



ISSN 1676 - 1340

Dezembro, 2003

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

## ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 41***

### **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**

Lilian Botelho Praça  
Andréa Cardoso Batista  
Erica Soares Martins  
Claúdia Brod Siqueira  
Daniel Gerheim Souza Dias  
Ana Cristina Menezes Mendes Gomes  
Rosana Falcão  
Rose Gomes Monnerat

Brasília, DF  
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão  
Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF  
CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372  
PABX: (61) 448-4600  
Fax: (61) 340-3624  
<http://www.cenargen.embrapa.br>  
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias  
Secretária-Executiva: Maria José de Oliveira Duarte  
Membros: Maurício Machaim Franco  
          Regina Maria Dechechi G. Carneiro  
          Luciano Lourenço Nass  
          Sueli Correa Marques de Mello  
          Vera Tavares Campos Carneiro  
Suplentes: Maria Alice Bianchi  
          Maria Fatima Batista  
Supervisor editorial: Maria José de Oliveira Duarte  
Revisor de texto: Maria José de Oliveira Duarte  
Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi  
Tratamento de ilustrações: Jorge Luiz de C. Vieira Júnior  
Edição eletrônica: Jorge Luiz de C. Vieira Júnior  
Fotos do trabalho:

**1ª edição**

1ª impressão (2003): tiragem 150 exemplares.

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

**Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem lepidoptera, coleoptera e diptera / Lilian Botelho Praça ... [et. al.] - Brasília : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.**

36 p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 41)

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. *Spodoptera frugiperda*. 3. *Anticarsia gemmatalis*. 4. *Anthonomus grandis*. 5. *Aedes aegypti*. 6. *Culex quinquefasciatus*. 7. Controle Biológico. I. Praça, Lilian Botelho. II. Série.

632.96 CDD - Ed. 21

© Embrapa 2003

## **Autores**

**Lilian Botelho Praça**

Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., M. Sc., Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Andréa Cardoso Batista**

Bióloga, estagiária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Erica Soares Martins**

Bióloga, mestranda, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Claúdia Brod Siqueira**

Eng<sup>a</sup>. Agr<sup>a</sup>., M. Sc., Técnica de Nível Superior, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Daniel Gerheim Souza Dias**

Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>., estagiário, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Bthek

**Ana Cristina Menezes Mendes Gomes**

Bióloga, Técnica de Nível Superior, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Rosana Falcão**

Bióloga, Técnica de Nível Superior, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Rose Gomes Monnerat**

Bióloga, PhD, Pesquisadora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	5
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	9
<b>Resultados</b> .....	9
<b>Discussão e Conclusão</b> .....	13
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	14

# Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

---

*Lilian Botelho Praça*

*Batista, A. C.*

*Martins, E. S.*

*Siqueira, C.*

*Dias, D. G. S.*

*Gomes, A. C.*

*Falcão, R.*

*Monnerat, R. G.*

## Resumo

A patogenicidade de trezentas estirpes de *Bacillus thuringiensis* foi avaliada contra larvas de *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*, *Anthonomus grandis*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, a fim de se determinar as estirpes com maior espectro de ação, ou seja, que fossem ao mesmo tempo efetivas contra os insetos acima citados. Foram selecionadas duas estirpes de *B. thuringiensis*, denominadas S234 e S997, que apresentaram atividade contra as três ordens de insetos. Além disso essas estirpes foram caracterizadas por métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares. As mesmas apresentaram duas proteínas principais de 130 e 65 kDa, produtos de PCR de tamanho esperado para a detecção de genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* e *cry2* e cristais bipiramidais, cubóides e redondos.

**Termos para indexação:** *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*, *Anthonomus grandis*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*.

- 8 | Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

## Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

---

### Abstract

Three hundred *Bacillus thuringiensis* strains had been tested against larvae of *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*, *Anthonomus grandis*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, in order to determine which ones could be effective against all the insects cited above at the same time. Two strains of *B. thuringiensis* had been selected, S234 and S997, which presented activity against three insect orders. The two stains had been characterized by morphological, biochemical and molecular methods. Both had presented two main proteins with 130 and 65 kDa, PCR products with expected sizes for the detection of the genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* and *cry2* and bipiramidal, squared and round crystals.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*, *Anthonomus grandis*, *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*

- 10 | Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

## Introdução

Cerca de 15% das safras de alimentos do mundo são perdidas devido ao ataque de insetos, cujo controle tem sido feito predominantemente com uso de inseticidas químicos, (Silva-Filho e Falco, 2000). O uso destes produtos altamente tóxicos e de amplo espectro de ação pode resultar em conseqüências graves ao homem e ao meio ambiente, além de causar o aparecimento de populações de insetos resistentes. Isto indica a necessidade de se reduzir o consumo destes produtos através do emprego de alternativas de controle mais seguras. Com isso os agentes de controle biológico, principalmente as bactérias aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável.

Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico, *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90-95% do mercado de bioinseticidas (Valadares-Inglis *et al.*, 1998). Esta bactéria é de ampla distribuição, podendo ser encontrada em praticamente todos os ambientes onde foi procurada. Além disso, produz diferentes proteínas tóxicas, denominadas cristal que são altamente específicas para insetos de diferentes ordens como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera e não afetam os homens, os animais e as plantas (De-Souza *et al.*, 1999).

Os cristais de *B. thuringiensis* ao serem ingeridos pelas larvas dos insetos susceptíveis, sofrem ação do pH intestinal e de proteases, que solubilizam o cristal e ativam as toxinas. Estas, por sua vez, se ligam a receptores localizados no tecido epitelial do intestino da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico da célula, que se intumescce e rompe, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto. Em conseqüência, a larva, para de se alimentar, entra em paralisia geral e morre por inanição ou septicemia. Não há atividade de *B. thuringiensis* sobre as fases de pupa e de adulto dos insetos (Monnerat e Bravo, 2000).

Laboratórios, em todo o mundo, buscam estirpes de *B. thuringiensis* produtoras de novas toxinas que poderão ser utilizadas como base para a produção de bioinseticidas ou como doadoras de genes para a síntese de plantas transgênicas resistentes a insetos.

