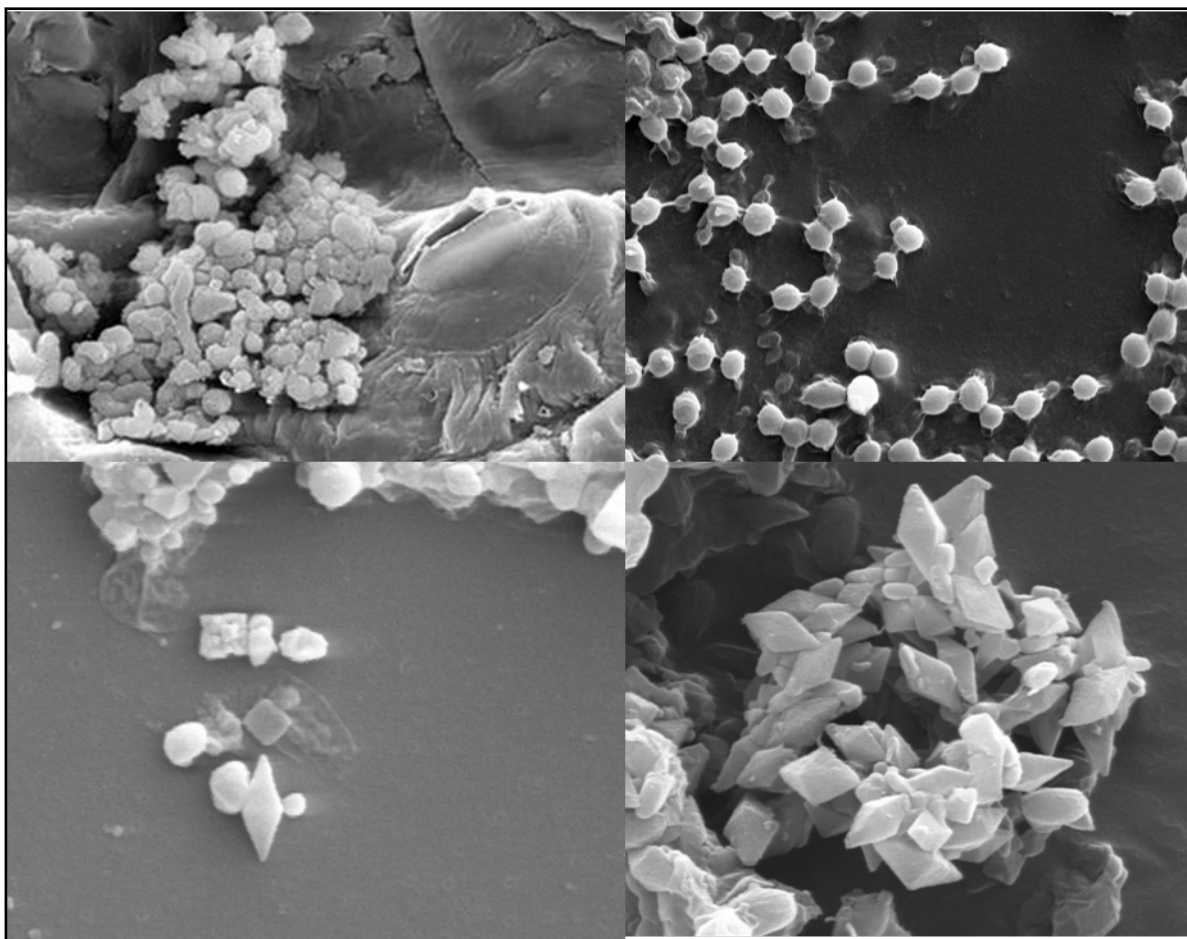


Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias de Invertebrados

Fotos: Ana Cristina Gomes e Lilian Botelho Praça



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 332

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias de Invertebrados

Lílian Botelho Praça
Érica Soares Martins
Fernanda Álvares da Silva
Rose Gomes Monnerat

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB – Av. W5 Norte (final)

Caixa Postal: 02372 - Brasília, DF - Brasil – CEP: 70770-917

Fone: (61) 3448-4700

Fax: (61) 3340-3624

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

E-mail (sac): sac@cenargen.embrapa.br

Comitê Local de Publicações

Presidente: *João Batista Teixeira*

Secretário-Executivo: *Thales Lima Rocha*

Membros: *Jonny Everson Scherwinski Pereira*

Lucília Helena Marcelino

Lígia Sardinha Fortes

Márcio Martinelli Sanches

Samuel Rezende Paiva

Vânia Cristina Rennó Azevedo

Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*

Daniela Aguiar de Souza Kols

Supervisor editorial: Lígia Sardinha Fortes

Revisor de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica: Lígia Sardinha Fortes

Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães

Fotos da capa: Ana Cristina Gomes e Lílian Botelho Praça

1ª edição (online)

Todos os direitos reservados.

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias de Invertebrados. Lílian Botelho Praça, Érica Soares Martins, Fernanda Álvares da Silva e Rose Gomes Monnerat. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

22 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 332).

1. Recursos Genéticos – Micro-organismos. 2. Conservação. 3. Bactérias. 4. Invertebrados. I. Praça, Lílian Botelho. II. Martins, Érica Soares. III. Silva, Fernanda Álvares da. IV. Monnerat, Rose Gomes. V. Título. VI. Série.

