

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA:  
Diversidade e Manejo de Vida Silvestre

MESTRADO

Seleção de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* que codificam proteínas tóxicas a insetos-praga da cultura do arroz

Laura Massochin Nunes Pinto

São Leopoldo, janeiro de 2002.

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA:  
Diversidade e Manejo de Vida Silvestre

MESTRADO

Seleção de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* que codificam proteínas  
tóxicas a insetos-praga da cultura do arroz

Laura Massochin Nunes Pinto

Lidia Mariana Fiuza – Orientadora  
Elena Diehl – Co-orientadora

São Leopoldo, janeiro de 2002.

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA:  
Diversidade e Manejo de Vida Silvestre

MESTRADO

A dissertação intitulada “Seleção de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* que codificam proteínas tóxicas a insetos-praga da cultura do arroz”, elaborada pela aluna Laura Massochin Nunes Pinto, foi julgada adequada e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA, área de concentração: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre.**

São Leopoldo, 14 de janeiro de 2002.

Apresentada à Banca, integrada pelos seguintes Professores:

Presidente da Banca e Orientador : Profa. Dra. Lidia Mariana Fiuza

Co-orientadora : Profa. Dra. Elena Diehl

Membro : Profa. Dra. Maria Helena Bodanese-Zanettini

Membro : Prof. Dr. Rogério Fernando Pires da Silva



## Índice

---

|   |           |
|---|-----------|
| Agradecimentos .....  | 7         |
| Resumo .....  | 8         |
| Abstract.....   | 9         |
| Introdução.....   | 10        |
| <b>Capítulo 1</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>Artigo de Revisão: GENES <i>CRY</i> DE <i>Bacillus thuringiensis</i>: UMA ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA APLICADA AO MANEJO DE INSETOS</b> ..... | <b>13</b> |
| Resumo.....   | 15        |
| Abstract .....  | 16        |
| Introdução.....   | 17        |
| Classificação dos genes <i>cry</i> .....  | 17        |
| Expressão de genes <i>cry</i> .....   | 18        |
| Diversidade de genes <i>cry</i> .....   | 20        |
| Especificidade das proteínas codificadas por genes <i>cry</i> .....   | 21        |
| Perspectivas.....   | 23        |
| Referências Bibliográficas .....  | 24        |
| <b>Capítulo 2</b> .....   | <b>29</b> |
| <b>Artigo de Pesquisa: DISTRIBUIÇÃO DE GENES <i>CRY</i> DE <i>Bacillus thuringiensis</i> EM ISOLADOS DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL</b> .....    | <b>29</b> |
| Abstract .....  | 31        |
| Resumo.....   | 32        |
| Introdução.....   | 33        |
| Material e Métodos.....   | 33        |
| Resultados e Discussão .....  | 34        |
| Referências Bibliográficas .....  | 38        |
| <b>Capítulo 3</b> .....   | <b>40</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Artigo de Pesquisa: PCR PARA DETECÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> COM POTENCIAL TÓXICO A LEPIDÓPTEROS E COLEÓPTEROS.....</b> | <b>40</b> |
| Abstract .....   | 42        |
| Resumo.....  | 43        |
| Introdução.....  | 44        |
| Material e Métodos.....  | 44        |
| Resultados .....   | 47        |
| Discussão.....   | 50        |
| Referências .....  | 53        |
| <b>Capítulo 4 .....</b>  | <b>56</b> |
| <b>Artigo de Pesquisa: PATOGENICIDADE DE <i>Bacillus thuringiensis</i> ISOLADOS DE <i>Acromyrmex</i> spp. (HYMENOPTERA, FORMICIDAE).....</b>               | <b>56</b> |
| Abstract .....   | 58        |
| Resumo.....  | 59        |
| Introdução.....  | 60        |
| Material e Métodos.....  | 60        |
| Resultados e Discussão .....   | 62        |
| Discussão.....   | 69        |
| Referências Bibliográficas.....  | 73        |
| APÊNDICE – 1 .....   | 76        |

## **Agradecimentos**

*À Deus, pelo privilégio de poder conviver com pessoas tão especiais.*

*Aos meus pais, Ilka e Frederico, aos meus irmãos, Rafael e Cláudia, e aos meus familiares, por todo apoio e incentivo, pela amizade, carinho e presença constantes em todas as etapas da minha vida.*

*Ao meu namorado, Guilherme, pela companhia, carinho, incentivo e incontáveis "translados" realizados, durante estes dois anos. Aos seus pais, Ana e Bruno, pela compreensão e auxílio.*

*À minha orientadora Lidia, pela confiança, por seu conhecimento, amizade e incentivo transmitidos ao longo do curso, decisivos na realização deste trabalho.*

*À minha co-orientadora, Elena, pela contribuição científica na execução dos bioensaios com formigas cortadeiras, e pelo apoio e atenção dedicados.*

*A todos os colegas, professores e amigos conquistados na UNISINOS, pelo carinho, profissionalismo e amizade.*

*À equipe do Laboratório de Microbiologia, pelo auxílio e incentivo. Em especial à Aline, Diounéia e Ana, pelo auxílio inestimável, e ao Cristiano e Rogério, pela amizade e colaboração. À Raquel, Fernando, Marcia e Daniel, pela paciência e ajuda durante esse período.*

*Ao pessoal da Estação Experimental do Instituto RioGrandense do Arroz pelo apoio financeiro. Ao Jaime, ao Maurício, à Odete e Valmir, pela amizade e contribuição nos bioensaios com coleópteros.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela concessão da bolsa de estudos.*

*Ao Prof. Dr. Fernando Cruz, a Rute e Sônia, pela amizade e auxílio.*

*Aos professores Dra. Maria Helena B. Zanettini e Dr. Rogério F. P. da Silva, por aceitarem participar desta banca.*

*Por fim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, minha sincera gratidão.*

## Resumo

O presente trabalho, inserido na Linha de Pesquisa Conservação e Manejo de Ecossistemas e de Vida Silvestre, objetivou a seleção de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* que codificam delta-endotoxinas ativas contra insetos-praga do arroz, em especial contra os representantes das ordens Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae), Coleoptera (*Oryzophagus oryzae*, Curculionidae) e Hymenoptera (*Acromyrmex*, Formicidae), que poderão ser utilizadas no manejo de populações desses insetos. Na seleção de *B. thuringiensis*, ativos contra *S. frugiperda* e *O. oryzae*, foram utilizados isolados obtidos de amostras de solos, coletadas em áreas agrícolas do Rio Grande do Sul, os quais foram submetidos a predição da atividade inseticida pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), utilizando os *primers* que amplificam fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry1*, *cry2* e *cry9* específicos a lepidópteros e genes *cry3*, *cry7* e *cry8* ativos a coleópteros. Os isolados pré-selecionados, nessa etapa da pesquisa, foram avaliados quanto a toxicidade *in vivo* através de bioensaios. Nas pesquisas contra *Acromyrmex lundii* foram utilizados isolados de *B. thuringiensis* obtidos de formigas cortadeiras, sendo estes preliminarmente avaliados através de bioensaios, onde amostras selecionadas como patogênicas foram avaliadas por PCR com os *primers* mencionados anteriormente. Nos isolados obtidos das amostras de solos, os resultados da PCR revelam a presença de oito diferentes perfis genéticos, homoganeamente distribuídos nos solos do Rio Grande do Sul, predominando os genes *cry9* (39,1%). A análise protéica de *B. thuringiensis*, por SDS-PAGE, identificou 14 famílias de proteínas Cry, que possivelmente são codificadas pelos genes presentes nos isolados analisados, além de proteínas desconhecidas que podem representar novos genes *cry* ainda não caracterizados. Considerando os dados da pré-seleção por PCR, entre os 46 isolados de *B. thuringiensis*, oriundos de amostras de solos, 56,5 e 21,7% foram potencialmente específicos aos lepidópteros e coleópteros, respectivamente. Para esses isolados, nos ensaios de patogenicidade, a maior mortalidade corrigida foi 25,0% para *S. frugiperda* e 53,4% para *O. oryzae*. Os dados de isolamento a partir de formigas cortadeiras revelaram 14 amostras correspondentes a *B. thuringiensis*, sendo 42,8% ativos contra *A. lundii*, cuja mortalidade corrigida variou entre 12,5 e 100,0%. Nesses isolados foram amplificados fragmentos de DNA dos genes *cry1* (22,0%) e *cry9* (67,0%). Os resultados obtidos através desta pesquisa foram divulgados em Congressos e Simpósios, sendo que um artigo de revisão bibliográfica e três artigos com os resultados da pesquisa desenvolvida estão sendo submetidos à publicação em Periódicos Científicos.



## Abstract

### Screening of *Bacillus thuringiensis* cry genes which codify toxic proteins to the insects pest of rice-crop

This work, which is part of the Preservation and Management of Ecosystems and Wild Life research line, has as its aim the selection of the *Bacillus thuringiensis* cry genes that codify delta-endotoxins active against rice pest insects, representatives of the Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae), Coleoptera (*Oryzophagus oryzae*, Curculionidae) and Hymenoptera (*Acromyrmex lundii*, Formicidae) orders, which can be used for the management of those insect populations. In order to select *B. thuringiensis* active against *S. frugiperda* and *O. oryzae* there have been used isolates from soil samples that had been collected in agricultural areas in *Rio Grande do Sul*, and they had gone through the prediction of insecticidal activity by the Polymerase Chain Reaction (PCR), with the primers that magnify DNA fragments which correspond to lepidopterans-specific *cry1*, *cry2* and *cry9* genes and coleopterans-specific *cry3*, *cry7* and *cry8* genes. The preselected isolates during this phasis of the research, have been assessed regarding *in vivo* toxicity, by means of bioassays. In the research against hymenopterans, *B. thuringiensis* isolates from leaf-cutting ants were used, seeing that they had preliminarily been assessed by bioassays against *Acromyrmex lundii*, in which samples that had been selected as pathogenic have gone through PCR assessment with the primers mentioned earlier. As to the isolates from soil samples, PCR results have shown the presence of eight different genetic profiles evenly distributed throughout the soil of Rio Grande do Sul, with a prevalence of *cry9* genes (39.1%). *B. thuringiensis* protein analysis by SDS-PAGE has identified 14 families of Cry proteins, which may be codified by the genes present in analysed isolates, and unknown proteins as well, that may represent new and not yet characterized *cry* genes. Taking into consideration the data of the preselection by PCR, among the 46 *B. thuringiensis* isolates from the soil samples, 56.5 and 21.7% were potentially lepidoptera and coleoptera specific, respectively. For those isolates, during the pathogenicity assays, the highest corrected mortality was of 25.0% for *S. frugiperda* and of 53.4% for *O. oryzae*. Isolation data from leaf-cutting ants have shown 14 samples which correspond to *B. thuringiensis*, seeing that 42.8% are active against *A. lundii*, of which the corrected mortality has ranged from 14.2 to 100.0%. In those isolates, DNA fragments of *cry1* (22.0%) and *cry9* (67.0%) have been magnified. The results of this research have been announced in Congresses and Symposiums, seeing that one paper review and three papers with the results of the research in progress have been published in Scientific Journals.

## Introdução

O Brasil é o nono maior produtor de arroz do mundo, tendo produzido em 1999 uma safra de 11,5 milhões de toneladas de grãos. Neste contexto, o Rio Grande do Sul ganha destaque sendo o líder nacional de produção de arroz, totalizando 48,5% da produção nacional (fonte: SECEX/MDIC, CONAB).

Apesar da alta produtividade, a orizicultura gaúcha tem sofrido grandes perdas devido ao ataque de insetos, entre os quais se destacam algumas espécies de coleópteros, lepidópteros e himenópteros.

Na ordem Coleoptera, o inseto *Oryzophagus oryzae* destaca-se como a principal praga do arroz irrigado, sendo denominado de gorgulho-aquático ou bicheira-da-raiz-do-arroz. O inseto adulto mede 3,5mm e as larvas têm aproximadamente 8,5mm de comprimento. Os adultos e larvas têm hábito aquático, sendo ágeis nadadores. A fêmea fecundada faz sua postura na raiz da planta e após a eclosão, as larvas escavam galerias cortando-as. Após 30 dias, surgem as pupas. Estima-se que a perda da produção de arroz de uma lavoura infestada por *O. oryzae* possa chegar a 30% (Gallo *et al.*, 1988). Recentemente foi observado um crescimento populacional deste inseto nas lavouras do Rio Grande do Sul, sendo que sua distribuição está se modificando da forma localizada para uma distribuição uniformizada em quase todas as regiões de cultivo de arroz irrigado (Vieira *et al.*, 1999).

As lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) são consideradas como pragas da parte aérea da planta (Gallo *et al.*, 1988). Estes insetos estão presentes em todos os estados brasileiros, caracterizando-se por terem hábito alimentar polífago, com alto poder de destruição da parte aérea das plantas. Na cultura do arroz irrigado, as lagartas representam grande dano entre a emergência das plantas e a inundação da lavoura. Nos dois primeiros ínstaes causam pouco dano por rasparem apenas a epiderme das folhas, porém nos ínstaes seguintes costumam cortar as plantas rente ao solo, muitas vezes destruindo áreas extensas da cultura. Atacam toda a parte aérea da planta, causando redução foliar e conseqüentemente a diminuição da fotossíntese (Gallo *et al.*, 1988; Vieira *et al.*, 1999).

Na ordem Hymenoptera, as principais pragas são as formigas cortadeiras que se caracterizam por serem insetos sociais, vivendo em colônias subterrâneas com sua

população composta de indivíduos de diferentes tamanhos e formas (Della-Lucia, 1993). Estas formigas estão distribuídas em dois gêneros: *Atta* e *Acromyrmex*. As espécies do gênero *Acromyrmex*, constroem ninhos pequenos, geralmente com apenas uma câmara (Gallo *et al.*, 1988). O gênero *Acromyrmex* apresenta 18 espécies no Brasil, sendo que destas, 13 espécies ocorrem no Rio Grande do Sul (Mayhé-Nunes & Diehl-Fleig, 1994). Em áreas de arroz irrigado, no município de Cachoeirinha, foram encontradas as espécies *A. crassispinus* e *A. lundi*.

No controle desses insetos-praga, produtos químicos têm sido utilizados amplamente nas áreas de cultivo de arroz irrigado. Considerando os problemas relacionados a ação desses inseticidas sobre outros organismos, a contaminação de águas e resíduos em alimentos, faz-se necessário estudos que propiciem métodos alternativos de controle, os quais podem ser aplicados no Manejo Integrado de Populações de Insetos.

Considerando o controle de insetos com produtos biológicos, que representam aproximadamente 1% do mercado mundial de pesticidas, podem ser mencionados como alternativas de métodos de controle biológico aqueles produtos onde o ingrediente ativo trata-se de microrganismos, os quais são aplicados de maneira similar a um inseticida químico (Melo & Azevedo, 1998).

Entre os microrganismos utilizados no controle biológico, destacam-se as bactérias que têm sido amplamente estudadas. *Bacillus thuringiensis*, pertencente a família Bacillaceae, tem se revelado promissora para o controle de insetos (Alves, 1998). Essa bactéria, presente no solo, é gram-positiva, esporulante e caracteriza-se por produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, denominadas de cristais, exibindo alta atividade específica contra insetos devido a presença de delta-endotoxinas (Höfte & Whiteley, 1989). Devido a esta característica, vários bioinseticidas formulados com isolados de *B. thuringiensis* têm sido desenvolvidos para o controle de certas espécies pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera.

As delta-endotoxinas foram classificadas em vários grupos protéicos, denominados Cry (Crickmore *et al.*, 1998). A procura de novas delta-endotoxinas incentivou o desenvolvimento de técnicas moleculares que proporcionassem uma seleção rápida de genes que codificam proteínas Cry, em diferentes isolados de *B. thuringiensis*. Vários métodos foram propostos, como a técnica da Reação em Cadeia da

Polimerase, a qual permite a correta identificação das famílias de genes *cry* (Cerón *et al.*, 1995; Juárez-Pérez *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 1998).

Os trabalhos de pesquisa referentes a esta Dissertação foram desenvolvidos durante os anos de 2000 e 2001, através de colaboração científica e financeira estabelecida entre o grupo de pesquisa Manejo de Populações de Insetos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (São Leopoldo, RS) e a Estação Experimental do Arroz do Instituto Riograndense do Arroz (Cachoeirinha, RS).

O presente trabalho objetivou a seleção de genes *cry* de *B. thuringiensis* que codificam delta-endotoxinas com atividade inseticida às ordens Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*), Coleoptera (*Oryzophagus oryzae*) e Hymenoptera (*Acromyrmex lundii*), as quais poderão representar alternativas ao Manejo de Populações de Insetos-praga da cultura do arroz. Os resultados obtidos serão apresentados na forma de artigos científicos, sendo esses:

- ARTIGO 1: Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa biotecnológica aplicada ao manejo de insetos.
- ARTIGO 2: Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* em isolados de solos do Rio Grande do Sul.
- ARTIGO 3: PCR para detecção e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* com potencial tóxico a lepidópteros e coleópteros.
- ARTIGO 4: Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* isolados de *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera, Formicidae).

## Capítulo 1

---

---

### Artigo de Revisão:

GENES *CRY* DE *Bacillus thuringiensis*. UMA  
ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA APLICADA AO MANEJO  
DE INSETOS

**GENES *CRY* DE *Bacillus thuringiensis*: UMA ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA APLICADA AO MANEJO DE INSETOS**

Laura Massochin Nunes Pinto<sup>1</sup> & Lidia Mariana Fiuza<sup>1,2</sup>

Endereço para correspondência:

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro 2, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS. C.P. 275, CEP 93001-970, São Leopoldo, RS. E-mail: fiuza@cirrus.unisinos.br. <sup>2</sup>EEA/Instituto Riograndense do Arroz. C.P. 29, CEP 94930-030, Cachoeirinha, RS.

