

**NOVAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E *Bacillus sphaericus* TESTADAS
CONTRA LARVAS DE INSETOS DA ORDEM LEPIDOPTERA E DIPTERA**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 87

NOVAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E *Bacillus sphaericus* TESTADAS CONTRA LARVAS DE INSETOS DA ORDEM LEPIDOPTERA E DIPTERA

**Helena Cavaleiro
Lílian Botelho Praça
Érica Soares Martins
Patrícia Teles Medeiros
Ana Cristina M. M. Gomes
Rose Gomes Monnerat**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)

3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

C 376 Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem lepidóptera e diptera / Helena Cavaleiro ... [et. al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
22.p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 87)

1. Bactéria. 2. Bacilos Entomopatogênicos. 3. Bioinseticidas. I. Praça, Lílian Botelho. II. Martins, Érica Soares. III. Medeiros, Patrícia Teles. IV. Gomes, Ana Cristina M. M. V. Monnerat, Rose Gomes. VI. Série.

632.96 – CDD 21

Sumário

RESUMO	6
ABSTRACT	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
1. Isolamento	9
2. Caracterização de Bacilos entomopatogênicos.....	10
2.1. Crescimento em meio seletivo com antibiótico	10
2.2. Caracterização morfológica	10
3. Avaliação de patogenicidade.....	10
3.1. Contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	11
3.2. Contra <i>Anticarsia gemmatalis</i>	11
3.3. Contra <i>Plutella xylostella</i>	11
3.4. Contra <i>Aedes aegypti</i> e <i>Culex quinquefasciatus</i>	12
4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%)	12
5. Caracterização molecular	12
6. Caracterização morfológica via Microscopia eletrônica de varredura	13
Discussão e resultados.....	13
1. Isolamento	13
2. Avaliação da patogenicidade.....	14
3. Eletroforese de proteínas-cristal	15
4. Caracterização Molecular.....	16
5. Microscopia eletrônica de varredura	16
Conclusão.....	19
Referência Bibliográfica.....	20

NOVAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E *Bacillus sphaericus* TESTADAS CONTRA LARVAS DE INSETOS DA ORDEM LEPIDOPTERA E DIPTERA

Helena Cavaleiro¹

Lílian Botelho Praça²

Érica Soares Martins³

Patrícia Teles Medeiros⁴

Ana Cristina M. M. Gomes⁵

Rose Gomes Monnerat⁶

RESUMO

O emprego de *Bacillus* spp. constitui uma importante ferramenta no manejo integrado de pragas agrícolas e vetores de doenças. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de uma Coleção de Bacilos Entomopatogênicos isolados a partir de amostras de solos, água e insetos oriundos de diferentes regiões do Brasil. O intuito desta coleção é coletar, selecionar, estocar e disponibilizar estirpes tóxicas ou que produzam toxinas diferentes das já existentes que possam ser utilizadas para produção de bioinseticidas. Visando enriquecer o acervo do banco foi realizado um trabalho de isolamento de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* a partir do processamento de 94 amostras de solos e duas de insetos mortos. Foram isoladas 32 estirpes de *Bacillus thuringiensis* e 5 de *Bacillus sphaericus*. As estirpes foram testadas contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Das 37 estirpes testadas, 13 estirpes de *B. thuringiensis* se mostraram ativas contra lepidópteros e uma se mostrou ativa contra dipteros.

¹ Engenheira de Biotecnologia – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

² Engenheira Agrônoma – Mestre em Ciências Agrárias – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

³ Bióloga – Mestre em Patologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

⁴ Engenheira Agrônoma – Mestre em Agricultura Tropical – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

⁵ Bióloga – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

⁶ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

NEW STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* AND *Bacillus sphaericus* TESTED AGAINST INSECTS LARVAE OF LEPIDOPTERA AND DIPTERA ORDERS

ABSTRACT

The use of *Bacillus* spp. in insect control is an important tool. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia has a Collection of Entomopathogenic *Bacillus* isolated from soil, water and insects samples collected in different regions of Brazil. The aim of this collection is collect, select, store and make available toxic strains or toxins that could be used to produce bioinsecticides. In order to improve this bank, 94 soil samples and two dead insects were processed and 32 strains of *Bacillus thuringiensis* and 5 strains of *Bacillus sphaericus* were isolated. These strains were tested against *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae and 13 *B. thuringiensis* showed toxicity against lepidopteran and 1 against mosquitoes.