592.2 – CDD

© Embrapa 2011

Autores

Lílian Botelho Praça

M.Sc./Doutoranda em Ciências Agrárias, Assistente da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
lilian.praca@embrapa.br

Érica Soares Martins

Ph.D. em Biologia Molecular, Docente das Faculdades Integradas Promove de Brasília
es.martins2@gmail.com

Fernanda Álvares da Silva

Ph.D. em Zootecnia, Analista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
fernanda.silva@embrapa.br

Rose Gomes Monnerat

Ph.D. em Agronomia, Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
rose.monnerat@embrapa.br

Apresentação

Desde o início da década de 1970, há uma crescente conscientização mundial sobre a necessidade de preservação dos recursos genéticos, que são essenciais para o atendimento das demandas de variabilidade genética dos programas de melhoramento, principalmente aqueles voltados para alimentação.

No Brasil, esta necessidade é especialmente importante, uma vez que a maioria dos cultivos que compõem a base alimentar do país é de origem exótica. Observa-se, por exemplo, que cerca de 95% dos acessos de cereais conservados em coleções do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA) são de espécies exóticas. Portanto, a manutenção e o enriquecimento contínuo da variabilidade genética dessas coleções são prioritários e estratégicos, considerando, ainda, as atuais restrições internacionais ao intercâmbio de germoplasma.

Na década de 1970, a *Food and Agriculture Organization* (FAO), órgão das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de centros para a conservação de recursos genéticos situados em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Em 1974, o *Consultative Group for International Agricultural Research* (CGIAR) criou o *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), hoje transformado no *Bioversity International*. No mesmo ano, a Embrapa reconheceu a importância estratégica dos recursos genéticos com a criação do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura-síntese Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A criação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a consolidação do SNPA estabeleceram ambiente propício para a formatação da Rede Nacional de Recursos Genéticos. A partir de então, paulatinamente, coleções de germoplasma foram estruturadas em diferentes Unidades Descentralizadas, predominantemente na área vegetal.

Em 1993, por intermédio de deliberação da Diretoria Executiva, a Embrapa formalizou, como ferramenta de gestão das coleções, o Sistema de Curadorias de Germoplasma e definiu os papéis e as responsabilidades para os diversos atores envolvidos nesse Sistema, tais como: curadores de coleções de germoplasma, chefes de Unidades Descentralizadas que abrigavam as coleções e a Supervisão de Curadorias. Os projetos em rede foram definidos como figuras programática e operacional, possibilitando o custeio de atividades de coleta, intercâmbio, quarentena, caracterização, avaliação, documentação, conservação e utilização de germoplasma, além da manutenção das coleções. De 1993 até a presente data, muitas coleções de germoplasma foram estabelecidas e, atualmente, o Sistema de Curadorias da Embrapa reúne 209 coleções, incluindo Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal (BAGs), Núcleos de Conservação Animal, Coleções Biológicas de Micro-organismos e Coleções de Referência, as quais abrangem espécies nativas e exóticas. Nas

demais Instituições do SNPA, estima-se que são mantidos pelo menos outros 243 Bancos Ativos de Germoplasma Vegetal.

Como duplicata de segurança dos acessos mantidos nos BAGs, a Embrapa Cenargen abriga a Coleção de Base (COLBASE) de germoplasma vegetal, projetada para conservar sementes sob temperatura de -20°C por longo período de tempo.

Como consequência desses 30 anos de atividades relacionadas ao manejo dos recursos genéticos, os curadores adquiriram uma bagagem de conhecimentos práticos na área, conhecimentos estes que foram, em parte, sistematizados e disponibilizados para a sociedade por intermédio da presente obra: "Manual de Curadores de Germoplasma".

Esperamos que esta publicação em série torne-se um guia para curadores de germoplasma no Brasil e no exterior, e que contribua efetivamente para o aprimoramento da gestão dos recursos genéticos deste país.

Mauro Carneiro

Chefe Geral

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

Introdução	08
Coleta	09
Isolamento	10
Identificação e caracterização	10
Caracterização morfológica	10
Caracterização entomopatogênica	11
Bioensaios	11
Contra <i>Spodoptera frugiperda</i>	11
Contra <i>Anticarsia gemmatilis</i>	12
Contra <i>Anthonomus grandis</i>	12
Contra <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i>	13
Caracterização sorológica	14
Caracterização das toxinas	14
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	14
Caracterização dos genes	15
PCR	15
Conservação e armazenamento das estirpes	16
Em tubos de ensaio com meio inclinado (“Slants”)	16
Liofilizados	17
Em tiras de papel-filtro	17
Controle de qualidade das amostras da coleção de bactérias de invertebrados	18
Referências	19

Bactérias de Invertebrados

Lílian Botelho Praça
Érica Soares Martins
Fernanda Álvares da Silva
Rose Gomes Monnerat

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) e *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) são bactérias Gram-positivas da família *Bacillaceae*, as quais apresentam duas fases distintas durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria multiplica-se por bipartição; outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Quando o esporo encontra-se de novo em um meio que contém os nutrientes necessários, pode germinar e iniciar o crescimento vegetativo (SOBERÓN; BRAVO, 2001).

Essas bactérias são consideradas ubíquas, porque foram isoladas de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de diferentes substratos, como solo, água, folhas e insetos mortos. Bt apresenta um corpo paraesporal ou cristal proteico; Ls está taxonomicamente mais distante desse grupo. Pouco se sabe sobre o *habitat* de Bt e Ls; entretanto, seu requerimento nutricional vitamínico e de aminoácidos como o ácido glutâmico sugere que as formas vegetativas só se reproduzem no interior dos insetos hospedeiros (SOBERÓN; BRAVO, 2001). O corpo paraesporal de Bt contém proteínas denominadas delta endotoxinas, as quais formam atualmente uma família de mais de 600 membros, classificados em 68 grupos de proteínas *Cry* (CRICKMORE *et al.*, 2011). Elas são produzidas sob a forma de protoxinas que, no intestino dos insetos, são solubilizadas e ativadas em peptídeos tóxicos pela ação do pH alcalino intestinal e de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (ARONSON *et al.*, 1986).