## RESUMO

Devido às propriedades entomopatogênicas, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) representa uma alternativa promissora no controle biológico de insetos. Diversas cepas de *Bt* têm sido estudadas por apresentarem atividade altamente tóxica a representantes de várias ordens de insetos, como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. A toxicidade de *Bt* está relacionada à produção de endotoxinas inseticidas, as quais são codificadas por genes, denominados *cry*. Atualmente, estão identificados mais de 190 genes *cry*, distribuídos em 32 classes. A identificação e a caracterização de novos genes *cry* são realizadas através das técnicas de PCR, RFLP e RAPD. Estes estudos visam a detecção de genes *cry* que codificam proteínas ativas contra insetos de importância agrícola, os quais podem ser aplicados na obtenção de plantas geneticamente modificadas ou na produção de biopesticidas, ambos aplicados diretamente no Manejo Integrado de Pragas.

**Palavras-chave:** controle microbiano, *Bacillus thuringiensis*, genes *cry*, proteínas, Insecta

## ABSTRACT

### ***Bacillus thuringiensis cry* genes: a biotechnological alternative applied to insect management**

Due to its entomopathogenic properties, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) represents a promising alternative to insect biological control. Various *Bt* strains have been investigated because they show highly toxic activity against many insect orders, such as Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. The *Bt* toxicity relates to the production of insecticidal toxins, which are coded by the so-called *cry* genes. More than 190 *cry* genes have been identified up to now, comprised into 32 classes. The identification and characterization of the new *cry* genes are carried out through the PCR, RFLP and RAPD techniques. Such investigations aim at the detection of *cry* genes that codify active proteins against agriculturally significant insects, which can be applied to the attainment of genetically modified plants or the production of biopesticides, both directly applied to the Integrated Pest Management.

**Key words:** microbiol control, *Bacillus thuringiensis*, *cry* genes, proteins, Insecta



## INTRODUÇÃO

Os inseticidas químicos utilizados no controle de pragas da agricultura e de dípteros vetores de doenças epidêmicas devem possuir propriedades que confirmem-lhes longa ação residual e amplo espectro de ação. Por outro lado, estas características, ao longo do tempo, têm trazido sérios problemas ambientais (Van Frankenhuyzen, 1993). Devido aos riscos que os produtos químicos oferecem ao homem e animais domésticos, há necessidade de diminuir sua liberação em nosso ecossistema (Lacey & Lacey, 1990). Considerando o alto custo da produção de inseticidas químicos, tornam-se necessárias alternativas à diminuição de seu uso (Margalith, 1989). Nesse contexto, o uso de agentes microbianos, particularmente da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), no controle de insetos, tende a aumentar significativamente. Desde o seu descobrimento no início do século XX por Berliner (Berliner, 1911, 1915), até a atualidade, diversos trabalhos têm sido realizados com esta bactéria devido a sua alta ação inseticida específica. A ação entomopatogênica de *Bt* está relacionada com a produção de um corpo parasporal, também conhecido como cristal, composto por um agregado de proteínas inseticidas codificadas por genes, denominados *cry* (Höfte & Whiteley, 1989). Vários formulados de *Bt* estão disponíveis no comércio e representam uma ferramenta valiosa nos sistemas de Manejo Integrado de Insetos Pragas. Porém, as formulações ainda apresentam limitações no controle dos insetos. A principal barreira consiste no hábito alimentar de vários insetos, visto que estes produtos têm sido aplicados na superfície das plantas por pulverização e muitos fitófagos atacam tecidos internos das plantas ou até mesmo raízes. Como a toxina produzida por esta bactéria atua somente após ingestão (Schnepf *et al.*, 1998), torna-se praticamente impossível uma ação contra os insetos endofíticos. Dessa forma, o futuro das pesquisas com *Bt* tem se direcionado à biotecnologia e biologia molecular, visando a obtenção de plantas geneticamente modificadas (Betz *et al.*, 2000) capazes de expressar genes de delta-endotoxinas caracterizados e com ação conhecida sobre os insetos (Ely, 1993; Peferoen, 1997; Schuler *et al.*, 1998).

## CLASSIFICAÇÃO DOS GENES *CRY*

Os genes *cry* foram classificados por Höfte e Whiteley (1989) de acordo com sua estrutura molecular, bem como seu alcance de hospedeiros. Os referidos autores mencionam a classificação de 13 genes *cry*, os quais foram distribuídos em quatro

classes. Recentemente, Crickmore *et al.* (1998) relataram o trabalho de revisão da nomenclatura dos genes *cry*, mencionando a existência de aproximadamente 100 genes *cry*, agrupados em 22 classes. Na nova nomenclatura destes genes, os numerais romanos que apareciam em primeiro lugar após a sigla *cry*, foram trocados por numerais arábicos a fim de comportar o crescente número de novas proteínas. Atualmente, já foram encontrados mais de 190 genes *cry*, os quais estão distribuídos em 32 classes (Tabela 1).

### **EXPRESSÃO DE GENES *CRY***

O genoma de *Bt* varia de 2,4 a 5,7 milhões de pares de bases, sendo que a maioria dos isolados apresenta elementos extracromossômicos lineares ou circulares (Carlson *et al.*, 1994). Os genes *cry* estão localizados em plasmídios e muitos isolados de *Bt* possuem diversos genes *cry* responsáveis pela síntese de diferentes proteínas inseticidas (Lereclus *et al.*, 1993). Durante seu desenvolvimento, *Bt* passa por duas fases, a fase vegetativa e a estacionária, semelhantes ao desenvolvimento de *Bacillus subtilis*. A primeira fase caracteriza-se pelo crescimento exponencial das células de *Bt*, momento em que há grande disponibilidade de nutrientes no meio. A transcrição de genes neste momento é feita principalmente pelo fator sigma-A ( $\sigma^A$ ). A fase estacionária ocorre quando o meio se torna hostil e a bactéria adapta-se à diminuição de nutrientes através de mecanismos genéticos. Nesta fase ocorre a fosforilação da proteína Spo0A, a qual ativa a transcrição de vários genes em *B. subtilis*, dentre eles os fatores sigmas  $\sigma^H$ ,  $\sigma^E$  e  $\sigma^F$ , os quais controlam a esporulação (Smith, 1993; Haldenwang, 1995; Lereclus *et al.*, 2000). A expressão dos genes *cry* de *Bt* geralmente ocorre na fase estacionária da célula, acumulando seu produto na célula mãe, na forma de uma inclusão cristalífera, a qual é liberada no meio ao final da esporulação (Lereclus *et al.*, 2000). Esta inclusão pode representar cerca de 25% do peso seco de células já esporuladas (Agaisse & Lereclus, 1995). Apesar da expressão dos genes *cry* estar estreitamente relacionada ao evento da esporulação, existem genes *cry* que são expressados independentemente da esporulação (Agaisse & Lereclus, 1995).

### **Genes *cry* dependentes da esporulação**

Um típico exemplo de gene *cry* dependente de esporulação é o *cryIAa*, o qual codifica proteínas tóxicas para lepidópteros. A transcrição desse gene é efetuada por

dois sítios iniciadores, denominados BtI e BtII. O primeiro é ativo entre o  $t_2$  e o  $t_6$  da esporulação e BtII é ativo a partir de  $t_5$ , considerando  $t_n$  como  $n$  horas após o fim da fase exponencial (Agaisse & Lereclus, 1995). Brown e Whiteley (1988), a partir de experimentos *in vitro* revelaram que a transcrição, a partir de BtI, é iniciada por uma RNA polimerase contendo um fator sigma alternativo  $\sigma^{35}$ . A transcrição a partir de BtII é iniciada por uma forma de RNA polimerase contendo outro fator sigma alternativo, denominado  $\sigma^{28}$  (Brown & Whiteley, 1990). Os genes codificantes dos fatores  $\sigma^{35}$  e  $\sigma^{28}$  foram clonados e seqüenciados e sua seqüência de aminoácidos deduzida, mostrou 88 e 85% de identidade com os fatores  $\sigma^E$  e  $\sigma^K$  de *B. subtilis*, respectivamente (Adams *et al.*, 1991).

Mutantes de  $\sigma^E$  e  $\sigma^K$  de *Bt* foram construídos para a análise da expressão gênica de *cryIAa* (Bravo *et al.*, 1996). Os resultados demonstraram que esses dois fatores sigma regularam a expressão de *cryIAa*'-'lacZ. O mutante  $\sigma^K$  mostrou atividade de  $\beta$ -galactosidase aproximadamente 50% menor que a cepa selvagem, sendo que a síntese de  $\beta$ -galactosidase no mutante  $\sigma^E$  foi nula, indicando que estes dois fatores estão envolvidos na transcrição de *cryIAa*. A comparação de outros promotores de genes *cry* mostrou similaridade entre *cryIAa* e outros genes, como: *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry15Aa* (Brizzard *et al.*, 1991; Brown, 1993; Yoshisue *et al.*, 1993; Dervyn *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998).

### **Genes *cry* que não dependem da esporulação**

O gene *cry3A*, codificante de uma toxina ativa para coleópteros, foi isolado da cepa *Bt tenebrionis* e representa um exemplo típico de gene *cry* não dependente de esporulação. Este gene é expresso durante a vida vegetativa da célula, porém de uma maneira menos intensa que na fase estacionária (Sekar, 1988; De Souza *et al.*, 1993). Embora o promotor do gene *cry3A* seja fraco, este é significativamente expressado durante a fase vegetativa, diferentemente do promotor *cryIAa*. Sua ativação ocorre no final da fase de crescimento exponencial, sendo expressado de  $t_0$  a  $t_{10}$ , durante a fase estacionária (Lereclus *et al.*, 2000). Ao contrário de BtI e BtII, o promotor de *cry3A* assemelha-se aos promotores reconhecidos pelo fator  $\sigma^A$ . A análise gênica de *Bt* (Salamitou *et al.*, 1996) e *B. subtilis* (Agaisse & Lereclus, 1994; Baum & Malvar, 1995), mostra que a expressão do gene *cry3A* não é dependente dos fatores sigma

específicos de esporulação, além de ter sua expressão aumentada em isolados mutantes incapazes de iniciar a esporulação (Lereclus *et al.*, 1995). Os resultados da ativação da transcrição de *cry3A*, na fase estacionária, devem-se ao mecanismo independente da esporulação, ainda não caracterizado (Lereclus *et al.*, 2000).

### **Número de cópias de genes *cry***

Algumas cepas de *Bt*, como a *kurstaki* HD73, possuem apenas uma cópia de gene *cry1*, mas sintetizam cristais bipiramidais em quantidades semelhantes às aquelas produzidas por cepas que apresentam três ou quatro diferentes genes *cry1*. Assim, a quantidade de proteína produzida não está diretamente relacionada com o número de cópias de genes *cry*, pois a capacidade de produção de proteína pela célula pode ser elevada. A síntese proteica atinge um limite máximo, com um certo número de cópias de genes *cry* na célula, acima deste não há acréscimo na síntese (Agaisse & Lereclus, 1995). Estudos utilizando genes de *Bt* clonados em outras espécies do gênero *Bacillus* mostram que um alto número de cópias de plasmídios causam distúrbios fisiológicos nas células e impedem sua esporulação (Donovan *et al.*, 1988).

### **DIVERSIDADE DE GENES *CRY***

A busca de novos isolados de *Bt* e sua caracterização tem sido realizada por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo. Estes novos isolados têm sido importantes para o controle de insetos, pois representam novas alternativas no Manejo Integrado de Pragas. O principal método utilizado para obtenção de novos isolados de *Bt* tem sido sua procura em diferentes substratos, como folhas e insetos mortos (Hansen *et al.*, 1998). Porém como esta bactéria é naturalmente encontrada no solo, a maioria dos trabalhos concentram-se neste habitat como fonte de novos isolados (Landén *et al.*, 1994; Ohba & Aratake, 1994; Hossain *et al.*, 1997). Após o isolamento bacteriano, a microscopia de contraste de fase permite verificar a presença do cristal, sendo esta seguida pela caracterização sorológica, com base nos antígenos flagelares (H). Estes métodos têm sido considerados muito trabalhosos às pesquisas que envolvam análise da diversidade ou montagem de um banco de *Bt*. Atualmente, a técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) tem sido amplamente utilizada à detecção de novos genes *cry* (Valicente *et al.*, 2000; Hansen & Hendriksen, 2001; Ben-Dov *et al.*, 2001), onde os

*primers* utilizados podem ser desenhados a partir de regiões conservadas destes genes. A PCR tem sido utilizada também em combinação com “Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição – RFLP” (Kuo & Chark, 1996) e “Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso – RAPD” (Hansen *et al.*, 1998). Juárez-Pérez *et al.* (1997) desenvolveram um método baseado em PCR para a detecção de novos genes *cry* de *Bt*, denominada E-PCR de exclusão. Esta técnica foi realizada utilizando trios de *primers* para *cryI*, sendo dois no sentido senso (um generalista, o qual detecta a classe de genes *cryI*, e um específico para identificar as sub-classes, *cryIA*) e um anti-senso (generalista para *cryI*). O produto esperado representa o resultado da competição entre o *primer* generalista e o específico (*primers* senso) para a extensão com o *primers* anti-senso generalista. Os resultados foram interpretados de acordo com o peso molecular dos fragmentos amplificados. A amplificação simultânea dos *primers* generalistas e de um *mix* dos específicos resultaria no desaparecimento da banda do generalista quando os genes estudados fossem conhecidos. Caso o gene não fosse reconhecido pelos *primers* específicos, a banda seria resultado da amplificação com os *primers* generalistas e conteria essencialmente o gene *cryI* não detectado.

### **ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR GENES *CRY***

As proteínas *cry* de *Bt* têm mostrado atividade inseticida altamente específica entre as diversas ordens de insetos. Dentre os insetos suscetíveis a *Bt*, destacam-se as ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Zhong *et al.*, 2000). Recentemente, estudos sobre a ação das proteínas *cry* em outras ordens, como Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Malophaga, têm sido divulgados (De Maagd *et al.*, 2001; Feitelson *et al.*, 1992), sendo que algumas proteínas *cry* mostram atividade contra nematódeos (Marroquin *et al.*, 2000). As toxinas *cry*, individualmente, apresentam atividade específica contra as ordens de insetos, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Classificação e nomenclatura atualizada dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*.

| Classe | Sub-Classe | Genes   | Proteína (≅kDa)  | Toxicidade  |         |     |
|--------|------------|---|------------------|---|---------|-----|
| 1      | A          | <i>cry1Aa1, cry1Aa2, cry1Aa3, cry1Aa4, cry1Aa5, cry1Aa6, cry1Aa7, cry1Aa8, cry1Aa9, cry1Aa10, cry1Aa11, cry1Aa12, cry1Ab1, cry1Ab2, cry1Ab3, cry1Ab4, cry1Ab5, cry1Ab6, cry1Ab7, cry1Ab8, cry1Ab9, cry1Ab10, cry1Ab11, cry1Ab12, cry1Ab13, cry1Ab14, cry1Ab15, cry1Ab-like, cry1Ab-like, cry1Ab-like, cry1Ac1, cry1Ac2, cry1Ac3, cry1Ac4, cry1Ac5, cry1Ac6, cry1Ac7, cry1Ac8, cry1Ac9, cry1Ac10, cry1Ac11, cry1Ac12, cry1Ac13, cry1Ad1, cry1Ad2, cry1Ae1, cry1Af1, cry1Ag1, cry1Ah1, cry1A-like</i> | 130 - 134        | L/D   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ba1, cry1Ba2, cry1Ba3, cry1Bb1, cry1Bc1, cry1Bd1, cry1Be1</i>  | 139 - 140        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ca1, cry1Ca2, cry1Ca3, cry1Ca4, cry1Ca5, cry1Ca6 [1], cry1Ca7, cry1Ca8, cry1Cb1, cry1Cb2</i>   | 133 - 134        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Da1, cry1Da2, cry1Db1, cry1Db2</i>   | 131 - 132        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ea1, cry1Ea2, cry1Ea3, cry1Ea4, cry1Ea5, cry1Ea6, cry1Eb1</i>  | 133 - 134        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Fa1, cry1Fa2, cry1Fb1, cry1Fb2, cry1Fb3, cry1Fb4, cry1Fb5</i>  | 132 - 134        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ga1, cry1Ga2, cry1Gb1, cry1Gb2</i>   | 132 - 133        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ha1, cry1Hb1, cry1H-like</i>   | 131 - 133        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ia1, cry1Ia2, cry1Ia3, cry1Ia4, cry1Ia5, cry1Ia6, cry1Ia7, cry1Ia8, cry1Ib1, cry1Ic1, cry1Id1, cry1Ie1, cry1I-like</i>   | 81               | L/C   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ja1, cry1Jb1, cry1Jc1</i>  | 133 - 134        | L   |         |     |
|        |            | <i>cry1Ka1</i>  | 137              | L   |         |     |
|        |            | -   | <i>cry1-like</i> | -   | -       |     |
|        |            | 2   | A                | <i>cry2Aa1, cry2Aa2, cry2Aa3, cry2Aa4, cry2Aa5, cry2Aa6, cry2Aa7, cry2Aa8, cry2Aa9, cry2Ab1, cry2Ab2, cry2Ab3, cry2Ab4, cry2Ac1, cry2Ac2, cry2Ad1</i> | 70 - 71 | D/L |
|        |            |   |                  | <i>cry3Aa1, cry3Aa2, cry3Aa3, cry3Aa4, cry3Aa5, cry3Aa6, cry3Aa7</i>  | 73      | C   |
| 3      | B          | <i>cry3Ba1, cry3Ba2, cry3Bb1, cry3Bb2, cry3Bb3</i>  | 74 - 75          | C   |         |     |
|        |            | <i>cry3Ca1</i>  | 73               | C   |         |     |
| 4      | A          | <i>cry4Aa1, cry4Aa2</i>   | 135              | -   |         |     |
|        |            | <i>cry4Ba1, cry4Ba2, cry4Ba3, cry4Ba4</i>   | 128              | D   |         |     |
| 5      | A          | <i>cry5Aa1, cry5Ab1, cry5Ac1</i>  | 135 - 152        | N/H   |         |     |
|        |            | <i>cry5Ba1</i>  | 140              | H   |         |     |
| 6      | A          | <i>cry6Aa1</i>  | 54               | N   |         |     |
|        |            | <i>cry6Ba1</i>  | 44               | N   |         |     |
| 7      | A          | <i>cry7Aa1, cry7Ab1, cry7Ab2</i>  | 129 - 130        | C   |         |     |
|        |            | <i>cry8Aa1</i>  | 131              | C   |         |     |
| 8      | B          | <i>cry8Ba1</i>  | 134              | C   |         |     |
|        |            | <i>cry8Ca1</i>  | 130              | C   |         |     |
|        |            | <i>cry9Aa1, cry9Aa2</i>   | 130              | L   |         |     |
| 9      | B          | <i>cry9Ba1</i>  | -                | -   |         |     |
|        |            | <i>cry9Ca1</i>  | 130              | L   |         |     |
|        |            | <i>cry9Da1, cry9Da2</i>   | 132              | -   |         |     |
| 10     | E          | <i>cry9Ea1, cry9Ea2</i>   | 130              | -   |         |     |
|        |            | -   | <i>cry9 like</i> | -   | -       |     |
|        |            | <i>cry10Aa1, cry10Aa2</i>   | 78               | D   |         |     |
| 11     | A          | <i>cry11Aa1, cry11Aa2</i>   | 72               | D   |         |     |
|        |            | <i>cry11Ba1, cry11Bb1</i>   | 81 - 84          | D   |         |     |
| 12     | A          | <i>cry12Aa1</i>   | 142              | N   |         |     |
| 13     | A          | <i>cry13Aa1</i>   | 88               | N   |         |     |
| 14     | A          | <i>cry14Aa1</i>   | 132              | C   |         |     |
| 15     | A          | <i>cry15Aa1</i>   | 38               | L   |         |     |
| 16     | A          | <i>cry16Aa1</i>   | 71               | D   |         |     |
| 17     | A          | <i>cry17Aa1</i>   | 71               | D   |         |     |
| 18     | A          | <i>cry18Aa1</i>   | 79               | C   |         |     |
|        |            | <i>cry18Ba1</i>   | 76               | C   |         |     |
|        |            | <i>cry18Ca1</i>   | 78               | C   |         |     |
| 19     | A          | <i>cry19Aa1</i>   | 75               | D   |         |     |
|        |            | <i>cry19Ba1</i>   | 78               | D   |         |     |
| 20     | A          | <i>cry20Aa1</i>   | 86               | D   |         |     |
| 21     | A          | <i>cry21Aa1, cry21Aa2</i>   | 132              | N   |         |     |
| 22     | A          | <i>cry22Aa1</i>   | 79               | H   |         |     |
| 23     | A          | <i>cry23Aa1</i>   | -                | -   |         |     |
| 24     | A          | <i>cry24Aa1</i>   | 75               | -   |         |     |
| 25     | A          | <i>cry25Aa1</i>   | 76               | -   |         |     |
| 26     | A          | <i>cry26Aa1</i>   | 131              | -   |         |     |
| 27     | A          | <i>cry27Aa1</i>   | 94               | -   |         |     |
| 28     | A          | <i>cry28Aa1, cry28Aa2</i>   | 126              | -   |         |     |
| 29     | A          | <i>cry29Aa1</i>   | -                | -   |         |     |
| 30     | A          | <i>cry30Aa1</i>   | -                | -   |         |     |
| 31     | A          | <i>cry31Aa1</i>   | -                | -   |         |     |
| 32     | A          | <i>cry32Aa1</i>   | -                | -   |         |     |

