI, 2001) ou que espécies de insetos e linhagens de *B. thuringiensis* vêm co-evoluindo, como foi proposto por FEITELSON *et al.* (1992). Seguindo a mesma corrente de pensamento, BERNHARD *et al.* (1997) encontraram um alto número de linhagens de *B. thuringiensis* ativas contra *Heliothis virescens* em amostras coletadas nos Estados Unidos, onde este inseto é uma das maiores pragas agrícolas.

Geralmente, o tipo do gene *cry* presente em um isolado correlaciona a sua especificidade, logo, a identificação do gene em um isolado pode ser utilizada para prever seu potencial ao biocontrole, bem como a sua especificidade (WANG *et al.*, 2003). A técnica de PCR com iniciadores específicos foi utilizada por vários autores (CERON *et al.*, 1994; LERECLUS *et al.*, 1993; VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004; THULER, 2007) com diversos fins, desde diferenciar isolados de *B. thuringiensis* de isolados de *Bacillus cereus*, verificar a diversidade genética de genes *cry* até a identificação de genes *cry* de interesse ou mesmo novos genes.

Identificou-se uma variedade de combinações de genes *cryI* nos isolados analisados que, em bioensaios preliminares com *S. frugiperda*, demonstraram perfis de toxicidades distintos (Quadro 4). A identificação dos diversos genes *cryI* e sua relação com a concentração letal média (CL₅₀) em bioensaios com *S. frugiperda* foi demonstrado por CERON *et al.* (1994), onde se utilizou a técnica de PCR multiplex para identificar os genes.

O conjunto de genes *cryIAa*, *cryIAb* e *cryIAc* caracteriza uma grande efetividade contra *S. frugiperda*, como já demonstrado (HD1, 158 e 184) e altamente comercializado no bioinseticida Dipel obtido de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1. Como esse produto utiliza os cristais e esporos dessa subespécie, ao ser aplicado na lavoura, pode introduzir genes novos na população de *B. thuringiensis* já existente no local. Isso faz com

que as linhagens conjuguem entre si, fazendo com que fiquem mais semelhantes a subespécie introduzida e disseminando esses genes mais promissores para a população do local.

Nos isolados mais efetivos (157, 158 e 184) assim como os padrões, com médias de mortalidade altas, nota-se a presença de dois ou mais genes *cryI*, o que indica um sinergismo entre eles para a expressão de um maior nível de toxicidade das proteínas Cry.

A presença do gene *cryIB* nas linhagens com maiores médias de mortalidade demonstra sua alta eficiência a *S. frugiperda*, principalmente ao analisar o isolado 157 que, assim como os de baixa mortalidade, contém o gene *cryIAa* e a presença de apenas mais o gene *cryIB* torna-o tão eficiente quanto outros que contém três ou mais genes *cryI*. Isso faz com que esse gene seja de grande interesse para obtenção de novos produtos a base de *B. thuringiensis* para o controle dessa praga.

A presença da dupla de genes *cryIAa* e *cryIB* nos isolados que tiveram 100% de mortalidade pode indicar uma interação sinérgica entre esses genes de modo a formar proteínas com maior toxicidade a *S. frugiperda*, sendo essa característica a mais promissora para uso contra essa praga. Segundo XUE *et al.* (2005), a interação sinérgica entre as toxinas Cry1Aa e Cry1C exibiu uma maior toxicidade a *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa armigera* do que as mesmas toxinas isoladas.

A técnica de RAPD-PCR mostrou-se eficaz na predição do conteúdo de genes *cry* e permite concluir que a proximidade filogenética está relacionada com a localidade de coleta das cepas e com a especificidade à praga dominante na região onde foram isoladas, e que os diferentes níveis de toxicidade *S. frugiperda* estão relacionados com ao conteúdo de diferentes genes *cryI* devido ao sinergismo entre eles para a expressão de um maior nível de toxicidade das proteínas Cry.

RESUMEN

BERGAMASCO, V. B., J. X. CORDEIRO, J. F. GONÇALVES, R. A. POLANCZYK, J. A. D. SENA, M. V. F. LEMOS. 2009. Variabilidad genética y análisis de genes *cryI* en aislados de *Bacillus thuringiensis* nocivos a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 329-341.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la variabilidad genética de 30 aislados de *Bacillus thuringiensis* usando la técnica de RAPD-PCR. Además de la correlación entre estos resultados y los de los bioensayos realizados con larvas de *Spodoptera frugiperda* con aislados filogenéticamente relacionados con los linajes estándar, fue posible la identificación de los genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* y *cryID* por PCR. Estos resultados permitieron la predicción de la actividad de control de un particular aislado considerando las relaciones filogenéticas entre los mismos. Fue observado que para la mayoría de los aislados así como para los linajes estándar, la presencia de dos o más genes *cryI*, puede indicar un sinergismo entre ellos, elevando el nivel de efectividad de las proteínas Cry. La acción combinada de las proteínas cristal codificadas por los genes *cryIAa*, *cryIAb* y *cryIAc*, caracteriza una fuerte actividad de control contra larvas de *S. frugiperda* descrita en la literatura y basada en este tipo de estándar de co-expresión la presencia de genes *cryIAa* y *cryIB* en los aislados que controlan 100%, podrá indicar que tal tipo de sinergismo se caracteriza como una alternativa más propicia para el control de *S. frugiperda*. La técnica RAPD-PCR posibilitó la detección eficiente de genes *cry* por predicción de la acción, lo que también permitió observar las similitudes entre los lugares geográficos de colecta de estos aislados y asociar estas informaciones con el predominio de un tipo particular de plaga.

Palabras clave: Control microbiano, bioensayo, RAPD, PCR.