As vantagens da utilização dessas bactérias são sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; OMS, 1987). Produtos à base de Bt para o controle de pragas agrícolas são comercializados há mais de setenta anos. Prevê-se que essa utilização aumentará quando uma legislação de proteção ambiental mais rigorosa for adotada e produtos mais eficientes e baratos forem lançados no mercado.

A primeira menção a doenças em insetos causada por Bt data de 1902, quando Ishiwata descreveu no Japão uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, a qual ele chamou de *Bacillus sotto*. Em 1911, na Alemanha, Berliner descreveu a mesma bactéria isolada de lagartas conhecidas popularmente por traças-da-farinha, *Anagasta kuhniella*, e em 1915 chamou-a de *Bacillus thuringiensis*, em homenagem à região de onde as lagartas foram coletadas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; DIAS, 1992).

As possibilidades de utilização de Bt foram logo reconhecidas em controle biológico e, em 1938, uma formulação à base dessa bactéria, a Sporeína, foi produzida na França. A partir da década de 1950, diversos países, como Rússia, Checoslováquia, França, Alemanha e Estados Unidos, começaram a produzir inseticidas biológicos à base de Bt (WEISER, 1986).

Na década de 1960, foi isolada uma estirpe de Bt subsp. *kurstaki*, chamada HD-1 (DULMAGE, 1970), que apresentou toxicidade de duas a duzentas vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. A partir de então, a procura por outras estirpes possuidoras de novas toxinas foi estimulada e, em 1977, Goldberg e Margalit isolaram uma estirpe eficaz contra dípteros (GOLDBERG; MARGALIT, 1977). Alguns anos mais tarde, em 1983, outra estirpe foi identificada como patogênica contra coleópteros (KRIEG *et al.*, 1983).

L. sphaericus foi isolada em 1902, e sua ação está restrita apenas a insetos da ordem Diptera. No mundo inteiro, diversas estirpes de Bt e Ls foram isoladas, e atualmente inúmeros laboratórios continuam procurando novas toxinas. Existem várias coleções espalhadas pelo mundo, e estima-se que existam mais de 50.000 estirpes conhecidas. Entre estas, existem algumas que são eficazes contra diversas ordens de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros) e contra outros grupos de invertebrados – nematoides, ácaros e protozoários (EDWARDS *et al.*, 1989; FEITELSON *et al.*, 1992; CRICKMORE *et al.*, 1995).

Coleta

Em geral, amostras de Bt e Ls são coletadas, em sua maioria, a partir de amostras de solo, e em menor frequência a partir de água, plantas e insetos mortos. Após a coleta, as amostras devem ser guardadas em recipientes limpos e, de preferência, estéreis. As amostras de insetos e plantas devem ser acondicionadas em geladeira até que se proceda ao isolamento para evitar sua deterioração.

Antes de sair para coleta, deve-se solicitar autorização para coleta e transporte de material biológico em áreas federais; por meio do Sisbio, pelo *site* <http://www4.icmbio.gov.br/sisbio/>. Para obtenção de autorização de coleta de amostras em outras áreas, como estados e municípios, deve-se buscar informações nas Secretarias de Meio Ambiente ou nos órgãos responsáveis.

A Instrução Normativa nº 154/2007 poderá ser consultada para maiores informações a respeito de coleta e transporte de material. Ela regulamenta a coleta de material biológico para fins científicos e didáticos no âmbito do ensino superior e instituiu o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (Sisbio).

A legislação brasileira não prevê a autorização (ou licença) para coleta e transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico para fins científicos ou didáticos. Por isso, aconselha-se o registro voluntário para evitar constrangimentos, caso pesquisadores sem clareza sobre as exigências legais sejam abordados por fiscais. O pesquisador poderá, voluntariamente, registrar-se no Sisbio e obter comprovante de "Registro Voluntário" para eventual apresentação à fiscalização.

Para o trabalho de campo, deve-se levar um caderno de campo, uma caneta para anotação dos dados das amostras coletadas e um GPS para coleta das coordenadas geográficas. Todas as informações sobre a amostra são de grande importância, tais como: local de coleta, coletor, cidade e estado onde foi realizada a coleta, tipo de substrato (solo, espécie de planta, ambientes aquáticos) e outras informações importantes sobre o substrato e o local onde as amostras foram coletadas.

Isolamento

Uma forma simples de isolamento de diferentes espécies de *Bacillus* foi descrita no Protocolo da Organização Mundial de Saúde de 1985. Consiste em preparar as amostras (solo, planta, água ou insetos mortos) na quantidade de aproximadamente um grama e submetê-las a choque térmico (80°C por 12 minutos/5 minutos no gelo). Amostras de plantas e insetos devem ser maceradas, e as de solo e água devem ser bem homogeneizadas. Esse choque térmico mata as células vegetativas de todas as bactérias, deixando vivos apenas os esporos.

Em seguida, essa solução é semeada em meio EMBRAPA (MONNERAT *et al.*, 2007), acrescido de penicilina, na concentração de 100 µg/mL de meio. Nessas condições, somente os esporos de Bt e *B. cereus* germinam. No caso de Ls, o procedimento é semelhante, sendo que essa bactéria é resistente à estreptomicina em uma concentração de 25 µg/mL de meio (MONNERAT *et al.*, 2001).