L- Lepidoptera; C- Coleoptera; D- Diptera; H- Hymenoptera; N- Nematoda

Fonte: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

## PERSPECTIVAS

*Bacillus thuringiensis* tem sido o agente biológico mais utilizado para o controle de insetos. De acordo com Van Rie (2000), apesar desta ampla aplicação, as formulações disponíveis no mercado apresentam algumas limitações quando comparadas aos inseticidas químicos, como: pouco eficazes a insetos endofíticos (devido ao hábito alimentar deste grupo) e as proteínas Cry são facilmente degradadas pela radiação ultra-violeta (após aplicação). Considerando essas desvantagens, as plantas geneticamente modificadas com genes *cry* de interesse podem representar uma alternativa viável junto aos programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP). Diversos genes *cry* já foram transferidos à plantas, como por exemplo algodão (Perlak *et al.*, 1990), batata (Adang *et al.*, 1993), milho (Kozziel *et al.*, 1993), arroz (Nayak *et al.*, 1997), revelando que diferentes genes *cry* podem ser combinados e introduzidos em plantas, aumentando o espectro de ação inseticida (Schuler *et al.*, 1998). No MIP, tanto as formulações à base de *Bt*, já disponíveis no mercado, quanto as plantas geneticamente modificadas, podem representar ferramentas importantes no controle de populações de insetos. Por outro lado, esses métodos não devem ser considerados como a única alternativa, mas como parte de um conjunto de métodos de controle de pragas que visa manter as populações de insetos abaixo do nível de dano econômico, com redução de riscos e problemas nos agroecossistemas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.F.; BROWN, K.L. & WHITELEY, H.R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes promoter. **J. Bacteriol.**, v.173, p. 3846-3854, 1991.
- ADANG, M.J.; BRODY, M.S., CARDINEAU, G.; EAGAN, N.; ROUSH, R.T.; SHEWMAKER, C.K.; JONES, A.; OAKES, J.V. & MCBRIDE, K.E. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. **Plant Mol. Biol.**, v. 21, p. 1131-1145, 1993.
- AGAISSE, H. & LERECLUS, D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis cryIIIa* toxin gene is not dependent on a sporulation specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4734-4741, 1994.
- AGAISSE, H. & LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **J. Bacteriol.**, v.177, p. 6027-6032. 1995.
- BAUM, J. & MALVAR, T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.**, v. 18, p. 1-12. 1995.
- BEN-DOV, E.; MANASHEROB, R.; ZARITSKY, A.; BARAK, Z. & MARGALITH, Y. PCR analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by the five conserved blocks of toxins. **Current Microbiol.**, v. 42, p. 96-99, 2001.
- BERLINER, E. Über die schlaffsucht der Mehlmotenraupe. *Z. ges. Getreidewesen.* v. 3, p. 63-70, 1911.
- BERLINER, E. Eber die schlaffsucht der Mehlmotenraupe. (*Ephestia kuehniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. **Z. Ang. Entomol.**, v. 2, p. 29-56, 1915.
- BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G. & FUCHS, R.L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 32, p. 156-173, 2000.
- BRAVO, A.; AGAISSE, H.; SALAMITOU, S. & LERECLUS, D. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* e *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 250, p. 734-741, 1996.
- BRIZZARD, B.L.; SCHNEPF, H.E. & KRONSTAD J.W. Expression of the *cryIB* crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 231, p. 59-64,



- 1991.
- BROWN, K.L. Transcriptional regulation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* crystal protein gene operon. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 7951-7957, 1993.
- BROWN, K.L. & WHITELEY, H.R. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p. 4166-4170, 1988.
- BROWN, K.L. & WHITELEY, H.R. Isolation of second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6682-6688, 1990.
- CARLSON, C.R.; CAUGANT, D.A. & KOLSTØ, A.B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 1719-1725, 1994.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. & DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 807-813, 1998.
- DE MAAGD, R.A.; BOSCH, D. & STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends Genet.**, v.17, n. 4, p. 193-199, 2001.
- DERVYN, E.; PONCET, S.; KLIER, A. & RAPOPORT, G. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **J. Bacteriol.**, v. 177, p. 2283-2291, 1995.
- DE SOUZA, M.T.; LECADET, M.-M. & LERECLUS, D. Full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2952-2960, 1993.
- DONOVAN, W.P.; GONZÁLEZ, J.M.JR.; GILBERT, M.P. & DANKOCSIK, C. Isolation e characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotid sequence of the toxin gene. **Mol. Gen. Genet.**, v. 214, p. 365-372, 1988.
- ELY, S. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. p.105-124 **In:** P. Entwistle, J.S.; Cory, M.J.; Baley & S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and pratice, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K. p.37-69. 1993.

- FEITELSON, J. S., J. PAYNE, AND L. KIM. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, v. 10, p. 271–275, 1992.
- HALDENWANG, W.G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. **Microbiol. Rev.**, v. 59, p. 1-30. 1995.
- HANSEN, B.M. & HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 1, p. 185–189, 2001.
- HANSEN, B.M.; DAMGAARD, P.H.; EILENBERG, J. & PEDERSEN, J.C. Molecular and Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 71, p. 106-114, 1998.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 242-255, 1989.
- HOSSAIN, M.A.; AHMED, S. & HOQUE S. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 70, p. 221-225, 1997.
- JUÁREZ-PÉREZ, V. M.; FERRANDIS, M.D. & FRUTOS, R.. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 8, p. 2997–3002, 1997.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; MCPHERSON, K.; MEGHJI, M.R.; MERLIN E.; RHODES, R.; WARREN, G.W.; WRIGHT, M. & EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v. 11, p. 194-200, 1993.
- KUO, W.-S. & CHARK, K.-F. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1369-1377, 1996.
- LACEY, L.A. & LACEY, C.M. The medical importance of riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. **Journal of American Mosquito Control Association.**, v. 6, p.1-93. 1990.
- LANDÉN, R. BRYNE, M. & ABDEL-HAMMED, A. Distribution of *Bacillus thuringiensis* strains in southern Sweden. **Worlds. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10,

- p. 45-50, 1994.
- LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GOMINET, M. & CHAUF AUX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* *sp0A* mutant. **Bio/Technology**, v. 13, p. 67-71, 1995.
- LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GRANDVALET, C.; SLAMITOU, S. & GOMINET, M. Regulation of toxin virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 295-299, 2000.
- LERECLUS, D.; DELÉCLUSE & LECAD ET, M.-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. **In:** P. Entwistle, J.S.; Cory, M.J.; Baley & S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K. p. 37-69. 1993.
- MARGALITH, Y. Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti); history and present status. **Isr. J. Entomol.**, v. 23, p. 3-8, 1989.
- MARROQUIN, L.D., ELYASSNIA, D., GRIFFITTS, J.S., FEITELSON, J.S., AND AROIAN R.V. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 155, p. 1693-1699, 2000.
- NAYAK, P.; BASU, D.; DAS, S.; BASU, A.; GHOSH, D.; RAMAKRISHNAN, N.A.; GHOSH, M. & SEM, S.K. Transgenic elite indica rice plants expressing *CryIAc* delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 2111-2116, 1997.
- OHBA, M. & ARATAKE, Y. Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silkworm-breeding environments. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 80, p. 56-64, 1994.
- PEFEROEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Tibtech**, v. 15, p. 173-177, 1997.
- PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.A.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T. & FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v. 8, p. 939-943, 1990.
- SALAMITOU, S.; AGAISSE, H.; BRAVO, A. & LERECLUS, D. Genetic analysis of *cryIII A* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, v. 142, p. 2049-2055, 1996.

- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 775-806, 1998.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R. & DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Tibtech.**, v. 16, p. 168-174, 1998.
- SEKAR, V. The insecticidal crystal protein gene is expressed in vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Curr. Microbiol.**, v. 17, p. 347-349, 1988.
- SMITH, I. Regulatory proteins that control late-growth development. **In: Bacillus subtilis** and other Gram-positive bacteria. Sonenshein, A.L.; Hoch, J.A. & Losick, R. American Society of Microbiology, Washington D.C., p. 785-800, 1993.
- VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F. DE & PAIVA, E. 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). **Soc. Entomol. Brasil.**, v. 29, n. 1, p. 174-153, 2000.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis* **In: P.** Entwistle, J.S.; Cory, M.J.; Baley & S. Higgs (ed.), *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K., p.1-35, 1993.
- VAN RIE, J. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 2, n. 90, p. 463-469, 2000.
- YOSHISUE, H.; NISHIMOTO, T.; SAKAI, H. & KOMANO, T. Identification of a promoter for the crystal protein-encoding gene *cryIVB* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Gene.**, v. 137, p. 247-251, 1993.
- ZHANG, J.; SCHAIRER, H.U.; SCHNETTER, W.; LERECLUS, D. & AGAISSE, H. *Bacillus popilliae cryI8Aa* operon is transcribed by  $\sigma^E$  and  $\sigma^K$  forms of RNA polymerase from a single initiation site. **Nucleic Acids Res.**, v. 26, p. 1288-1293, 1998.
- ZHONG, C.; ELLAR, D.J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S. & HART, E.R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin which is toxic to insects in three orders. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 76, p. 131-139, 2000.

## **Capítulo 2**

---

---

### **Artigo de Pesquisa:**

DISTRIBUIÇÃO DE GENES *CRY* DE *Bacillus thuringiensis*  
EM ISOLADOS DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL

**DISTRIBUIÇÃO DE GENES *CRY* DE *Bacillus thuringiensis* EM ISOLADOS DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL**

Laura Massochin Nunes Pinto<sup>1\*</sup> & Lidia Mariana Fiuza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro 2, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS. C.P. 275, CEP 93001-970, São Leopoldo, RS. Fone: (51) 590 3333. Ramal 1213. Fax: (51) 590 8122. E-mail: lau@pro.via-rs.com.br. <sup>2</sup>EEA/Instituto do Riograndense do Arroz. C.P. 29, CEP 94930-030, Cachoeirinha, RS.

## ABSTRACT

### **Distribution of *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from soils of Rio Grande do Sul**

Minor environmental impact and new alternatives for insect control are of increasing interest nowadays. In that context the microbial control using negative interactions as a natural basis for biological control of pests appears. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) emerges, among several, as a toxic protein producer for various species of insects which are codified by *cry* genes. Due to that characteristic more than 40.000 strains of *Bt* were already isolated and around 190 *cry* genes identified. New isolates of *Bt* with toxic activity for different species of insects are being searched by a number of new studies with interest on technologies of low environmental impact. The state of Rio Grande do Sul (RS) has a limited number of studies on *Bt*. Our research had the objective of detect six families of *cry* genes of *Bt* obtained from soil samples from RS. Genetic and proteic profiles of 46 isolates were evaluated. Using the PCR 47.82% of *cry9* genes, followed by 15.21% of *cry3*, 6.52% of *cry1* and *cry7*, and 2.17% of *cry2* were detected. Eight different genetic profiles were identified, and the most frequent was the profile *cry9* (39.13%). The proteic analysis of *Bt* by SDS-PAGE, identified 14 families of Cry proteins, that possibly are coded by the genes presents in the isolates analyzed. Beside the unknown proteins that can represent new *cry* genes not characterized yet.

**Key words:** biological control, entomopathogen, bacterial, insect.

## RESUMO

Estudos visando a descoberta de novas alternativas para o controle de insetos, com menor impacto ambiental, têm sido intensificados. Nesse contexto, surge o controle microbiano de insetos, o qual utiliza interações negativas, como a base natural para o controle biológico de pragas. Entre os diversos patógenos de insetos, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), caracterizada pela produção de proteínas tóxicas a representantes de diversas ordens de insetos, as quais são codificadas por genes *cry*. Devido a esta característica, mais de 40.000 cepas de *Bt* já foram isoladas e cerca de 190 genes *cry* caracterizados. O interesse em utilizar tecnologias com menor impacto ambiental, têm impulsionado várias pesquisas a selecionar novos isolados de *Bt* com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos. Considerando que no Rio Grande do Sul (RS), os dados sobre *Bt* são limitados, essa pesquisa objetivou a detecção de seis famílias de genes *cry* de *Bt*, isolados de amostras de solos do RS. Neste estudo foram avaliados os perfis genéticos e protéicos de 46 isolados de *Bt* obtidos de solos do RS. Através da PCR foi detectada a presença de genes *cry9* em 47.82% dos isolados analisados, seguido de *cry3* (15.21%), *cry1* e *cry7* (ambos com 6.52%) e *cry2* (2.17%). Oito diferentes perfis genéticos foram identificados, sendo que o mais freqüente foi o perfil *cry9* (39.13%). A análise protéica de *Bt* por SDS-PAGE, identificou 14 famílias de proteínas Cry, que possivelmente são codificadas pelos genes presentes nos isolados analisados, além de proteínas desconhecidas que podem representar novos genes *cry* ainda não caracterizados.

**Palavras chave:** controle biológico, entomopatógenos, bactérias, insetos



## INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental com elementos químicos tóxicos, incluindo o uso de pesticidas na agricultura, tem aumentado a cada ano. Estudos visando a descoberta de novas alternativas para o controle de insetos, com menor impacto ambiental, têm sido crescentes. Nesse contexto, surge o controle microbiano de insetos, o qual utiliza as interações negativas, como predação e parasitismo, como a base natural para o controle biológico de pragas (4).

Vários agentes microbianos foram estudados para a supressão de populações de insetos que causam danos em lavouras e demais plantas (2, 3), sendo descobertos diversos patógenos bacterianos, destacando-se *Bacillus thuringiensis* (*Bt*).

*Bt* atende aos requisitos de um agente de controle microbiano, tendo como sua principal característica a produção de cristais inseticidas durante a esporulação. Estes cristais consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, denominados *cry*, os quais conferem a ação tóxica de *Bt* a insetos de diversas ordens, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (9). Devido a esta característica, mais de 40.000 cepas de *Bt* já foram isoladas e cerca de 190 genes *cry* caracterizados. As informações sobre os genes já caracterizados estão disponíveis na internet pelo endereço: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

O crescente interesse em utilizar tecnologias com menor impacto ambiental e as propriedades entomopatogênicas desta bactéria altamente variáveis, têm impulsionado várias pesquisas a selecionar isolados de *Bt* com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos (12). Atualmente a procura de genes que sintetizam as proteínas inseticidas de *Bt* tem sido feita através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), técnica molecular que tem se mostrado uma ferramenta valiosa à predição da atividade inseticida de novos isolados.

