

## BIOLOGICAL CONTROL

Associação de Bioensaios e Caracterização Molecular para Seleção de Novos Isolados de *Bacillus thuringiensis* Efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

JÚLIO C. FATORETTO<sup>1</sup>, JANETE A.D. SENA<sup>1</sup>, MARLITON R. BARRETO<sup>2</sup>, MANOEL V.F. LEMOS<sup>1</sup> E ARLINDO L. BOIÇA JUNIOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Depto. Biologia Aplicada à Agropecuária; <sup>3</sup>Depto. Fitossanidade

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP/Jaboticabal, 14.870-000. Jaboticabal, SP

<sup>2</sup>Univ. Federal do Mato Grosso – UFMT / Instituto Universitário do Norte Matogrossense – IUNMAT, Campus de Sinop Av. Alexandre Ferronato, n. 1200, 78550-000, Sinop, MT; mrbarreto@pop.com.br, autor p/ correspondência

*Neotropical Entomology* 36(5):737-745 (2007)

Association of Bioassays and Molecular Characterization to Select new *Bacillus thuringiensis* Isolates Effective against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

**ABSTRACT** - The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), is one of the main corn pests and *Bacillus thuringiensis* is important in its control because of its entomopathogenic property. The objective of this study was the molecular characterization of *B. thuringiensis* isolates for *cry1 locus* presence and the assessment of the efficiency of these isolates in controlling *S. frugiperda* caterpillars. *Gral-cry1* was used in the PCR analyses to confirm the presence of the *cry1 locus* in 15 isolates. A 3 x 10<sup>8</sup> spore/ml suspension bathed the diet used to feed 30 caterpillars per isolate, with three replications. The *cry1 locus* type genes of the different isolates were identified for five gene subclasses; linear regression analyses were carried out to ascertain possible associations between the presence of an individual *cry1 locus* gene and high levels of toxicity. All the DNAs amplified with *Gral-cry1* presented an amplification product with the expected size. Regarding the levels of insecticide efficiency against the cob worm, 41 isolates presented 100% mortality and 16 presented an index between 70% and 90%. The *cry1Ab* gene was present in 80 isolates, *cryb* in 69 isolates, *cry1Ac* in all the isolates and *cryv* and *cry1E* in 93 and 27 isolates, respectively. The values regarding the individual effect of each gene on caterpillar mortality were significant at 1% probability for the *cry1Ac* and *cry1E* genes.

**KEY WORDS:** Fall armyworm, *cry1*, bacteria, prospection, gene

**RESUMO** - A lagarta de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) é uma das principais pragas do milho e para seu controle o *Bacillus thuringiensis* se destaca por sua atividade entomopatogênica. Este trabalho objetivou a caracterização molecular de isolados de *B. thuringiensis* quanto à presença do gene *cry1* e a avaliação da sua eficiência no controle de lagartas de *S. frugiperda*. Nas análises da PCR, foi utilizado o *Gral-cry1* para confirmação da presença do gene *cry1* nos 115 isolados. Uma suspensão de 3 x 10<sup>8</sup> esporos/ml banhou a dieta utilizada para alimentação de 30 lagartas por isolado, com três repetições. A identificação do tipo de genes *cry1* dos diferentes isolados foi realizada para cinco sub-classes de genes e análises de regressão linear foram realizadas para verificar possíveis associações entre a presença de um gene *cry* individual e altos níveis de toxicidade. Todos os DNAs amplificados com os iniciadores *Gral-cry1* apresentaram produto de amplificação com tamanho esperado. Quanto aos níveis de eficiência inseticida contra a lagarta-do-cartucho, 41 isolados apresentaram 100% de mortalidade e 16 apresentaram índice entre 75% e 90%. O gene *cry1Ab* esteve presente em 80 isolados, *cryB* em 69 isolados, *cry1Ac* em todos os isolados, *cryV* e *cry1E* em 93 e 27 isolados, respectivamente. Os valores referentes ao efeito individual de cada gene na mortalidade de larvas foram significativos a 1% de probabilidade, para os genes *cry1Ac* e *cry1E*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Lagarta-do-cartucho, *cry1*, bactéria, prospecção, gene

A lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é uma das principais pragas da cultura do milho em todas as regiões do Brasil. Quanto aos hospedeiros naturais da praga, Labrador (1967) cita a preferência pelas gramíneas como milho, sorgo, cana-de-açúcar e pastagens naturais e artificiais. Seu controle é realizado basicamente com inseticidas químicos, cuja utilização abusiva tem trazido vários problemas que decorrem desde a falta de especificidade dos produtos, até o seu acúmulo no meio ambiente ocasionando sérios problemas de poluição, e originando somas vultosas que, no caso do Brasil, são destinadas à importação dos inseticidas químicos (Pfeifer & Grigeatti 1996).