ABSTRACT

BERGAMASCO, V. B., J. X. CORDEIRO, J. F. GONÇALVES, R. A. POLANCZYK, J. A. D. SENA, M. V. F. LEMOS. 2009. Genetic variability and genes *cryI* analysis in *Bacillus thuringiensis* strains harmful for *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, **35**: 329-341.

The present work aimed to analyze the genetic variability on 30 new isolates of *Bacillus thuringiensis* using the RAPD-PCR technique. Besides a correlation of these findings with those of bioassays conducted using *Spodoptera frugiperda* larvae developed with the isolates phylogenetically related to the standard strain and the identification of *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAC*, *cryIB*, *cryIC* and *cryID* genes by PCR. This would allow predicting the control activity of a particular isolated considering the phylogenetic relation among the isolates. It was observed for the most effective isolates as for the standard strains, the presence of two or more *cryI* genes, what might indicate a synergism among them so as to raise the level of Cry proteins control effectivity. The combined action of crystal proteins coded by *cryIAa*, *cryIAb* e *cryIAC* genes characterizes the strong control activity against *S. frugiperda* described elsewhere and based in this type of co-expression patterns the presence of the *cryIAa* and *cryIB* genes on the 100% control isolates might point out also such synergism indicating a promising use of them to control *S. frugiperda*. The RAPD-PCR technique allowed detecting efficiently the *cry* genes prediction action which also permitted to observe the similarities among the geographical collection sites of these isolates in association with the presence of a particular dominant pest.

Key words: Microbian control, bioassay, RAPD, PCR.

REFERÊNCIAS

- ARONSON, A. I., SHAI, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.*, **195** (1): 1-8.
- BARRETO, M. R. 1999. Atividade inseticida do sobrenadante da cultura de cepa de *Bacillus thuringiensis* Berliner contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera:Noctuidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, **28** (4): 675-685.
- BERNHARD, K., JARRETT, P., MEADOWS, M., BUTT, J., ELLIS, D. J., ROBERTS, G. M., PAULI, S., RODGERS, P., BURGESS, H. D. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. *J. Invertebr. Path.*, **70** (1): 59-68.
- BERTELS, A. 1970. Estudos da influência da umidade sobre a dinâmica de flutuação de lepidópteros, pragas do milho. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **5** (1): 67-79.
- CAROZZI, N. B., KRAMER, V. C., WARREN, G. W., EVOLA, S., KOZIEL, M. G. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** (11): 3057-3061.
- CERON, J., COVARRUBIAS, L., QUINTERO, R., ORTIZ, A., ORTIZ, M., ARANDA, E., LINA, L., BRAVO, A. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60** (1): 353-356.
- CRUZ, I. 1980. Impact of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith and Abbot, 1797), on grain yield in field corn. Dissertation (M.S.) - Purdue University. Lafayette, 162 p.
- ESCUADERO, I. R., ESTELA, A., PORCAR, M., MARTÍNEZ, C., OGUIZA, J. A., ESCRICHE, B., FERRÉ, J., CABALLERO, P. 2006. Molecular and Insecticidal Characterization of a CryII Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72** (7): 4796-4804.
- FEITELSON, J. S., PAYNE, J., KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Biotechnology*, **10**: 271-275.
- HANSEN, B. M.; DAMGAARD, P. H.; EILENBERG, J.; PEDERSEN, J. C. 1996. Non-radioactive colony hybridization. In *Bacillus thuringiensis- Ecology and Environmental Effects of its Use for Microbial Pest Control.*, 99-101.
- KITADA, S.; ABE, Y.; SHIMADA, H. et al. 2006. Cytocidal actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, **281**: 26350-26360.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Edited by Enwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., Higgs, S. West Sussex, J. Wiley, 37-70.
- PEREZ, C., FERNANDEZ, L. E., SUN, J., FOLCH, J.L., GILL, S. S., SOBERON, M., BRAVO, A. 2005. *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane bound receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 18303-18308.
- POLANCZYK, R. A. 2004. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de

- Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Tese de Doutorado em Ciências, área de concentração: Entomologia – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 145 p.
- PRAÇA, L. B., BATISTA, A. C., MARTINS, E. S., SIQUEIRA, C. B., DIAS, D. G. D., GOMES, A. C. M. M., FALCAO, R., MONNERAT, R. G. 2004. *Bacillus thuringiensis* strains effective against insects of Lepidoptera, Coleoptera and Diptera orders. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **39**: 11-16.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ª ed. 250 p.
- SELVAPANDIYAN, A.; ARORA, N.; RAJAGOPAL, R.; JALALI, S. K.; VENKATESAN, T.; SINGH, S. P.; BHATNAGAR, R. K. 2001. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 5855–5858.
- THULER, A. M. G., THULER, R. T., CÍCERO, E. S., DE BORTOLI, S. A., LEMOS, M. V. F. 2007. Estudo da variabilidade gênica em isolados de *Bacillus thuringiensis* para o emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*. *Bol. San. Veg. Plagas*, **33**: 409-417.
- VILAS-BÔAS, G. F. L. T., LEMOS, M. V. F. 2004. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol.*, **50** (8): 605–613.
- WANG, J., BOETS, A., VAN RIE, J., REN, G. 2003. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J. Invertebr. Path.*, **82** (1): 63-71.
- WAQUIL, J.M., VILELLA, F.M.F. 2003. Gene bom. *Rev. Cultivar*, **49**: 22-26.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary “primers” are useful as genetic makers. *Nuc. Ac. Res.*, **18** (22): 7213-7218.
- XUE, J. L., CAI, Q. X., ZHENG, D. S., YUAN, Z. M. 2005. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **40** (6): 460-465.

(Recepción: 24 octubre 2008)

(Aceptación: 6 mayo 2009)