- 12 Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

O objetivo deste trabalho foi selecionar entre 300 estirpes de *B. thuringiensis*, as que apresentassem maior espectro de ação, ou seja, fossem ao mesmo tempo efetivas contra insetos pertencentes a três diferentes ordens, Lepidoptera: (*Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*), Coleoptera: (*Anthonomus grandis*) e Diptera: (*Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*). As estirpes selecionadas foram caracterizadas através de métodos bioquímicos, moleculares e ultra-estruturais

## Material e Métodos

### Seleção das estirpes

#### Isolamento e caracterização morfológica

Para execução deste trabalho foram utilizadas 300 estirpes de *B. thuringiensis* depositadas no Banco de Germoplasma de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estas estirpes foram isoladas de amostras de solo e água das várias regiões do Brasil, de acordo com a metodologia descrita no Protocolo da Organização Mundial de Saúde de 1987 (World Health Organization, 1987; Monnerat *et al.*, 2001).

Inicialmente as estirpes foram submetidas a choque térmico (80°C por 12 minutos/ gelo por 5 minutos) e plaqueadas em meio NYSM (Yousten, 1984 com modificações na composição dos sais) adicionado de 100 mg/L de penicilina (Yousten, 1991). Após 48 horas as mesmas foram visualizadas em microscópio de contraste de fases para observação da presença de células vegetativas, esporos e cristais. Esse procedimento foi realizado para a confirmar a identificação das estirpes como *B. thuringiensis*.

#### Avaliação de patogenicidade

As estirpes foram testadas contra larvas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *A. grandis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Inicialmente foram feitos bioensaios seletivos para testar dentre 300 estirpes as que seriam mais eficazes contra os insetos alvo, ou seja, apresentariam atividade entomopatogênica. Do total de estirpes foram selecionadas as que apresentaram mortalidade igual ou superior a 50% para todos os insetos em questão. As estirpes selecionadas foram submetidas a bioensaios de diluições com a cultura bacteriana liofilizada para

determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população testada ( $CL_{50}$ ).

- Contra *Spodoptera frugiperda*

**A - Procedência dos insetos:** As larvas de *S. frugiperda* foram criadas, em laboratório, em dieta artificial elaborada à base de feijão, levedo de cerveja e germe de trigo, sob temperatura de  $25^{\circ} \text{C} \pm 2$ ,  $70\% \pm 10$  de umidade relativa e fotoperíodo de 14 horas (Schmidt *et al.*, 2001).

**B - Bioensaio seletivo:** Os bioensaios foram realizados espalhando-se  $35\mu\text{L}$  da cultura bacteriana crescida em meio NYSM por 48 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm na dieta distribuída previamente em placas de cultivo de células com 24 poços. Após a absorção da cultura bacteriana pela dieta, uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a bactéria, como testemunha. As placas foram devidamente fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas e colocadas na sala de bioensaio, regulada sob as mesmas condições de criação dos insetos. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram passadas para copinhos de plástico de 50 mL, contendo dieta livre do bacilo. No sétimo dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura. As larvas não foram colocadas em grupos devido ao seu hábito canibal (Monnerat *et al.*, 2001; Silva-Werneck e Monnerat, 2001).

**C - Bioensaio de dose ( $CL_{50}$ ):** As estirpes que causaram mortalidade a todos os insetos testados foram submetidas a bioensaio de dose para se determinar à concentração letal necessária para matar 50% das larvas testadas ( $CL_{50}$ ). Inicialmente, as estirpes cultivadas por 48 h em meio NYSM contendo basicamente esporos e cristais foram liofilizados. Para isso, estes cultivos foram centrifugados a  $12.800 \times g$  por 30 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  (centrífuga BR4i, Jouan), congelados "overnight" e liofilizados por 18 horas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock 18. Depois de liofilizado, os materiais foram pesados na quantidade de 1 mg e adicionou-se aos mesmos 1 mL de água destilada estéril. Após completa homogeneização em agitador tipo "vortex", obteve-se a suspensão I. A partir desta suspensão, obteve-se a suspensão II, pegando-se  $571,4 \mu\text{L}$  da suspensão I e adicionaram-se  $428,6 \mu\text{L}$  de água, obtendo-se uma concentração final de  $571,4 \mu\text{g/mL}$ . Daí por diante, preparou-se 1 mL de cada

- 14 | Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

uma das diluições conforme descrito na tabela 1, misturando um determinado volume da suspensão I que se apresenta na coluna 2 da tabela 1 com o volume de água correspondente na coluna 3 da mesma tabela. Em seguida, os bioensaios foram realizados espalhando-se 35 µl de cada uma das diluições em cada um dos 24 poços das placas de cultivo de células. A cultura bacteriana foi absorvida pela dieta e em seguida uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a bactéria como testemunha. As placas foram devidamente fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas e colocadas na sala de bioensaios nas mesmas condições de criação dos insetos. Foram testados dez diluições e um controle por bioensaio, com 24 indivíduos por tratamento. A primeira leitura foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram passadas para copinhos de plástico de 50 mL, contendo dieta livre do bacilo. No sétimo dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura.

Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (Finney, 1971) e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi determinada. *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (Btk) foi utilizado como padrão e controle positivo.

**Tabela 1.** Tabela de diluições e concentração final para realização de bioensaios contra *Spodoptera frugiperda*

Dose	Suspensão II ( $\mu\text{l}$ )	Água ( $\mu\text{l}$ )	ng/cm <sup>2</sup>
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	72	928	720
4	43,2	956,8	432
5	25,92	974,08	259,2
6	15,552	984,448	155,52
7	9,3312	990,6688	93,312
8	5,59872	994,4013	55,9872
9	3,359232	996,6408	33,59232
10	2,015539	997,9845	20,15539

**Contra *Anticarsia gemmatilis***

**A - Procedência dos insetos:** As larvas de *A. gemmatilis* foram criadas, em laboratório, em dieta artificial elaborada à base de feijão, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja e caseína, em sala de criação regulada sob as mesmas condições descritas para *S. frugiperda* (Schmidt *et al.*, 2001).