Introdução

Algumas espécies de insetos são consideradas pragas importantes na agricultura brasileira, como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). Outros podem ser vetores de doenças como a dengue, febre-amarela e filaríoses, como os mosquitos *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).

O uso inadequado dos inseticidas químicos para o controle de muitos destes insetos vem causando nos últimos anos um desequilíbrio nos ecossistemas por poluírem o meio ambiente, atuarem sobre os inimigos naturais e promoverem o surgimento de populações de insetos resistentes. Neste sentido, Os agentes biológicos surgem como uma alternativa importante e mais segura para o controle de pragas.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva e entomopatogênica, aeróbia, cujos esporos são entre elípticos e cilíndricos em posição central com um esporângio distendido. Inicialmente foi descrita como uma bactéria de solo, mas atualmente sabe-se que poder ser encontrada em folhas, água e insetos mortos, estando, portanto, amplamente distribuída na natureza (HABIB e ANDRADE, 1998).

A atividade inseticida desta bactéria é devida à produção de inclusões protéicas cristalinas durante a fase de esporulação. A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal (LERECLUS et al., 1993) e estes cristais formados por diferentes δ -endotoxinas, relacionadas entre si, muitas das quais tóxicas e específicas para determinadas ordens de insetos Lepidoptera, Coleoptera, Diptera (EDWARDS et al., 1988), Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera (Feitelson, 1994), não afetando insetos não alvo, plantas, vertebrados ou o meio ambiente (CERÓN et al., 1994, 1995).

Bacillus sphaericus é uma bactéria gram-positiva, aeróbica, com esporo subterminal e esférico que deforma o esporângio, o que determina a forma de uma raquete de tênis. As células desta bactéria medem de 0,6 a 1 μ m. A posição do esporângio é terminal, e só é produzido um endósporo por esporângio (NEIDE, 1904; SILVA et al., 1998). Quase todas as espécies do gênero *Culex* e *Anopheles*

são susceptíveis ao *B. sphaericus*, entretanto esta bactéria não apresenta ou apresenta pouca eficiência sobre larvas de mosquitos do gênero *Aedes*.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui em torno de 2300 estirpes de *Bacillus* spp. armazenadas na Coleção de Bacilos Entomopatogênicos. Todas estas estirpes foram testadas e caracterizadas contra insetos-praga e vetores de doenças para serem utilizadas como base para produção de bioinseticidas ou como doadoras de genes para a síntese de plantas transgênicas resistentes a insetos.

Este trabalho foi efetuado com o intuito de se encontrar novas estirpes de *B. thuringiensis* e *B. sphaericus* visando o aumento do número de estirpes disponíveis para o controle das lagartas *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *P. xylostella* e dos mosquitos *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*.

Material e Métodos

1. Isolamento

Foram utilizadas 92 amostras de solos provenientes do Núcleo Rural Taquara, Brasília - DF, e 2 amostras de insetos mortos providas da colônia de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, num total de 94 amostras. A metodologia utilizada foi adaptada do Protocolo da Organização Mundial de Saúde de 1987 (WORLD..., 1987; SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001).

2. Caracterização de Bacilos entomopatogênicos

As colônias típicas de *B. thuringiensis*, de tamanho médio medindo aproximadamente 0,5 cm, esbranquiçadas, opacas e com margens irregulares e as típicas de *B. sphaericus*, mais arredondadas e amarelas foram selecionadas e inoculadas em meio NYSM (Nutrient broth, yeast extract, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) (YOUSTEN et al., 1984). Após 48 horas, essas bactérias foram caracterizadas quanto à resistência a antibióticos, morfologia e entomopatogenicidade.

2.1. Crescimento em meio seletivo com antibiótico

A identificação inicial das estirpes foi realizada através do crescimento diferencial em placas de Petri, que continham meio NYSM com 100 mg/L de penicilina ou com 25 mg/L de estreptomicina (YOUSTEN, 1991), por 24 horas a 30° C. As estirpes que cresceram em meio com penicilina foram identificadas como *B. thuringiensis* ou *B. cereus*, e os que cresceram nas placas com estreptomicina foram classificados como *B. sphaericus*.

