



**CARACTERIZAÇÃO ENTOMOPATOGÊNICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE  
*Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO BICUDO DO ALGODOEIRO.  
(*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**

Lílian Botelho Praça (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / lilian@cenargen.embrapa.br), Vinicius Fiuza Dumas (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - UnB), Felipe Rosa Ramos (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), Érica Soares Martins (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - UnB), Rose Gomes Monnerat (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

**RESUMO** - A utilização de plantas transgênicas com genes de *Bacillus thuringiensis* tem gerado um bom nível de controle contra algumas pragas de importância agrícola em todo o mundo. A Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia possui em torno de 2.300 estirpes de *Bacillus spp.*, armazenadas no Banco de Bactérias Entomopatogênicas, com possibilidade de serem utilizadas como doadoras de genes para construção de plantas transgênicas. Diante disto 300 estirpes foram testadas contra larvas de *Anthonomus grandis* a fim de se determinar quais seriam efetivas. Deste total foram selecionadas quatro estirpes de *B. thuringiensis*, denominadas S601, S906, S907 e S1806, que apresentaram resultados promissores contra o bicudo do algodoeiro. Estas estirpes foram caracterizadas por métodos bioquímicos e moleculares. As duas primeiras apresentaram uma forte banda de 130 kDa e produtos de PCR de tamanho esperado para a detecção de genes *cry1*. Já a estirpe S1806 apresentou perfil protéico de 129, 65 e 29 Kda e produtos de PCR de tamanho esperado para a detecção de genes *cry4*, *cry11*, *cry10*, *cyt1* e *cyt2*. As estirpes S601, S906 e S907 apresentaram resultado de  $LC_{50}$  inferiores ao do padrão *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt) para coleópteros, enquanto a estirpe S1806 apresentou-se semelhante ao padrão Btt.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, *Anthonomus grandis*, estirpes

**ENTOMOPATHOGENIC, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* STRAINS toxic to BOLL WEEVIL (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**

**ABSTRACT** - The use of *Bacillus thuringiensis* genes in transgenic plants has generated a good level of control against several pests of important crops in the world. Embrapa Genetic Resources and Biotechnology has 2.300 *Bacillus spp.* strains stored in the Bank of Entomopathogenic Bacteria with potential to be used as genes donors for transgenic plants construction. Three hundred of these strains had been tested against *Anthonomus grandis* larvae in order to determine which one could be effective. Four strains of *B. thuringiensis* had been selected S601, S906, S907 and S1806 for its high toxicity to boll weevil. These strains have been characterized by biochemical and molecular methods. S601, S906 and S907 presented a main protein of 130 KDa and PCR products with expected sizes for the detection of the genes *cry1*. S1806 presented proteins of 129, 65 e 29 KDa and PCR products with expected size for the detection of the genes *cry4*, *cry11*, *cry10*, *cyt1* e *cyt2*. S601, S906 and S907 strains presented lower  $LC_{50}$  compared to *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (Btt), that was used as standard and the  $LC_{50}$  of S1806 was similar to Btt.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, *Anthonomus grandis*, strains



## INTRODUÇÃO

O algodão é um cultivo de grande importância econômica e situa-se entre as dez maiores fontes de riqueza no setor agropecuário brasileiro, ocupando o sexto lugar em superfície cultivada no Brasil. Contudo, desde meados da década de 80, seu cultivo vem sofrendo sérios problemas de ordem agrícola e conjuntural (CRUZ e PASSOS, 2002), passando o Brasil de grande exportador para grande importador de fibras do algodão (SANTOS e SANTOS, 1997).

Entre os principais fatores de ordem agrícola que contribuíram para o decréscimo na produção do algodão no Brasil, é grande vulnerabilidade às pragas, sendo o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843), considerado a principal praga dos algodoeiros nas Américas (BUSOLI *et al.*, 1994; GALLO *et al.*, 2002). Todas as fases imaturas deste inseto se desenvolvem no interior das estruturas de frutificação de plantas hospedeiras e, desta forma, o bicudo está protegido de inúmeros inimigos naturais, das condições adversas do meio ambiente e da ação eficaz dos inseticidas (BUSOLI *et al.*, 1994). Desta forma, em todo o mundo, se procuram formas alternativas para o controle desta praga, que sejam menos prejudiciais ao ser humano e ao ambiente. A obtenção de algodão transgênico, contendo gene ou genes de resistência ao bicudo, vem surgindo como uma possibilidade na redução de insumos químicos para o estabelecimento da lavoura, uma vez que as toxinas de *Bacillus thuringiensis* possuem atividade entomopatogênica contra esta ordem de insetos. Essas toxinas são compostas por proteínas denominadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry (MONNERAT *et al.*, 2000). As proteínas Cry apresentam ação extremamente tóxica para larvas de várias ordens como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari (FEILTEISON, 1994). A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia conta com um banco de Bacilos entomopatogênicos (MONNERAT *et al.*, 2001), onde estão armazenadas 2.300 estirpes de *Bacillus* spp.

O objetivo deste trabalho foi identificar estirpes de *B. thuringiensis* que apresentem atividade entomopatogênica para o bicudo do algodoeiro, que poderão ser utilizadas como fonte de genes para a construção de uma planta geneticamente modificada.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 300 estirpes de *B. thuringiensis*, previamente selecionadas por bioensaios seletivos, pertencentes ao banco de *Bacillus* spp. Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas estirpes são originárias de amostras de solo e água de diferentes regiões do país (MONNERAT *et al.*, 2001).

