

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Identificação Através de PCR dos Genes *CryI* de Cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner Eficientes Contra a Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

FERNANDO H. VALICENTE, MARLITON R. BARRETO, MARIA J. V. DE VASCONCELOS,
JOSÉ E.F. DE FIGUEIREDO E EDILSON PAIVA

Núcleo de Biologia Aplicada, Embrapa Milho Sorgo, Caixa postal 151,
35701-970, Sete Lagoas, MG.

An. Soc. Entomol. Brasil 29(1): 147-153 (2000)

PCR Identification of *Cry I* Genes in *Bacillus thuringiensis* Strains
that are Efficient Against Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*
(J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

ABSTRACT - Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), is the most important maize insect pest in Brazil and its damage can reduce yield up to 34%. The objective of this work was to utilize the PCR technique to Identify *Bacillus thuringiensis* (B.t) strains that control *S. frugiperda* in maize crops. Bioassays showed that 16 strains were very effective against *S. frugiperda*, 15 of them collected from soil samples and one (T09) obtained at the Institute Pasteur. The DNA of these strains were probed with *cryI* general primers and their proteins were analysed by SDS-PAGE eletrophoresis. All strains present positive results for *cryI* genes. To further characterize these strains, specific *cryI* primers were employed. PCR technique showed that some strains harbour the same *cryI* genes. The only difference was the amplification of an unexpected fragment of approximately 160bp when a mixture of *cryIB* and *cryID* specific primers was used. Analysis by phase contrast microscope showed that crystal proteins produced by these strains were all bipyramidal crystals. Also, elctrophoretic analysis of proteins by SDS-PAGE showed the same protein banding pattern for most of the strains.

KEY WORDS: Insecta, *cryI* genes, biocontrol, fall armyworm.

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram positiva que ocorre naturalmente no solo, água, insetos mortos e ambientes onde se armazenam grãos (Lambert & Peferoen, 1992). Durante a fase de esporulação o *B. thuringiensis* produz um esporângio que contém um endosporo e inclusões protéicas cristalinas (d-endotoxinas) que são tóxicas para um grande número de insetos. Estas

proteínas podem perfazer até 1/3 do total de proteínas da célula (Herrnstadt *et al.* 1986). As delta endotoxinas são sintetizadas na forma de pró-toxinas que quando ingeridas pelo inseto são solubilizadas e convertidas proteoliticamente em fragmentos tóxicos de aproximadamente 650 aminoácidos. Esses fragmentos ligam-se especificamente, e com alta afinidade, a receptores protéicos na mem-

brana das células epiteliais do intestino, criando poros na membrana celular. Essas lesões levam ao dilatamento e lise do epitélio intestinal, causando a morte do inseto (Gill *et al.* 1992, Lambert & Peferoen 1992, Visser *et al.* 1990, Li *et al.* 1991).

As toxinas do *B. thuringiensis* são codificadas pelos genes *cryI*, *cryII*, *cryIII*, *cryIV*, *cryV* e *cytA*. A classificação destes genes está relacionada com a atividade biológica dos seus produtos. Deste modo, as toxinas codificadas pelos genes *cryI* são tóxicas para lepidópteros, *cryII* para dípteros e lepidópteros, *cryIII* para coleópteros, *cryIV* para dípteros e *cryV* para nematóides (Gill *et al.* 1992, Koziel *et al.* 1993, Cerón *et al.* 1995).

O método da PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação da Polimerase em Cadeia) tem-se mostrado uma ferramenta poderosa na detecção de genes com ação inseticida específicos em diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Carozzi *et al.* 1991, Bourque *et al.* 1993, Cerón *et al.* 1994, Cerón *et al.* 1995). A PCR também tem mostrado grande potencial na identificação de novos genes *cry*, como relatado por Kalman *et al.* 1993, que a usou para identificar genes *cryIC*.

A lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é uma das principais pragas da cultura do milho e pode causar danos de até 34% na produção de grãos (Carvalho 1970, Cruz 1996). O controle desta praga é feito basicamente com inseticidas químicos, sendo que o controle através do uso de patógenos pode se tornar uma alternativa viável. Krieg & Langenbruch (1981) relatam que a lagarta do cartucho pode ser controlada por *B. thuringiensis* (sorovariedades *thuringiensis* e *kurstaki*), mas não informam a percentagem de mortalidade das larvas. Do mesmo modo, Hernandez (1988) relata que *B. thuringiensis* var. *kenyae* e var. *tolworthi* causaram mortalidade de 100% em lagartas de *S. frugiperda*, em duas doses testadas. Entretanto, Beegle & Yamamoto (1992) afirmam que *Spodoptera* spp. não é afetada por *B. thuringiensis* do mesmo modo que outras pragas, tais como: *Trichoplusia ni* e *Heliothis virescens*. O objetivo deste trabalho

foi detectar dentre as cepas de *B. thuringiensis* que causam mortalidade acima de 75% (eficientes) em lagartas de *S. frugiperda*, aquelas que contenham os genes *cryI*, através da técnica da PCR.

Biensaio: A partir do isolamento de bactérias que possuíam esporos e cristais de *B. thuringiensis*, prepararam-se suspensões com bactérias em 5 ml de água destilada, que foram aplicadas em pedaços de dieta artificial. As lagartas, juntamente com a dieta inoculada, foram colocadas individualmente em copos descartáveis de 50 ml, tampados com tampas de acrílico. Foram utilizadas 24 lagartas, de dois a três dias de idade, criadas em laboratório, por cepa de *B. thuringiensis*. Avaliações, diárias, foram realizadas para constatação da mortalidade de lagartas infectadas por *B. thuringiensis*. Durante os bioensaio, as lagartas permaneceram sob temperatura ambiente.

As lagartas infectadas foram armazenadas sob temperatura ambiente e, diariamente, avaliações foram realizadas para constatação da mortalidade das mesmas. Foram utilizadas 24 lagartas, de dois a três dias de idade e criadas em laboratório, por cepa de *B. thuringiensis*.

Cepas bacterianas: As cepas de B.t. 344, 348, 426, 460, 461 A, 462 A, 474, 520 A, 520 B, 566 BPR, 566 BLR, 7 A, 7 A*, 7 B1, 7 B8, 701, 702, 734 e 739 foram isoladas, de amostras de solo coletadas em diversas regiões do Brasil, no laboratório de Controle Biológico do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da Embrapa, localizado em Sete Lagoas, MG. A cepa T09, cedida pelo Instituto Pasteur (França) e as cepas HD 73 e HD 125, cedidas pela UNAM (México), foram usadas como controle.

Primers para uso em PCR: Os primers utilizados neste trabalho foram os mesmos descritos por Cerón *et al.* 1994 e Cerón *et al.* 1995. Foram utilizados primers gerais (Carozzi *et al.* 1991) para detectar genes *cryI* e depois, para uma caracterização mais aprofundada, foram utilizados primers específicos para os mesmos genes, que são os específicos para lepidópteros.

Preparação da amostra e PCR: As cepas de *B. thuringiensis* foram crescidas por 12 horas em placas de Petri contendo ágar nutriente. Uma alçada de bactérias de uma simples colônia foi transferida para 100µl de água milliQ e a mistura foi deixada no freezer a - 80°C por 15 minutos e imediatamente após, colocada em água fervente por 10 minutos. Após este período, 5µl foram usados como a amostra de DNA na mistura. Na mistura final de 50µl para o uso no termociclador, foram usados 2,5U da enzima Taq DNA polimerase, 0,1 a 0,5µl de cada um dos primers usados na reação e 2,5mM de cada um dos quatro desoxynucleosídeos trifosfatos (dNTP's). 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

nal a 72°C por 5 min. Um total de 15 µl de cada mistura da PCR foi usado em gel de agarose a 3% em buffer 0,5 x Tris-borato, a 100V por 180 a 210 min. e, coradas com brometo de etídeo.