Identificação e caracterização

Várias metodologias de identificação e caracterização de Bt e Ls foram propostas, tais como perfil enzimático, morfologia e reações aos corantes. Até 1960, essas metodologias mostravam-se pouco apropriadas para uma classificação segura das estirpes isoladas em diversas regiões do globo. Nessa época, De Barjac e Bonnefoi (1962), baseados em substâncias existentes no flagelo de *Bacillus*, introduziram o conceito dos “antígenos H” como elemento diferenciador de estirpes. Outras técnicas foram propostas, como eletroforese de esterases (NORIS, 1964), antígenos do cristal (KRYWIENCZYK *et al.*, 1978), análise de plasmídeos (LERECLUS *et al.*, 1982), eletroforese multilocus das isoenzimas (SEDLANDER *et al.*, 1986) e cromatografia dos ácidos graxos (SCHENKEL; FRACHON, 1990).

A partir da década de 1990, diversos genes das delta-endotoxinas foram clonados, o que permite a caracterização das toxinas pela análise completa da sequência de DNA de cada grupo (KRONSTAD; WHITELEY, 1986), por sondas específicas de DNA (VISSER, 1989) e pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR (STEFFAN; ATLAS, 1991). As maneiras mais utilizadas para a caracterização de Bt e Ls estão descritas a seguir.

Caracterização morfológica

As estirpes são cultivadas em meio EMBRAPA (MONNERAT *et al.*, 2007) por 48 a 72 horas a 200 rpm e 28°C em incubador rotativo. Nessas condições, as formas das células vegetativas, dos esporos e dos cristais de Bt e Ls são facilmente visualizadas em microscópio de contraste de fases com aumento de 1000 X. Para preparar o material,

deposita-se uma gota da colônia dissolvida em solução salina ou uma gota do isolado crescido em meio líquido em uma lâmina.

A diferença morfológica entre Bt e *B. cereus* é a presença de cristais na primeira; caso a bactéria não apresente essa estrutura, trata-se de *B. cereus*. No caso do Ls, o esporângio é distendido e apresenta forma de raquete.

Caracterização entomopatogênica

Durante a prospecção de novas estirpes, é importante determinar quais e quantos são os insetos-alvo suscetíveis à ação tóxica da estirpe. Assim, são conduzidos bioensaios com o maior número possível de espécies, dependendo da disponibilidade, para verificar sua atividade (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1998).

Há dois tipos de testes de patogenicidade. Inicialmente, realiza-se o denominado bioensaio seletivo, a fim de investigar se a estirpe é eficaz ou não. Após a seleção das estirpes, realizam-se bioensaios com diluições seriadas das culturas bacterianas e determina-se a concentração letal. Em ambos os casos, cada estirpe da bactéria é cultivada e visualizada conforme descrita no item caracterização morfológica deste manual.

Um aspecto muito importante para a realização dos bioensaios é o conhecimento e o domínio da técnica de criação de insetos em laboratório, pois os testes devem ser realizados com insetos sadios. Quando a mortalidade da testemunha dos testes é superior a 10%, o bioensaio deve ser descartado e repetido. Metodologias de bioensaios seletivos e de dose para alguns insetos-alvo serão descritas a seguir.

Bioensaios

Contra *Spodoptera frugiperda*

Bioensaio seletivo – Os bioensaios são realizados espalhando-se 35 µL da cultura bacteriana 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 é colocada em cada poço. Uma placa é deixada sem a bactéria, como testemunha. As placas são devidamente fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas e colocadas na sala de bioensaios, sob as mesmas condições descritas para a criação dos insetos. A primeira leitura é feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas são transferidas para copinhos de plástico de 50 mL contendo dieta livre do bacilo. No sétimo dia do ensaio, faz-se a segunda e última leitura. As larvas não são colocadas em grupos devido ao seu hábito canibal (MONNERAT *et al.*, 2001; PRAÇA, 2003).

Bioensaio de dose (CL₅₀) – As estirpes efetivas são submetidas a bioensaios de dose para se determinar a concentração letal necessária para matar 50% das larvas testadas (CL₅₀). Inicialmente, as estirpes devem ser cultivadas e liofilizadas. Para isso, esses cultivos são centrifugados a 10.000 rpm (12.800 x g) por 30 minutos, a 4°C, congelados por 16 horas e liofilizados por 18 horas em liofilizador e guardados em geladeira ou freezer. Depois de liofilizado, os materiais são pesados na quantidade de 1 mg e adicionados a 1 mL de água destilada estéril. Após a completa homogeneização em agitador tipo “Vortex”, obtém-se a suspensão I. A partir dessa suspensão, obtém-se a suspensão II, coletando-se 571,4 µL da suspensão I e adicionando-se 428,6 µL de água, para uma concentração final

de 571,4 µg/mL. Posteriormente, prepara-se 1 mL de cada uma das diluições, conforme descrito na Tabela 1, misturando-se um determinado volume da suspensão II, como mostrado na coluna 2 da Tabela 1, com o volume de água correspondente na coluna 3 da mesma tabela. Em seguida, realizam-se os bioensaios mediante a aplicação de 35 µL de cada uma das diluições em cada um dos 24 poços das placas de cultivo de células, e o restante de acordo com o bioensaio seletivo.

Os dados de mortalidade obtidos são analisados por meio de “Probits” (ROBERTSON *et al.*, 2002) e a concentração letal (CL₅₀) é determinada. *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (Btk) é utilizada como padrão e controle positivo (PRAÇA, 2003).