2.2. Caracterização morfológica

Após crescimento em meio seletivo, as estirpes foram inoculadas em meio líquido NYSM em incubador rotativo a 200 rpm a 28° C durante 48 a 72 horas (até completa esporulação). Após o crescimento, as células vegetativas, esporos e cristais dos bacilos foram visualizados em microscópio de contraste de fases com aumento de 1.000 vezes (SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001; MONNERAT et al., 2001b).

3. Avaliação de patogenicidade

As estirpes de *B. thuringiensis* foram crescidas em meio líquido NYSM em incubador rotativo a 200 rpm a 28° C durante 48 a 72 horas (até completa esporulação) e testadas contra *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *S. frugiperda*, *A. gemmatilis* e *P. xylostella*. As estirpes de *B. sphaericus* foram testadas contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Foram consideradas patogênicas aquelas que causaram mortalidade igual ou superior a 50% (MONNERAT et al., 2001a).

3.1. Contra *Spodoptera frugiperda*

Os bioensaios foram realizados espalhando-se 35 µl de cultura bacteriana sobre a dieta distribuída previamente em placas de cultivo de células com 24 poços. Após a absorção da cultura bacteriana pela dieta, uma lagarta de segundo instar foi colocada em cada poço e uma placa foi mantida sem bactéria, como controle negativo e em outra placa foi colocado *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Btk) como controle positivo. As placas foram fechadas com as tampas de acrílico e com o

auxílio de ligas elásticas. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copos de plástico de 50 ml, contendo dieta livre de bactéria. No sétimo dia, foi feita a segunda e última leitura. (MONNERAT et al, 2001a; SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001). As lagartas foram individualizadas devido ao seu hábito canibal, sendo colocado um indivíduo por copinho.

3.2. Contra *Anticarsia gemmatalis*

Os bioensaios foram realizados espalhando-se 150 µl de cultura bacteriana na dieta distribuída previamente em copinhos descartáveis de 50 ml. Após absorção da cultura bacteriana pela dieta, dez lagartas de segundo instar de *Anticarsia gemmatalis* foram colocadas em cada copo. Em seguida os copos foram fechados com tampas de acrílico e incubados sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2$, $70\% \pm 10$ de umidade relativa e fotoperíodo de 14 horas (SCHMIDT et al., 2001). Duas repetições foram feitas para cada estirpe, um copo foi deixado sem a cultura de bactéria como controle negativo e em outro copo foi colocado *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Btk) como controle positivo. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para novos copos, contendo dieta livre de bactéria. No quinto dia, foi feita a segunda e última leitura (MONNERAT et al, 2001a; SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001).

3.3. Contra *Plutella xylostella*

Os bioensaios foram realizados colocando-se 100 µl de cultura de bacteriana em folhas de couve. Após a secagem foram colocadas 10 lagartas de terceiro instar em cada folha. Fez-se duas repetições para cada estirpe e um controle negativo livre de bacilos. Para avaliar a mortalidade das lagartas foram efetuadas duas leituras, a primeira após 48 horas, na qual se fez a troca das folhas por uma nova sem adição de bactéria e a segunda e última leitura no quinto dia. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1(Btk) foi utilizado como controle positivo.

3.4. Contra *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*

O procedimento para a realização do bioensaio seletivo foi semelhante para cada uma das espécies de mosquitos testadas e consistiu em colocar 1ml da cultura

bacteriana em dois copos descartáveis de 200ml, contendo 100ml de água destilada com 25 larvas de segundo instar. Foram feitas duas repetições para cada estirpe e um copo sem a cultura bacteriana foi usado como controle negativo. Como controle positivo foram utilizados o *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS-82 (Bti), e *B. sphaericus* estirpe 2362. Após 24 e 48 horas realizou-se a leitura do número de sobreviventes. (MONNERAT et al, 2001a; SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001).

4. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%)

As estirpes selecionadas nos bioensaios foram analisadas quanto ao perfil protéico em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE-10%) de acordo com o protocolo descrito por Lecadet et al. (1991) e Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em aparelho Hoefer miniVE vertical electroforesis system – Amersham Pharmacia, contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), a voltagem constante de 150 V, por 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado em solução corante de Comassie blue por uma hora e descorado em solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) por 1-2 horas até visualização dos perfis protéicos. As estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) foram utilizadas como padrão.

5. Caracterização molecular

As estirpes foram também caracterizadas com relação ao seu perfil molecular. O DNA total das estirpes foi extraído segundo metodologia descrita por Bravo et al. (1998). As reações de PCR foram montadas usando-se 12 µl do DNA extraído, 12,5µM de cada “primer”, 10mM de dNTP mix, tampão de Taq 10x e 2,5 U de Taq DNA polimerase (0.4 U) para um volume final de 40 µl.

Foram usados “primers” gerais para identificação de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry11*, *cry17+27*, *cry19+39*, *cry24+40*, *cry29*, *cry30*, *cyt1* e *cyt2* e específicos para identificação de *cry4*, *cry9* e *cry10* (WERNECK, 1997; BRAVO et al.,1998; IBARRA et al., 2003).

Após amplificação, 18 µl de cada produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. As

estirpes *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (Btmed) e *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan* (Btjeg) foram utilizados como padrões.

6. Caracterização morfológica via Microscopia eletrônica de varredura

As estirpes foram crescidas em placas de Petri com meio NYSM em estufa incubadora a 30°C por 72h (até completa esporulação). Em seguida foram depositadas sobre suportes metálicos e cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando-se metalizador Emitech Modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

Discussão e resultados

1. Isolamento

A partir do isolamento efetuado para a obtenção de bacilos entomopatogênicos obtiveram-se 38 estirpes provenientes de 92 amostras de solo e 2 de insetos com elevada toxicidade contra os diferentes insetos testados (*Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatilis*, *Plutella xylostella*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*). Destas 33 foram identificadas como *B. thuringiensis* e 5 como *B. sphaericus*.

2. Avaliação da patogenicidade

Dentre as 38 estirpes de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* verificou-se que 14 apresentaram toxicidade para um ou mais insetos (tabela 1).

As estirpes de *B. thuringiensis* S2049, S2052, S2056 e S2057 apresentaram dupla atividade, sendo que S2049, S2052 e S2057 foram efetivas contra *A. gemmatilis* e *P. xylostella* e a estirpe S2056 foi efetiva contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. As estirpes S2042, S2043, S2045, S2048 e S2054 apresentaram toxicidade apenas para *P. xylostella*, as estirpes S2047 e S2069 apresentaram toxicidade somente para *A. gemmatilis*. Com relação a *S. frugiperda* as únicas

estirpes com toxicidade superior ou igual a 50% foram S2051, S2055 e S2054 (tabela 1).

Tabela 1 - Resposta de estirpes de *B. thuringiensis* em relação a patogenicidade contra as diferentes ordens e espécies de insetos: *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *P.xylostella*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

Insetos Estirpes	<i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i>	<i>Anticarsia</i> <i>gemmaalis</i>	<i>Plutella</i> <i>xylostella</i>	<i>Aedes</i> <i>aegypti</i>	<i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i>
S2042, S2048, S2054	-	-	50%	-	-
S2043, S2045	-	-	60%	-	-
S2044, S2046, S2050, S2053, S2055, S2056, S2058, S2059, S2060, S2061, S2062, S2063, S2065, S2066, S2067, S2068, S2070, S2071, S2072, S2073, S2074	-	-	-	-	-
S2047, S2069	-	60%	-	-	-
S2049	-	65%	65%	-	-
S2051	58,33%	-	-	-	-
S2052	-	60%	50%	-	-
S2055, S2064	50%	-	-	-	-
S2056	-	-	-	100%	100%
S2057	-	75%	65%	-	-

Nenhuma das cinco estirpes de *B. sphaericus* apresentou patogenicidade superior a 50% contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, logo não foram utilizadas para a continuação dos trabalhos.

3. Eletroforese de proteínas-cristal

Através da utilização desta técnica pode-se observar que as estirpes apresentaram perfis diferentes entre si, com exceção da S2056, cujo perfil foi semelhante ao do padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Esse perfil corresponde provavelmente as proteínas Cry4A e Cry4B, Cry11, Cyt1 e Cyt2, que são conhecidas

por desempenharem um papel fundamental no controle de mosquitos (Figuras 1 e 2) (BRAVO et al.,1998; IBARRA et al., 2003).