Biensaio: Das 23 cepas utilizadas no experimento, 15 apresentaram percentual de mortalidade superior a 75% e foram consideradas eficientes. Duas delas (734 e 739), somente utilizadas nas análises de proteínas dos cristais, apresentaram 0% de mortalidade quando administradas a lagartas de *S. frugiperda*. As cepas 7A e 7A* apresentaram percentual de mortalidade médio de 4,4%. No grupo controle, as cepas T09, T09 P foram consideradas eficientes e as cepas HD 73 e HD 125, apresentaram índice de mortalidade de 31 e 65,2%, respectivamente (Tabela 1).

Uso de primers gerais para genes *cryI*: A técnica da PCR foi utilizada para detectar as cepas que continham os genes *cryI*. Para tal,

Tabela 1. Mortalidade (%) causada por diferentes cepas de *B. thuringiensis* em lagartas de *S. frugiperda*.

Cepa	Quantidade de lagartas		Mortalidade (%)	Cepa	Quantidade de lagartas		Mortalidade (%)
	Inicial	Mortas			Inicial	Mortas	
344	23	22	95,6	702	41	40	97,6
348	24	22	88,3	7 B ₁	19	19	100
426	22	19	86,4	7 B ₈	41	37	90,2
460	24	24	100	734	24	00	00
461 A	23	22	95,4	739	24	00	00
462 A	24	24	100	7 A	22	01	4,5
474	24	24	100	7 A*	23	01	4,3
520 A	24	18	76,6	T09	24	22	91,7
520 B	22	21	95,6	T09 P	46	46	100
566 BPR	24	22	90,9	HD 73	22	07	31,0
566 BLR	23	20	86,9	HD 125	23	15	65,2
701	30	30	100				

cryIab foi de 48°C, para *cryIB* e *cryID* foi de 56°C e para os primers *cryIE* e *cryIF* foi de 57°C. Foi também realizado uma extensão fi-

foi usado um par de primers que continham seqüências dos genes *cryI*. O tamanho esperado dos produtos gerados pela PCR

