



NOVOS ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL PARA CONTROLE DE LARVAS DE INSETOS

Ana Paula Scaramal Riccieto¹, Fernanda A.P. Fazon¹, Luisa C. F. Helene², Laurival A. Vilas-Bôas³ Gislayne T. Vilas-Bôas⁴

RESUMO: *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria esporulante e produtora de cristais protéicos com atividade inseticida. Este bacilo compreende o organismo mais estudado e utilizado como forma de controle biológico para diversos insetos pragas agrícolas bem como vetores de doenças. A prospecção de novas linhagens e a descoberta de novos genes *cry* possibilita o desenvolvimento de novos programas de controle biológico. Este trabalho teve por objetivo isolar novas linhagens de *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo provenientes de três ambientes distintos: cultura de soja, pomar e mata ciliar, ambos situados numa área localizada na cidade de Bela Vista do Paraíso na Região Norte do Estado do Paraná. As linhagens foram caracterizadas quanto ao formato do cristal protéico via microscopia óptica e quanto à presença de genes *cry* codificantes para proteínas Cry com ação entomopatogênica frente a diferentes ordens de insetos por PCR. Ao todo foram coletadas e processadas 38 amostras de solo, tendo sido depositados 22 novos isolados no Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina. Tais isolados foram analisados por PCR, permitindo a detecção de sete genes *cry*, codificantes para proteínas Cry com ação entomopatogênica frente a insetos de três importantes Ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. A prospecção de novas estirpes e a descoberta de novos genes *cry* vem contribuir para a ampliação dos bancos de linhagens já existentes, contribuindo para o desenvolvimento de novos programas de manejo de pragas, reduzindo o uso de inseticidas sintéticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*; controle biológico; genes *cry*; prospecção.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria formadora de endósporo, que durante a esporulação forma um corpo cristalino parasporal, composto de proteínas conhecidas como Cry ou δ -endotoxinas (Vilas-Bôas et al., 2004). As toxinas Cry constituem uma família de proteínas que possuem ação entomopatogênica com especificidade de ação

¹ Mestranda do Programa de Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, UEL – Londrina-PR. Bolsista CAPES. ricietto@hotmail.com

² Colaboradora do Laboratório de Genética e Taxonomia de microrganismos da Universidade Estadual de Londrina, UEL – Londrina-Pr. lully_verdevale@hotmail.com

³ Orientador, Professor Doutor do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, UEL – Londrina-PR. laurival.vboas@gmail.br

⁴ Orientador, Professor Doutor do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, UEL – Londrina-PR. gvboas@uel.br

para insetos de diferentes ordens como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, e Mallophaga, bem como alguns nematóides.

O uso de bactérias entomopatogênicas como o *B. thuringiensis* em programas de controle biológico tem se sido adotado como alternativa ao uso de inseticidas sintéticos devido ao seu poder inseticida. Inseticidas químicos em geral são tóxicos e podem causar problemas ambientais quando usados indevidamente, além de problemas a seleção de insetos resistentes, levando ao uso mais intenso deste agroquímicos, além de desenvolvimento de novos formatos, aumentando o custo financeiro e ambiental (Bravo et al., 1998).

Uma das principais linhas de pesquisa na área do controle biológico de pragas com *B. thuringiensis* é a seleção de novos isolados, bem como novos perfis de toxicidade aos insetos alvo, permitindo o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, estimulando novos estudos que visem selecionar novas linhagens de bactérias entomopatogênicas.