**B - Bioensaio seletivo:** Os bioensaios foram realizados espalhando-se 150  $\mu\text{l}$  da cultura bacteriana crescida em meio NYSM por 48 horas a 28°C e 200 rpm na dieta distribuída previamente em copos descartáveis de 50 mL. Após a absorção

da cultura bacteriana pela dieta, dez larvas de segundo estágio de *A. gemmatilis* foram colocadas em cada copinho, que em seguida foram fechados com tampas de acrílico e incubados nas mesmas condições de criação do inseto. Duas repetições foram feitas e um copo foi deixado sem a bactéria, como testemunha. 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 do bacilo. No quinto dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura (Monnerat *et al.*, 2001; Silva-Werneck e Monnerat, 2001).

**C - Bioensaio de dose (CL<sub>50</sub>):** Para se determinar a concentração letal (CL<sub>50</sub>) das estirpes selecionadas, o procedimento utilizado foi idêntico ao descrito para *S. frugiperda*, com exceção da última leitura do bioensaio que foi feita no quinto dia. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (Finney, 1971) e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi determinada. *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (Btk) foi utilizado como padrão e controle positivo.

#### **Contra *Anthonomus grandis***

**A - Procedência dos insetos:** As larvas de *A. grandis* foram criadas, em laboratório, em dieta artificial elaborada à base de levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, pharmanédia (proteína de algodão) e glicose, em insetário regulado a temperatura de 25°C ± 2, umidade relativa de 65% ± 5 e fotoperíodo de 14 horas (Monnerat *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001).

**B - Bioensaio seletivo:** Os bioensaios foram realizados incorporando-se 10 mL da cultura bacteriana crescida em meio NYSM por 48 horas a 28°C e 200 rpm em 35 mL de dieta artificial à temperatura de aproximadamente 50°C. Em seguida, a dieta foi vertida em placas de petri. Após solidificação, foram feitos 15 furos e colocadas larvas neonatas (uma por furo). Foram feitas quatro repetições e uma placa foi deixada sem a bactéria, como controle. A leitura foi feita sete dias após o início do bioensaio (Monnerat *et al.*, 2000).

**C - Bioensaio de dose:** Para se determinar a concentração letal (CL<sub>50</sub>), as estirpes selecionadas foram crescidas e liofilizadas nas mesmas condições descritas para *S. frugiperda*. Em seguida, os materiais liofilizados foram pesados na quantidade de 1,5 mg e adicionados 15 mL de água destilada estéril. Após completa homogeneização em agitador tipo "vortex", obteve-se a suspensão I a uma concentração final de 0,1 mg/mL. A partir desta suspensão foram feitas diluições

seriadas decimais. Preparou-se dieta artificial para *A. grandis*, acondicionou-se em béqueres e autoclavou-se. As diluições seriadas foram incorporadas em 35 mL de dieta artificial à temperatura de aproximadamente 50°C e o total foi vertido em placas de petri, em capela de fluxo laminar. Após solidificação da dieta, foram feitos 15 furos e colocadas larvas neonatas (uma por furo). Foram feitas 4 repetições e uma placa foi deixada sem a bactéria, como controle. Seis concentrações foram testadas e um controle por bioensaio, com 60 indivíduos por tratamento. Os bioensaios foram mantidos em BOD 10/14 fotoperíodo e a temperatura de 26°C. A leitura foi feita sete dias após o início do bioensaio. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (Finney, 1971) e a concentração letal ( $CL_{50}$ ) foi determinada. *B. thuringiensis* subespécie *tenebrionis* (Btt) foi utilizado como padrão e controle positivo.

#### **Contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti***

**A - Procedência dos insetos:** As larvas de *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* foram criadas, em laboratório regulado a temperatura de 25°C ± 2, umidade relativa de 70% ± 10 e fotoperíodo de 14 horas. A alimentação das larvas foi feita com biscoitos de ração de gato (Schmidt *et al.*, 2001).

**B - Bioensaio seletivo:** O procedimento para a realização do bioensaio seletivo consistiu em colocar 1 mL da cultura bacteriana crescida em meio NYSM por 48 horas a 28°C e 200 rpm em dois copos descartáveis de 200 mL contendo 100 mL de água destilada e 25 larvas de segundo estágio das duas espécies de mosquitos. Foram feitas duas repetições e um copo sem a cultura foi deixado como testemunha. Após 24 e 48 horas, fez-se a leitura do número de sobreviventes, determinando-se quais as estirpes foram tóxicas (Monnerat *et al.*, 2001; Silva-Werneck e Monnerat, 2001).

**C - Bioensaio de dose ( $CL_{50}$ ):** Para se determinar a concentração letal ( $CL_{50}$ ), as estirpes selecionadas foram crescidas e liofilizadas nas mesmas condições descritas para *S. frugiperda*. Em seguida, os materiais liofilizados foram pesados na quantidade de 5 mg em tubos Eppendorf e adicionados aos mesmos 1 mL de água destilada estéril, obtendo-se após completa homogeneização em agitador tipo "vortex", a suspensão I. Depois se pegou uma quantidade de 400 µL da suspensão e adicionou-se a 3,6 mL de água destilada estéril, obtendo-se a suspensão II a uma concentração final de 500µg/mL. A partir da suspensão II foram feitas diluições seriadas decimais e foram utilizadas cinco concentrações.

Prepararam-se os copos com 100 mL de água destilada e colocou-se 1 mL de cada uma das diluições e 25 larvas de segundo estágio de cada uma das espécies de mosquito. Foram realizadas três repetições e, um copo sem a cultura foi deixado como testemunha. Os bioensaios foram mantidos em sala com umidade de 70% e temperatura de aproximadamente 25 °C. Após 48 horas do início do teste, foi efetuada a contagem do número de larvas mortas. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (Finney, 1971) e a concentração letal (CL<sub>50</sub>) foi determinada. *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* IPS-82 (Bti) foi utilizado como padrão e controle positivo.

#### **Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%)**

Este procedimento foi realizado com as estirpes selecionadas nos bioensaios seletivos, tóxicas a todos os insetos testados.

