

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE 27 CEPAS EFICIENTES DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA A LAGARTA DO CARTUCHO, *Spodoptera frugiperda*.

Maria Isabella Santos Leite¹, Fernanda Lyon Freire¹, Corina Macedo Vieira¹, Fernando Hercos Valicente¹.

¹Núcleo de Biologia Aplicada, EMBRAPA/CNPMS, Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas/ MG, e-mail: maryisabella@yahoo.com.br, fernandalyon@hotmail.com, corina_biologia@yahoo.com.br, valicent@cnpm.br.

1- INTRODUÇÃO

O controle biológico é definido como a ação de inimigos naturais sobre uma população de praga, resultando numa posição geral de equilíbrio mais baixa do que prevaleceria na ausência daqueles (Gravena, 1992). O controle microbiano é um ramo do controle biológico que objetiva principalmente a redução ou manutenção da população de pragas em um nível inferior ao de dano econômico, dentro do contexto do manejo integrado de pragas (Alves, 1998; Gallo et al., 2002).

Como alternativa ao emprego de inseticidas químicos, existe um grande complexo de inimigos naturais com potencial para constituir novas táticas de controle a *Spodoptera frugiperda*, uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil, que venham a minimizar ou substituir a utilização dos inseticidas convencionais (Ashley, 1979; Ferraz, 1998; Gallo et al., 2002; Gardner et al., 1984). Esses inseticidas são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação com consequências graves ao homem e ao meio ambiente dentre elas a seleção de uma gama de populações de insetos resistentes. Já os biopesticidas, são vantajosos por apresentarem alta especificidade e virulência à praga alvo, evitando desta forma que outros invertebrados sejam, afetados o que consequentemente causaria um desequilíbrio ecológico.

O ataque da *Spodoptera frugiperda* à cultura do milho pode reduzir em até 34% a produção de grãos e causam danos por consumirem as folhas. Elas ficam localizadas no cartucho de plantas jovens e por isso são comumente chamadas de lagarta-do-cartucho. O local estratégico e de difícil acesso dificulta o combate e facilita seu sucesso com herbívoros. As larvas mais novas consomem os tecidos das folhas de um lado e deixam a epiderme oposta intacta. Quando atingem o segundo ou terceiro instar as larvas começam a fazer buracos nas folhas, alimentando-se delas e geralmente produzem uma típica fileira de perfurações. A densidade de larvas no cartucho normalmente é reduzida a uma ou duas, devido a seu comportamento canibal. Seu ciclo de vida é completado em 30 dias em condições de laboratório, e o número de ovos pode variar de 100 a 200 ovos por postura / fêmea, sendo que um total de 1500 a 2000 ovos podem ser colocados por uma única fêmea.

Entre os patógenos que podem ser usados contra essa praga, destaca-se o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Bacillacea), que é uma bactéria gram positiva, encontrada no solo, na água e em insetos mortos. Durante seu processo de esporulação essa bactéria é capaz de produzir inclusões cristalinas ou cristais protéicos que são os responsáveis pela atividade tóxica da espécie e pela sua alta especificidade à praga alvo (Glare e O'Callaghan, 2000). Ao serem solubilizados, pelo pH alcalino do intestino médio (mesentero) do inseto, esses cristais liberam toxinas que são proteoliticamente ativas e lá se ligam a sítios de receptores

específicos localizados nas membranas das células colunares, modificando suas conformações e interferindo conseqüentemente no transporte de íons e no balanço osmótico. Esse desequilíbrio conduz a desintegração do mesentero com posterior morte do inseto. Essas toxinas expressas são codificadas pelos genes *cry* e seu potencial inseticida deve-se a região N-terminal das cadeias polipeptídicas (Li et al., 1991).

Por esta razão, esses genes tornaram-se alvos de estudos no objetivo de se tentar selecionar cepas de *Bt* que sejam eficientes no controle biológico de *Spodoptera frugiperda*. Neste trabalho fizemos a caracterização molecular de 27 cepas eficientes de *Bt* contra essa praga.

2- MATERIAL E MÉTODOS

A caracterização gênica das 27 cepas de *Bt* foi feita através da PCR (reação da polimerase em cadeia) com *primers* específicos. Além desta, foi realizada também uma caracterização das proteínas de algumas dessas cepas de *Bt*.