Os polipeptídios de 270 e 20 kDa encontrados são provavelmente de proteínas estruturais que são comuns a todos as estirpes, proteínas essas pertencentes à membrana, parede celular ou outra parte da bactéria.

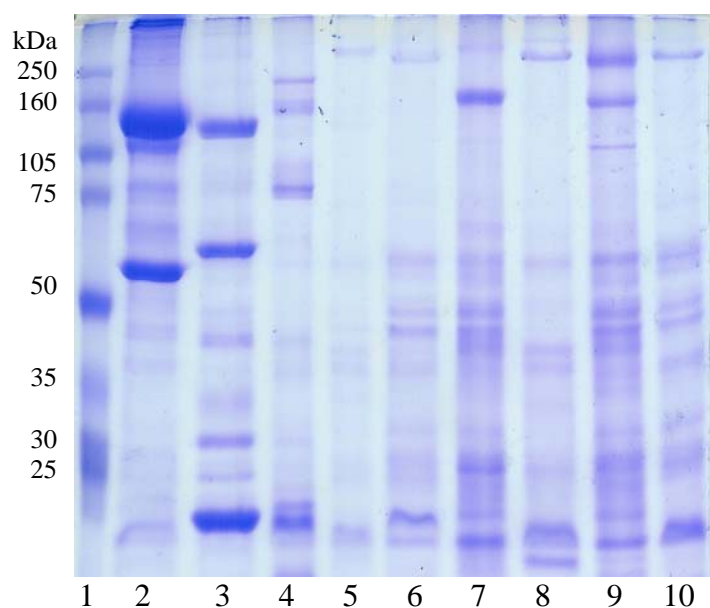


Figura 1: SDS-PAGE 10% do complexo esporo-cristal das estirpes de *B. thuringiensis*
1: Marcador Full Range Rainbow Protein molecular Weight; **2:** Btk; **3:** Bti; **4:** S2042;
5: S2043; **6:** S2045; **7:** S2047; **8:** S2048; **9:** S2049; **10:** S2051

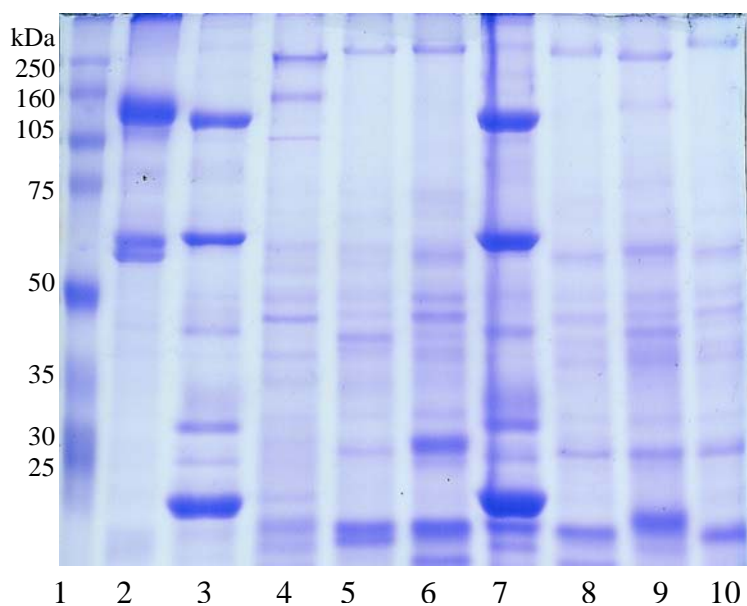


Figura 2: SDS-PAGE 10% do complexo esporo-cristal das estirpes de *B. thuringiensis*
1: Marcador Full Range Rainbow Protein molecular Weight; **2:** Btk; **3:** Bti; **4:** S2052;
5: S2054; **6:** S2055; **7:** S2056; **8:** S2057; **9:** S2064; **10:** S2069

4. Caracterização Molecular

Das estirpes testadas, somente a estirpe S2056 apresentou produtos de amplificação para os oligonucleotídeos testados. Nesta estirpe detectou-se a presença de seis genes *cyt1*, *cyt2*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10* e *cry11* (IBARRA et al., 2003) todos eles codificando proteínas tóxicas para insetos da ordem Diptera, o que confirma os resultados de patogenicidade e de eletroforese de proteínas para esta estirpe.