#### **Preparação das misturas esporos-cristais**

As estirpes bacterianas foram crescidas em meio NYSM por 72 horas em incubador rotativo a 28°C e 200 rpm e, em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet *et al.* (1991). As culturas bacterianas foram transferidas na quantidade de 1,5 mL para tubos Eppendorf de 2 mL, previamente autoclavado, e centrifugadas a 12.800 x g, em microcentrífuga Eppendorf, por 20 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCl 0,5 M por 20 minutos. Descartou-se o NaCl 0,5M foi descartado e secaram-se as paredes do tubo eppendorf com papel de filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF a 1mM e centrifugados a 12.800 x g por 20 minutos. Descartou-se o PMSF 1mM e os sedimentos foram ressuspensos em 500µL de PMSF 1 mM e armazenados a -20°C.

#### **Análise das proteínas em gel de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)**

As preparações de esporos-cristais das estirpes foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS a 10% (SDS-PAGE), conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Alíquotas de 20 µL das preparações de esporos-cristais foram diluídas em tampão de amostra de proteína 5X (1,5M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol, SDS, 2b-Mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Usaram-se 10 µL

de marcador de proteína de alto e baixo peso molecular (Bench Mark™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen). 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 (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por uma hora e descorado em solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) por 1-2 horas até visualização dos perfis protéicos das estirpes. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi utilizado com padrão.

### Caracterização Molecular

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi usada para identificação dos genes *cry* presentes no DNA total das estirpes tóxicas a todos os insetos testados. Todas as reações se processaram em tubos de polipropileno de 0,2 mL, em um termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100™).

O DNA total dos isolados foi extraído segundo metodologia descrita por Bravo *et al.* (1998). As estirpes foram cultivadas em meio agar NYSM a 30°C por 16 horas. Uma alçada de células foi transferida para 100 µL de água destilada, congelada a – 20°C e, em seguida, fervida por 10 minutos para lisar as células. Depois, centrifugou-se o material rapidamente a 12.800 x g por 30 segundos, em microcentrifuga Eppendorf. Transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante sem o pellet para outro tubo Eppendorf e preparou-se, então, a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a realização das PCRs, 15 µL do sobrenadante da cultura foram transferidos para um tubo contendo 12,5 µM de cada “primer”, 100mM de dNTP mix, tampão de Taq 1x e 2,5 U de Taq DNA polimerase (5.0 U) em um volume total de 50 µL.

Foram usados “primers” gerais para identificação de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cry21* e *cyt* e específicos para identificação de *cry1*, *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry13*.

Para identificação de genes *cry1* nos isolados foram usados os pares de “primers” gerais *gral-cry1* (Bravo *et al.*, 1998). A amplificação foi processada em termociclador de DNA e as condições das PCRs foram as seguintes: 94°C por

um minuto de desnaturação, 52°C por um minuto de anelamento, 72°C por um minuto de extensão e uma extensão extra de 72°C por cinco minutos num total de 30 ciclos. Foram usados também pares de “primers” para identificação de genes *cry9*, *cry11* e *cyt* (spe-cry9A, spe-cry9B, spe-cry9C e gerais gral-cry11 e gral-cyt). A amplificação foi processada em termociclador e as condições das PCRs com estes outros “primers” foram similares, exceto que a temperatura de anelamento foi de 51°C.

Para a identificação de genes *cry8* foram usados pares de “primers” gerais e específicos (gral-cry8, spe-cry8A, spe-cry8B, spe-cry8C) e para a identificação de genes *cry13*, *cry5*, *cry12*, *cry14* e *cry21* foram usados “primers” específicos para *cry13* e gerais para os outros (spe-cry13 e gral-nem). As condições de PCR foram às mesmas descritas para o gene *cry1*, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 49°C para o *cry8* geral e específicos e de 50°C para o *cry13* específico e gral-nem.

Para identificação de genes da subclasse *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1D*) foram usados os pares de “primers” específicos (Ceron *et al.*, 1994) CJ1/CJ2, CJ3/CJ2, CJ4/CJ5, CJ6/CJ7, CJ8/CJ9, CJ10/CJ11 e CJ12/CJ13 e amplificações foram processadas em termociclador de DNA e as condições das PCRs foram as seguintes: 92°C por um minuto de desnaturação, 53°C por um minuto de anelamento, 72°C por um minuto de extensão e uma extensão extra a 72°C por 10 minutos num total de 25 ciclos.

Para genes *cry1E*, *cry1F* e *cry1G* foram usados os pares de “primers” específicos CJ14/CJ15, CJ16/CJ17 e CJ18/CJ19 (Ceron *et al.*, 1995). As amplificações foram processadas em termociclador de DNA e as condições das PCRs foram as seguintes: 95°C por um minuto de desnaturação, 48°C por um minuto de anelamento, 72°C por um minuto de extensão e uma extensão final de a 72°C por 5 minutos num total de 30 ciclos.

Para a identificação de genes *cry3* foram usados os pares de “primers” CJIII20/CJIII21 e para a identificação do *cry3* específico foram usados os pares de “primers” CJIIIcte22/CJIIIA23, CJIIIcte22/CJIIIB24, CJIIIcte22/CJIIIC25, CJIIIcte22/CJIIICg26, CJIIIcte22/CJIIID27 e CJIIIE28/CJIIIE29 (Ceron *et al.*, 1995). As condições de PCR foram às mesmas descritas no parágrafo anterior.

Finalmente, para identificação de genes *cry4* foram feitas PCRs com os pares de

primers gerais Dip1A/Dip1B e Dip2A/Dip2B (Carozzi *et al.*, 1991); e as condições das PCRs foram as seguintes: 94°C por 45 segundos de desnaturação, 45°C por 45 segundo de anelamento, 72°C por um minuto de extensão num total de 35 ciclos.

Uma alíquota de 24 µL de cada produto de PCR foi misturada com tampão de amostra 6X e aplicada em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi processada em Tampão TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico, EDTA 0,5M – pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio diluído em água na concentração de 1mg/mL por 20 minutos, e descorado em água destilada por 15 minutos. O gel foi observado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador modelo Eagle Eye (Stratagene). 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.