As cepas foram obtidas através do isolamento feito no Laboratório de Controle Biológico, da EMBRAPA Milho e Sorgo Sete Lagoas – MG, provenientes de lagartas mortas e de amostras de solo de diversas regiões do Brasil. Após isso, fez-se um repique dessas amostras em placas de petri contendo ágar nutriente. Estas foram crescidas por 12h ou overnight e no dia seguinte uma alçada de bactérias foi transferida para um microtubo contendo água milliQ. Para a extração do DNA dos microorganismos, os microtubos foram colocados no freezer à -80°C por 15 minutos e imediatamente depois colocados em água fervente por 10 minutos. Após este período, 5 µl foram usados como amostra de DNA na mistura para PCR. Na solução final para uso em termociclador foram usados também 0,25 µl da enzima Taq DNA polimerase, 0,5 µl de cada um dos *primers* específicos, 1 µl de desoxynucleosídeos trifosfatos (d NTP's), 2,5 µl de buffer e de cloreto de magnésio e em seguida o volume final foi completado para 25 µl usando água ultra pura. A amplificação foi realizada em termociclador usando uma etapa de desnaturação única (2 minutos a 95°C), seguida de 30 ciclos (cada ciclo composto por uma fase de desnaturação a 95°C por 1 min., uma de hibridação a 48°C por 1 min. e uma extensão a 72°C por 1 min.). A temperatura de hibridação para o *primer cryI Ab* foi de 40°C, para *cryI B*, *cryI C* e *cryI D* foi de 56°C e para os *primers cryI E* e *cryI F* foi de 57°C. Foi também realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Após a amplificação um total de 25 µl de cada amostra da PCR foi corada com 5 µl de corante e corridas em gel de agarose 3% por 120 minutos a 110 v. Para revelar o gel, corou-o em solução de brometo de etídio. Foram usados dois padrões de 50 pares de bases em cada um dos géis para analisarmos os tamanhos das bandas geradas.

Para a segunda etapa da caracterização molecular de cepas eficientes de *Bt* realizou-se uma análise de proteínas utilizando protocolo já padronizado no Laboratório de Controle Biológico – NBA. Este protocolo é dividido em três partes e a primeira permite a identificação das proteínas totais das cepas, a segunda a identificação das pró-toxinas e a terceira a identificação das toxinas ativas. Para revelar os resultados, as amostras foram corridas em gel de poliacrilamida 10% com sobre-gel 6% que correu a 120 v por aproximadamente 120 minutos. Nesta caracterização 16 cepas foram analisadas e comparadas a um padrão que variou de 30 a 200 KDa.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que a maioria das 27 cepas apresentou o gene *cryI E* cujo peso molecular do produto da PCR é de 147 pares de bases. Já para o gene *cryIF* apenas a cepa 1644 teve o fragmento de 170 pares de bases amplificadas, esses resultados estão representados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