Apesar dessa estirpe apresentar um produto de PCR correspondente ao gene *cry10*, o mesmo não apresentou no gel de poliacrilamida um polipeptídeo com tamanho de aproximadamente 80 kDa (IBARRA et al., 2003). Isto se deve ao fato dessa proteína ter uma baixa expressão nesta estirpe não sendo produzida em quantidade suficiente para ser detectada neste tipo de técnica ou ainda, por este gene poder estar silencioso levando a ausência desse polipeptídeo.

As demais estirpes testadas não apresentaram produtos de amplificação para nenhum dos genes testados, sugerindo que estes possam possuir algum gene diferente dos já estudados até o momento.

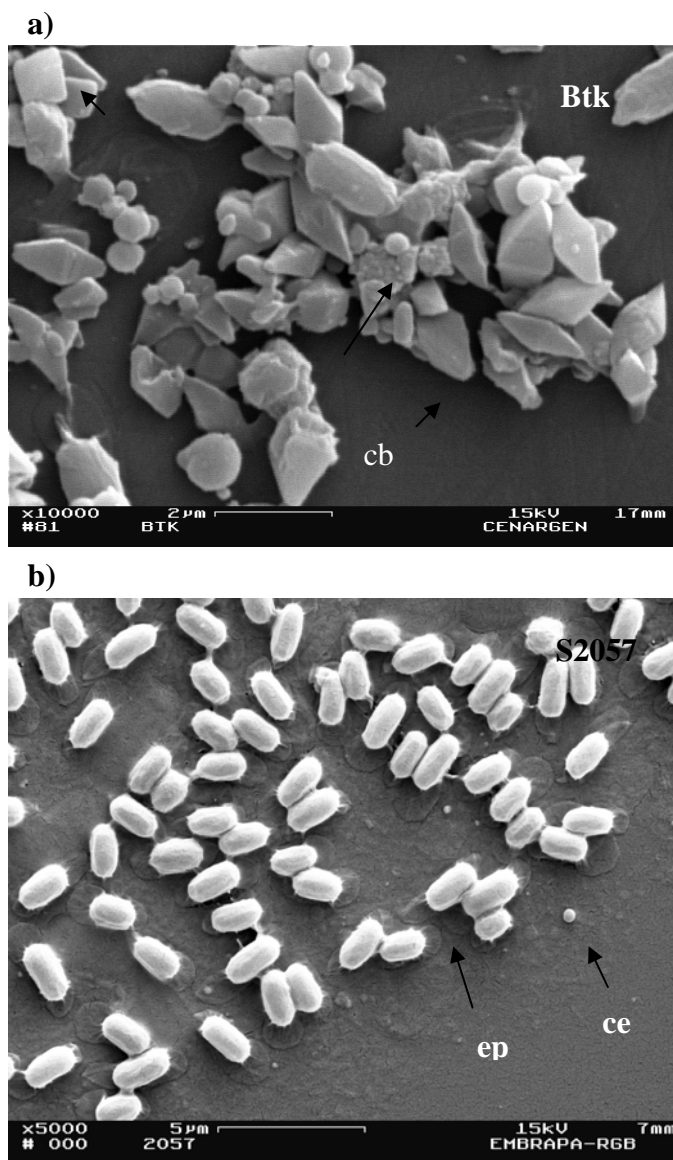
5. Microscopia eletrônica de varredura

As análises efetuadas em microscopia eletrônica mostraram que as estirpes com patogenicidade para ordem Lepidoptera não apresentaram cristais semelhantes ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, uma vez que no padrão Btk pode-se encontrar três tipos de cristal diferentes, esféricos, cubóides e bipiramidais (Figura 3a) e nas estirpes só observamos cristais esféricos com menor tamanho e diferentes do padrão (Figura 3b e 3c).