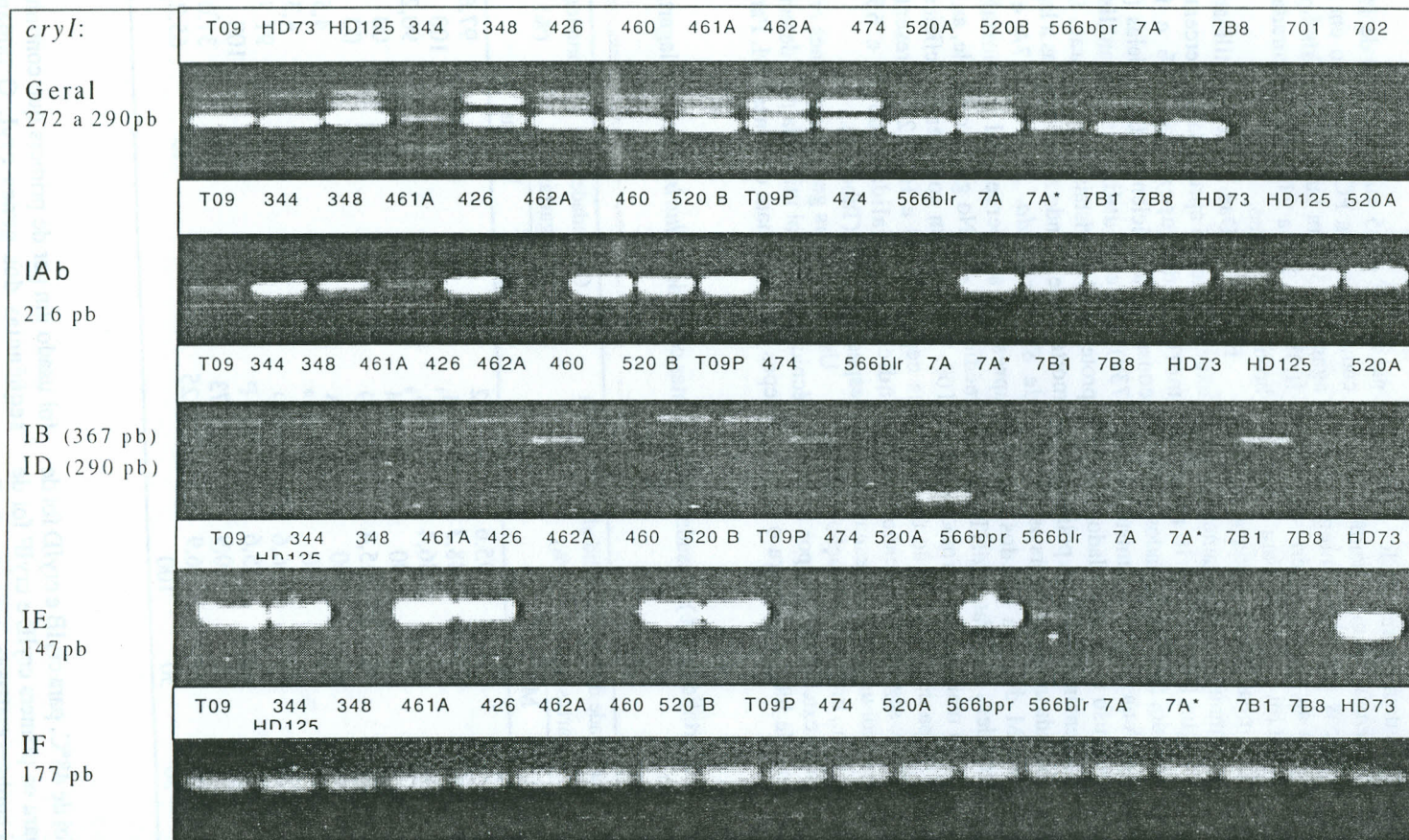


Figura 1. Géis de agarose (3%) dos produtos obtidos através da PCR com o primers geral e específicos para o gene *cryI*.

variavam de 272 a 290 pb. Os resultados visualizados em gel de agarose (Fig. 1), mostraram resultado positivo para genes *cryI* para as cepas 344, 348, 426, 460, 461A, 462A, 474, 520A, 520B, 566 BPR, 7A, 7B8, T09, e testemunhas HD 73 e HD 125 (Tabela 2).

foi de 216 pb, para *cryIB* foi de 367 pb, para *cryID* foi de 290 pb, para *cryIE* foi de 147 pb, para *cryIF* foi de 177 pb. Conforme observado na Tabela 2, as cepas 344, 426, 461A, 520B, T09, T09P, 7A e HD125 apresentaram ampliações positivas para os

Tabela 2. Cepas de *B. thuringiensis* testadas com primer geral e primers específicos para os diferentes genes *cryI*.

Cepas	<i>cryI</i>					
	Geral	Ab	B	D	E	F
344	+	+	+	+	+	-
348	+	+	-	-	-	-
426	+	+	+	+	+	-
460	+	+	-	-	-	-
461 A	+	+	+	+	+	-
462 A	+	-	+	+	+	-
474	+	-	+	+	+	-
520 A	+	-	-	-	+	-
520 B	+	+	+	+	+	-
566 BPR	+	-	-	-	+	-
566 BLR	*	+	-	-	+	-
701	-	*	*	*	*	*
702	-	*	*	*	*	*
7 A	+	+	+	+	+	-
7A*	*	+	-	-	-	-
7B ₁	*	+	-	-	-	-
7B ₈	+	+	-	-	-	-
T09 ₈	+	+	+	+	+	-
T09 P	*	+	+	+	+	-
HD 73	+	+	-	-	-	-
HD 125	+	+	+	+	+	-
734	*	*	*	*	*	*
739	*	*	*	*	*	*

Cepa não testada (*)

Amplificação: presente (+) e ausente (-)

Uso de primers específicos para detecção de genes *cryI*: Foram usadas misturas de primers para amplificar regiões específicas dos genes *cryIA* a *cryIF*. A análise permitiu identificar genes específicos *cryI*, em cada cepa de *B. thuringiensis*, com base no tamanho do produto final da PCR para *cryIAb*

mesmos primers (*cryIAb*, *cryIB*, *cryID* e *cryIE*). Na figura 1, observa-se, também, que a maioria das cepas apresentou resultado positivo para *cryIAb*, *cryIE*, poucas para *cryIB* e *cryID* e nenhuma para *cryIF*.

