

## Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão

Rose Monnerat<sup>1</sup>  
Roseane Cavalcanti dos Santos<sup>2</sup>  
Polliana Carvalho Barros<sup>3</sup>  
Andréa Cardoso Batista<sup>4</sup>  
Colin Berry<sup>5</sup>

### Introdução

Microorganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior das plantas durante pelo menos um período do ciclo de suas vidas (Azevedo, 1998). No início dos anos setenta, microrganismos endofíticos eram considerados neutros, não causando danos ou benefícios às plantas, mas através dos conhecimentos adquiridos, sabe-se atualmente que esses microrganismos em muitos casos desempenham um papel importante na proteção de plantas contra predadores e patógenos (Azevedo et al., 2000).

Weber (1981), foi provavelmente o primeiro pesquisador a relatar a proteção de plantas a insetos devido a um fungo entomopatogênico. Trabalhos posteriores sustentaram esses dados em gramíneas e outras plantas (Funk et al., 1983; Claydon et al., 1985).

A partir de bactérias endofíticas, novas formas de controle biológico vêm sendo desenvolvidas com o auxílio da engenharia genética. Como exemplo, deve-se mencionar a transformação da bactéria *Clavibacter xyli* com o gene *cry1Ac* de *Bacillus thuringiensis* Berliner que codifica uma proteína tóxica a alguns insetos da ordem Lepidoptera (Tester, 1992).

Muitas bactérias do gênero *Bacillus* foram isoladas a partir de tecidos de plantas (Azevedo et al., 2000), entretanto nenhum autor cita o isolamento da espécie *B. thuringiensis*. Trabalhos realizados por diversos autores mostram que esta bactéria possui ampla distribuição, podendo ser isolada a partir de diferentes ambientes (Monnerat et al., 2001; Bravo et al., 1998).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem desenvolvendo projetos de pesquisa com algodão e possui pequenos campos para darem suporte às pesquisas. Foi observado que as plantas de algodão de um desses campos não apresentavam ocorrência natural de lepidópteros, assim, foi realizado um experimento para verificar a presença de *B. thuringiensis* no interior dessas plantas.

### Materiais e Métodos

**1- Isolamento das estirpes:** As estirpes foram coletadas do solo próximo às raízes, das raízes, dos pedúnculos, das maçãs, dos caules e das hastes de algodão plantado á 90 dias. As estruturas da planta foram lavadas e esterilizadas superficialmente para evitar contaminações com bactérias epifíticas e em seguida seccionadas e colocadas em meio ágar NYSM (Yousten, 1984). O solo foi submetido a choque térmico e plaqueado em ágar NYSM. Quarenta e oito horas depois, as colônias foram coletadas e analisadas.

<sup>1</sup> Bióloga, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, MSc, Embrapa Algodão

<sup>3</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>5</sup> Biólogo, Universidade de Cardiff

**2- Caracterização morfológica:** As estirpes foram submetidas a choque térmico e crescidas em meio NYSM acrescido de penicilina. As colônias detectadas após 48 horas foram observadas através de microscopia óptica em contraste de fases para a verificação da presença do cristal protéico. As positivas eram *B. thuringiensis*.

**3- Determinação do peso molecular das proteínas totais:** O peso molecular foi determinado através de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). As proteínas de *B. thuringiensis* foram extraídas de acordo com Lecadet et al. (1991). Para determinação da composição protéica, alíquotas de 20 ml das preparações de esporos-cristais foram fervidas por 5 minutos em tampão de amostra de proteínas e submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida-SDS 10%, conforme descrito por Laemmli (1970). O gel foi corado em solução de Comassie blue R-250 0,1% em fixador composto por 40% metanol, 10% ácido acético.

**4- Caracterização molecular através da presença de genes de toxinas pela reação em cadeia da polimerase:** Para identificar a presença dos genes codificadores de toxinas de *B. thuringiensis* realizaram-se reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando diferentes oligonucleotídeos (Céron et al., 1995; Bravo et al., 1998). A metodologia de extração de DNA utilizada foi a descrita por Bravo et al. (1998). As reações foram realizadas utilizando-se oligonucleotídeos específicos para a detecção dos genes *cry1* e *cry3* (Ceron et al., 1995) e *cry2*, *cry8*, *cry9* e *cyt* (Bravo et al., 1998). As condições das reações foram descritas pelos mesmos autores. Analisou-se 20 ml de cada produto obtido em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta. *B. thuringiensis kurstaki*, tóxico a lepidópteros foi utilizado como controle positivo.