As estirpes que apresentaram os melhores resultados foram utilizadas em bioensaios de dose para cálculo de CL<sub>50</sub> (MARTINS *et al.*, 2004). Além disso, estas estirpes tiveram seu perfil protéico determinado por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) que permitiu identificar as proteínas produzidas pelas estirpes. As proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet *et al.* (1991). Para comparação dos resultados, a estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi utilizada como padrão. Para identificar os genes codificadores das toxinas foi realizada a caracterização molecular através de PCR, usando diferentes oligonucleotídeos para detecção dos genes *cry* e *cyt* (Ceron *et al.*, 1995). A metodologia de extração de DNA foi descrita por Bravo *et al.* (1998). Todas as reações se processaram em tubos de polipropileno de 0,2 mL, em um termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100™).



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes avaliadas foram agrupadas em dois grupos estatisticamente distintos. As estirpes S601, S906 e S907 foram classificadas como grupo A por demonstrarem os melhores resultados de  $CL_{50}$ , que foram de 0,146, 0,163 e 0,275 mg/mL, sendo mais tóxicas que o padrão *Bacillus thuringiensis* susp. *tenebrionis* (Btt). A estirpe Btt e a S1806 foram classificadas como pertencentes ao grupo B com  $CL_{50}$  respectivamente de 0,328 mg/mL e 0,306 mg/mL, não diferindo estatisticamente entre si. (Tab. 1).

**Tabela 1.**  $CL_{50}$  das estirpes de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *A grandis*

Estirpes	$CL_{50}$ (mg/mL)	Intervalo de confiança 95%	Homologia
S601	0,146	0,117-0,174	A
S906	0,163	0,096-0,229	A
S907	0,275	0,106-0,459	A
S1122 (Btt)	0,328	0,230-0,440	B
S1806	0,306	0,253-0,362	B

As estirpes S601, S906 e S907 além de se destacarem pelo seu resultado de  $CL_{50}$ , apresentaram perfil protéico (Tab. 2) bastante diferenciado da estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* (S1122 – Btt) contra coleópteros, com uma forte banda de 130 kDa e outras bandas de menor densidade. A estirpe S1806 também se destacou por se tratar de uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), com atividade descrita para dípteros, corroborando com alguns trabalhos já realizados por outros grupos de pesquisa, que têm demonstrando a atividade de estirpes de Bti ativas a insetos da ordem Coleoptera. Quanto à caracterização molecular (Tabela 2), as estirpes S601, S906 apresentaram gene *cry1* e a S1806 apresentou genes semelhantes ao da estirpe padrão para dípteros (Bti), apenas a estirpe padrão para coleópteros (Btt) apresentou produto de PCR para o gene *cry3*, demonstrando que nenhuma das estirpes se assemelha ao Btt com relação às características moleculares e bioquímicas.

**Tabela 2.** Perfis protéicos e genes presentes nas estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Estirpes	Perfil protéico (kDa)	Genes <i>cry</i>
S601	130	<i>cry1</i>
S906	130	<i>cry1</i>
S907	130	<i>cry1</i>
S1122 (Btt)	130 – 75	<i>cry3, cry8</i>
S1806	129 – 65 – 29	<i>cry4, cry10, cry11, cyt1 e cyt2</i>



V CONGRESSO  
BRASILEIRO  
DE ALGODÃO

## CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou a identificação de quatro estirpes patogênicas ao bicudo do algodoeiro, diferentes do padrão, fato este importante no manejo de pragas agrícolas. As estirpes S601, S906 e S907 foram as mais efetivas e apresentaram resultados superiores ao padrão. Estas apresentaram proteína de 130kDa e produtos de PCR para a detecção de genes *cry1*. Novos estudos deverão ser conduzidos para se estudar os genes específicos para confirmar quais as toxinas responsáveis pela toxicidade ao bicudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, 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**, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BUSOLI, A. C.; SOARES, J. J.; LARA, F. M. **O bicudo do algodoeiro e seu manejo**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 32 p. (Boletim, 5).

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

CRUZ, V. R. da.; PASSOS, S. M. de G. **Algodão (*Gossypium hirsutum*)**. Disponível em: <[http://www.agrocasa.com.br/Arquivos\\_culturas/Culturas/ALGOD%C30.HTM](http://www.agrocasa.com.br/Arquivos_culturas/Culturas/ALGOD%C30.HTM)>. Acesso em: 12 set. 2002.

FEITELSEN, J. S.; PAYNE, J & KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

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

LECADET, M. M.; CHAUFaux, J.; RIBIER, J. LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991.

MARTINS, E. S., PRAÇA, L. B., DUMAS, V. F.; MONNERAT, R. G. **Desenvolvimento de metodologia de bioensaio de dose contra o bicudo do algodoeiro utilizando estirpes de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa- Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 8 p. (Comunicado Técnico, 108).



MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v. 3, 2000. p.163-200.

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

SANTOS, R. F.; SANTOS, J. W. Crise na cadeia produtiva do algodão. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, v. 1, n. 1, p. 25-36, 1997.