#### **Caracterização ultra-estrutural**

##### **Purificação de cristais para microscopia eletrônica**

Os isolados foram crescidos em meio NYSM em incubador rotativo a 200 rpm, a 30°C, por 48 a 72 horas (até completa esporulação). Para purificação de cristais, foi utilizado o protocolo descrito por Thomas e Ellar (1983). Duzentos mL dos isolados selecionados e do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foram transferidos para tubo Falcon previamente autoclavado e esterilizado e centrifugados a 12.800 x g, por 30 minutos, a 5°C (Centrífuga BR4i – Jouan ). O sobrenadante foi coletado e observado para verificar a presença de cristais. Caso se visualizasse cristais, guardava-se os mesmos. Os sedimentos foram lavados por três vezes em 10 mL de uma solução contendo PMSF 0,1 mM (Phenylmethyl Sufonyl fluoride) e triton 0,01% e ressuspensos em 3 mL de solução TTN (Triton 1%, Tris HCl 0,05M pH 8 e NaCl 0,01M). Em seguida, as suspensões foram sonicadas a 3 pulsos de 1 minuto, com intervalos de 1 minuto entre cada pulso, para separar os esporos dos cristais. Durante esta etapa, as amostras foram mantidas no gelo. Preparou-se o gradiente de sacarose em um tubo de 30 mL Ultraclear (Beckman<sup>®</sup>), nas seguintes concentrações: 84%, 79%, 72% e 69%, e sobre as soluções de sacarose foram acrescentadas às suspensões de esporos-cristais. Então, o gradiente foi centrifugado a 47.800 x g por 30 minutos a 15°C (Ultracentrífuga Sorvall, modelo Combi-plus, rotor

AH 628). Após centrifugação, as bandas contendo os cristais foram recuperadas, colocando-se em igual volume de água, e centrifugadas a 12.800 x g por dez minutos, a 4°C (Centrífuga BR4i, Jouan). Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de solução triton 0,01%. Observou-se ao microscópio de contraste de fases. Depois, lavou-se novamente por 2 vezes com a mesma solução de triton. Os sedimentos finais foram ressuspensos em 500 µL de solução de PMSF 0,1 mM. As amostras foram analisadas em gel de proteínas para controle da pureza das mesmas e depois armazenadas a – 20°C.

#### **Microscopia Eletrônica de varredura**

As suspensões de cristais das estirpes foram liofilizadas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock 18. Depois de liofilizadas, as amostras 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.

## **Resultados e Discussão**

#### **Seleção das estirpes**

Todas as 300 estirpes foram confirmadas como pertencendo a espécie *B. thuringiensis*. Dentre estas, 16 estirpes apresentaram toxicidade para um ou mais insetos (Tabela 2). As estirpes S541, S988, S78, S1115, S252, S710, S1015, S1063 apresentaram dupla atividade, sendo que S541 e S988 foram efetivas contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*; as estirpes S78 e S1115 foram efetivas contra *C. quinquefasciatus* e *A. grandis* e as estirpes S252, S710, S1015 e S1063 foram efetivas contra *A. gemmatalis* e *A. grandis*. As estirpes S725, S766, S991 e S1212 apresentaram toxicidade apenas para *A. gemmatalis* e as estirpes S984 e S1035 apresentaram toxicidade apenas para *C. quinquefasciatus*. Por último, as estirpes S234 e S997 apresentaram atividade contra todas as cinco espécies de insetos testadas e foram selecionadas para a continuação dos trabalhos (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação de algumas estirpes de *B. thuringiensis* em relação a patogenicidade contra as diferentes ordens e espécies de insetos: *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *A. grandis*, *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

Ordens  Insetos/ Estirpes	Patogenicidade				
	Lepidoptera		Coleoptera	Diptera	
	<i>S. frugiperda</i> / <i>A. gemmatalis</i>		<i>A. grandis</i>	<i>C. quinquefasciatus</i> / <i>A. aegypti</i>	
S78, S1115	-	-	+	-	+
S234, S997	+	+	+	+	+
S252, S710, S1015, S1063	-	+	+	-	-
S541, S988	-	-	-	+	+
S725, S766, S991, S1212	-	+	-	-	-
S984, S1035	-	-	-	-	+

(+) patogenicidade positiva, (-) patogenicidade negativa

Dentre as estirpes selecionadas, a mais efetiva contra *S. frugiperda* foi a S234 que apresentou  $CL_{50}$  três vezes menor que o do padrão utilizado *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Já a estirpe S997 se mostrou tão patogênica quanto o padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, apresentando valores de  $CL_{50}$  estatisticamente semelhantes (Tabela 3).

Para *A. gemmatalis*, as estirpes se mostraram semelhantes ao padrão HD-1 (Tabela 3). Os resultados de superioridade ou semelhança de estirpes contra lepidópteros com o padrão HD-1, já haviam sido relatados por De Souza *et al.* (1999).

- 24 Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera

**Tabela 3.** CL<sub>50</sub> das estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de 2º instar de *S. frugiperda* e de *A. gemmatalis*

Estirpes	<i>S. frugiperda</i> CL <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )	Homologia	<i>A. gemmatalis</i> CL <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )	Homologia
HD-1	285,22 (201,53 - 418,73)*	B	15,16 (5,95 - 23,06)	A
S234	90,24 (39,32 - 144,30)	A	17,22 (7,74 - 42,16)	A
S997	525,70 (387,22 - 699,79)	B	21,49 (13,06 - 39,39)	A

(\*) Números em parêntesis refere-se ao Intervalo de confiança a 95%

Com relação ao coleóptero *A. grandis*, as estirpes S234 e S997 se mostraram mais efetivas, uma vez que apresentaram CL<sub>50</sub> inferior ao padrão utilizado *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Tabela 4). A diferença dos valores absolutos da CL<sub>50</sub> da estirpe S997 chegou a ser mais de 300 vezes inferior àquela obtida com o padrão *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt) (Tabela 4). Ainda que as CL<sub>50</sub> obtidas com os testes de toxicidade das estirpes S234 e S997 tenham sido diferentes, não houve diferenças estatísticas entre a atividade dos dois isolados (Tabela 4).