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

Dose	Suspensão II (µL)	Água (µL)	ng/cm ²
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	720	930	720
4	40	960	400
5	26	974	260
6	15	985	150
7	10	990	100
8	6	994	60
9	3	997	30
10	2	998	20

Contra *Anticarsia gemmatalis*

Bioensaio seletivo – Os bioensaios são realizados espalhando-se 150 µL da cultura bacteriana 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. gemmatalis* são colocadas em cada copinho, que em seguida são fechados com tampas de acrílico e incubados nas mesmas condições de criação do inseto. Duas repetições são feitas e um copo é deixado sem a bactéria, como testemunha. Realiza-se a primeira leitura 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas são transferidas para novos copos contendo dieta livre do bacilo. No quinto dia, faz-se a segunda e última leitura (MONNERAT *et al.*, 2001; PRAÇA, 2003).

Bioensaio de dose (CL₅₀) – Para se determinar a concentração letal (CL₅₀) das estirpes selecionadas, o procedimento utilizado é idêntico ao descrito para *S. frugiperda*, com exceção da última leitura, que é feita no quinto dia (PRAÇA, 2003).

Contra *Anthonomus grandis*

Bioensaio seletivo – Os bioensaios são realizados incorporando-se 10 mL da cultura bacteriana em 35 mL de dieta artificial, sob temperatura de aproximadamente 50°C. Em

seguida, a dieta é vertida em placas de Petri. Após a solidificação, a dieta é dividida em quatro quadrantes e são feitos 15 furos/quadrante, em que são colocadas as larvas neonatas (uma por furo). São feitas quatro repetições e deixa-se uma placa sem a bactéria, como controle. No sétimo dia, realiza-se a leitura, sem trocas de dieta (MONNERAT *et al.*, 2000).

Bioensaio de dose – Para se determinar a concentração letal (CL₅₀), as estirpes selecionadas são crescidas e liofilizadas nas mesmas condições descritas para *S. frugiperda*. Em seguida, a bactéria liofilizada é pesada na quantidade de 60, 40, 20, 10 e 4 mg das bactérias liofilizadas em tubos tipo “Eppendorf”, de acordo com Martins *et al.* (2004). Coloca-se cada uma das pesagens em tubo de ensaio com 5 mL de água destilada estéril. Após a completa homogeneização em agitador tipo “Vortex”, obtêm-se as suspensões. Prepara-se a dieta artificial para *A. grandis*, acondiciona-se em béqueres e o material é autoclavado. Cinco mililitros de cada uma das diluições são misturados a 35 mL de dieta artificial, sob temperatura de aproximadamente 50°C, e o total é vertido em placas de Petri, em capela de fluxo laminar. Após a solidificação da dieta, são feitos 12 furos em cada quadrante da dieta e neles colocadas as larvas neonatas (uma por furo). São feitas todas as suspensões e uma placa é deixada sem a bactéria, como controle. Seis concentrações são testadas e um controle por bioensaio, com 48 indivíduos por tratamento. Os bioensaios são mantidos em BOD 10/14 fotoperíodo e sob temperatura de 26°C ± 2. Realiza-se a leitura sete dias após o início do bioensaio. Os dados de mortalidade obtidos são analisados por meio de “Probits” (ROBERTSON *et al.*, 2002) e a concentração letal (CL₅₀) é determinada. Utiliza-se *B. thuringiensis* subespécie *tenebrionis* (Btt) como padrão e controle positivo (PRAÇA, 2003; MARTINS *et al.*, 2004).

Contra *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*

Bioensaio seletivo – O procedimento para a realização do bioensaio seletivo consiste em colocar 1 mL da cultura bacteriana em dois copos descartáveis de 200 mL contendo 100 mL de água destilada e 25 larvas de segundo estágio das duas espécies de mosquitos. São feitas duas repetições, e um copo sem a cultura é deixado como testemunha. Após 24 e 48 horas, faz-se a leitura do número de sobreviventes, determinando-se quais as estirpes são tóxicas (MONNERAT *et al.*, 2001; PRAÇA, 2003).

Bioensaio de dose (CL₅₀) – Preparam-se os copos com 100 mL de água destilada e 25 larvas de segundo estágio de cada uma das espécies de mosquito. São realizadas três repetições, e três copos sem a cultura são deixados como testemunha. Para se determinar a concentração letal (CL₅₀), as estirpes selecionadas são crescidas e liofilizadas nas mesmas condições descritas para *S. frugiperda*. Em seguida, os materiais liofilizados são pesados na quantidade de 0,05 g em tubos tipo “Eppendorf” e transferidos para tubo de ensaio com 10 mL de água destilada estéril. Após a completa homogeneização do material em agitador tipo “Vortex”, obtém-se a solução I (5 mg/mL). Em seguida, são transferidos 100 µL da suspensão I para um tubo de ensaio contendo 9,9 mL de água, obtendo-se assim a solução II (0,05 mg/mL). A seguir, transfere-se 1 mL da solução II para um tubo de ensaio contendo 9 mL de água, obtendo-se a solução III, com uma concentração final de 0,005 mg/mL. A partir da solução III, são realizados os bioensaios mediante a aplicação de alíquotas de 1000, 800, 400, 200, 160, 120, 80, 40 e 20 µL em cada um dos copos descartáveis, conforme POP para bioensaio de dose contra *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*. Os bioensaios são mantidos em sala com umidade de 70% e temperatura de aproximadamente 25°C. Após 24 horas do início do teste, efetua-se a contagem do número de larvas mortas. Os dados de mortalidade obtidos são analisados por meio de

“Probits” (ROBERTSON *et al.*, 2002) e a concentração letal (CL₅₀) é determinada. *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* IPS-82 (Bti) ou *L. sphaericus* Sph 88 2362 são utilizados como padrão e controle positivo.