A estirpe S2056 apresentou também cristais esféricos e bipiramidais (Figura 4b) semelhantes ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Figura 4a). O cristal esférico é uma forma típica das proteínas Cry4, que apresentam atividade contra a ordem Diptera, logo é provável que a atividade da estirpe contra essa ordem esteja ligada à presença desses mesmos cristais. Os cristais bipiramidais observados são menores que os habitualmente encontrados, isto é, não são idênticos aos encontrados no *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Provavelmente essa forma

deve ser devida ao arranjo entre as proteínas, uma vez que a forma do cristal é um produto desse mesmo arranjo.

Estas formas observadas através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre a atividade inseticida dos cristais de uma estirpe (LERECLUS et al., 1993; TAYLOR et al., 1992; HABIB e ANDRADE, 1998).



c)

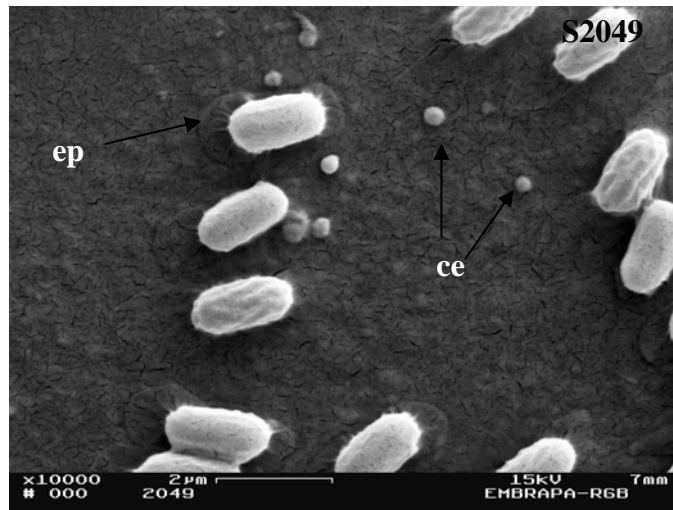
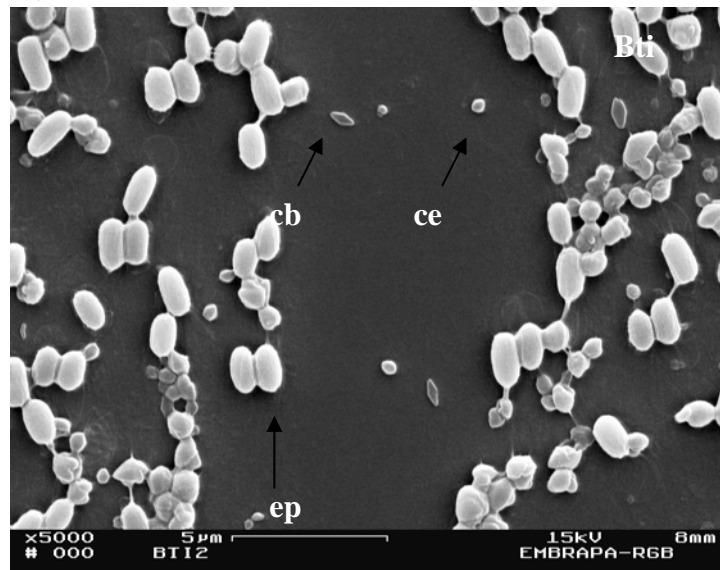


Figura 3: Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos - cristais das estirpes **a)**, padrão *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*; **b)** *Bacillus thuringiensis* S2057 e **c)** *Bacillus thuringiensis* S2049. cb- cristal bipiramidal, cc- cristal cubóide, ce- cristal esférico; ce- cristal esférico, ep- espora; ep- espora, ce- cristal esférico;

a)