**Tabela 4.** CL<sub>50</sub> das estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *A. grandis*

Estirpes	CL <sub>50</sub> (µg/mL)	Intervalo de confiança 95%	Homologia
Btt	537.10 <sup>-6</sup>	81 - 26.287,2.10 <sup>-6</sup>	B
S234	10,4.10 <sup>-6</sup>	4,0 - 21,9.10 <sup>-6</sup>	A
S997	1,8.10 <sup>-6</sup>	0,4 - 6,7.10 <sup>-6</sup>	A

Apesar das estirpes S234 e S997 terem apresentado toxicidade nos bioensaios seletivos contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, seus valores de  $CL_{50}$  foram semelhantes entre si e muitas vezes superiores ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS-82 (Bti), sendo, portanto menos efetivas (Tabela 5). Foi relatado que não se tem notícias de estirpes de *B. thuringiensis* mais eficazes que Bti para o controle de larvas de mosquitos (Dias *et al.*, 2002). Os resultados obtidos nestes testes demonstram mais uma vez a dificuldade de se encontrar estirpes com atividade superior ao padrão Bti.

**Tabela 5.**  $CL_{50}$  das estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas de 2º instar de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

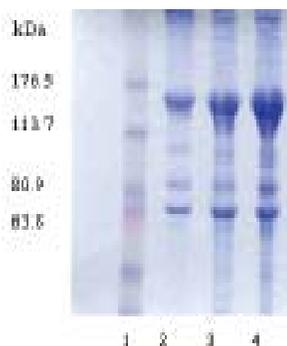
Estirpes	<i>A. aegypti</i> $CL_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Homologia	<i>C. quinquefasciatus</i> $CL_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Homologia
IPS-82	0,0016 (0,0012 – 0,0022)*	A	0,0096 (0,0074 – 0,0130)	A
S234	4,92 (2,33 – 17,97)	B	7,26 (4,86 -15,90)	B
S997	4,49 (2,06 – 16,97)	B	31,03 (9,45 -990,68)	B

(\*) Números em parêntesis refere-se ao Intervalo de confiança a 95%

#### Eletrforese de proteínas-cristal

A análise da eletrforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da mistura de esporos e cristais das estirpes S234 e S997 mostrou que as preparações são compostas de dois polipeptídios principais de aproximadamente de 130 e 65 kDa, semelhantes entre si e que correspondem ao perfil do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Höfte *et al.*, 1988; Lereclus *et al.*, 1993) (Figura 15). É importante observar que o perfil de 130 kDa é considerado padrão característico de estirpes ativas contra lepidópteros e coleópteros e o perfil de 65 kDa é característico de estirpes ativas contra lepidópteros e dípteros,

corroborando com os resultados de bioensaios apresentados pelas estirpes S234 e S997.



**Fig. 15.** SDS-PAGE 10% do complexo espora-cristal das estirpes de *B. thuringiensis* S234 e S997. 1: Marcador Invitrogen Bench Marker™ Prestained Protein Ladder; 2: HD-1; 3: S234 e 4: S 997

### Caracterização Molecular

Através da PCR, usando DNA total das estirpes S234 e S997 e primers específicos para a detecção de genes da classe *cry1*, foram obtidos fragmentos de tamanhos esperados. A PCR com os primers CJ1/CJ2 resultou num fragmento de 246 pb, indicando a presença do gene *cry1Aa* (Figura 16). A PCR com os primers CJ4 e CJ5 resultou num fragmento de 216 pb, obtido quando o gene *cry1Ab* está presente (Figura 17). A PCR com os primers CJ6 e CJ7 resultou num fragmento de 180 pb, indicando a presença de *cry1Ac* (Figura 18) e com os primers CJ8 e CJ9 um fragmento de 367 pb indicando a presença do gene *cry1B* (Figura 19). As duas estirpes S234 e S997 e o padrão HD-1 apresentaram os mesmos genes.

Quando o DNA das estirpes S234 e S997 foi amplificado com primer geral *cry2* (Bravo *et al.*, in press), foi obtido um produto de 526 pb evidenciando assim a presença do gene *cry2* (Figura 20). A PCR do padrão HD-1 também apresentou o mesmo fragmento.

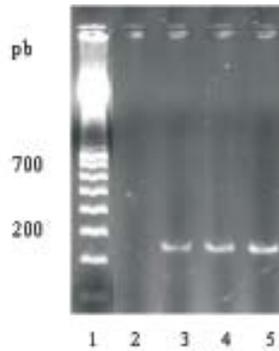
Os outros primers utilizados não produziram fragmentos de tamanho esperado, indicando que as estirpes não possuem genes *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*,

*cry9*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry21* e *cyt*. As PCRs realizadas com as estirpes padrão Bti, Bt jeg, Bt med e Btt apresentaram fragmentos de tamanho esperado para os genes *cry4*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, *cry3*, *cry7* e *cry8*, respectivamente.

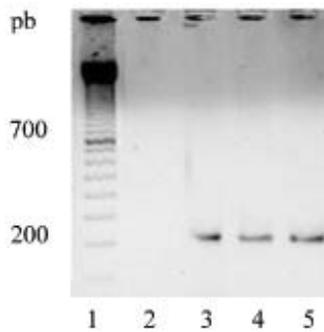
As estirpes S234 e S997 apresentaram cada uma cinco genes, sendo que quatro deles pertencem ao grupo *cry1*, demonstrando mais uma vez que é freqüente a aparição de genes *cry1* nas coleções de *B. thuringiensis* estudadas (Ben-Dov *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998). Além disso, Bourgouin *et al.* (1988) observaram que dentro de diversas estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene, já outras estirpes apresentam 5 genes diferentes, como é o caso da subespécie *azawai* HD-137, estando de conformidade com o resultado apresentado pelas estirpes analisadas neste trabalho.