As alíquotas utilizadas da solução III podem variar de acordo com a potência do produto ou a amostra a ser testada. Por exemplo, caso não ocorra mortalidade ou alta mortalidade nas dosagens utilizadas, estas devem ser diluídas ou concentradas. A partir disso, deve-se realizar um bioensaio-teste para determinação das alíquotas.

Caracterização sorológica

A técnica de caracterização sorológica foi desenvolvida em 1962 por De Barjac e Bonnefoi, baseada em substâncias existentes nos flagelos dos bacilos entomopatogênicos. Esses pesquisadores introduziram o conceito dos “antígenos H” como elemento diferenciador das estirpes, o que permitiu grande avanço na sistemática dos bacilos entomopatogênicos. Atualmente, estão descritos 67 grupos antigênicos, divididos em 80 serovares para Bt e 47 para Ls (DE BARJAC; FRACHON, 1990). Embora esse sistema de classificação seja simples, confiável e tenha sido muito utilizado, não há correspondência entre o sorotipo e a atividade inseticida. Com o fechamento do Instituto Pasteur, no ano 2000, essa classificação está em desuso. O sorotipo determina a subespécie de Bt.

Para a realização desse teste, é necessário que se produzam antígenos e antissoros. O protocolo está descrito com detalhes em De Barjac e colaboradores (1980). Os antígenos flagelares são produzidos a partir de células vegetativas de Bt e Ls em coelhos. Quando há reação, a suspensão fica com aspecto límpido, com um sedimento floculento e granular no fundo do tubo.

Caracterização das toxinas

Eletróforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Realiza-se a análise das proteínas de Bt e Ls por meio de eletróforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE (HÖFTE; WHITELEY, 1989), que possibilita a determinação do número e da massa molecular das toxinas, além de auxiliar na identificação do grupo *Cry* a que elas pertencem. Para isso, as estirpes bacterianas são crescidas em meio EMBRAPA por 72 horas em incubador rotativo, a 28°C e 200 rpm; em seguida, as proteínas são extraídas de acordo com Lecadet *et al.* (1991).

As preparações de esporos-cristais das estirpes são analisadas por eletróforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). O gel é corado em solução de “Coomassie brilliant blue” (40% metanol e 25% de “Coomassie brilliant blue” 250-R) por uma hora e descorado em solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético glacial) por 1-2 horas até visualização dos perfis proteicos das estirpes. Deve-se utilizar uma estirpe de Bt como padrão; por exemplo, para lepidópteros um *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*.

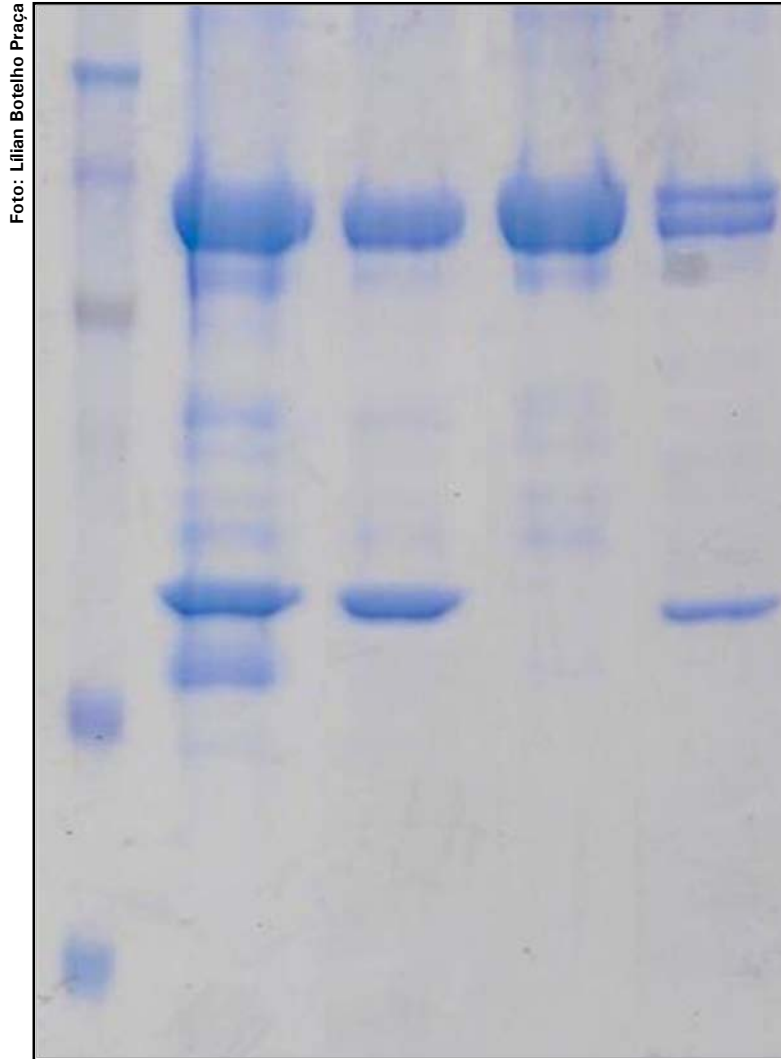


Figura 1. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) do perfil proteico de estirpes de *B. thuringiensis*.