Considerando que no Rio Grande do Sul (RS), os dados sobre *Bt* são limitados, essa pesquisa objetivou a detecção de seis famílias de genes *cry* de *Bt*, isolados de amostras de solos do RS, com atividade inseticida às ordens Lepidoptera e Coleoptera.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Isolados bacterianos:** as cepas *Bt tenebrionis cry3A* e *Bt aizawai HA3* foram fornecidas pelo Instituto Pasteur (França) e os demais 46 isolados de *Bt* utilizados neste

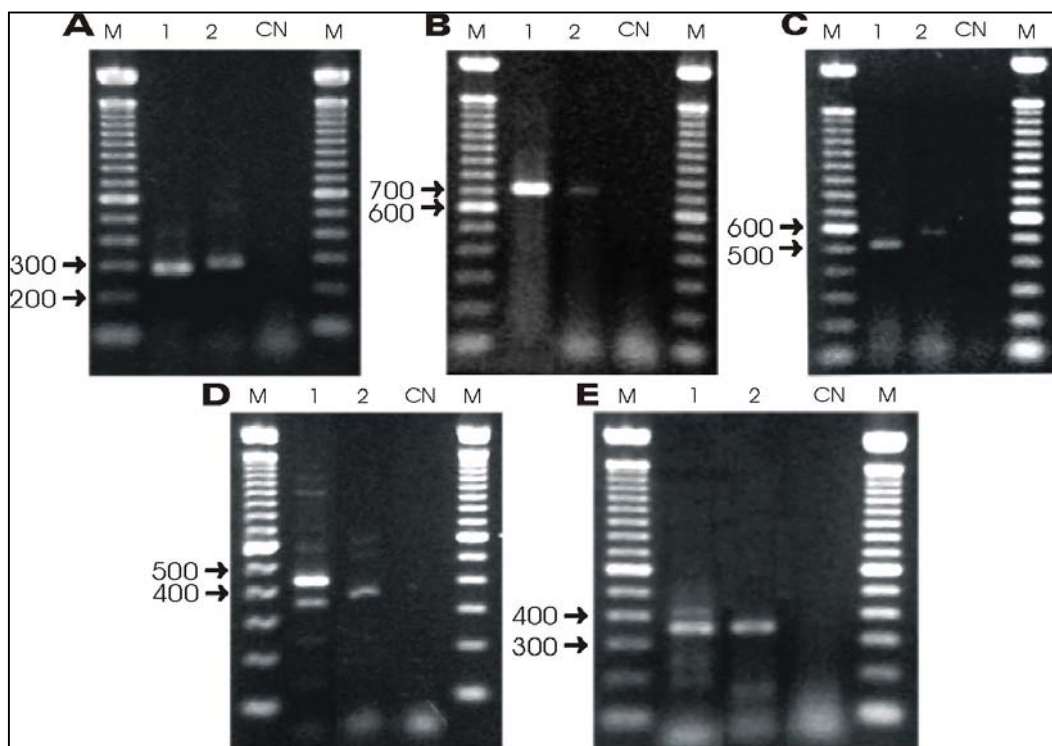
estudo foram obtidos de 29 amostras de solos de áreas cultivadas de arroz irrigado, coletadas em dez municípios do RS no período de julho e novembro de 1999 (1).

**Preparo das amostras e PCR:** os isolados de *Bt* foram crescidos em Ágar Nutriente durante 12 horas a 30°C. A extração de DNA total foi realizada segundo Hansen & Hendriksen (8). Os seis pares de *primers* sintetizados para este estudo visando a detecção de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7*, *cry8* e *cry9*, foram descritos por Ben-Dov *et al.* (5, 6) e Bravo (7). A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos de reação cada. As reações foram realizadas em volumes de 25µL que consistiam em 1µL de amostra de DNA com o tampão de reação, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 a 0,5 µM de cada primer e 0,5U de *Taq* DNA polymerase (GIBCO-BRL). As amostras foram desnaturadas 1 min a 94°C, aneladas aos primers por 40-50s a 60°C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 50-90s a 72°C. Como controle positivo, os experimentos foram associados a amostras de *Bt* já caracterizadas molecularmente e um controle negativo, sem adição de DNA. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1 e 1,5%.

**Análise protéica por SDS-PAGE:** a composição do complexo esporo-cristal foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida de sódio dodecyl sulfato a 10%. Para cada isolado, uma alíquota bacteriana crescida em Ágar Nutriente foi cultivada em meio LB por 48 h. As amostras foram preparadas com 15µL das suspensões bacterianas, 0,125M Tris-Cl pH6,8, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% Mercaptoetanol e 0,1% Bromofenol Blue. Em seguida, aquecidas a 100°C por 10 min, centrifugadas 10.000 rpm por 30s. O SDS-PAGE foi realizado de acordo com o método descrito por Laemmli (10).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de PCR, ilustrados na Figura 1, revelaram ampliações de fragmentos de DNA semelhantes aos controles positivos para genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7* e *cry9*, sendo que os genes *cry8* não foram detectados nas amostras testadas.



**Figura 1.** Géis de agarose (1-1,5%) de produtos amplificados por PCR. **M:** Marcador de Peso Molecular 100bp (Gibco BRL); **CN:** Controle Negativo. **(A)** Produtos amplificados de genes *cry1*; A1: *Bt aizawai* HA3; A2: 2023-10. **(B)** Produtos amplificados de genes *cry2*; canaletas B1: *Bt aizawai* HA3; B2: 2023-10. **(C)** Produtos amplificados de genes *cry3*; C1: *Bt tenebrionis* Cry3A; C2: 2017-9. **(D)** Produtos amplificados de genes *cry7*; D1: *Bt aizawai* HA3; D2: 1489-3. **(E)** Produtos amplificados de genes *cry9*; E1: *Bt aizawai* HA3; E2: 3420-12.

Em ordem decrescente de frequência, os isolados contendo genes *cry9* foram os mais abundantes, representando 47,82% dos isolados analisados, seguido de *cry3* (15,21%), *cry1* e *cry7* (ambos com 6,52%) e *cry2* (2,17%).

Os isolados que não foram amplificados por PCR com nenhum dos seis pares de *primers* de genes *cry*, mas foram identificados por microscopia apresentando inclusões cristalinas, totalizaram 36,95% das amostras. Este resultado sugere que tratam-se de isolados de *B. thuringiensis* contendo genes não identificados pelos *primers* utilizados ou novos genes *cry* ainda não caracterizados.

Os resultados obtidos mostraram que a frequência de genes *cry9* encontrados neste trabalho diferem dos resultados encontrados por Bravo *et al.* (7) que totalizou apenas 2,60% dos isolados analisados e também da frequência de 10,20% encontrada por Ben-Dov *et al.* (5). No presente trabalho, os genes *cry1* foram encontrados em apenas 6,52% dos isolados, diferindo de Bravo *et al.* (7), que relataram sua predominância nos isolados de *B. thuringiensis* analisados, identificando-os em 49,50%

das amostras. Os genes *cry3* apresentaram a segunda maior frequência neste estudo, sendo semelhante aos resultados de Bravo *et al.* (7), que também encontraram uma frequência alta para estes genes, representando 21,70% dos isolados. Por outro lado, Ben-Dov *et al.* (5) não identificaram estes genes nos isolados analisados.

A maioria dos isolados de *Bt* contém diversos genes *cry* em diferentes combinações. Neste trabalho foi analisado o perfil genético e protéico dos isolados. O perfil genético foi avaliado quanto a distribuição dos genes *cry* entre os isolados. A Tabela 1 mostra os oito diferentes perfis genéticos obtidos e sua frequência entre os 46 isolados analisados. Os resultados mostraram que a ocorrência dos genes *cry9* foi observada como o perfil único em 39,13% dos isolados e também associada a presença dos demais genes *cry* detectados. Entretanto, os genes *cry1* e *cry2* foram encontrados somente em perfis associados com outros genes, não ocorrendo isoladamente.

**Tabela 1.** Composição e frequência dos perfis de genes *cry* presentes nos isolados de *Bacillus thuringiensis*.

| Número de isolados | Genes                   | % de detecção |
|--------------------|-------------------------|---------------|
| 18                 | <i>cry9</i>             | 39,13         |
| 17                 | Não amplificaram        | 36,95         |
| 4                  | <i>cry3</i>             | 8,70          |
| 2                  | <i>cry9, cry3</i>       | 4,35          |
| 1                  | <i>cry9, cry7</i>       | 2,17          |
| 1                  | <i>cry3, cry1</i>       | 2,17          |
| 1                  | <i>cry1, cry7</i>       | 2,17          |
| 1                  | <i>cry9, cry1, cry2</i> | 2,17          |
| 1                  | <i>cry7</i>             | 2,17          |

A análise protéica por SDS-PAGE dos isolados de *Bt* mostrou perfis altamente variáveis. Através de uma comparação entre os pesos moleculares obtidos e os pesos conhecidos para as proteínas Cry, foram identificadas 14 classes de proteínas Cry que possivelmente sejam codificadas pelos isolados analisados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Classes de proteínas Cry identificadas nos isolados de *Bacillus thuringiensis*.

| Peso molecular<br>(~kDa) | Classe | Nº de isolados | Peso molecular<br>(~kDa) | Classe | Nº de isolados |
|--------------------------|--------|----------------|--------------------------|--------|----------------|
| 130-140                  | Cry1   | 2              | 72-84                    | Cry11  | 3              |
| 70-71                    | Cry2   | 1              | 88                       | Cry13  | 1              |
| 128-135                  | Cry4   | 2              | 38                       | Cry15  | 1              |
| 135-152                  | Cry5   | 1              | 76-79                    | Cry18  | 3              |
| 129-130                  | Cry7   | 2              | 75-78                    | Cry19  | 1              |
| 130-134                  | Cry8   | 2              | 86                       | Cry20  | 8              |
| 78                       | Cry10  | 1              | 79                       | Cry22  | 3              |

Além das proteínas com pesos moleculares conhecidos e característicos, diversas encontradas não correspondem às proteínas Cry já caracterizadas (12). Algumas destas podem representar novos genes *cry* ainda não caracterizados.

Quatro isolados apresentaram várias bandas pequenas com baixo peso molecular. Este resultado pode ser devido a degradação das proteínas do cristal (11).

Os resultados do presente estudo sugerem que os isolados de *Bt*, provenientes de solos do Rio Grande do Sul, apresentam uma grande diversidade de genes *cry*. Cinco classes foram identificadas molecularmente, além da caracterização de proteínas que indicam a presença de novos perfis genéticos e protéicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Antonio, A.C.; Pinto, L.M.N.; Jesus, M.A.S. & Fiuza, L.M. Levantamento de bactérias entomopatogênicas em amostras de solos de áreas orizícolas do Rio Grande do Sul. Anais do II Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXIV Reunião da Cultura do Arroz Irrigado, Porto Alegre, RS, 2001, p.255.
2. Aronson, A.I.; Beckman, W. & Dunn, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.*, 50: 1-24, 1986.
3. Deacon, J.W. Microbial control of plant pests and disease. Aspects of Microbiology, No.7. American Society for Microbiology, Washington, DC., 1983.
4. Atlas, R.M. & Bartha, R. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4ed. Cummings Science Publishing, 1998, 694p.
5. Ben-Dov, E.; Zaritski, A.; Dahan, E.; Barak, Z.; Sinai, R.; Manasherob, R.; Khamraev, A.; Troitskaya, E.; Dubitsky, A.; Berezina, N. & Margalith, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4883-4890, 1997.
6. Ben-Dov, E.; Wang, Q.; Zaritsky, A.; Manasherob, R.; Barak, Z.; Schneider, B.; Khamraev, A.; Baizhanov, M.; Glupov, V. & Margalith, Y. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3714-16, 1999.
7. Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F.J.; Peña, G.; Nuñez-Valdez, M.; Soberón, M. & Quintero, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4965-72, 1998.
8. Hansen, B.M. & Hendriksen, N.B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 185-189, 2001.
9. Höfte, H. & Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255, 1989.

10. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
11. Ohba, M.; YU, Y.M.; Aizawa, K. Non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions with unusual protein components. *Lett. Appl. Microbiol.*, 5: 29-32, 1987.
12. Schnepf, E.; Crickmore, N.; Vanrie, J; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; ZEIGLER, D.R. & Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 775-806, 1998.

## **Capítulo 3**

---

### **Artigo de Pesquisa:**

PCR PARA DETECÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE  
*Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL TÓXICO A  
LEPIDÓPTEROS E COLEÓPTEROS



**PCR PARA DETECÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*  
COM POTENCIAL TÓXICO A LEPIDÓPTEROS E COLEÓPTEROS**

Laura Massochin Nunes Pinto<sup>1\*</sup> & Lidia Mariana Fiuza<sup>1,2</sup>

**Endereço:** <sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia, Centro 2, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS. C.P. 275, CEP 93001-970, São Leopoldo, RS. Fax: (51) 590 8122. E-mail: [fiuza@cirrus.unisinos.br](mailto:fiuza@cirrus.unisinos.br). <sup>2</sup>EEA/Instituto do Riograndense do Arroz. C.P. 29, CEP 94930-030, Cachoeirinha, RS.

## ABSTRACT

### PCR to detect and select *Bacillus thuringiensis* isolates with insecticidal potential to Lepidoptera and Coleoptera

By aiming at the screening of six groups of *Bt cry* genes which codify active proteins for harmful rice-fields coleopteran and lepidopteran, 46 *Bt* isolates from soil samples of rice-fields in Rio Grande do Sul (RS) have been tested for PCR. The *Bt* isolates have been grown in Agar Nutrient for 12 hours, and they have gone through DNA total extraction. The magnified fragments have been analysed in 1-1.5% agarose gels. Results concerning the amount of the screenings isolates show that 56.51% were potentially lepidopteran specific (*cry1*, *cry2* and *cry9*), and 21.73% were coleopteran specific (*cry3* and *cry7/8*), with a homogeneous distribution among the rice-fields areas in Rio Grande do Sul. *Cry2* genes were the only ones to be located solely in the Northshore area. In tests with *Spodoptera frugiperda* larvae the highest corrected mortality was equivalent to 25% for *Bt* 2027-1 isolate, which was characterized by the presence of *cry9* genes. Still regarding the same species, toxicity tests carried out by means of purified proteins of *Bt aizawai* HD68 indicate a  $CL_{50}$  of 9.38  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . *Bt* 2014-2 isolate has brought about 53.4% of corrected mortality of *Oryzophagus oryzae* larvae, which has been preselected because of the presence of *cry3* genes. Bioassay results confirm the prediction of *Bt* activity by PCR, which must have a straight relationship to the *cry* genes that codify specific insecticidal proteins.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, PCR, Bioassay, Lepidoptera, Coleoptera

## RESUMO

Visando a seleção de seis grupos de genes *cry* de *Bt*, que codificam proteínas ativas para coleópteros e lepidópteros prejudiciais à cultura do arroz, 46 isolados de *Bt* provenientes de amostras de solos das regiões orizícolas do Rio Grande do Sul (RS), foram testados por PCR. Os isolados de *Bt* foram crescidos em Ágar Nutriente durante 12 horas e submetidos a extração de DNA total. Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1-1,5%. Os resultados referentes ao total de isolados selecionados mostram que 56,51% foram potencialmente específicos a lepidópteros (*cry1*, *cry2* e *cry9*) e 21,73% a coleópteros (*cry3* e *cry7/8*), tendo sua distribuição homogênea entre as regiões orizícolas do RS. Apenas os genes *cry2* foram localizados somente na região Litoral Norte. Nos testes com lagartas de *Spodoptera frugiperda* a maior mortalidade corrigida foi equivalente a 25,0% para o isolado *Bt* 2027-1, o qual caracterizou-se pela presença de genes *cry9*. Para a mesma espécie, os testes de toxicidade através de proteínas purificadas de *Bt aizawai* HD68 revelaram uma  $CL_{50}$  de 9,38  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . O isolado *Bt* 2014-2 causou 53,4% de mortalidade corrigida às larvas de *Oryzophagus oryzae*, tendo sido esse pré-selecionado pela presença de genes *cry3*. Os resultados dos bioensaios confirmam a predição da atividade de *Bt* por PCR a qual deve estar diretamente relacionada aos genes *cry* que codificam proteínas inseticidas específicas.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*, PCR, Bioensaios, Lepidoptera, Coleoptera.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, vários estudos visam a diminuição do uso de produtos químicos no controle de insetos-praga da agricultura, devido aos riscos que oferecem ao homem e ao ecossistema (Lacey & Lacey, 1990). Assim, o controle microbiano torna-se uma alternativa no Manejo Integrado de Pragas (MIP), com baixo impacto ambiental. Dentre os microrganismos entomopatogênicos, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a qual produz corpos paraesporais, também conhecidos como cristais, compostos por proteínas inseticidas codificadas por genes denominados *cry* (Höfte & Whiteley, 1989).

A procura dos genes *cry* de *Bt* tem sido feita através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), a qual se aplica na predição da atividade inseticida de novos isolados de *Bt* (Juárez-Pérez *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998).

Na região sul do Brasil, a cultura do arroz irrigado tem grande importância econômica, porém vem sofrendo perdas pelo ataque de insetos fitófagos, principalmente das ordens Lepidoptera e Coleoptera (Gallo *et al.*, 1988).

Dentre os coleópteros, *Oryzophagus oryzae* é considerado o principal inseto prejudicial, devido ao hábito alimentar rizófago de suas larvas, que torna difícil o controle. Estes insetos podem ocasionar perdas de produção na ordem de 10 a 30% (Prando, 1999).

Da ordem Lepidoptera, as lagartas de *Spodoptera frugiperda* danificam a parte aérea das plantas, representando grandes danos entre a emergência das plantas e a inundação da lavoura (Vieira *et al.*, 1999).