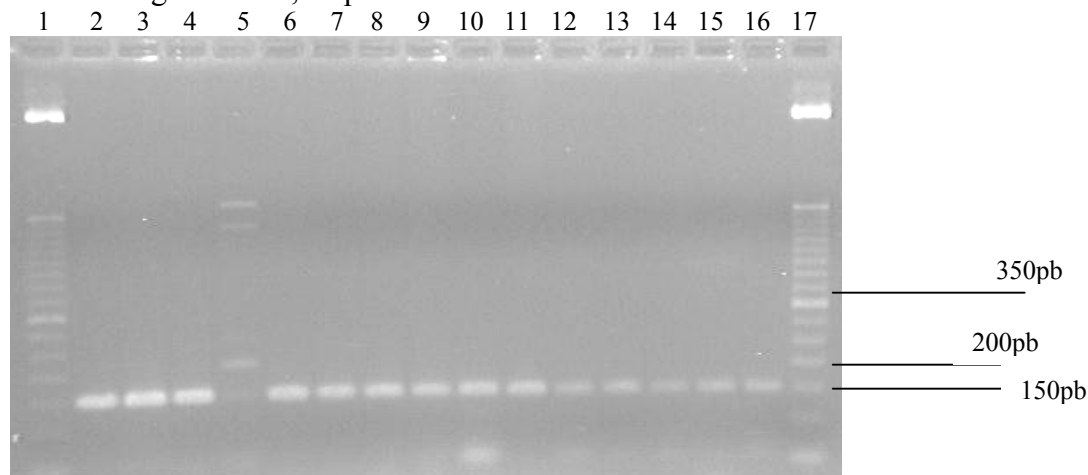


Figura 1: Exemplo do padrão de bandas obtido via PCR de 27 cepas de *Bt* utilizado *primers* específicos. Canaletas 1 e 17: marcador, canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 as cepas T 09, 344, HD 125, 1644, 426, S460, S461 A, S 462 A, BT LM, 566 BLR, 701 A, 701 B, 1119 C, 1124 E, 1131 A, respectivamente.

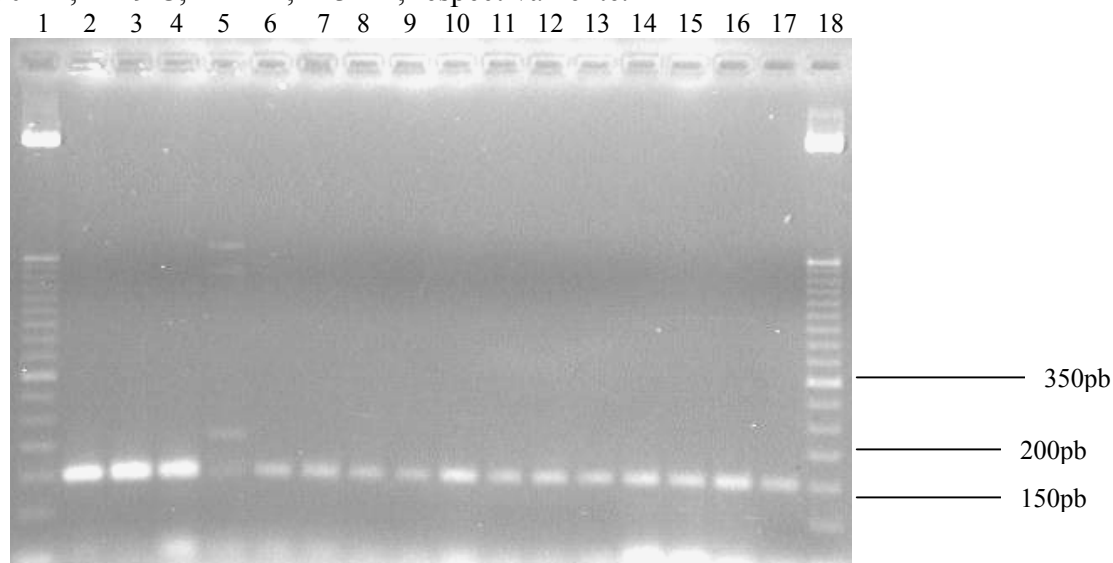


Figura 2: Canaletas 1 e 18: marcador, canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 as cepas T 09, 344, HD 125, 1644, 1131 C, 1132 A, , 1132 C, 1138G, 1109 N, 1145 B, 1145 C, 1132 E, 1148 F, 1135 B, 1136 B, 1139 respectivamente.

Para os genes *cryI B*, *C* e *D* os géis mostraram que apenas a cepa 1644 apresentou bandas de 290 e 130 pares de bases correspondentes aos pesos moleculares dos produtos da PCR para os genes *cryI C* e *D*. Já para o gene *cryI B* parte da amostra teve o fragmento de 367 pares de bases amplificado conforme as figuras 3 e 4.