Caracterização dos genes

PCR

A técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) tem-se mostrado eficaz para a identificação de genes em estirpes de Bt e Ls, principalmente em coleções, pois permite a identificação rápida e precisa, requer pouco DNA para análise e permite o processamento de grande número de amostras em relativamente pouco tempo.

O DNA total dos isolados é extraído segundo a metodologia descrita por Bravo *et al.* (1998). As estirpes são cultivadas em meio ágar EMBRAPA a 30°C por 16 horas. Transfere-se uma alçada de células para 100 µL de água destilada, congelada a -20°C e, em seguida, ferve-se por 10 minutos para efetuar a lise das células. Depois, centrifuga-se o material rapidamente a 12.800 x *g* por 30 segundos em microcentrifuga "Eppendorf". Transfere-se cuidadosamente o sobrenadante sem o sedimento para outro tubo "Eppendorf" e prepara-se, então, a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para a realização das PCRs, 15 µL do sobrenadante da cultura são transferidos para um tubo contendo 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de dNTP mix, tampão de Taq 1X e 2,5 U de Taq DNA polimerase.

São utilizados oligonucleotídeos gerais e específicos para a identificação de genes *Cry* (CERON *et al.* 1993, 1994; BRAVO *et al.*, 1998). A amplificação (Figura 2) é processada em termociclador de DNA e as condições das PCRs são especificadas de acordo com os pares de oligonucleotídeos. Estirpes padrão dos bacilos, como, por exemplo, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk), podem ser utilizadas como padrões.

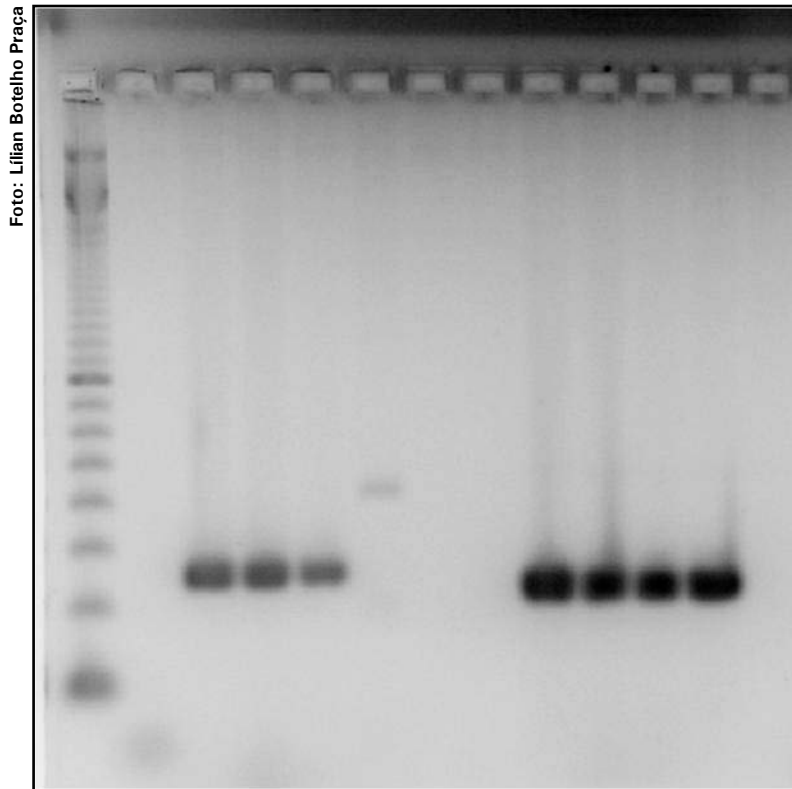


Figura 2. Gel de DNA apresentando fragmentos de genes *Cry1* de *B. thuringiensis*.

Conservação e armazenamento das estirpes

Em tubos de ensaio com meio inclinado (“Slants”)

Nesse tipo de armazenamento, as estirpes são crescidas por 72 horas em tubos de ensaio contendo meio EMBRAPA sólido, em estufa a 30°C. Depois do crescimento, as amostras são depositadas em uma gota da colônia dissolvida em solução salina em uma lâmina para visualização dos esporos e cristais e, em seguida, as amostras são conservadas a -20°C. Essas culturas devem ser repicadas a cada três meses, podendo-se ampliar esse período para até seis meses. É importante realizar um controle de qualidade, pois repicagens sucessivas podem causar a perda ou a diminuição do poder entomopatogênico, devido à possível perda de material genético.

Liofilizados

Depois do crescimento das bactérias em incubador rotativo, por 72 horas, a 28°C e 200 rpm, as amostras são visualizadas em microscópio de contraste de fase para observação de esporos e cristais dos bacilos a serem preservados. Após a visualização, as bactérias crescidas são centrifugadas a 10000 rpm, a 4°C por 30 minutos, distribuídas em tubos criogênicos estéreis de 2 mL identificados, com 400 µL da amostra por tubo, congeladas por 16 h e liofilizadas por 12 a 18 h. Em seguida, essas ampolas são lacradas, conservadas em geladeira e podem ser utilizadas por até 15 anos ou mais (Figura 3).



Fotos: Lilian Botelho Praça

Figura 3. Armazenamento em geladeira (4 – 10°C) de estirpes de *B. thuringiensis* em esporo seco liofilizado.