A presente pesquisa objetivou a seleção de genes *cry* de *Bt* que codificam proteínas ativas para coleópteros e lepidópteros prejudiciais à cultura do arroz, as quais poderão ser utilizadas no MIP desta cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Isolados de *Bacillus thuringiensis*:** Quarenta e seis isolados de *Bt* obtidos de amostras de solos oriundos de regiões produtoras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul (RS) foram avaliados nesta pesquisa. Estes isolados pertencem a coleção de bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale

do Rio dos Sinos (UNISINOS) e ao Instituto Rio-Grandense do Arroz (EEA-IRGA). Como isolados de referência (padrão), foram utilizados *Bt tenebrionis 3A* e *Bt aizawai HA3* cedidos pelo “International Entomopathogenic *Bacillus* Center” do Instituto Pasteur (Paris).

**Genes *cry* de *Bt* - PCR:** As amostras de *Bt* utilizadas foram cultivadas 12 horas a 30°C em Ágar Nutriente. Após, os isolados foram submetidos a extração de DNA total conforme o método descrito por Hansen & Hendriksen (2001). Nesse estudo foram sintetizados seis pares de *primers*: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7/8*, *cry8* e *cry9* (Ben-Dov *et al.* 1997 e 1999; Bravo *et al.*, 1998). Os *primers* *cry1*, *cry2* e *cry9* identificam genes que codificam proteínas inseticidas para a ordem Lepidoptera e os *primers* *cry3*, *cry7/8* e *cry8* para Coleoptera. Cada reação de PCR foi realizada com volume final de 25µL, sendo: 1µL de amostra de DNA com o tampão de reação, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 a 0,5 µM de cada *primer* e 0,5U de *Taq* DNA polimerase (GIBCO-BRL). A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos de reação cada, onde as amostras foram desnaturadas 1 min a 94°C, aneladas aos *primers* por 40-50s a 60°C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 50-90s a 72°C. Os isolados de referência de *Bt* já caracterizadas molecularmente foram utilizados como controle positivo e reações sem adição de DNA como controle negativo. Os fragmentos amplificados foram analisados em géis de agarose a 1 e 1,5% e comparados com o marcador molecular 100bp (GIBCO BRL).

**Insetos:** As lagartas de 2º instar de *S. frugiperda* foram obtidas da criação de insetos do Laboratório de Microbiologia do Centro 2 da UNISINOS, mantidas em câmara climatizada regulada a 25 ± 2°C, 80% de Umidade Relativa (UR) e 12h de fotofase. As larvas de *O. oryzae* foram coletadas das raízes das plantas de arroz na EEA-IRGA (Cachoeirinha, RS), de outubro de 2000 e maio de 2001.

**Bioensaios:** Os ensaios *in vivo* com ambas espécies de insetos foram conduzidos em câmaras B.O.D. (*Biological Oxygen Demand*) a 25 ± 2°C, 80% de UR e 12h de fotofase. Os isolados bacterianos testados foram crescidos em Meio Usual Glicosado (De Barjac & Lecadet, 1976) a 28°C e 180rpm por 48h. As suspensões bacterianas foram centrifugadas 4.500 rpm por 15min e o sobrenadante descartado, sendo o *pellet* recuperado com água destilada autoclavada. A concentração bacteriana foi determinada

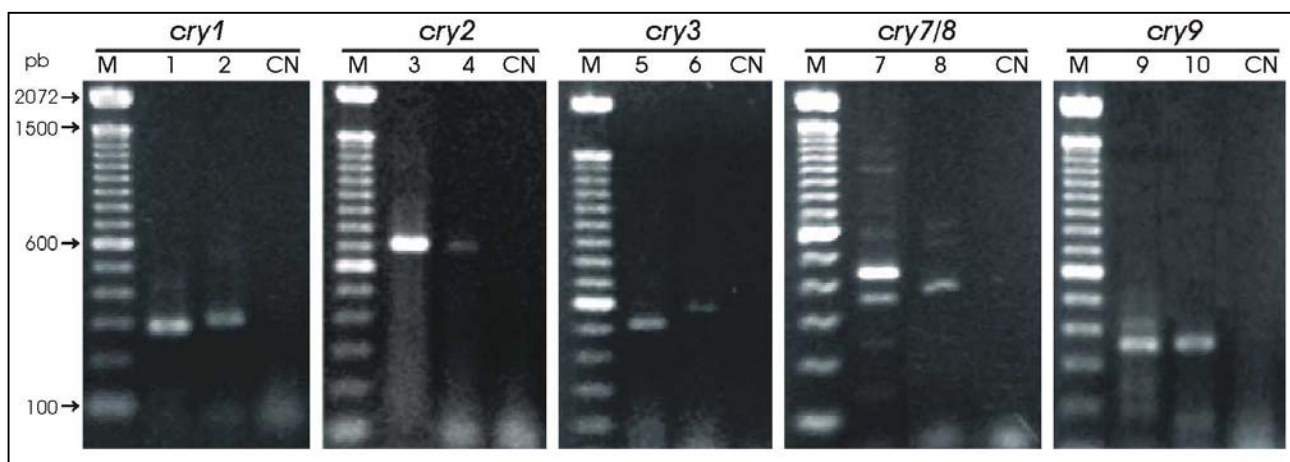
com auxílio da Câmara de Neubauer e microscópio óptico. Os dados de mortalidade obtidos foram corrigidos pela fórmula de Abbott (1925).

- *Spodoptera frugiperda*: os isolados que apresentaram fragmentos correspondentes aos genes *cry1*, *cry2* e *cry9* foram avaliados *in vivo* para esta espécie. As suspensões bacterianas na concentração de  $1.10^9$  céls./mL foram aplicadas na superfície da dieta artificial, previamente acondicionada em mini-placas de 30mm de diâmetro, onde as lagartas de 2º instar foram individualizadas. No grupo controle, a suspensão bacteriana foi substituída por água destilada autoclavada. Para cada isolado foram utilizadas 20 lagartas. A mortalidade foi observada diariamente durante sete dias após a aplicação dos tratamentos. Para o isolado *Bt aizawai* HD68, onde foi utilizada em bioensaio a suspensão bacteriana como controle positivo (Polanczyk *et al.*, 2000), também foi avaliada a toxicidade através da determinação da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>), utilizando-se proteína purificada através do método descrito por Fiuza *et al.* (1996). Os insetos foram individualizados nas condições mencionadas anteriormente, porém a dieta artificial foi substituída por discos de folha de milho, onde a proteína foi aplicada nas concentrações de 2, 10 e 50µg/µL. Na testemunha a proteína foi substituída por água destilada esterilizada. Para cada tratamento foram utilizados 30 insetos, sendo feitas três repetições, totalizando 90 insetos por tratamento. Com auxílio do medidor de área foliar LI-COR (LI-3100, USA), foi verificada a média de consumo foliar para cada tratamento. A mortalidade também foi observada até o sétimo dia após a aplicação dos tratamentos. Os dados foram analisados com o programa POLO-PC LeOra Software, 1987 (Alves, 1998).

- *Oryzophagus oryzae*: trata-se de um coleóptero aquático, cujas larvas encontram-se no sistema radicular das plantas de arroz. O bioensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Steffens *et al.* (2000). Na avaliação do novo isolado de *Bt* 2014-2, que revelou a presença de genes *cry3* nos ensaios de detecção por PCR, a suspensão bacteriana foi adicionada a concentração final de  $8.10^{10}$  céls./mL, em tubos de ensaio contendo duas plântulas de arroz e 8mL de água da lavoura. No grupo correspondente ao controle, não foi adicionada a suspensão bacteriana. A mortalidade foi avaliada sete dias após a instalação dos experimentos. Para cada tratamento foram utilizadas 20 larvas de 3º e 4º instares de *O. oryzae* e efetuadas três repetições.

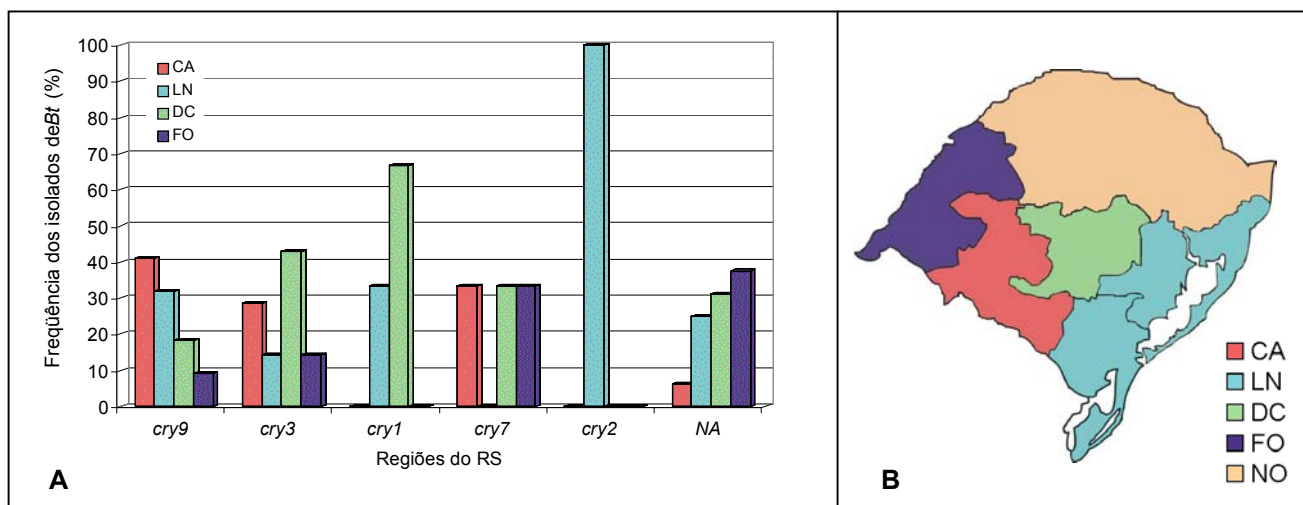
## RESULTADOS

A análise das ampliações por PCR do DNA total dos isolados revelou a presença de fragmentos com pesos moleculares característicos de genes *cry* para os isolados *Bt tenebrionis* 3A e *Bt aizawai* HA3, utilizados como controle positivo. Os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7/cry8* e *cry9*, foram identificados entre os novos isolados, sendo que apenas não foram amplificados os isolados testados com os *primers* específicos para genes *cry8*. Estes resultados estão representados na Figura 1.



**Figura 1.** Géis de agarose (1-1,5%) de produtos amplificados por PCR. (M) Marcador 100bp (Gibco BRL), setas indicam o peso molecular; (CN) Controle Negativo; (1) *Bt aizawai* HA3; (2) *Bt* 2023-10; (3) *Bt aizawai* HA3; (4) *Bt* 2023-10; (5) *Bt tenebrionis* 3A; (6) *Bt* 2017-9; (7) *Bt aizawai* HA3; (8) *Bt* 1489-3; (9) *Bt aizawai* HA3; (10) *Bt* 3420-12.

Entre os 46 novos isolados de *Bt* (Figura 2A), os genes *cry9*, oriundos de amostras de solos das áreas orizícolas do Rio Grande do Sul, mostraram-se os mais freqüentes (47,82%), seguidos dos genes *cry3* (15,21%), *cry1* e *cry7* igualmente representados (6,52%) e os genes *cry2* com a menor freqüência (2,17%). Um total de 36,95% isolados de *Bt* não foram amplificados pelos *primers* utilizados no presente trabalho. A maioria dos genes *cry* foi identificada em todas as regiões produtoras de arroz do RS. Apenas os genes *cry2* foram localizados somente na região Litoral Norte (Figura 2B).



**Figura 2.** Genes *cry* identificados nas diferentes regiões do Rio Grande do Sul (RS) e isolados de *Bt* Não Amplificados (NA); A: Distribuição das freqüências; B: Mapa representativo das regiões do RS; CA: Campanha; LN: Litoral Norte; DC: Depressão Central; FO: Fronteira Oeste; NO: Não-orizícola.

Nos ensaios *in vivo* com lagartas de *S. frugiperda*, foram testados os 24 isolados que amplificaram os genes *cry1*, *cry2* e *cry9* por PCR, caracterizados pela produção de proteínas ativas para lepidópteros. Os isolados testados mostraram baixa atividade inseticida ao lepidóptero alvo, quando comparados ao controle positivo, *Bt aizawai* HD68, que alcançou 100% de mortalidade corrigida a concentração de  $1.10^9$  céls./mL. Apenas 48,0% dos isolados testados causaram mortalidade, sendo que destes 90,9% amplificaram fragmentos equivalentes aos genes *cry9* e 9,0% equivalentes a *cry1* (Tabela 1). O isolado *Bt* 2027-1, caracterizado pela presença de genes *cry9*, apresentou a maior mortalidade corrigida (25,0%) nos bioensaios efetuados com lagartas de 2º ínstar.

Considerando a baixa atividade dos novos isolados de *Bt* obtidos no presente estudo, foi efetuada a avaliação da toxicidade de proteínas purificadas de *Bt aizawai* HD68 através da determinação da  $CL_{50}$ , onde os resultados da Análise de Probit revelam uma  $CL_{50}$  equivalente a 9,38  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , com intervalos de confiança entre 5,38 a 17,39, a 95% de probabilidade.



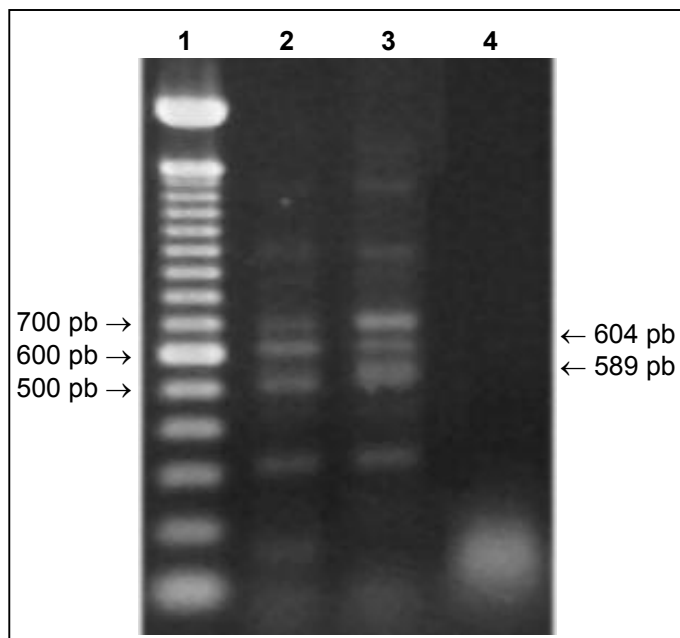
**Tabela 1.** Toxicidade e características dos isolados de *Bacillus thuringiensis* avaliados contra *Spodoptera frugiperda* e *Oryzophagus Oryzae*.

| Isolados de <i>B. thuringiensis</i> | Procedência (cidade/região <sup>b</sup> ) | Presença de genes |             |             |             |             | Mortalidade Corrigida (%) |                  |
|-------------------------------------|---|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|------------------|
|                                     |   | <i>cry9</i>       | <i>cry3</i> | <i>cry1</i> | <i>cry7</i> | <i>cry2</i> | <i>S. frugiperda</i>      | <i>O. oryzae</i> |
| <i>Bt aizawai</i> HD68 <sup>a</sup> | Instituto Pasteur                         | +                 | +           | +           | +           | +           | 100,0                     | ∅                |
| 1608-7                              | São Sepé/DC                               | +                 | +           | -           | -           | -           | 5,5                       | ∅                |
| 2017-9                              | Camaquã/LN                                | +                 | +           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 2023-10                             | Camaquã/LN                                | +                 | -           | +           | -           | +           | 0                         | ∅                |
| 1491-2                              | Itaqui/FO                                 | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 1608-1                              | São Sepé/DC                               | +                 | -           | -           | -           | -           | 5,5                       | ∅                |
| 1732-7                              | Agudo/DC                                  | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 1732-16                             | Agudo/DC                                  | +                 | -           | -           | -           | -           | 5,2                       | ∅                |
| 1816-1                              | Rosário do Sul/CA                         | +                 | -           | -           | -           | -           | 5,3                       | ∅                |
| 1879-1                              | Rosário do Sul/CA                         | +                 | -           | -           | -           | -           | 5,9                       | ∅                |
| 2010-10                             | Alegrete/FO                               | +                 | -           | -           | -           | -           | 11,1                      | ∅                |
| 2014-3                              | Camaquã/LN                                | +                 | -           | -           | -           | -           | 17,6                      | ∅                |
| 2018-9                              | Camaquã/LN                                | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 2023-9                              | Camaquã/LN                                | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 2027-1                              | Rosário do Sul/CA                         | +                 | -           | -           | -           | -           | 25,0                      | ∅                |
| 2049-1                              | Capivari do Sul/LN                        | +                 | -           | -           | -           | -           | 10,5                      | ∅                |
| 2388-1                              | Camaquã/LN                                | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 3419-1                              | Dom Pedrito/CA                            | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 3420-12                             | Dom Pedrito/CA                            | +                 | -           | -           | +           | -           | 5,3                       | ∅                |
| 3420-14                             | Dom Pedrito/CA                            | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 3420-5                              | Dom Pedrito/CA                            | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 3420-6                              | Dom Pedrito/CA                            | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 3420-9                              | Dom Pedrito/CA                            | +                 | -           | -           | -           | -           | 0                         | ∅                |
| 1610-6                              | São Sepé/DC                               | -                 | +           | +           | -           | -           | 5,3                       | ∅                |
| 1732-12                             | Agudo/DC                                  | -                 | +           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 2033-1                              | Uruguaiana/FO                             | -                 | +           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 3280-1                              | Dom Pedrito/CA                            | -                 | +           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 3280-8                              | Dom Pedrito/CA                            | -                 | +           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1732-15                             | Agudo/DC                                  | -                 | -           | +           | +           | -           | 0                         | ∅                |
| 1489-1                              | Itaqui/FO                                 | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1489-3                              | Itaqui/FO                                 | -                 | -           | -           | +           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1493-11                             | Itaqui/FO                                 | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1608-16                             | São Sepé/DC                               | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1608-2                              | São Sepé/DC                               | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1608-5                              | São Sepé/DC                               | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1618-2                              | São Borja/FO                              | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1732-4                              | Agudo/DC                                  | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1734-1                              | Agudo/DC                                  | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1831-1                              | Alegrete/FO                               | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 1855-1                              | Camaquã/LN                                | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 2010-2                              | Alegrete/FO                               | -                 | +           | -           | -           | -           | ∅                         | 53,4             |
| 2014-2                              | Camaquã/LN                                | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 2023-8                              | Camaquã/LN                                | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 2044-3                              | São Borja/FO                              | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 2050-3                              | Capivari do Sul/LN                        | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 2988-2                              | Dom Pedrito/CA                            | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |
| 3012-1                              | São Borja/FO                              | -                 | -           | -           | -           | -           | ∅                         | ∅                |

<sup>a</sup>isolado utilizado como controle positivo; +presença do gene; -ausência do gene; ∅isolado não testado;

<sup>b</sup>CA: Campanha; LN: Litoral Norte; DC: Depressão Central; FO: Fronteira Oeste.