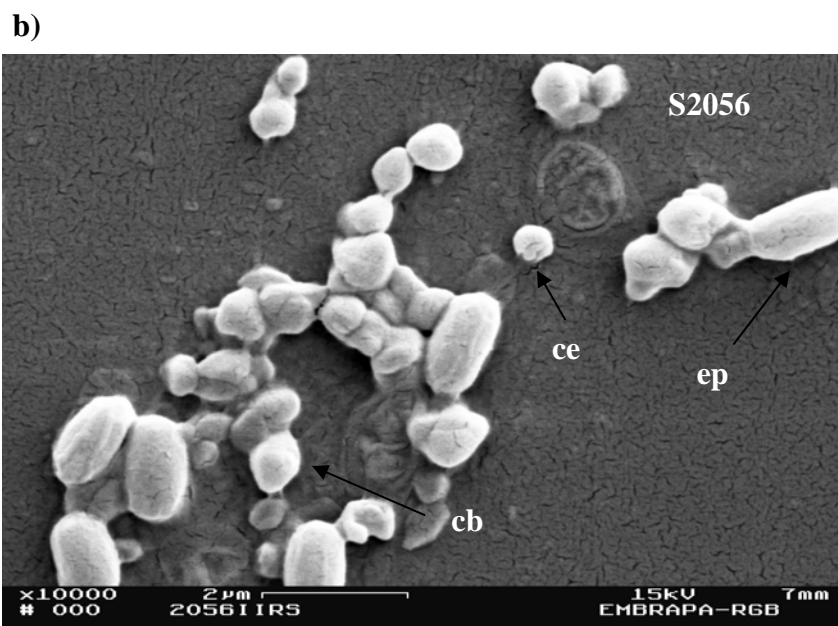


Figura 4: Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos - cristais das estirpes **a)** padrão *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; **b)** *Bacillus thuringiensis* S2056. cb- cristal bipiramidal, ce- cristal esférico; ep- espora; ce- cristal esférico, cb- cristal bipiramidal, ep- espora;

Conclusão

Foi possível identificar 14 estirpes patogênicas, 13 a insetos da ordem Lepidoptera e 1 a insetos da ordem Diptera. A estirpe S2056 patogênica aos insetos da ordem Diptera foi a mais eficiente de todos com uma mortalidade de 100% para *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. As estirpes testadas apresentaram um perfil protéico muito heterogêneo, unicamente S2056 apresentou perfil protéico semelhante ao *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* com as proteínas de 130, 70 e 30 kDa.

No produto de PCR, apenas na estirpe S2056 foi detectada a presença de genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, esta mesma estirpe apresentou cristais esféricos semelhantes ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, as restantes apresentaram unicamente cristais esféricos muito menores que o apresentado por *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Referência Bibliográfica

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p. 353-356, 1994.

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p. 3826-3831, 1995.

EDWARDS, D. L., PAYNE, J., SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application**, German, EP O 303 426 A2, 1988.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994, Montpellier, France. Proceedings... Montpellier, France: [s.n.], 1994. p.184.

IBARRA, J. E.; RINCÓN, M. C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENNINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, S.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LECADET, M. M.; CHAUF AUX, J.; RIBIER, J. E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 840-849, 1991.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: ENWISTLE, P.F. et al. (Ed.) ***Bacillus thuringiensis, An Environmental biopesticide: Theory and Practice***. West Sussex, England: John Wiley e Sons, 1993. p. 37-69.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001a. 65p.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; WERNECK, J. O. S.; DIAS, J. M. C. de S. **Métodos de coleta, isolamento, caracterização e armazenamento de estirpes de *Bacillus Sphaericus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001b. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 9).

NEIDE, E. Botanische Beschreibung einiger sporenbildenden Bacterien. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenk., Infektionskr. und Hygiene. Arbeitshygiene**, v. 12, n.1, 1904.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Metodologia de criação de insetos para a avaliação de agentes entomopatogênicos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SILVA, K. R.; MEIRELLES, M. N. S. L.; RABINOVITCH, L. Ultrastructural and entomoxic aspects of *Bacillus sphaericus* strains isolated from Brazilian soils. **Journal of Entomology**, Israel, Bet Dagan, v. 32, 1998. (in press)

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 5 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 10).

TAYLOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

WERNECK, J. O. S. **Caracterização Molecular parcial da estirpe S93 de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* efectiva contra *Spodoptera frugiperda***. 1997. 140p. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors**. [s.l.]: WHO, 1987. (Mimeograph Document, 87.3)

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v.3, 315-343. 1984.

YOUSTEN, A. A. Entomopathogenic bacteria for biological control. In: **Workshop Manual**. Campinas: Fundação André Tosello, 1991. 50p. (Mimeography Document)