**5- Avaliação da patogenicidade das estirpes:** A patogenicidade das estirpes foi avaliada em insetos das ordens Lepidoptera, disponíveis na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

5.1- *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): Uma alíquota de 150 µl do cultivo final de cada uma das estirpes crescidas em meio NYSM foi depositada sobre a superfície da dieta artificial de *A. gemmatilis* previamente distribuída em copos plásticos descartáveis de 50 ml. Em seguida 10 larvas de segundo estágio foram adicionadas. Foram feitas 3 repetições e 3 copos foram deixados sem a suspensão bacteriana, como testemunha. Dois e cinco dias após o início do ensaio a mortalidade foi avaliada (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

5.2 – *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae): O procedimento foi semelhante ao descrito para *A. gemmatilis*, mas as larvas foram individualizadas devido ao seu hábito canibal. Dois e cinco dias após o início do ensaio a mortalidade foi avaliada (Silva-Werneck & Monnerat, 2001).

**6- Verificação do efeito de folhas de algodão coletadas no campo sobre larvas de *S. frugiperda*:** Quatro folhas de quatro plantas de algodão foram coletadas, lavadas superficialmente e dadas como alimento para 5 larvas de segundo instar de *S. frugiperda*. As lagartas foram acompanhadas durante 5 dias, quando foram maceradas, submetidas a choque térmico e plaqueadas para verificação da presença do *B. thuringiensis*.

## Resultados e Discussão

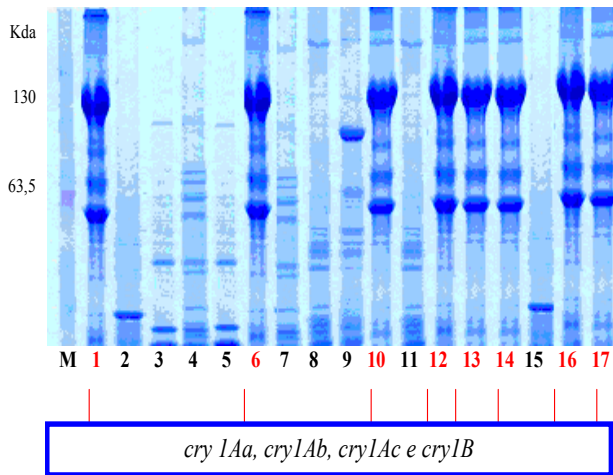
Foram isoladas quinze estirpes de *B. thuringiensis* das plantas de algodão e uma estirpe do solo. Dentre as estirpes isoladas da planta, seis mataram larvas de *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* (Tabela 1). É importante salientar que as estirpes foram isoladas de todas as partes da planta. A estirpe isolada do solo também se mostrou tóxica aos dois lepidópteros testados.

As proteínas encontradas nas estirpes tóxicas apresentaram tamanho compatível com as toxinas efetivas a lepidópteros (130 kDa.) e a análise molecular confirmou a presença dos genes do grupo *cry1*, codificadores das toxinas ativas a lepidópteros (Figura 1). Não foi detectada a presença de nenhum outro gene descrito de *B. thuringiensis*.

As larvas de *S. frugiperda* colocadas sobre folhas de algodão provenientes da mesma plantação tiveram seu desenvolvimento alterado e morreram cinco dias após o início do ensaio. Foi detectada a presença de *B. thuringiensis* nas larvas após maceramento e isolamento (Tabela 1). A estirpe encontrada também apresentou a proteína de 130 kDa e genes *cry1* (Figura 1). Nas lagartas utilizadas como controle, oriundas da criação de laboratório, não foi detectada a presença de *B. thuringiensis*.