Provavelmente a mortalidade causada pelas estirpes S234 e S997 aos insetos *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *A. grandis* se deva ao gene *cry1B*, uma vez que Bradley *et al.* (1995) observaram a atividade dupla da proteína Cry1Ba contra lepidópteros e coleópteros. Van Rie *et al.* (1990) afirmaram que espécies de *Spodoptera* são tolerantes a proteínas Cry1Aa e Cry1Ab. Com relação *A. gemmatalis*, a atividade entomopatogênica das estirpes S234 e S997 pode ser em função da presença dos genes *cry1A*, como também pela presença do gene *cry2*, que são ativos contra insetos da ordem Lepidoptera (Dankocsik *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991). No entanto, a baixa atividade das estirpes S234 e S997 contra os dípteros *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* se deve provavelmente à presença do gene *cry2*, já que este gene apresenta baixa atividade contra esta ordem de insetos (Dankocsik *et al.*, 1990; Wu *et al.*, 1991).

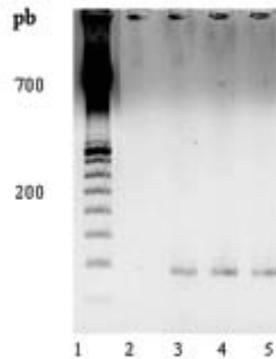
É importante salientar que a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ser devido a interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos, existindo dificuldade para se estabelecer à contribuição de cada toxina, devido à variação nos resultados de toxicidade de proteínas individuais. Portanto, se torna necessário realizar e analisar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade (Lee *et al.*, 1996; Schnepf *et al.*, 1998).



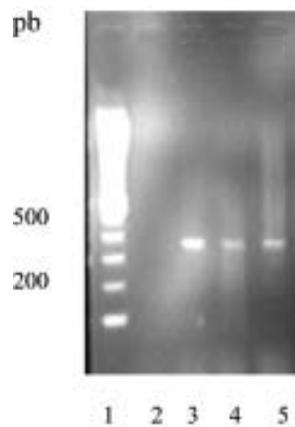
**Fig. 16.** Produtos de PCR obtidos com "primers" específicos para genes tipo *cry1Aa*, através da utilização dos "primers" CJ1/CJ2 e DNA das estirpes HD-1, S234 e S997. 1- Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S234 e 5 - S997



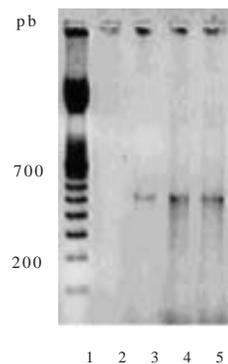
**Fig. 17:** Produtos de PCR obtidos com "primers" específicos para genes tipo *cry1Ab*, através da utilização dos "primers" CJ4/CJ5 e DNA das estirpes HD-1, S234 e S997. 1- Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2 - Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S234 e 5 - S997



**Fig. 18.** Produtos de PCR obtidos com “primers” específicos para genes tipo *cry1Ac*, através da utilização dos “primers” CJ6/CJ7 e DNA das estirpes HD-1, S234 e S997. 1- Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S234 e 5 - S997



**Fig. 19.** Produtos de PCR obtidos com “primers” específicos para genes tipo *cry1B*, através da utilização dos “primers” CJ8/CJ9 e DNA das estirpes HD-1, S234 e S997. 1- Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3- HD-1, 4 - S234 e 5 - S997

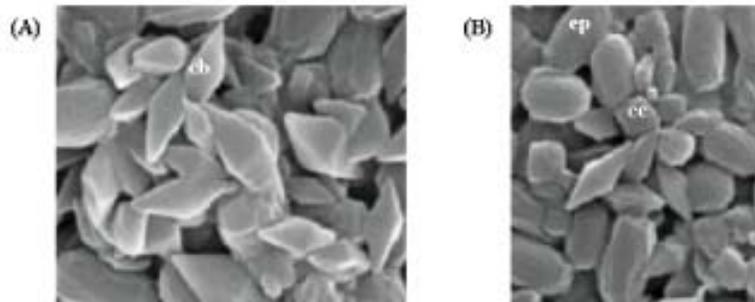


**Fig. 20.** Produtos de PCR obtidos com “primers” específicos para genes tipo *cry2*, através da utilização dos “pri,mers” *Cry2(d)/Cry2(r)* e DNA das estirpes HD-1, S234 e S997. 1- Marcador de massa molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 – HD-1, 4 – S234 e 5 – S997

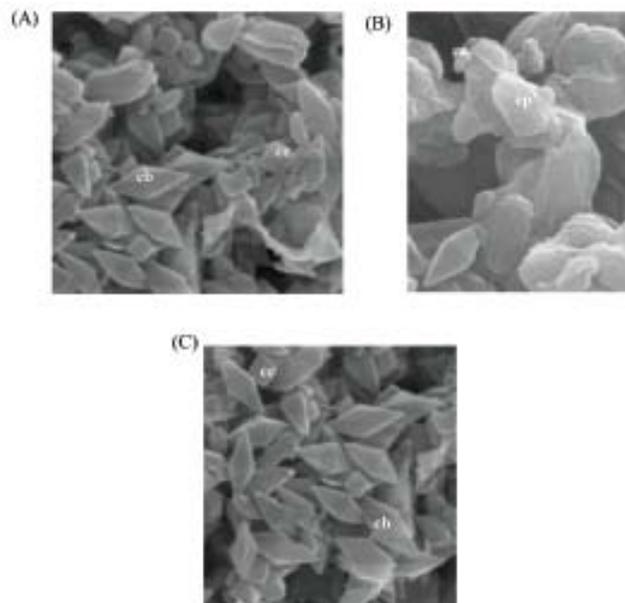
### Microscopia eletrônica

As amostras de cristais purificados em gradiente de sacarose das estirpes S234 e S997 mostraram, através da microscopia eletrônica de varredura que ambas as estirpes possuem cristais bipiramidais, cubóides e esféricos (Figuras 21 e 22). Estas formas vistas através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre atividade inseticida dos cristais de uma estirpe (Lereclus *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1992; Habib e Andrade, 1998).