Uma vez que linhagens de *B. thuringiensis* têm sido identificadas a partir de amostras de solos, filoplano, insetos e grãos estocados (Vilas-Bôas et al., 2004), o presente estudo tem como objetivo o isolamento e a ampliação do Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina, bem como a seleção de linhagens que apresentem melhor eficiência para o controle de pragas de lavouras e vetores de doenças.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção de novos isolados de *B. thuringiensis* foram coletadas amostras de solo a partir de áreas de pomar, áreas agrícolas com cultivo de soja e solos de áreas de mata ciliar perfazendo um total de 38 amostras provenientes da cidade de Bela Vista do Paraíso, região norte do Paraná. Para cada amostra, foram coletadas entre 5 – 10 g de solo que foram transferidas para tubos plásticos e armazenadas à 4° C até o processamento destas. O isolamento de linhagens de *B. thuringiensis* foi realizado de acordo com o método descrito por Ohba e Aizawa (1986). Um grama de amostra de solo foi suspenso em 10 mL de água destilada esterilizada. As suspensões foram mantidas sob agitação por 20' e tratadas a 80° C em banho-maria durante 20'. Após, foram diluídas 10x e semeadas em placas de Petri contendo meio ágar nutriente (Biobrás), as quais foram incubadas à 30°C por 5 dias. Após cultivo, colônias com morfologia típica do grupo do *B. thuringiensis* foram selecionadas e posteriormente analisadas por observação ao microscópio óptico, com aumento de 100X, onde foi verificado da presença de cristais, confirmando pertencer a espécie. As linhagens de *B. thuringiensis* isoladas foram estocadas na forma esporulada, à temperatura ambiente em tiras de papel filtro para posteriormente serem utilizadas na realização dos bioensaios e caracterização molecular. Amostras de DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foram extraídas pelo método de Hansen & Hendriksen (2001). Os isolados foram cultivados por 15 h / 30°C em placas contendo meio Luria-Bertani (LB). Com o auxílio de um palito esterilizado, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para microtubos contendo 200 µL de TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA; pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria sob fervura por 10 min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos. A solução resultante foi utilizada para as reações de amplificação por PCR. A presença dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10* e *cry11* foi analisada por meio da técnica de PCR utilizando iniciadores específicos. A amplificação do DNA foi realizada em Termociclador Techne TC-512, onde cada reação foi preparada em um volume total de 25 µL, contendo 1 U de *Taq* Dna polimerase (Invitrogen, Brasil), 2,5 µL de tampão 10 x (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTP, 0,5 µM de cada iniciador,

2 µL do DNA extraído e água Milli-Q esterilizada. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) corados com Syber Safe (Invitrogen, Inglaterra) usando marcador de 100 pb DNA ladder (Invitrogen, Inglaterra) como referência.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram coletadas e processadas 38 amostras de solo provenientes de três ambientes distintos: 11 de mata ciliar, 12 de pomar e 15 de cultura de soja, localizados na cidade de Bela Vista do Paraíso, região norte do Estado do Paraná. O procedimento permitiu a seleção de 22 isolados de *B. thuringiensis*, confirmado pela presença dos cristais. Foram obtidos um (4,56%) isolado a partir das amostras de mata ciliar, nove (40,9%) de pomar e 12 (54,54%) a partir das amostras de cultura de soja. A diversidade e frequência de isolamento de linhagens de *B. thuringiensis* pode ser resultado do comportamento cosmopolita desta bactéria, assim como o nicho utilizado para sua multiplicação e troca de material genético, bem como os ambientes reservatórios. As alterações ambientais que os isolados de *B. thuringiensis* estão sujeitos como diversos fatores ecológicos, como a presença de microrganismos no solo, o tipo de inseto encontrado na área, ou o tipo de cobertura vegetal, além de fatores abióticos como pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, temperatura e umidade (Vilas-Bôas et al., 2004; Bravo et al., 1998). A morfologia dos cristais de uma linhagem, avaliado por microscopia, pode fornecer informações sobre sua atividade inseticida (Martin & Travers, 1989). Em geral, cristais bipiramidais estão associados à presença da proteína Cry1, ativa contra lepidópteros, cristais cubóides relacionados à proteína Cry2, eficaz contra lepidóptero-dípteros, cristais rombóides à ação da proteína Cry3 ativa contra coleópteros (Melatti, 2008; Roh et al., 2007). A linhagem BR145 foi a única a apresentar cristais bipiramidais (Fig.1), no entanto foram observados cristais com formato, esférico, irregular e microcristais, formatos já relatados na literatura (Roh et al., 2007).

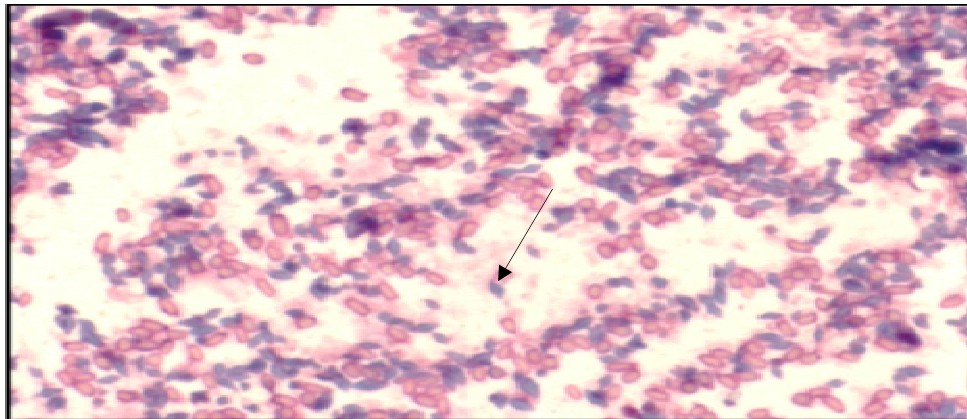


Figura 1: Lâmina do isolado BR 145 evidenciando cristais bipiramidais

O uso da técnica de PCR, com iniciadores para a detecção de genes *cry1*, *cry2*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10* e *cry11* permitiu amplificar fragmentos conforme reportado pelos autores Bravo et al., 1998; Céron et al., 1995, Ibarra et al., 2003 e Vidal-Quist et al., 2009. A linhagem BR145 (Tab.1) provavelmente apresenta atividade entomopatogênica contra insetos da Ordem Lepidoptera em função do gene *cry1*, como também pela presença do gene *cry2* (Ibarra et al., 2003).