Hoje são conhecidos muitos microrganismos entomopatogênicos, especialmente fungos, vírus e bactérias, que podem ser empregados no controle biológico de insetos praga (Valadares-Inglis *et al.* 1998). Dentre eles, *Bacillus thuringiensis* destaca-se por apresentar atividade tóxica contra cerca de 130 espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, onde se incluem importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lereclus *et al.* 1993). O que caracteriza *B. thuringiensis* é a produção de uma inclusão protéica de formato cristalino, que confere a essa bactéria sua característica entomopatogênica. Esse cristal, sintetizado durante a fase de esporulação, é formado por polipeptídeos denominados  $\delta$ -endotoxinas, ou proteínas Cry, que vão sendo acumuladas na célula bacteriana. No final da esporulação, o cristal corresponde a cerca de 20-30% do peso seco da célula esporulada (Herrnstadt *et al.* 1986), sendo liberado juntamente com o esporo no momento da lise celular.

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase), muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e direcionando os trabalhos de bioensaios (Bravo *et al.* 1998, Cerón *et al.* 1995, Vilas-Bôas 2002, Lima *et al.* 2002). Este trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* quanto à presença do gene *cry1* e algumas de suas subclasses e a avaliação de sua eficiência no controle de lagartas de *S. frugiperda*.

## Material e Métodos

A criação de *S. frugiperda* foi realizada conforme Barreto *et al.* (1999) utilizando-se três populações de lagartas provenientes do: 1) Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, Piracicaba, SP; 2) Laboratório de Controle Biológico da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG; 3) Centro de Manejo Integrado de Pragas (CEMIP) da UNESP/Jaboticabal, SP. As populações permaneceram isoladas durante todo o experimento, não havendo cruzamentos entre elas.

A metodologia utilizada baseia-se na constatação de que a existência de raças tem fundamental importância na atual concepção da entomologia econômica, pois pode haver variação no consumo de alimento e, conseqüentemente, no nível de dano econômico para cada cultura, bem como comportamento diferenciado em relação a inseticidas e ao controle biológico (Pashley *et al.* 1987). Busato *et al.*

(2004) e McMichael & Pashley (1999), em estudos com populações de *S. frugiperda*, apontam para a existência de maior similaridade genética entre populações de uma mesma planta hospedeira. Sugerem que a seleção natural via planta hospedeira foi o processo que orientou as populações para maior nível de adaptação, fato relatado por população de lagartas, e para maior a distância genética das populações de lagarta, como no caso da cultura do milho. A recombinação genética favorecida pela migração dos insetos adultos de *S. frugiperda* a grandes distâncias, que de acordo com Johnson (1987), pode chegar até 250 km, pode suprir a população com novas combinações ampliando a variabilidade genética.

Neste trabalho, foram utilizados 115 isolados de *B. thuringiensis* pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias - UNESP/Jaboticabal. Esses isolados já haviam sido caracterizados anteriormente como lepidóptero-específicos pela técnica da PCR (Vilas-Bôas 2002) e apresentaram amplificação com iniciadores gerais para o gene *cry1*.

Os isolados estudados foram provenientes de cinco regiões geográficas do território nacional sendo 47 isolados da Região Sul, 30 do Sudeste, 18 do Centro-Oeste, 10 do Nordeste, cinco do Norte, e cinco isolados foram provenientes de outros países. Dos 47 isolados da Região Sul, 38 foram obtidos em silos de armazenagem de grãos, os quais são considerados um ambiente excelente para isolamento de *B. thuringiensis*, por serem ricos em insetos (Meadows *et al.* 1992).