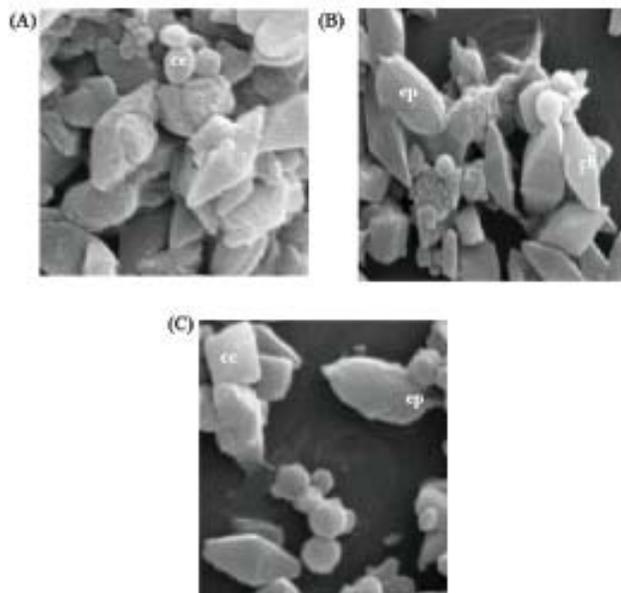
Cristais bipiramidais podem estar associados às proteínas do tipo *Cry1*, que apresentam atividade contra insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera e os cristais cubóides podem estar associados com as proteínas do tipo *Cry2* que apresentam atividade contra insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. A estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 utilizada como padrão apresentou os mesmos cristais que as estirpes S234 e S997, confirmando o observado por Höfte *et al* (1988) (Figura 23).



**Fig. 21.** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S234. (A) cb-cristal bipiramidal (aumento de 20.000 x); (B) ep-esporo, cc-cristal cubóide (aumento 15.000 x).



**Fig. 22.** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe de *Bacillus thuringiensis* S997. (A) cb-cristal bipiramidal, ep-esporo, cc-cristal cubóide; (B) ce-cristal esférico, ep-esporo; (C) cc-cristal cubóide, cb-cristal bipiramidal (aumento de 10.000 x).



**Fig. 23.** Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais da estirpe de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. (A) ce-cristal esférico; (B) cb – cristal bipiramidal, ep-esporo; (C) cc-cristal cubóide, ep-esporo (aumento de 10.000x)

## Conclusões e Perspectivas

Este trabalho possibilitou a identificação de duas estirpes patogênicas a três ordens de insetos, fato este que até o momento não havia sido relatado. A estirpe S234 foi mais efetiva contra *Spodoptera frugiperda*, a lagarta do cartucho do milho. Para *A. gemmatalis*, as estirpes se mostraram semelhantes ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Com relação ao coleóptero *A. grandis*, as estirpes S234 e S997 foram semelhantes entre si e superiores ao padrão. As estirpes S234 e S997 apresentaram valores de CL50 semelhantes entre si para os dípteros *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, entretanto nenhuma delas foi mais tóxica que o padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. As estirpes testadas apresentaram duas proteínas principais de 130 e 65 kDa e produtos de PCR para a detecção de genes *cry1* e *cry2*. Novos estudos deverão ser conduzidos para se conhecer e confirmar quais as toxinas responsáveis pela toxicidade a cada um dos insetos e se elas agem individual ou conjuntamente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.;  
MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.;  
BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-  
group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microb.** 63: 4883-4890, 1997.
- BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G.  
*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton  
larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **J. Bacter.**  
170:3575-3583, 1988.
- BRADLEY, D.; HARKEY, M.A.; KIM, M.-K.; BREVER, D.; BAUER, L.S. The  
insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* has dual  
specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **J. Invert. Pathology.** 65: 162-  
173, 1995.
- 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. **Appl. Environ. Microb.** 4965-4972,  
1998.
- CAROZZI, N.B.; KRAMER, W.G.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G.  
Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase  
chain reaction product profiles. **Appl. Environ. Microb.**, v.57, p.3057-3061,  
1991.
- 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*. **Appl. Environ. Microb.**, 60, 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. **Appl. Environ. Microb.**, 61, 3826-3831, 1995.

DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W.P.; IANY, C.S. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Mol. Microbiol.** 4(12): 2087-2094, 1990.

DE-SOUZA, M.T.; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell.** 23(1): 43-49, 1999.

DIAS, G. S. D.; SILVA, S. F. da.; MARTINS, E. S.; S, C. M. S.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; DIAS, J. M. C. de S. D.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra mosquitos.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 23 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 30), 2002.

FINNEY, D.J. **Probit analysis.** Cambridge University Press, Cambridge, England, 1971.

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

HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN HOUTVEN, A.; VANDERBRUGGEN, H.; VAECK, M. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 2010-2017, 1988.

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. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.58, p. 840-849, 1991.

LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.A.; DEAN, D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:583-586, 1996.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: ***Bacillus thuringiensis, An Environmental biopesticide: Theory and Practice***. Enwistle P.F., Cory J.S., Bailey M.J., and Higgs S. Eds., John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England, pp. 37-69, 1993.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: **Controle Biológico**, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, Vol. 3, p.163-200, 2000.

MONNERAT, R.G.. DIAS, S.C.. OLIVEIRA NETO, O.B.de; NOBRE, S.D.; SILVA-WERNECK, J.O.; SÁ, M.F.G. de. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 46), 2000.

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

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

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v.62, p.775-806. 1998.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biotecnol. Ciência & Desenvol.**, 2(12):38-42, 2000.

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

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. **Mol. Microbiol.** 6(9): 1211-1217, 1992.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **J. Cell Sci.** 60: 181-197, 1983.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; DE-SOUZA, M.T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: **Controle biológico**. eds. Melo, I.S; Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, Vol. 1, p.201-230, 1998.

VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W. H.; JOHNSON, D. E.; BARNETT, B. D.; VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science** 247:72-74, 1990.

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

WU, D.; CAO, X.L.; BAI, Y.Y; ARONSON, A.I. Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Lett**, 65(1): 31-35, 1991.

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

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