Tabela 1: Isolados de *B. thuringiensis* e seus respectivos genes *cry* confirmados por PCR.

| Linhagem | <i>cry1</i> geral | <i>cry2</i> geral | <i>cjIII20-21</i> (<i>cry3</i>) | <i>cry4A</i> | <i>cry4B</i> | <i>cry10spe</i> | <i>cry11</i> geral |
|----------|-------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------|--------------|-----------------|--------------------|
| BR145 | + | + | + | + | | | + |
| BR146 | | | | + | + | + | + |
| BR147 | | | | + | + | + | + |
| BR149 | | | + | | | | |
| BR151 | | | + | | | | |
| BR152 | | | | | + | + | + |
| BR153 | | | | | + | + | + |
| BR154 | | | | + | + | + | + |
| BR155 | | | | + | + | + | + |
| BR156 | | | | | | + | + |
| BR157 | | | | + | + | + | + |
| BR158 | | | | + | + | + | + |
| BR159 | | | | + | + | + | + |
| BR160 | | | | + | + | + | + |
| BR161 | | | | + | + | + | + |
| BR162 | | | + | | | | |
| BR163 | | | | + | + | | |
| BR164 | | | + | | | | |
| BR165 | | | | + | + | + | + |
| BR166 | | | | + | + | + | + |

[+] presença do gene *cry* indicado.

Os fragmentos esperados para a presença do gene *cry3* foram verificados nas linhagens BR145, BR149, BR151, BR162 e BR164. Estas linhagens são provavelmente entomopatogênicas para insetos da Ordem Coleoptera, cujos insetos são tipicamente sensíveis à ação das proteínas codificadas pelos genes *cry3*. A combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* foi encontrada em três isolados, não sendo observada a presença de *cry10*. A combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt2* em apenas um isolado, as quais são semelhantes àquelas encontradas em *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry10* e *cry11* foi observada em 11 isolados (Tabela 1) mostrando que estas linhagens têm perfis gênicos semelhantes ao *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Além das 11 linhagens que confirmaram a combinação acima, outras duas linhagens apresentaram a combinação similar *cry4B*, *cry10* e *cry11*, Br 152 e Br 153, não foi verificado a presença do gene *cry4A* e uma outra linhagem, Br 156, foi confirmada a presença apenas dos genes *cry10* e *cry11*.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, a prospecção de isolados de *B. thuringiensis* agregou 22 novos isolados ao Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina. Tais isolados foram analisados por PCR, permitindo a detecção de sete genes *cry*, codificantes para proteínas Cry cuja ação entomopatogênica frente a insetos de três importantes Ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera é conhecida. A análise dos

resultados permite o direcionamento dos experimentos de verificação da atividade entomopatogênica das linhagens.

REFERÊNCIAS

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., and QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 64, nº 12, p. 4965 – 4972, 1998:

CÉRON, J., ORTÍZ, A., QUINTERO, R., GÜERECA, L. and BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cry1* and *cry3* genes within a *Bacillus thuringiensis* strains collection. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 61, nº 11, p.3826 – 3831, 1995.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysys. *Applied Environmental Microbiology*, v.67, p. 185-189, 2001.

IBARRA, J.E., RINCÓN, M.C.D., ORDÚZ, S., NORIEGA, D., BENINTENDE, G., MONNERAT, R., REGIS, I., OLIVEIRA, C.M.F., LANZ, H., RODRIGUEZ, M.H., SÁNCHEZ, J., PEÑA, G., and BRAVO, A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 69, nº 9, p. 5269 – 5274, 2003

MARTIN, P., and TRAVERS, R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. vol.55, nº 10, p. 2437 – 2442, 1989

MELATTI, V.M. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro *Aphis gossypii*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), p. 120.– Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008.

OHBA, M. and AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 277-282, 1986.

ROH, J.Y., CHOI, J.Y., LI, M.S., JIN, B.R., and JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 547 – 559, 2007.

VIDAL-QUIST, J.C., CASTAÑERA, P., and GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitits capitata*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 749 – 759, 2009.

VILAS-BÔAS, G.T., and LEMOS, M.V.F. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50: 605 – 613, 2004.