Houve a amplificação de um fragmento, não esperado, de aproximadamente 160 pb,

quando foi usada a mistura dos primers cryIB e cryID (Figura 1). Todas as cepas trabalhadas apresentam os genes *cryIAb*, *cryIB*, *cryID* e *cryIE*, mas não foram encontrados os genes *cryIC* e *cryIF*. De acordo com a literatura, os genes *cryID* e *cryIC* são os mais tóxicos para lagartas de *S. frugiperda* (Cerón *et al.* 1995). Entretanto, de acordo com Bohorova *et al.* (1997) os genes *cryID*, *cryIE* e *cryIF* são mais eficientes no controle de *S. frugiperda*, resultado este obtido em bioensaios realizados no CIMMYT/México (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo). A amplificação de um fragmento não específico com cerca de 160 pares de bases, é de tamanho superior ao gene *cryIC*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao convênio PRONEX/FINEP - Projeto: Biologia Molecular e Celular no Melhoramento de Milho Tropical, pelo apoio financeiro.

Literatura Citada

- Bai, C. S-X. Yi & D. Degheele. 1992. The comparative potency of commercial *Bacillus thuringiensis* formulations to larvae of *Spodoptera exempta* (walker) (Lepidoptera: Noctuidae). *Parasitica*. 48: 35-42.
- Beegle, C.C. & T. Yamamoto. 1992. Invitation paper (C. P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research and development. *Can. Ent.* 124: 587-616.
- Bohorova, N. , M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo. 1997. Susceptibility of four tropicalmaize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *Biol. Microbiol. Cont.* 90: 412-415.
- Bourque, S. N. , J. R. Valero, J. Mercier, M.Lavoie & R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:523-527.
- Carozzi, N.B. , V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola & M.G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3057-3061.
- Carvalho, R.P.L. 1970. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. Piracicaba, Brasil, ESALQ, 170p. (Tese de Doutorado).
- Cruz, I., L.J. Oliveira, A.C. Oliveira & C.A. Vasconcelos. 1996. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. *An. Soc. Entomol. Brasil* 25:293-297.
- Cerón, J. A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca & A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3826-3831.
- Cerón, J. L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina & A. Bravo. 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:353-356.
- Gill, S.S.; E. A. Cowles & P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Hernandez, J.L.L. 1988. Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur

Spodoptera frugiperda. Entomophaga 33:163-171.

Herrnstadt, C., G.G. Soares, E.R. Wilcox & D.L. A. Edwards. 1986. New Strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran Insects Biotech. 4: 305-308.

Kalman, S., K.L. Kiehme, J.L. Liebs & T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59:1131-1137.

Koziel, M. G., N. B. Carozzi, T. C. Currier, G. W. Warren & S. V. Evola. 1993. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: Past, present and future uses. Biot. Gen. Engin. Rev. 11: 171-228.

Krieg, A. & G.A. Langenbruch, 1981. Susceptibility of Arthropod Species to

Bacillus thuringiensis p. 837-896. In: Burges, H.D. (ed.) Microbial control of insects and mites. Academic Press, London, 861p.

Lambert, B. & M. Peferoen, 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis* Bioscience 42: 112-122.

Li, J.J. Carrell, D.J. Ellar. 1991. Crystal Structure of Insecticide delta - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å Resolution. Nature 353: 815-821.

Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker & W.G. Dirkse. 1990. A Novel *Bacillus thuriengiensis* Gene Encoding a *Spodoptera exigua* - Specific Crystal Proetin. J. Bacteriol. 172: 6783-6788.

Recebido em 05/10/98. Aceito em 27/10/99.