Nas análises da PCR, o DNA de cada um dos isolados foi obtido com a utilização da resina de troca iônica InstaGene Matrix (Bio-Rad). As colônias isoladas foram obtidas pela inoculação de uma alíquota da solução estoque de esporos em placas de Petri, contendo meio de cultura BHI ("Brain Heart Infusion" ou Infusão de Cérebro e Coração - Biobrás), as quais foram incubadas a 30°C por 18h. As colônias foram coletadas, ressuspensas em microtubos contendo 1,0 ml de água destilada esterilizada, seguindo-se de centrifugação a 15.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensado em 200  $\mu$ l da resina InstaGene Matrix. As suspensões contendo o DNA foram incubadas a 56°C por 30 min. Em seguida, procedeu-se à agitação vigorosa dos tubos por 10 segundos, seguida de centrifugação a 15.000 x g por 5 min. Posteriormente, 200  $\mu$ l do DNA obtido foi transferido para outro microtubo e armazenado a -20°C. O DNA das linhagens de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* - HD-1 (lepidóptero-específicas) foi extraído e utilizado como controle positivo e o DNA da linhagem de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, caracterizada como coleóptero-específica (Sekar *et al.* 1987), foi utilizado como controle negativo nos bioensaios e na amplificação com os iniciadores gerais Gral-cry1.

A quantificação do DNA das amostras foi realizada em espectrofotômetro (BECKMAN-DU 640), medindo-se a absorvância nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Para estimar a concentração do DNA total utilizou-se o conceito padrão de que uma unidade de absorvância na densidade óptica de 260 nm equivale a 50  $\mu$ g de DNA por ml de solução (Sambrook *et al.* 1989). A concentração média encontrada foi de 43,3  $\mu$ g/ml de DNA.

Para confirmação da presença do gene *cry1* nos isolados deste trabalho, foi utilizado o par de iniciadores gerais Gral-cry1 (Bravo *et al.* 1998). As reações de amplificação foram conduzidas no volume total de 20  $\mu$ l contendo: 30 ng

de DNA; 250  $\mu$ M de uma solução de dNTPs; 2,0 mM de  $MgCl_2$ ; 0,2  $\mu$ M de cada um dos iniciadores; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (GIBCO-BRL); solução tampão para reação de PCR (1x) e água Milli-Q (q.s.p 20  $\mu$ l). As reações de amplificação foram realizadas utilizando um aparelho termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller – MJ Research, inc.) com o seguinte programa: um ciclo de desnaturação de 2 min a 95°C e 30 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min; pareamento a 52°C por 1 min e extensão a 72°C por 5 min.

Após as amplificações, 2  $\mu$ l de tampão de amostra (*loading buffer*) (0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) foram adicionados às amostras. Quinze microlitros de cada amostra foram aplicados em géis de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml) e submetidos à eletroforese horizontal por 2h à corrente elétrica de 80V constantes, conduzida em tampão TEB 1x (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml). Em todas as eletroforeses realizadas, foi utilizado como marcador o DNA Ladder (1Kb). Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e armazenados em fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad).

Nos bioensaios, a partir de uma suspensão estoque de esporos, os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura (Nutriente Agar) sólido e incubados a 30°C por 36h. Em seguida, coletou-se todo o conteúdo de esporos/cristal presentes na superfície do meio de cultura e ressuspendeu-se em 7,0 ml de água, homogeneizado e quantificado quanto ao número de esporos/ml da suspensão, por meio de leitura em câmara de Neubauer obtendo-se na contagem a média de  $3 \times 10^8$  esporos/ml (Barreto *et al.* 1999).

Cubos de dieta artificial foram mergulhados na suspensão de esporos/cristais de cada isolado por 30 segundos, colocados isoladamente em copos (50 ml) e deixados à temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, lagartas de dois a três dias de idade foram colocadas nos copos. Estes foram tampados e levados para uma sala mantida a 25°C, com umidade relativa do ar a 70% e fotofase de 14h de luz.

Foram utilizadas 30 lagartas por isolado, com três repetições. A dieta da testemunha foi banhada somente com água, e para

o controle positivo foi utilizado o isolado HD-1 e, como controle negativo, utilizou-se a linhagem de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (coleóptero-específica). As avaliações foram realizadas no terceiro, sexto e oitavo dias, após a exposição da lagarta à dieta contendo a suspensão esporo/cristal. Foram considerados eficientes apenas os isolados com índice de mortalidade igual a 100%. A mortalidade das lagartas por *B. thuringiensis* foi comprovada pela presença de esporos, através da observação das mesmas em microscópio óptico.