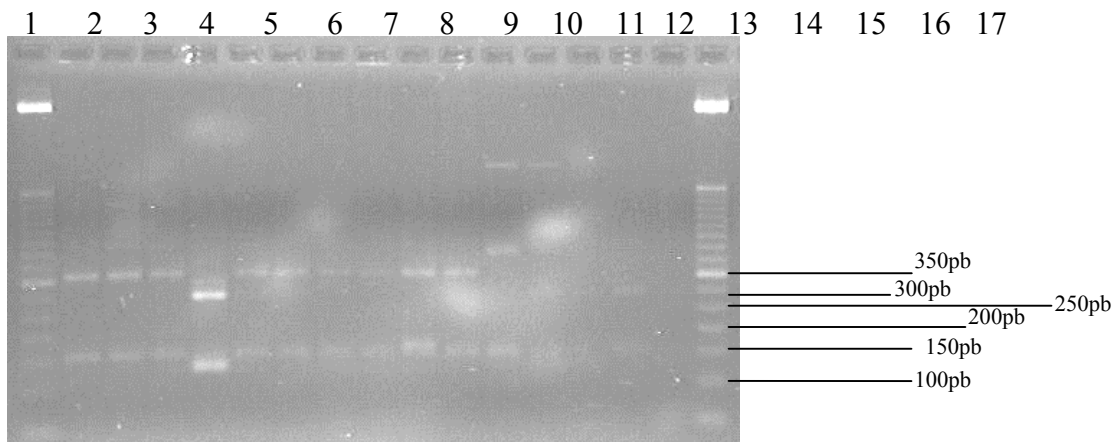


Figura 3: Canaletas 1 e 17: marcador, canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 as cepas T 09, 344, HD 125, 1644, 426, S460, S461 A, S 462 A, BT LM, 566 BLR, 701 A, 701 B, 1119 C, 1124 E, 1131 A respectivamente.

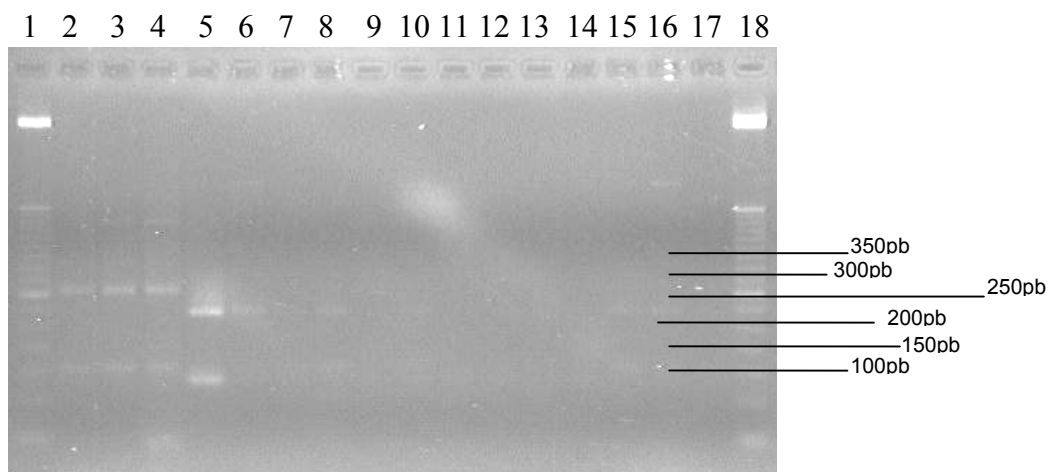


Figura 3: Canaletas 1 e 18: marcador, canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 as cepas T 09, 344, HD 125, 1644, 1131 C, 1132 A, , 1132 C, 1138G, 1109 N, 1145 B, 1145 C, 1132 E, 1148 F, 1135 B, 1136 B, 1139 respectivamente.

As figuras 5 e 6 mostram a amplificação para o gene *cryI Ab*, cujo fragmento é de 418 pares de bases. O marcador utilizado foi de 50 pares de bases.