Para o coleóptero *O. oryzae*, foi testado o isolado de *Bt* 2014-2, o qual foi selecionado por PCR por amplificar fragmentos de DNA com peso molecular entre 589 e 604pb, característico de genes *cry3* (Figura 3).



**Figura 3.** Gel de agarose (1%) de produtos amplificados por PCR com *primers cry3*. Canaletas: (1) Marcador de Peso Molecular 100bp (Gibco BRL); (2) *Bt tenebrionis 3A*; (3) *Bt* 2014-2; (4) controle negativo.

Nos ensaios *in vivo*, realizados com larvas de *O. oryzae*, após sete dias da aplicação do tratamento foi verificada a mortalidade, a qual foi corrigida pela fórmula de Abbott (1925). O isolado de *Bt* 2014-2 obteve o valor médio de mortalidade de 53,4%. Este resultado revelou a toxicidade deste entomopatógeno às larvas de *O. oryzae*.

## DISCUSSÃO

Os 46 isolados estudados apresentaram grande diversidade e distribuição de genes *cry* entre a diferentes regiões do RS avaliadas (Figura 2B). Os genes *cry9* foram os mais freqüentes, estando presentes em 47,8% dos isolados analisados. Esta freqüência diferiu da encontrada por Bravo *et al.* (1998) que totalizou apenas 2,6% e de Ben-Dov *et al.* (1999) com 10,2%. Os genes *cry1* foram predominantes nos resultados

obtidos por Bravo *et al.* (1998), com 49,5% de presença nos isolados, enquanto no presente estudo os genes *cry1* foram identificados em apenas 6,5%, dos isolados. A segunda maior frequência neste estudo, foi atingida pelos genes *cry3*. Resultados semelhantes aos de Bravo *et al.* (1998), que também encontraram uma frequência alta para estes genes (21,7%). As visíveis diferenças encontradas entre as frequências obtidas neste estudo e aquelas alcançadas por Ben-Dov *et al.* (1997, 1999), tornam-se interessantes quando comparadas, pois os *primers* são idênticos. Estes dados sugerem a diferença na diversidade de isolados de *Bt* quando comparada entre diferentes regiões geográficas.

A distribuição dos genes *cry* mostrou-se homogênea, entre as diferentes regiões orizícolas do RS, sendo que apenas um isolado contendo genes *cry2* foi identificado, oriundo da região Litoral Norte (Figura 2B).

Devido a alta diversidade e espectro de ação das toxinas produzidas, *Bt* tem sido coletado e caracterizado em diversas regiões do mundo (Bernhard *et al.*, 1997). Atualmente, várias pesquisas utilizando isolados de *Bt* em ensaios entomopatogênicos têm sido precedidos da caracterização molecular dos mesmos a fim de identificar os genes *cry* responsáveis pela síntese de proteínas específicas às diversas espécies de insetos (Valicente *et al.*, 2000). Esta etapa de seleção *in vitro* dos isolados, a qual antecede os ensaios *in vivo* com insetos alvo, tem mostrado resultados satisfatórios e assim impulsionado mais estudos.

No presente trabalho, foram realizados ensaios com *S. frugiperda*, utilizando as suspensões de isolados de *Bt* avaliados por PCR. Estes isolados mostraram baixa atividade inseticida, tanto para isolados com genes *cry1*, quanto para *cry2* e *cry9*. Do total de isolados testados, 54,1% não causaram mortalidade aos insetos (Tabela 1). Estes dados podem ser comparados aos encontrados por Valicente (2001) que obteve 51,5% dos isolados de *Bt* testados para *S. frugiperda* com mortalidade nula. Este mesmo autor afirma que 30,5% dos isolados testados, causaram a mortalidade de até 20,0% dos insetos, resultados que diferem do presente estudo, que identificou 95,8% dos isolados com esta mesma mortalidade (Tabela 1). Valicente *et al.* (2000), utilizando isolados pré-selecionados por PCR com *primers* gerais para *cry1*, identificaram que 65,2% destes tinham potencial para matar 75,0% das lagartas de *S. frugiperda*. Sendo assim, pode-se mencionar que os dados da presente pesquisa diferem dos de Valicente *et al.* (2000),

mas corroboram os valores mencionados por Loguercio *et al.* (2001) que testaram 60 isolados de *Bt*, também pré-selecionados com genes *cry1*, e dos quais, 52,1% causaram mortalidade de 0 a 10,0% dos insetos.

A análise dos resultados obtidos a partir dos ensaios com suspensão bacteriana, assim como com proteínas Cry1 e outras purificadas de *Bt aizawai* HD68, comprovaram a ação altamente tóxica deste isolado para *S. frugiperda*, correspondendo a CL<sub>50</sub> de 9,38 µg de proteína/µL. Aranda *et al.* (1996) testaram as delta-endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B e Cry1E, separadamente para *S. frugiperda* evidenciando valores de CL<sub>50</sub> maiores que 2µg/cm<sup>2</sup>, mesmo após purificação e ativação enzimática. Apesar do valor obtido no presente estudo ser superior aos encontrados pelos autores mencionados anteriormente, deve-se levar em conta que as proteínas utilizadas por estes autores haviam sido ativadas em fragmentos tóxicos *in vitro*. Este processo potencializa a toxicidade das δ-endotoxinas que agem mais rapidamente e com menor possibilidades de perdas no intestino médio das lagartas (Visser *et al.*, 1993).

Os ensaios de *Bt* realizados com *O. oryzae* tiveram resultados altamente satisfatórios visto que ainda não há dados de pesquisa disponíveis desse entomopatógeno contra as larvas deste inseto-praga. A partir do experimento realizado por Steffens *et al.* (2000), comprovando que as larvas ingerem a água em que estão submersas, foi adaptado um método de bioensaio com as suspensões de *Bt*, onde a mortalidade corrigida atingida para o tratamento correspondente ao novo isolado de *Bt* 2014-2 correspondeu a 53,4%. Esses resultados confirmam a predição da atividade do referido isolado de *Bt* por PCR (Figura 3), possivelmente devido a presença de genes *cry3*, os quais codificam delta-endotoxinas específicas aos insetos da ordem Coleoptera (Höfte & Whiteley, 1989).

A partir dos resultados obtidos, os isolados de *Bt* selecionados podem ser avaliados em campos experimentais e posteriormente utilizados na formulação de biopesticida, bem como os genes *cry* identificados podem ser utilizados na obtenção de plantas resistentes às larvas de *O. oryzae* e *S. frugiperda*, através da engenharia genética de plantas, cujos métodos de controle podem ser aplicados no Manejo de Populações de Insetos associados à orizicultura.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness insecticide. *Journal of Economic Entomology*, College Park, 18:265-267, 1925.
- Alves, S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ed. Piracicaba. FEALQ, 1998, 1163p.
- Aranda, E.; Sanchez, J.; Peferoen, M.; Güereca, L.; Bravo, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 68:203-212, 1996.
- Ben-Dov, E.; Zaritski, A.; Dahan, E.; Barak, Z.; Sinai, R.; Manasherob, R.; Khamraev, A.; Troitskaya, E.; Dubitsky, A.; Berezina, N.; Margalith, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4883-4890, 1997.
- Ben-Dov, E.; Wang, Q.; Zaritsky, A.; Manasherob, R.; Barak, Z.; Schneider, B.; Khamraev, A.; Baizhanov, M.; Glupov, V.; Margalith, Y. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3714-16, 1999.
- Bernhard, K.; Jarret, P.; Meadows, M.; Butt, J.; Ellis, D.J.; Roberts, G.M.; Pauli, S.; Rodgers, P.; Burges, H.D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.*, 70: 59-68, 1997.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F.J.; Peña, G.; Nuñez-Valdez, M.; Soberón, M.; Quintero, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:4965-4972, 1998.
- De Barjac, H.; Lecadet, M.M. Dosage biochimique d'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymerases bacteriennes. *C. R. Acad. Sci.*, 282:2119-2122, 1976.
- Fiuza, L.M.; Nielsen-Leroux, C.; Goze, E.; Frutos, R.; Charles, J-F. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:1544-1549, 1996.

- Gallo, D.; Nakano, O.; Neto, S.S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Filho, E.B.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D. *Manual de Entomologia Agrícola*. Editora Agronômica Ceres. 2ed. São Paulo, SP, 1998, p.649.
- Hansen, B.M.; Hendriksen, N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:185-189, 2001.
- Hansen, B.M.; Damgaard, P.H.; Eilenberg, J.; Pedersen, J.C. Molecular and Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 71:106-114, 1998.
- Höfte, H.; Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53:242-255, 1989.
- Juárez-Pérez, V. M.; Ferrandis, M.D.; Frutos, R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2997-3002, 1997.
- Lacey, L.A.; Lacey, C.M. The medical importance of riceland mosquitoes and their control using alternatives to chemical insecticides. *Journal of American Mosquito Control Association*, 6:1-93, 1990.
- Loguercio, L.L.; Santos, C.G.; Barreto, M.R.; Guimaraes, C.T.; Paiva, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Lett. App. Microbiol.*, 32:1-6, 2001.
- Polanczyk, R.A.; Silva, R.F.P.da; Fiuza, L.M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Microbiol.*, 31:165-167, 2000.
- Prando, H. F. *Aspectos bioecológicos e de controle de Oryzophagus oryzae (Costa Lima, 1936) (Coleoptera, Curculionidae) em arroz irrigado, sistema de cultivo pré-germinado*. Curitiba, 1999, 100p. (Ph.D. Thesis. PPGCB. UFPR)
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Vanrie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R.; Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:775-806, 1998.
- Steffens, C.; Oliveira, J.V.; Fiuza, L.M. *Método de bioensaio de Bacillus thuringiensis com larvas de Oryzophagus oryzae (Coleoptera, Curculionidae)*. Semana de

Pesquisa e Iniciação Científica da UNISINOS - Exponha-se, São Leopoldo, RS, 2000, p.192.

Valicente, F.H. *Estado da arte de Bacillus thuringiensis/Spodoptera frugiperda*. VII Simpósio de Controle Biológico, Poços de Caldas, MG, 2001, 1 CD.

Valicente, F.H.; Barreto, M.R.; Vasconcelos, M.J.V. de; Figueiredo, J.E.F. de; Paiva, E. 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). *An. Soc. Entomol. Brasil.*, 29:147-153, 2000.

Vieira, N.R.A.; Santos, A.B.; Sant'Ana, E.P. *A cultura do arroz no Brasil*. EMBRAPA - Arroz e Feijão, GO. 1999, 633p.

Visser, B.; Bosch, D.; Honée, G. Domain-function studies of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: a genetic approach. In: P. Entwistle, J.S.; Cory, M.J.; Baley; S. Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K., 1993, p.37-69.

## **Capítulo 4**

---

---

### **Artigo de Pesquisa:**

PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* ISOLADOS  
DE *Acromyrmex* spp. (HYMENOPTERA, FORMICIDAE)



**PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* ISOLADOS DE *Acromyrmex* spp.  
(HYMENOPTERA, FORMICIDAE)**

*Laura Massochin Nunes Pinto*<sup>1,2\*</sup>

*Aline Oliboni de Azambuja*<sup>1,2</sup>

*Elena Diehl*<sup>1,3</sup>

*Lidia Mariana Fiuza*<sup>1,2</sup>

**Endereço:** <sup>1</sup>Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS, Centro 2, C.P. 275, 93001-970, São Leopoldo, RS, Brasil. E-mail: [fiuza@cirrus.unisinos.br](mailto:fiuza@cirrus.unisinos.br). <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia; <sup>3</sup>Laboratório de Genética: Setor de Insetos Sociais.

**Número de figuras:** 02.

**Palavras-chave:** bioensaio, formigas cortadeiras, *Bacillus thuringiensis*.

**Key words:** bioassay, leaf-cutting ants, *Bacillus thuringiensis*.

**Título abreviado:** Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* obtidos de *Acromyrmex* spp.

**\*Autora correspondente:** Laura Massochin Nunes Pinto

## ABSTRACT

### Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* isolates from *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera, Formicidae)

The chemical control of the leaf-cutting ants, of the *Acromyrmex* genus, has been necessary due to severe damages the diverse plants. An alternative would be the use of the *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) bacterium, with the production of insecticidal endotoxins as its characteristic. Such endotoxins have been effective for lepidopterans, dipterans and coleopterans, but with an unknown action against hymenopterans. This paper has as its goal the isolation of *Bt* from adults of *Acromyrmex* genus, the testing of its pathogenicity against this insect and the assessment of those isolates through PCR. Bacterial isolates of *Bt* obtained from *A. crassispinus* and *A. lundii*, have been testing against *A. lundii* through the method adapted from BUENO *et al.* (1997). The bioassays have been carried out in B.O.D. at 25°C, with a 12-hour photoperiod, until the seventh day after treatment application. In the PCR, the *Bt* obtained isolates have gone through total DNA extraction and tested with primers specific to *cry* genes. The results have shown the presence of *Bt* in 40% of the assessed samples. The data of the *in vivo* assays have shown a mortality higher than 50% of the target population, seeing that *Bt* HA48 isolate have effected 100% of corrected mortality. Results regarding the PCR of *Bt* isolates have shown a magnification of DNA fragments correspondent to *cry1* genes in 22% of the isolates, and *cry9* in 67%. *Cry2*, *cry3*, *cry7* and *cry8* genes have not been detected in the tested samples, and 22% have not magnified DNA fragments correspondent to the assessed *cry* genes. Thus, the results of this research seem to be promising not only regarding the identification of genes in new isolates, but also the assays aimed at determining of the CL<sub>50</sub> of the *Bt* HA48 isolate, which can be nominated as an alternative method for the control of leaf-cutting ants of the *Acromyrmex* genus.

## RESUMO

O controle químico das formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex* tem sido necessário devido aos severos danos causados a diversas plantas. Uma alternativa seria a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), caracterizada pela produção de endotoxinas inseticidas eficazes para lepidópteros, dípteros e coleópteros, mas cuja ação é ainda desconhecida para himenópteros. O presente trabalho objetivou isolar *Bt* a partir de adultos do gênero *Acromyrmex*, testar sua patogenicidade ao mesmo e avaliar os isolados por PCR. Isolados bacterianos de *Bt* obtidos de *A. crassispinus* e *A. lundii* foram testados contra *A. lundii* através do método adaptado de BUENO *et al.* (1997). Os bioensaios foram conduzidos em B.O.D a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, até o sétimo dia após a aplicação dos tratamentos. Na PCR, os isolados de *Bt* foram submetidos a extração de DNA total e testados com *primers* específicos para genes *cry*. Os resultados revelaram a presença de *Bt* em 40% das amostras avaliadas. Os dados dos ensaios *in vivo* evidenciaram uma mortalidade superior em 50% da população alvo, sendo que o isolado *Bt* HA48 causou 100% de mortalidade corrigida. Os resultados da PCR dos isolados de *Bt* revelaram a amplificação de fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry1* em 22% dos isolados e *cry9* em 67%. Os genes *cry2*, *cry3*, *cry7* e *cry8* não foram detectados nas amostras testadas e 22% dos isolados não amplificaram fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry* avaliados. Dessa maneira, os resultados obtidos na presente pesquisa mostraram-se promissores tanto na identificação dos genes nos novos isolados, quanto nos ensaios de determinação da CL<sub>50</sub> do isolado *Bt* HA48, o qual poderá futuramente ser indicado como método alternativo no controle das formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*.