A identificação do tipo de genes *cryI* dos diferentes isolados estudados foi realizada para cinco subclasses de genes: *cryIAb*, *cryIB*, *cryIAC*, *cryIIA* e *cryIE* (Tabela 1). Os iniciadores para esses genes foram elaborados e otimizados no laboratório de Genética de Bactérias, UNESP-Jaboticabal, para a linhagem de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – HD-1 exceto os iniciadores CryIE, os quais foram elaborados a partir da seqüência do gene *cryI*, linhagem de *B. thuringiensis* var. *kenyae*, disponível no banco de dados Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), número acesso GI:46852034.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume de 20  $\mu$ l contendo: 30 ng de DNA; 250  $\mu$ M da solução de dNTPs; 1,5 mM de  $MgCl_2$  para os iniciadores CryIAB, CryIB, CryIAC e CryIIA e 2,0 mM para os iniciadores CryIE; 0,5  $\mu$ M de cada um dos pares de iniciadores CryIAB, IB, IAC e IA e 0,25  $\mu$ M de cada um do par de iniciador CryIE; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (GIBCO-BRL); 1x solução tampão para reação de PCR e água Milli-Q (q.s.p. 20  $\mu$ l). Como controle negativo foi utilizada água Milli-Q, em substituição ao DNA.

Nas reações de amplificação para os iniciadores CryIB, CryIAC, CryIIA e CryIE foi utilizado o seguinte programa: um segmento de desnaturação de 2 min a 94°C e 30 ciclos consistindo de um segmento de desnaturação a 94°C por 1 min, um de pareamento a 54 °C por 1 min, e um último de extensão a 72°C por 1 min. Ao final dos 30 ciclos, seguiu-se um segmento extra de extensão a 72°C por 10 min. As condições do programa de amplificação feitas com os iniciadores CryIAB foram similares, exceto na temperatura de pareamento que foi de 56°C.

Após as amplificações, 15  $\mu$ l de cada amostra foram misturados a 2  $\mu$ l de tampão da amostra e aplicados em géis de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5  $\mu$ g/ml) e

Tabela 1. Seqüências dos iniciadores específicos utilizados para o gene *cryI*.

Iniciadores	Seqüências	Genes	Produto amplificado
CryIAB	5'CGGGATTAGAGCGTGTATG3'(d) 5'CATCCAGCGAATCTACCG3'(r)	<i>cryIAb</i>	~550 pb
CryIB	5'TACAGATACCCCTTGCTCGTG3'(d) 5'GGTGTTGATAAAGGAGGGAG3'(r)	<i>cryIB</i>	~750 pb
CryIAC	5'ATCGCTCGTCTATCGGCATTG3'(d) 5'AGCCAGCCCTCACGTTCTTC3'(r)	<i>cryIAC</i>	~400 pb
CryIIA	5'AACAGTGCCCTTACAACCG3'(d) 5'CAGACTTGAGAGGATTAGG3'(r)	<i>cryIIA</i>	~580 pb
CryIE	5'TCCGCAACTCCAATAGGG3'(d) 5'AAGCCTGCCCAAACACTG3'(r)	<i>cryIE</i>	~380 pb

(d) direto; (r) reverso

submetidas a eletroforese horizontal por 2h a 80 V constante. A eletroforese foi conduzida em tampão TEB 1x (Tris 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3) também adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). O marcador de peso molecular utilizado foi o DNA Ladder (1 Kb). Os fragmentos foram visualizados sob luz UV e armazenados em equipamento de fotodocumentação gel-Doc 2000 (Bio-Rad).

Modelos de regressão linear foram aplicados aos padrões de amplificação exibidos pelos isolados. Valores de “1” (presença de banda) e “zero” (ausência) foram atribuídos a cada *cry* e considerados como variáveis independentes, enquanto as correspondentes porcentagens de mortalidade das larvas para cada isolado foram consideradas variáveis dependentes. O nível de associação entre esses dois parâmetros foi representado por uma análise de variância para o coeficiente de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa *Fump* (SAS Institute, Cory, NC, USA).

Com a finalidade de verificar possíveis associações entre a presença de um gene *cry* individual e altos níveis de toxicidade foram realizadas análises de regressão linear, e a significância dos coeficientes de regressão foi avaliada por análise de variância, empregando o programa SAS. Todos os isolados foram submetidos à análise para maior confiabilidade dos resultados.