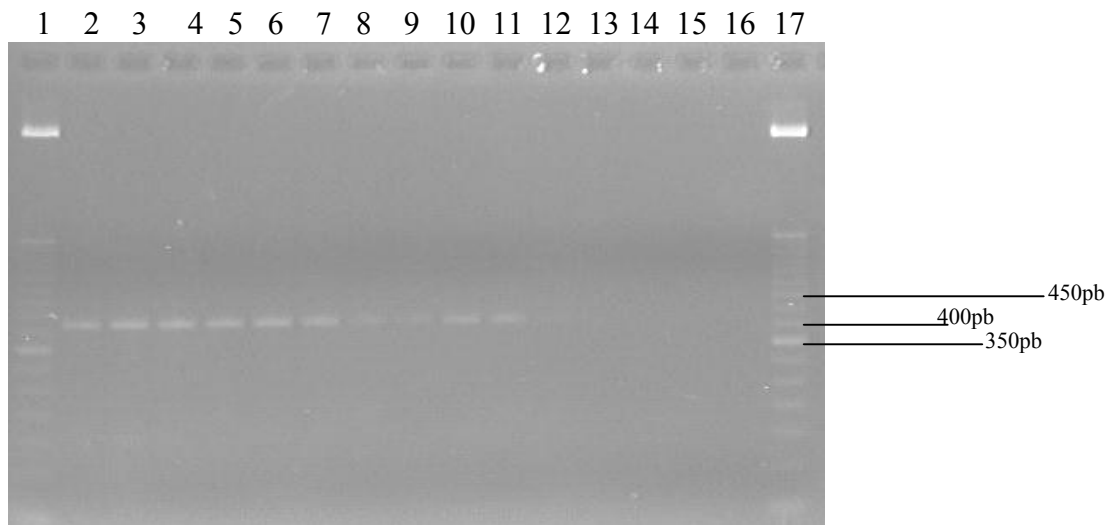


Figura 5: Canaletas 1 e 17: marcador, canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 as cepas T 09, 344, HD 125, 1644, 426, S460, S461 A, S 462 A, BT LM, 566 BLR, 701 A, 701 B, 1119 C, 1124 E, 1131 A respectivamente.

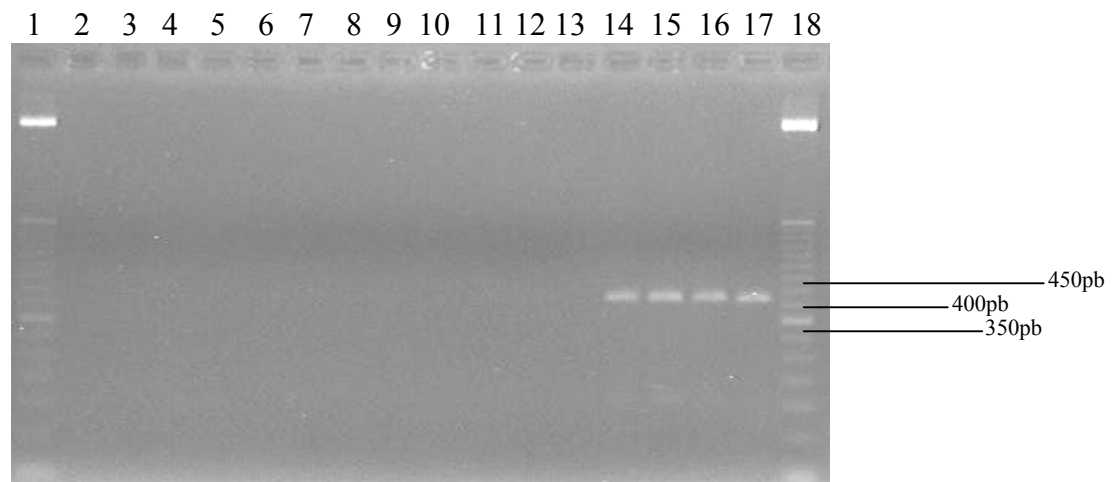


Figura 6: Canaletas 1 e 18: marcador, canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 as cepas 1131 C, 1132 A, , 1132 C, 1138G, 1109 N, 1145 B, 1145 C, 1132 E, 1148 F, 1135 B, 1136 B, 1139, T 09, 344, HD 125, 1644 respectivamente.

A análise de proteínas mostrou que as cepas apresentaram proteínas cujos fragmentos tóxicos são de 66 e, pró-toxinas de 116KDa conforme as figura 7.