## INTRODUÇÃO

As formigas do gênero *Acromyrmex*, também conhecidas como formigas cortadeiras, são responsáveis por severos danos a diversas plantas (DIEHL-FLEIG, 1995). A preocupação com o controle destas formigas tem sido constante, porém os métodos químicos têm sido os mais utilizados (BOARETTO & FORTI, 1997). As buscas de alternativas, com menor impacto ambiental, têm sido crescentes. Uma alternativa promissora é o controle biológico, que utiliza as interações negativas (ATLAS & BARTHA, 1998). Dentre os entomopatógenos, apenas os fungos têm sido testados no controle de formigas cortadeiras (ALVES, 1998), sendo até o momento desconhecido o potencial das bactérias no manejo das espécies praga das plantas cultivadas. A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é caracterizada pela produção de proteínas ou endotoxinas com ação biopesticida altamente eficaz para representantes de diversas ordens de insetos, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (HÖFTE & WHITELEY, 1989; SCHNEPF *et al.*, 1998). Estas proteínas são codificadas por genes *cry*, os quais têm sido comumente detectados nos isolados de *Bt* através da Reação da Polimerase em Cadeia - PCR (JUÁREZ-PÉREZ *et al.* 1997; HANSEN *et al.*, 1998). Por outro lado, a ação desta bactéria é pouco conhecida sobre a ordem Hymenoptera (SCHNEPF *et al.*, 1998), principalmente sobre as formigas cortadeiras, não havendo método de ensaios com *Bt in vitro* e *in vivo* descritos para estes insetos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de isolados de *Bt* a partir de formigas do gênero *Acromyrmex* e a análise destes isolados por PCR. Este trabalho também objetivou a adaptação de um método adequado de bioensaio às formigas cortadeiras e sua aplicação nos testes de patogenicidade dos novos isolados.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Isolamento bacteriano:** para o isolamento de *Bt* a partir de formigas, foram coletadas operárias de *Acromyrmex crassispinus* e *A. lundii* nas áreas orizícolas da Estação Experimental do Arroz (EEA/IRGA). Os insetos foram acondicionados a seco em frascos de vidro, em grupos de dez indivíduos, e mantidos a  $-18^{\circ}\text{C}$ . No isolamento,

amostras de dez formigas foram maceradas em solução salina, sendo 1mL desta suspensão submetida a pasteurização, inoculação em Ágar Nutriente e incubação durante 24h a 30°C. As colônias bacterianas obtidas foram analisadas morfológicamente com auxílio de lupa e contador de colônias, sendo então inoculadas em meio seletivo (Penicilina G) e mantidas a 30°C e 180rpm durante 24 horas. As amostras positivas foram avaliadas em microscopia de contraste de fase para identificação das inclusões paraesporais.

**Bioensaio de *Bt* contra *Acromyrmex lundii*:** (A) *Método*: os bioensaios com bactérias, para este inseto, foram adaptados do método descrito por BUENO *et al.* (1997), utilizado para formigas cortadeiras da espécie *Atta sexdens rubropilosa*. Para tanto, dois tipos de substratos foram testados a fim de verificar a longevidade alcançada pelos insetos em cada um deles: (DS): *Dieta Sólida*: 5,0% de glicose, 1,0% de peptona bacteriológica, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de ágar bacteriológico; (DL): *Dieta Líquida*: mesmos componentes da DS, exceto o ágar bacteriológico. Os testes foram conduzidos em frascos de vidros (9cm×5cm) com tampa, contendo cinco formigas por frasco. Em cada frasco foi acondicionada uma mini-placa de acrílico de 2,5cm de diâmetro. Para o teste com a DS, um disco de aproximadamente 0,5g da dieta foi colocado em cada mini-placa e para a DL foi umedecido um algodão com 1,5mL da mesma. Seis séries experimentais foram preparadas, cada uma com cinco operárias de *A. lundii*, sendo essas: (1) controle com água esterilizada e troca a cada 24h; (2) controle com água esterilizada e troca a cada 48h; (3) DS com troca a cada 24h; (4) DS com troca a cada 48h; (5) DL com troca a cada 24h; e (6) DL com troca a cada 48h. Os frascos foram mantidos em câmara úmida e acondicionados em *Biological Oxygen Demand* (B.O.D.) a 25°C com fotofase de 12 horas. (B) *Ensaio pré-seletivo*: as formigas utilizadas nos experimentos foram coletadas, no Campus da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS, São Leopoldo, RS), cerca de quatro horas antes da instalação dos experimentos. Para os bioensaios, nove isolados de *Bt* foram crescidos em Meio Usual glicosado (DE BARJAC & LECADET, 1976) por 48 horas a 30°C e 180rpm. As suspensões foram centrifugadas a 5000rpm, a 4°C por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado e a suspensão bacteriana homogeneizada com a DL em 1/3 do volume inicial da cultura. A suspensão de *Bt* utilizada nos tratamentos foi trocada por dieta esterilizada após 48 horas da instalação do experimento, sendo realizadas novas

substituições da dieta com intervalos de 24 e 48 horas. Para cada isolado foram utilizados dois frascos, totalizando dez indivíduos por tratamento. As observações da mortalidade foram realizadas até o sétimo dia após a aplicação dos tratamentos. Os bioensaios foram conduzidos nas mesmas condições descritas anteriormente. A mortalidade foi corrigida pela fórmula de ABBOTT (1925).

**Análise de *Bt* por PCR:** os isolados de *Bt* obtidos de *A. crassispinus* e *A. lundii* foram crescidos em Ágar Nutriente a 30°C por cerca de 12 horas e submetidos a extração de DNA total realizada segundo HANSEN & HENDRIKSEN (2001). Os *primers* utilizados no presente estudo foram descritos por BEN-DOV *et al.* (1997 e 1999) e BRAVO *et al.* (1998), visando a detecção de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7/8*, *cry8* e *cry9*. A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos de reação cada. As reações foram realizadas em volumes de 25µL contendo 1µL de amostra de DNA com o tampão de reação, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2-0,5 µM de cada *primer* e 0,5U de *Taq* DNA polymerase (GIBCO-BRL). As amostras foram desnaturadas 1 min a 94°C, aneladas aos *primers* por 40-50s a 60°C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 50-90s a 72°C. Como controle positivo, foram utilizados os isolados *Bt tenebrionis 3A* e *Bt aizawai HA3*, fornecidos pelo Instituto Pasteur (França), os quais já foram caracterizadas molecularmente. O controle negativo, foi preparado nas mesmas condições, sem adição de DNA. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1 e 1,5%.

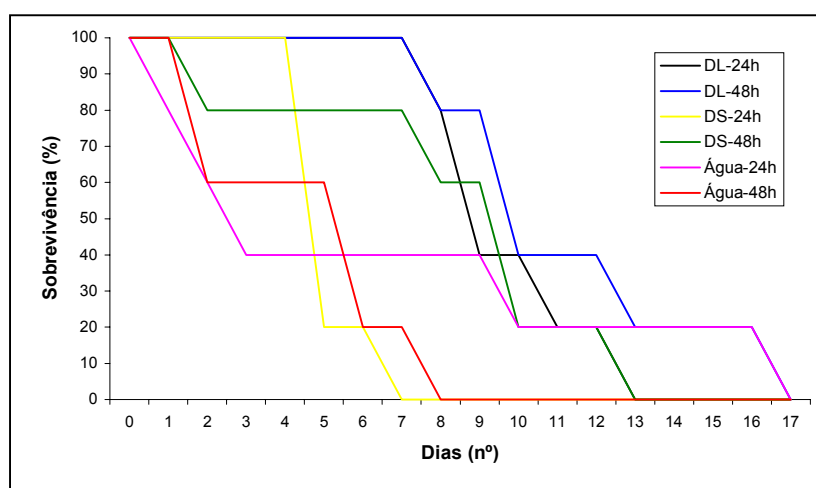
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia escolhida na obtenção de isolados de *B. thuringiensis* a serem testados para *A. lundii* foi o seu isolamento a partir do inseto alvo (BERNHARD *et al.*, 1997) devido a ausência de dados disponíveis sobre a ação de proteínas Cry em formigas cortadeiras. Este método tem sido utilizado para diversas espécies de importância econômica ou para insetos que, como as formigas, ainda não foram incluídos no espectro de ação de *Bt* (SCHNEPF *et al.*, 1998).

A partir do isolamento em 80 indivíduos de *Acromyrmex* spp., os dados revelam a presença de 35 isolados de gênero *Bacillus*. Os resultados da análise dos isolados, em

microscopia de contraste de fase, revelaram a presença de cristais em 40% desses, confirmando a identificação de 14 isolados de *B. thuringiensis*.

Na determinação do método de bioensaio com formigas os dados evidenciaram que a dieta líquida, associada ao sistema de trocas em intervalos de 48 horas, apresentam o melhor resultado com 100% de sobrevivência das formigas até 180 horas (7,5 dias). Esses resultados revelam que o método do bioensaio pode ser utilizado nos ensaios pré-seletivos de *Bt* contra a espécie alvo, cujas avaliações são efetuadas até 168 (7 dias) horas após a aplicação dos tratamentos (Figura 1).



**Figura 1.** Sobrevivência de *Acromyrmex lundii* em Dieta Líquida (DL); Dieta sólida (DS); e Testemunha (água esterilizada).

Os dados de sobrevivência de *A. lundii* obtidos no presente estudo são semelhantes aos resultados apresentados para *Atta sexdens rubropilosa* (BUENO *et al.*, 1997), evidenciando que no presente estudo os bioensaios poderão ser avaliados até 180 horas após a aplicação dos tratamentos.

Os resultados da patogenicidade dos novos isolados de *Bt* contra *A. lundii* obtidos até o momento, mostram que três isolados causaram de 50 a 100% de mortalidade (Tabela 1), sendo que o isolado *Bt* HA48 causou a maior mortalidade corrigida (100%) seguido pelo *Bt* HA58 (80%).

**Tabela 1.** Patogenicidade dos novos isolados de *Bacillus thuringiensis* contra *Acromyrmex lundii*.

| Isolados <i>Bt</i> | Mortalidade no 7º DAT* | Mortalidade Corrigida (%) |
|--------------------|------------------------|---------------------------|
| HA01               | 3                      | 12,5                      |
| HA02               | 3                      | 12,5                      |
| HA03               | 6                      | 50,0                      |
| HA48               | 10                     | 100,0                     |
| HA52               | 9                      | 42,8                      |
| HA53               | 6                      | 14,3                      |
| HA56               | 6                      | 20,0                      |
| HA57               | 7                      | 40,0                      |
| HA58               | 9                      | 80,0                      |

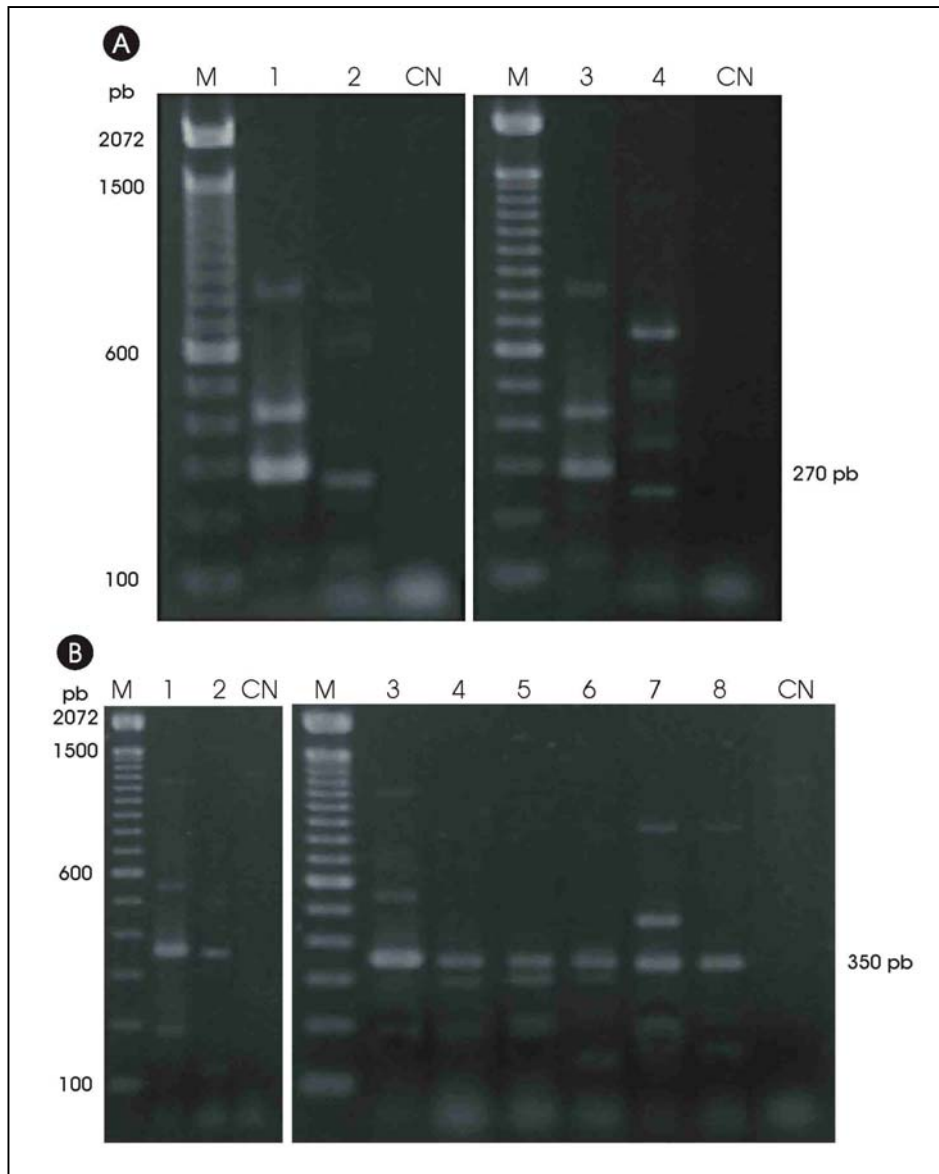
\*Dias após Aplicação dos Tratamentos

Os isolados pré-selecionados *in vivo* como patogênicos a *A. lundii*, foram analisados por PCR a fim de verificar a presença ou ausência de genes *cry* já conhecidos como ativos contra outras ordens de insetos, conforme descrito por SCHNEPF *et al.* (1998).

Os dados da PCR realizada para os nove isolados de *Bt* obtidos de formigas resultou na amplificação de fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry1* em 22% dos isolados e *cry9* em 67% (Figura 2), sendo que os genes *cry2*, *cry3*, *cry7* e *cry8* não foram detectados nas amostras testadas. Nesse contexto, pode-se mencionar que até o momento os genes *cry1* e *cry9* foram descritos como específicos para lepidópteros (SCHNEPF *et al.*, 1998; MAAGD *et al.*, 2001), embora, os genes *cry1* já tenham sido mencionados como ativos contra uma espécie de Coleoptera (NAIMOV *et al.*, 2001). Esses dados indicam que o espectro de ação das proteínas codificadas pelos grupos *cry* de *Bt* pode ser mais amplo que aquele atualmente conhecido e descrito.

Considerando o total de isolados de *Bt* avaliados por PCR, pode-se mencionar que 22% não amplificaram fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry* avaliados no presente estudo (*cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7*, *cry8* e *cry9*) de *Bt*.





**Figura 2.** Gel de agarose (1-1,5%) de produtos amplificados por PCR. (M) Marcador de Peso Molecular 100bp (Gibco BRL); (CN) Controle Negativo. (A) Produtos amplificados de genes *cryI*: (A<sub>1</sub>) *Bt aizawai HA3*; (A<sub>2</sub>) HA52; (A<sub>3</sub>) *Bt aizawai HA3*; (A<sub>4</sub>) HA58; (B) Produtos amplificados de genes *cry9*: (B<sub>1</sub>) *Bt aizawai HA3*; (B<sub>2</sub>) HA2; (B<sub>3</sub>) *Bt aizawai HA3*; (B<sub>4</sub>) HA48; (B<sub>5</sub>) HA52; (B<sub>6</sub>) HA53; (B<sub>7</sub>) HA56; (B<sub>8</sub>) HA57.

Esses dados sugerem que os isolados que não apresentam fragmentos da DNA correspondentes aos genes cujos *primers* foram testados, podem apresentar genes pertencentes às outras classes já conhecidas, ou podem representar uma nova classe de genes *cry*. Dessa maneira, os resultados obtidos nessa pesquisa mostram-se promissores, tanto na caracterização dos genes não identificados dos novos isolados, quanto nos ensaios de determinação da CL<sub>50</sub> do isolado *Bt* HA48, o qual poderá representar futuramente um método alternativo para o controle de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*.



## REFERÊNCIAS

- ABBOT, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness insecticide. *J. Econ. Ent.*, 18: 265-67.
- ALVES, S.B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ed. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and applications*. 4ed. Cummings Science Publishing. 694p.
- ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECÁ, L. & BRAVO, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 68: 203-212.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKI, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N. & MARGALITH, Y. 1997. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4883-4890.
- BEN-DOV, E.; WANG, Q.; ZARITSKY, A.; MANASHEROB, R.; BARAK, Z.; SCHNEIDER, B.; KHAMRAEV, A.; BAIZHANOV, M.; GLUPOV, V. & MARGALITH, Y. 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 3714-16.
- BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D.J.; ROBERTS, G.M.; PAULI, S.; RODGERS, P. & BURGESS, H.D. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.*, 70: 59-68.
- BOARETTO, M.A.C. & FORTI, L.C. 1997. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. *Série Técnica IPEF, FCA/UNESP*, 11(30): 31-46.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.; SOBERÓN, M. & QUINTERO, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 4965-4972.
- BUENO, O.C.; MORINI, M.S.C.; PAGNOCCA, F.C.; HEBLING, M.J.A. & SILVA, O.A. 1997. Sobrevivência de operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel

- (Hymenoptera: Formicidae) isoladas do formigueiro e alimentadas com dietas artificiais. *An. Soc. Entomol. Brasil.*, 26(1): 107-113.
- DE BARJAC, H. & LECADET, M.M. 1976. Dosage biochimique d'exotoxine thermostable de *Bacillus thuringiensis* d'après l'inhibition d'ARN-polymerases bacteriennes. *C. R. Acad. Sci.*, 282: 2119-2122.
- DIEHL-FLEIG, E. 1995. *Formigas: organização social e ecologia comportamental*. Ed. UNISINOS, São Leopoldo, p.168.
- HANSEN, B.M.; DAMGAARD, P.H.; EILENBERG, J. & PEDERSEN, J.C. 1998. Molecular and Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J. Invertebr. Pathol.*, 71: 106-114.
- HANSEN, B.M. & HENDRIKSEN, N.B. 2001. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 185-189.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. 1989. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255.
- JUÁREZ-PÉREZ, V. M.; FERRANDIS, M.D. & FRUTOS, R. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2997-3002.
- LOGUERCIO, L.L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARAES, C.T. & PAIVA, E. 2001. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Lett. App. Microbiol.*, 32: 1-6.
- MAAGD, R. DE; BRAVO, A. & CRICKMORE, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17: 193-199.
- NAIMOV, S.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; DUKIANDJIEV, S. & MAAGD, R.A.DE. 2001. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with ncreased activity against the colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 5328-5330.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62:775-806.