Os dados apresentados neste experimento não nos permitem afirmar que o *B. thuringiensis* tenha sido a causa da não ocorrência de lagartas no campo experimental. Entretanto, diversas estirpes foram isoladas do interior das plantas e do solo próximo às raízes, inclusive estirpes tóxicas a lepidópteros, mostrando que este microrganismo estava presente no solo e no algodão. Estava presente também nas larvas de *S. frugiperda* que ingeriram o algodão, e ausentes nas larvas alimentadas em dieta artificial, indicando ter sido a causa da morte das mesmas. Não se pode afirmar que esta bactéria tenha sido a causa da morte, pois poderiam haver outros fatores intrínsecos da cultura que tenham causado esta mortalidade. Por outro lado, sabe-se que o *B. thuringiensis* tem a capacidade de viver em diferentes habitats e que as plantas, de forma geral, absorvem, entre outras coisas, microrganismos do solo. É provável que a planta tenha absorvido o *B. thuringiensis* do solo e que este tenha proliferado em seu interior, protegendo-a contra insetos. Baseado nesses experimentos preliminares sugerimos a possibilidade de uma nova forma de utilização de *B. thuringiensis* no controle de insetos. Estudos futuros serão realizados para averiguar se o *B. thuringiensis* poderia ser utilizado como inoculante

ou aplicado diretamente nas raízes da planta. Este é o primeiro trabalho que relata o isolamento de *B. thuringiensis* a partir de tecidos de plantas.



**Figura 1:** Perfil de proteínas e genes presentes nas estirpes de *Bacillus thuringiensis* isoladas da planta de algodão (M: marcador de peso molecular; 1: S1974, 2: S1975, 3: S1976, 4: S1977, 5: S1978, 6: S1979, 7: S 1980, 8: S1981, 9: S1982, 10: S1983, 11: S1984, 12: S1985, 13: S1986, 14: S1987, 15: S1988, 16: S1989 e 17: S1990)

**Tabela 1:** Código, origem e patogenicidade das estirpes de *B. thuringiensis* isoladas da planta do algodão, do solo próximo às raízes e do inseto que se alimentou da planta.

| Isolado | Nº do Banco | Origem                       | Patogenicidade               |                              |
|---------|-------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|         |             |                              | <i>Spodoptera frugiperda</i> | <i>Anticarsia gemmatilis</i> |
| 1       | S 1974      | raiz                         | 100 %                        | 100 %                        |
| 2       | S 1975      | raiz                         | -                            | -                            |
| 3       | S 1976      | raiz                         | -                            | -                            |
| 4       | S 1977      | raiz                         | -                            | -                            |
| 5       | S 1978      | raiz                         | -                            | -                            |
| 6       | S 1979      | raiz                         | 100 %                        | 100 %                        |
| 7       | S 1980      | raiz                         | -                            | -                            |
| 8       | S 1981      | raiz                         | -                            | -                            |
| 9       | S 1982      | raiz                         | -                            | -                            |
| 10      | S 1983      | caule                        | 100 %                        | 100 %                        |
| 11      | S 1984      | haste                        | -                            | -                            |
| 12      | S 1985      | haste                        | 100 %                        | 100 %                        |
| 13      | S 1986      | maçã                         | 100 %                        | 100 %                        |
| 14      | S 1987      | folha                        | 100 %                        | 100 %                        |
| 15      | S 1988      | folha                        | -                            | -                            |
| 16      | S 1989      | solo                         | 100 %                        | 100 %                        |
| 17      | S 1990      | <i>Spodoptera frugiperda</i> | 100 %                        | 100 %                        |

## Referências Bibliográficas

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S. AND AZEVEDO, J. L. (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR., W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advantages on tropical plants. *Environmental Biotechnology*, v. 3, n.1, 31 p., 2000.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

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, DC, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CLAYDON, N.; GROVE, J. F.; POPLER, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry*, Oxford, UK, v. 24, p. 937-943, 1985.

FUNK, C. R.; HALISKY, P. M.; JOHNSON, M. C.; SIEGEL, M. R.; STEWART, A. V.; AHMAD, S.; HURLEY, R. H.; HARVEY, I. C. An endophytic fungus and resistance to sod webworms: association in *Lolium perenne*. *Bio/Technology*, v. 1, p. 189-191, 1983.

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.; CHAUFaux, 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, DC, v. 58, p. 840-849, 1991.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. G. 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).

TESTER, C. F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, UK, v. 24, p. 1107-1112, 1992.

WEBER, J. A natural control of Dutch elm disease. *Nature*, London, v. 292, p. 449-451, 1981.

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

### Comunicado Técnico, 98

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



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 70.770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e-mail: [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

1ª edição

1ª impressão (2003): 150 unidades

### Comitê de publicações

**Presidente:** José Manuel Cabral de Sousa Dias

**Secretário-Executivo:** 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

### Expediente

**Supervisor editorial:** Maria José de Oliveira Duarte

**Normalização Bibliográfica:** Maria Alice Bianchi

**Editoração eletrônica:** Giscard Matos de Queiroz