Em tiras de papel-filtro

As estirpes são crescidas por 48 a 72 horas em meio EMBRAPA e, em seguida, pinga-se uma gota dessa suspensão para realizar a microscopia. Após a confirmação da morfologia da bactéria, tiras de papel-filtro (Figura 3) de aproximadamente 2 cm², previamente esterilizadas em placas de Petri, são colocadas nos meios de cultura crescidos. Em seguida, são retiradas do Erlenmeyer e colocadas para secar em placas de Petri estéreis dentro da capela de fluxo laminar por cerca de 3 – 5 h. As tiras de papel-filtro são colocadas em tubos criogênicos de 5 mL e guardadas no armário da Coleção de Bactérias de Invertebrados. Essa metodologia é barata e bastante prática, pois a estocagem pode ser feita sob temperatura ambiente e as estirpes podem ficar armazenadas assim por mais de 15 anos.

Fotos: Rose Gomes Monnerat



Figura 4. Armazenamento de estirpes de *B. thuringiensis* em papel-filtro em frascos criogênicos sob temperatura ambiente.

Controle de qualidade das amostras da coleção de bactérias de invertebrados

O controle de qualidade das estirpes que são armazenadas em tiras de papel-filtro e liofilizadas da Coleção de Bactérias de Invertebrados deve ser feito uma vez ao ano. Escolhe-se aleatoriamente 1% do total de estirpes de cada um dos métodos utilizados para a conservação. As estirpes devem ser crescidas conforme o item caracterização morfológica deste volume, para observação do crescimento e visualização em microscópio de contraste de fases dos esporos e cristais de Bt e/ou Ls. O mesmo material deve ser riscado em placa de Petri com meio sólido Embrapa para observação da pureza das amostras armazenadas. Para as estirpes da coleção efetivas contra insetos-alvo, bioensaios seletivos devem ser realizados, conforme o item caracterização entomopatogênica.

O controle de qualidade é de grande importância para avaliação da viabilidade, pureza e efetividade das amostras armazenadas na coleção e da eficácia dos métodos de conservação. Esse item, inclusive, está previsto nas normas de qualidade ABNT NBR ISO/IEC 17025/2005 e no "Guidelines" para o Centro de Recursos Biológicos da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).

Referências

- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, Washington, D. C., v. 50, p. 1-24, 1986.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.
- CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryII* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 60, n. 1, 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 Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 61, p. 3826-3831, 1995.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LAMBERT, B.; LERECLUS, D.; GAWRON-BURKE, C.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* cry genes. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 28., 1995, Ithaca. **Program and abstracts...** Ithaca: Cornell University, p. 14, 1995.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: < http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ >. Acesso em: 02 jan. 2011.
- DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis*. **Entomophaga**, Paris, v. 7, n. 1, p. 5-31, 1962.
- DE BARJAC, H.; VERON, M.; DUMANOIR, V. C. Caracterization biochimique et serologique des souches de *Bacillus sphaericus* pathogenes ou non pour les moustiques. **Annales de Microbiologie**, Paris, v. 131, p. 191-201, 1980.
- DE BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. **Entomophaga**, Paris, v. 35, n. 2, p. 233-240, 1990.
- DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 27, p. 59-76, 1992.
- DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 15, p. 232-239, 1970.
- EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application**, 1989. EP 0 303 426 A2.

- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 10, p. 271-275, 1992.
- GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, Aliso Viejo, v. 37, p. 355-358, 1977.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, D. C., v. 53, p. 242-255, 1989.
- KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Berlin, v. 96, p. 500-508, 1983.
- KRONSTAD, J. W.; WHITELEY, H. R. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystalprotein genes. **Gene**, Amsterdam, v. 43, p. 29-40, 1986.
- KRYWIENCZYK, J.; DULMAGE, H. T.; FAST, P. G. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3a,3b var. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 31, p. 372-375, 1978.
- 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 Environmental and Microbiology**, [S. l.], v. 58, p. 840-849, 1991.
- LERECLUS, D.; LECADET, M. M.; RIBIER, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 186, p. 391-398, 1982.
- MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MONNERAT, R. G. **Desenvolvimento de metodologia de bioensaio de dose contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) utilizando estirpes de *Bacillus thuringiensis***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 8 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 108).
- MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; BERRY, C. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, [S. l.], v. 41, p. 291-295, 2007.
- 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, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 46).
- MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60).
- NORIS, J. R. The classification of *B. thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v. 27, p. 439-447, 1964.
- OMS. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors**. Geneva: World Health Organization, 1987. 41 p.

PRAÇA, L. B. **Prospecção de estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera.** Brasília, DF, 2003. 117 p.
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2003.

ROBERTSON, J. R.; PREISLER, H. K.; RUSSELL, R. M. **Polo Plus.** Probit and logit analysis user's guide. Petaluna, CA.: LeOra Software, 2002.

SCHENKEL, R. G. M.; FRACHON, E. Identification by gas chromatographic analysis of fatty acids of *Bacillus sp.* strains isolated from Brazilian soils. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 2., 1990, Brasília, DF. **Resumos...** Brasília: Embrapa-Cenargen, 1990. p. 97. (Embrapa-Cenargen. Documentos, 13).

SEDLANDER, R. K.; CAUGANT, D. A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J. M.; GILMOUR, M. N.; WHITTAN, T. S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 51, p. 873-884, 1986.

SOBERON, M.; BRAVO, A. Generalidades sobre *Bacillus thuringiensis*. In: **Metodologías utilizadas en investigacion sobre bacterias entomopatogenas.** Cidade do México: CYTED, 2001. 1 CD-ROM.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; TIGANO, M. S.; ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatógenos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos.** Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 731-763.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 137-161, 1991.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 549-576, 1986.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M. **Mitteilungen aus der biologischen bundesanstalt für land und forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft.** Berlin: Paul Parey, 1986. V. 233, p. 37-50.



***Recursos Genéticos e
Biotecnologia***