## Discussão

Devido às propriedades entomopatogênicas, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) representa uma alternativa promissora no controle biológico de insetos. Diversos isolados de *Bt* têm sido estudados por apresentarem atividade altamente tóxica a várias ordens de insetos, como foi apresentado no Capítulo 1 do presente trabalho. Atualmente, os estudos relacionados à identificação, caracterização e distribuição de novos genes *cry* (Capítulo 2), responsáveis pela síntese de delta-endotoxinas, têm sido realizados através das técnicas de PCR, RFLP e RAPD. Diversos estudos têm objetivado a detecção de genes *cry* que codificam proteínas ativas contra insetos-praga de importância agrícola, cujo tema foi abordado nos Capítulos 3 e 4.

Na presente pesquisa, inicialmente foram avaliados os perfis genéticos e protéicos de 46 isolados de *Bt* obtidos de solos do RS (Capítulo 2), sendo oito diferentes perfis genéticos identificados, onde o mais freqüente foi o perfil *cry9* (39,1%). A análise protéica de *Bt* por SDS-PAGE, identificou 14 famílias de proteínas Cry, que possivelmente sejam codificadas pelos genes detectados por PCR nos isolados analisados, além de proteínas desconhecidas que podem representar novos genes *cry* ainda não caracterizados. Os resultados obtidos mostraram que a freqüência de genes *cry9* encontrados neste trabalho diferem dos resultados encontrados por Bravo *et al.* (1998) e Ben-Dov *et al.* (1997). Nesse trabalho, os genes *cry1* foram encontrados em apenas 6,5% dos isolados, diferindo de Bravo *et al.* (1998), porém os genes *cry3*, apresentaram a segunda maior freqüência neste estudo, sendo semelhante aos resultados dos referidos autores.

No Capítulo 3, a distribuição dos genes *cry*, nas diferentes áreas orizícolas do Rio Grande do Sul, mostrou-se homogênea, sendo que apenas um isolado contendo genes *cry2* foi identificado, oriunda da região Litoral Norte. Além das proteínas com pesos moleculares conhecidos e característicos, várias proteínas encontradas não correspondem às proteínas Cry já caracterizadas (Schnepf *et al.*, 1998), as quais podem representar novos genes *cry* ainda não caracterizados. Nesse contexto, os resultados dessa pesquisa sugerem que os isolados de *Bt*, provenientes das amostras de solos do Rio Grande do Sul, apresentaram uma grande diversidade de genes *cry*, indicando a presença de novos perfis genéticos e protéicos.

Os isolados de *Bt* selecionados por PCR foram utilizados em bioensaios, devido à predição dos genes que podem codificar proteínas ativas para coleópteros e lepidópteros, como foi descrito no Capítulo 3.

Para *S. frugiperda*, importante praga na fase inicial da cultura do arroz, os bioensaios foram realizados utilizando as suspensões de isolados de *Bt* (Capítulo 3). Os resultados revelaram que os isolados com genes *cry1*, *cry2* e *cry9* mostram baixa atividade inseticida, sendo 54,1% inativos contra a espécie-alvo. Estes dados podem ser comparados aos encontrados por Valicente (2001) que não obteve mortalidade para 51,5% dos isolados de *Bt* testados para *S. frugiperda*. Este mesmo autor afirma que 30,5% dos isolados testados, causaram a mortalidade de até 20,0% dos insetos, resultados que diferem do presente estudo, o qual identificou 95,8% dos isolados com esta mesma mortalidade. Valicente *et al.* (2000), utilizando isolados pré-selecionados por PCR com *primers* gerais para *cry1*, identificaram 65,2% destes com potencial para matar 75,0% das lagartas de *S. frugiperda*. Sendo assim, pode-se mencionar que os dados da presente pesquisa diferem daqueles apresentados por Valicente *et al.* (2000), mas corroboram os valores mencionados por Loguercio *et al.* (2001) que testaram 60 isolados de *Bt*, também pré-selecionados com genes *cry1*, e destes 52,1% causaram de até 10,0% mortalidade dos insetos. Quanto aos resultados obtidos a partir dos ensaios com proteínas Cry1 e outras purificadas de *Bt aizawai* HD68, foi evidenciada a elevada toxicidade deste isolado à *S. frugiperda*, com CL<sub>50</sub> de 9,38 µg/µL. De acordo com Aranda *et al.* (1996), as delta-endotoxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B e Cry1E, testadas separadamente para *S. frugiperda*, evidenciaram valores de CL<sub>50</sub> maiores que 2µg/cm<sup>2</sup>, mesmo após purificação e ativação enzimática.

Também no Capítulo 3 são descritos os ensaios de *Bt* realizados com *O. oryzae* que mostram resultados promissores, visto que ainda não há dados de pesquisa disponíveis desse entomopatógeno contra as larvas de *O. oryzae*, esta importante praga do arroz irrigado. Para tanto, foi adaptado um método de bioensaio (Steffens *et al.*, 2000) com as suspensões de *Bt*, onde a mortalidade corrigida foi de 53,4% para o isolado *Bt* 2014-2. Esses resultados confirmam a predição da atividade do referido isolado de *Bt* por PCR, possivelmente devido a presença de genes *cry3*, os quais codificam delta-endotoxinas específicas aos insetos da ordem Coleoptera (Höfte & Whiteley, 1989).

O Capítulo 4 trata do potencial de *Bt* para o controle das formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*, devido ao hábito forrageador desse inseto, o qual também danifica a cultura do arroz. Nessa pesquisa, a estratégia à obtenção de isolados de *B. thuringiensis* a serem testados para *Acromyrmex lundii* foi o isolamento destas bactérias a partir do inseto alvo (Bernhard *et al.*, 1997). Este método tem sido utilizado para diversas espécies de insetos de importância econômica ou para insetos que, como as formigas, ainda não foram incluídos no espectro de ação de *Bt* (Schnepf *et al.*, 1998). Este método difere daquele utilizado às ordens Lepidoptera e Coleoptera, também avaliadas nesse estudo.

A partir do isolamento em 80 indivíduos de *Acromyrmex* spp., os dados revelaram a presença de 35 isolados de gênero *Bacillus* (Capítulo 4). Os resultados da análise dos isolados, em microscopia de contraste de fase, revelaram a presença de cristais em 40,0% desses, confirmando a identificação de 14 isolados de *B. thuringiensis*.

Na determinação do método de bioensaio com formigas e bactérias entomopatogênicas (Capítulo 4), que atuam por ingestão, os testes realizados no presente trabalho evidenciaram que a dieta líquida, associada ao sistema de trocas em intervalos de 48 horas, apresentaram o melhor resultado quanto a sobrevivência de *Acromyrmex lundii*, onde obtém-se 100% de sobrevivência até 180 horas (7,5 dias). Esses resultados revelaram que o método pode ser utilizado nos ensaios pré-seletivos de *Bt* contra a espécie alvo, cujas avaliações são efetuadas até 168 horas (7 dias) após a aplicação dos tratamentos. Os dados da patogenicidade dos novos isolados de *Bt* obtidos, nos bioensaios realizados com as formigas cortadeiras, os quais foram inoculados em dieta líquida e avaliados contra *A. lundii*, mostraram que três isolados causam entre 50 a 100% de mortalidade, sendo que o isolado *Bt* HA48 causou a maior mortalidade corrigida (100%) seguido pelo *Bt* HA58 (80%). Estes isolados pré-selecionados *in vivo* como patogênicos a *A. lundii*, foram analisados por PCR a fim de verificar a presença ou ausência de genes *cry* já conhecidos como ativos contra outras ordens de insetos, conforme descrito por Schnepf *et al.* (1998).

No Capítulo 4, a PCR realizada para os nove isolados de *Bt* obtidos de formigas resultou na amplificação de fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry1* (22%) e *cry9* (67%). Como até o momento esses genes foram descritos como específicos

apenas para lepidópteros (Schnepf *et al.*, 1998; Maagd *et al.*, 2001), embora Naimov *et al.* (2001) já tenham mencionado os genes *cry1* como ativos também para uma espécie de Coleoptera, os dados obtidos indicaram que o espectro de ação das proteínas codificadas pelos grupos *cry* de *Bt* pode ser mais amplo que aquele atualmente conhecido e descrito. Considerando o total de isolados de *Bt* avaliados por PCR, pode-se mencionar que 22,0% não amplificaram fragmentos de DNA correspondentes aos genes *cry* de *Bt* avaliados no presente estudo. Esses dados sugerem que os isolados que não apresentam fragmentos da DNA correspondentes aos genes cujos *primers* foram testados, podem apresentar genes pertencentes às outras classes já conhecidas, ou podem representar uma nova classe de genes *cry*. Dessa maneira, os resultados obtidos nessa pesquisa mostraram-se promissores, tanto na caracterização dos genes não identificados dos novos isolados, quanto nos ensaios de determinação da CL<sub>50</sub> do isolado *Bt* HA48, o qual poderá representar futuramente um método alternativo para o controle de formigas cortadeiras do gênero *Acromyrmex*.

Os isolados de *Bt* selecionados no presente estudo podem ser avaliados em campos experimentais e posteriormente utilizados na formulação de biopesticidas. Entretanto, as formulações de *Bt* apresentam algumas limitações quando comparados aos inseticidas químicos que poderão ser contornadas através do uso dos genes *cry* de interesse, identificados nesta pesquisa, na obtenção de plantas resistentes aos insetos-praga alvo, cujos métodos poderão representar alternativas viáveis junto aos programas de Manejo Integrado de Insetos (MIP) associados à orizicultura. No MIP, tanto as formulações à base de *Bt*, já disponíveis no mercado, quanto as plantas geneticamente modificadas (Schuler *et al.*, 1998), podem representar ferramentas importantes no controle de populações de insetos. Por outro lado, esses métodos não devem ser considerados como a única alternativa, mas como parte de um conjunto de métodos de controle de pragas que visa manter as populações de insetos abaixo do nível de dano econômico, com redução de riscos e problemas nos agroecossistemas.



## Referências Bibliográficas

- Adang, M.J.; Brody, M.S., Cardineau, G.; Eagan, N.; Roush, R.T.; Shewmaker, C.K.; Jones, A.; Oakes, J.V. & McBride, K.E. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis cryIIIa* gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol. Biol.*, 21: 1131-1145, 1993.
- Alves, S.B. 1998. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ed. Piracicaba. FEALQ. p.1163.
- Aranda, E.; Sanchez, J.; Peferoen, M.; Güereca, L. & Bravo, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212, 1996.
- Ben-Dov, E.; Zaritski, A.; Dahan, E.; Barak, Z.; Sinai, R.; Manasherob, R.; Khamraev, A.; Troitskaya, E.; Dubitsky, A.; Berezina, N. & Margalith, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4883-4890, 1997.
- Bernhard, K.; Jarret, P.; Meadows, M.; Butt, J.; Ellis, D.J.; Roberts, G.M.; Pauli, S.; Rodgers, P. & Burges, H.D. natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70: 59-68, 1997.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F.J.; Peña, G.; Nuñez-Valdez, M.; Soberón, M. & Quintero, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972, 1998.
- Cerón, J.; Ortíz, A.; Quintero, R.; Güereca, L. & Bravo, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bt* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 3826-3831, 1995.
- Crickmore, N.; Zeigler, D.R.; Feitelson, J.; Schnepf, E.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J. & Dean, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 807-813, 1998.
- Della-Lucia, T.M.C. 1993. *As formigas cortadeiras*. Viçosa. Minas Gerais. p.262.

- Gallo, D.; Nakano, O.; Neto, S.S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Filho, E.B.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D. *Manual de Entomologia Agrícola*. Editora Agronômica Ceres. 2ed. São Paulo, SP, 1998, p.649.
- Höfte, H. & Whiteley, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53: 242-255, 1989.
- Juárez-Pérez, V.M.; Ferrandis, M.D. & Frutos, R. PCR-Based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 2997-3002, 1997.
- Koziel, M.G.; Beland, G.L.; Bowman, C.; Carozzi, N.B.; Crenshaw, R.; Crossland, L.; Dawson, J.; Desai, N.; Hill, M.; Kadwell, S.; Launis, K.; Lewis, K.; Maddox, D.; Mcpherson, K.; Meghji, M.R.; Merlin E.; Rhodes, R.; Warren, G.W.; Wright, M. & Evola, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11: 194-200, 1993.
- Loguercio, L.L.; Santos, C.G.; Barreto, M.R.; Guimaraes, C.T. & Paiva, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Lett. App. Microbiol.*, 32: 1-6, 2001.
- Maagd, R. DE; Bravo, A. & Crickmore, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*. 17: 193-199, 2001.
- Mayhé-Nunes, A.J. & Diehl-Fleig, E. Distribuição de *Acromyrmex* (Hymenoptera: Formicidae) no Rio Grande do Sul. *Acta Biologica Leopoldensia*. 16: 115-118, 1994.
- Melo, I.S. & Azevedo, J.L. *Controle Biológico*. Vol. 1. EMBRAPA. Jaguariúna, SP, 1998, p.264.
- Naimov, S.; Weemen-Hendriks, M.; Dukijandjiev, S. & Maagd, R.A.DE. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the colorado potato beetle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(11): 5328-5330, 2001.

- Nayak, P.; Basu, D.; Das, S.; Basu, A.; Ghosh, D.; Ramakrishnan, N.A.; Ghosh, M. & Sem, S.K. Transgenic elite indica rice plants expressing *CryIAc* delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 2111-2116, 1997.
- Perlak, F.J.; Deaton, R.W.; Armstrong, T.A.; Fuchs, R.L.; Sims, S.R.; Greenplate, J.T. & Fischhoff, D.A. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology*, 8: 939-943, 1990.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Vanrie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D.R. & Dean, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 775-806, 1998.
- Schuler, T.H.; Poppy, G.M.; Kerry, B.R. & Denholm, I. Insect-resistant transgenic plants. *Tibtech.*, 16: 168-174, 1998.
- Steffens, C.; Oliveira, J.V. & Fiuza, L.M. Método de bioensaio de *Bacillus thuringiensis* com larvas de *Oryzophagus oryzae* (COLEOPTERA, CURCULIONIDAE). *Semana de pesquisa e iniciação científica da UNISINOS - Exponha-se*, São Leopoldo, RS, 2000, p.192.
- Valicente, F.H. Estado da arte de *Bacillus thuringiensis/Spodoptera frugiperda*. VII *Simpósio de Controle Biológico*, Poços de Caldas, MG, 2001, 1 CD.
- Valicente, F.H.; Barreto, M.R.; Vasconcelos, M.J.V. de; Figueiredo, J.E.F. de & Paiva, E. 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). *An. Soc. Entomol. Brasil.*, 29: 147-153, 2000.
- Vieira, N.R.A.; Santos, A.B. & Sant'Ana, E.P. *A cultura do arroz no Brasil*. EMBRAPA - ARROZ E FEIJÃO, GO, 1999, p.633.
- Visser, B.; Bosch, D. & Honée, G. Domain-function studies of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: a genetic approach. In: P. Entwistle, J.S.; Cory, M.J.; Baley & S. Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K., 1993, p.37-69.

## APÊNDICE – 1

### Publicações da Autora

- **Trabalhos completos em eventos:**

- PINTO, L.M.N.** & FIUZA, L.M. Predição da atividade inseticida de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* através da PCR. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO E XXIV REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, Porto Alegre, RS. 2001, p.55-57.
- STEFFENS, C.; AZAMBUJA, A.O.; **PINTO, L. M. N.**; OLIVEIRA, J.V. DE; MENEZES, V.G. & FIUZA, L.M. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* às larvas de *Oryzophagus oryzae* (Col., Curculionidae), em laboratório. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO E XXIV REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, Porto Alegre, RS. 2001, p.411-413.
- ANTONIO, A.C.; **PINTO, L.M.N.**; JESUS, M.A.S. & FIUZA, L.M. Levantamento de bactérias entomopatogênicas em amostras de solos de áreas orizícolas do Rio Grande do Sul. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO E XXIV REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, Porto Alegre, RS. 2001, p.255.

- **Trabalhos resumidos em eventos:**

- PINTO, L.M.N.** & FIUZA, L.M. Diversidade de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* em solos agrícolas do Rio Grande do Sul. In: V CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, Porto Alegre, RS. 2001.
- AZAMBUJA, A.O.; **PINTO, L.M.N.**; DIEHL, E. & FIUZA, L.M. Ocorrência natural de bactérias em insetos-sociais (Hymenoptera, Formicidae). In: V CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, Porto Alegre, RS. 2001.
- PINTO, L.M.N.** & FIUZA, L.M. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* específicos aos lepidópteros. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Foz do Iguaçu. 2001, p. 32.
- AZAMBUJA, A.O.; **PINTO, L.M.N.** & FIUZA, L.M. *Bacillus thuringiensis* obtido de insetos sociais (*Acromyrmex* sp.) coletados em áreas orizícolas. In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, Poços de Caldas, MG. 2001. p. 74.
- PINTO, L.M.N.** & FIUZA, L.M. Seleção de genes *cry3* de *Bacillus thuringiensis* com potencial no manejo de coleópteros. In: VII SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO., Poços de Caldas, MG. 2001. p.405.
- AZAMBUJA, A.O.; **PINTO, L.M.N.**; DIEHL, E. & FIUZA, L.M. Isolamento de bactérias associadas às formigas cortadeiras, *Acromyrmex* spp. (Hymenoptera, Formicidae). In: EXPONHA-SE: SEMANA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNISINOS, São Leopoldo, RS. 2000, p.171.
- PINTO, L.M.N.**; ANTONIO, A.C.; STEFFENS, C. & FIUZA, L.M. Ocorrência natural de *Bacillus* spp. em lavouras de arroz irrigado. In: VII ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, Recife, PE. 2000, p.166.