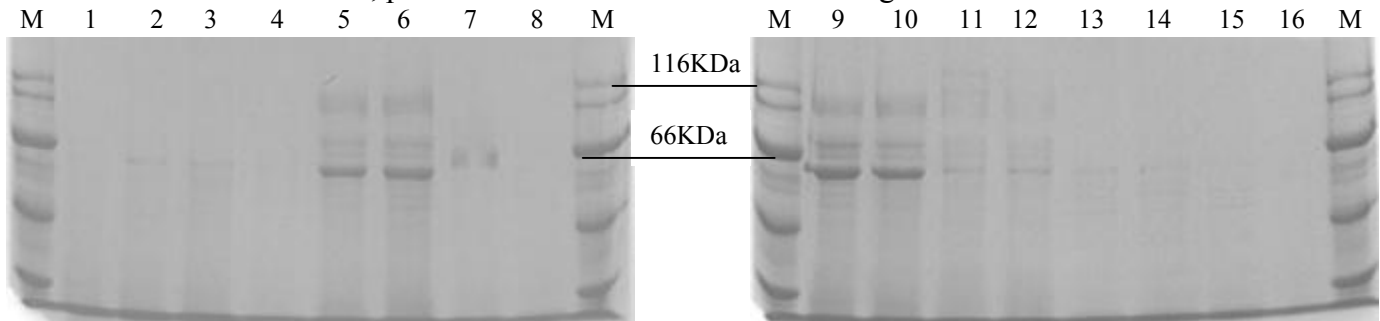


Figura 7: Padrão de bandas obtido na análise de proteína. As canaletas representam respectivamente as cepas: T09, 344, HD125, 1644, 426, S460, 1131C, 1132A, S461A, S462A, BT LM, 566BLR, 1132A, 1138G, 1109N, 1145B.

Após a tripsinagem, o fragmento tóxico foi de 66KDa, como mostra figura abaixo.

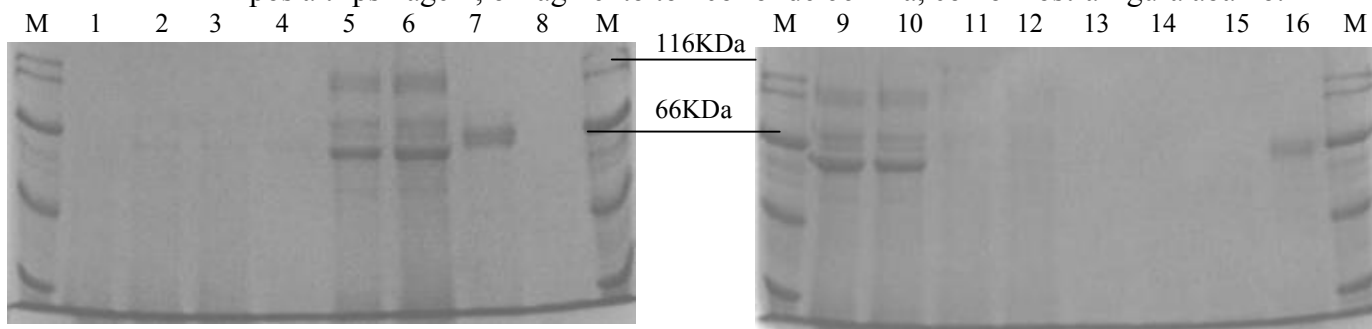


Figura 8: Padrão de bandas obtido na análise de proteína. As canaletas representam respectivamente as cepas: T09, 344, HD125, 1644, 426, S460, 1131C, 1132A, S461A, S462A, BT LM, 566BLR, 1132A, 1138G, 1109N, 1145B.

4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. B. Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998; cap. 1; p.21-38.

ASHLEY, T. R. Classification and distribution of fall armyworm parasites. Florida Entomologist, v.62, n.1, p.114-123, 1979.

FERRAZ, L. C. C. B. Nematóides entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.). Controle microbiano de insetos. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p.541-570.

GALLO, D., O. HAKANO, S. SILVEIRA NETO, R. P. L. CARVALHO, G. C. DE BAPTISTA, E. BERTI FILHO, J. R. P. PARRA, R. A. ZUCCHI, S. B. ALVES, J. D. VENDRAMIM, L. C. MARCHINI, J. R. S. LOPES, C. OMOTO. Entomologia Econômica. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARDNER, W. A.; NOBLET, R.; SCHWEHR, R. The potencial of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomologist, v.67, n.3, p.325-332, 1984.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. 2000. *Bacillus thurigiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: Jonh Wiley, 350p.

GRAVENA, S. Controle biológico no manejo integrado de pragas. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.27, n.3, p.281-300, 1992.

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. 1991. Cristal structure of insecticide delta-endotoxina from *bacillus thuringiensis* at 2,5 A resolyution. Nature, v.353, n.7, p.815-821.