## Resultados e Discussão

Todos os DNAs amplificados com os iniciadores Gral-cry1 apresentaram um produto de amplificação com tamanho

esperado em torno de 558 pb, o qual também foi obtido para a linhagem *B. thuringiensis* HD1, utilizada como controle positivo. Como controle negativo da amplificação, constatou-se a ausência de produto na linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, caracterizada como coleóptera-específica e portadora do gene *cry3*.

A alta frequência dos genes *cry1* pode ser explicada pelo mecanismo de seleção de linhagens, que é baseado na análise da presença do cristal protéico. Como isolados produzindo cristais bipiramidais (freqüentemente compostos de proteínas Cry1) são mais freqüentes e distinguíveis que os demais formatos, é possível que a alta proporção de genes *cry1*, presentes na maior parte das coleções de linhagens de *B. thuringiensis*, tenha sido causada pelo procedimento usado para a identificação dos isolados (Bravo *et al.* 1998). Apesar disso, não se descarta a possibilidade de que linhagens que contenham genes *cry1* sejam mais abundantes que as demais linhagens, uma vez que as toxinas codificadas por esses genes são específicas para lepidópteros com grande variedade de representantes na natureza (Vilas-Bôas 2002).

Os níveis de eficiência inseticida contra a lagarta-do-cartucho foram obtidos por bioensaios envolvendo os 115 isolados. Na Tabela 2, 41 isolados (cerca de 35,0%) promoveram 100% de mortalidade nas larvas. Esses índices são considerados elevados quando comparados aos relatados por Loguercio *et al.* (2001), que obtiveram baixa porcentagem de isolados, cerca de 3,3%, considerando ainda o mínimo de 75% de mortalidade das larvas como índice para alta toxicidade. No entanto, outros 16 isolados (13,7%) apresentaram índice de mortalidade entre 75% e 90%, e as

Tabela 2. Distribuição de isolados de *B. thuringiensis* em diferentes classes de toxicidade contra larvas de *S. frugiperda* e em combinações específicas de genes *cry1*.

Mortalidade larvas (%)	Nº isol. de B.t.	Total (%)	Nº de isolados com genes <i>cry1</i>					
			Ausente	AB	B	Ac	IA	E
0-20	33	28,2	1 <sup>1</sup>	26	24	32	29	15
20-40	9	7,7	0	7	6	9	8	2
40-60	7	6,0	0	3	3	7	6	0
60-75	10	8,6	0	5	5	10	6	5
75-90	16	13,7	0	9	6	15	13	3
90-100	41	35,0	0	30	25	42	31	2

Mortalidade larvas (%)	Nº isol. de B.t.	Total (%)	Nº de isolados com gene <i>cry</i> associados			
			AB+B	AB+ B+Ac	AB+B+Ac+IA	AB+B+Ac+IA+E
0-20	33	28,2	22	22	21	10
20-40	9	7,7	6	6	6	2
40-60	7	6,0	2	2	2	0
60-75	10	8,6	5	5	5	3
75-90	16	13,7	5	5	5	0
90-100	41	35,0	25	25	24	2

<sup>1</sup>*B. thuringiensis* var. *tenebrionis* utilizado como controle negativo.

outras classes ocasionaram mortalidade de 60% a 75% (10 isolados ou 8,6%, sete isolados (6,0%) com 40% a 60%, nove isolados (7,7%) com 20% a 40% e 33 isolados (28,2%) com mortalidade de 0% a 20%).

Os isolados provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste foram os que apresentaram os maiores índices de mortalidade. Doze isolados da Região Sul, oito do Sudeste e cinco do Centro-Oeste apresentaram 100% de mortalidade. Resultado semelhante foi obtido com a linhagem HD-1. No entanto, a elevada frequência obtida pode ser justificada pelo fato de já se ter partido de uma coleção previamente caracterizada como lepidóptero-específica, o que certamente aumenta a probabilidade de se encontrar maior número de isolados com atividade inseticida.

Dentre os isolados selecionados, encontram-se alguns provenientes de silos de armazenagem de grãos. Segundo Meadows *et al.* (1992), tais silos são ambientes propícios para obtenção de novas linhagens de *B. thuringiensis* por apresentarem situação ecológica particular (temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas) e alta diversidade biológica de insetos. Nesse ambiente, existe elevada estabilidade nas condições climatológicas e ausência de luz solar (irradiação UV), a qual danifica as proteínas Cry, podendo facilitar a reciclagem de *B. thuringiensis*, por propiciar tempo suficiente e condições adequadas para a proliferação e reciclagem bacterianas (Lambert *et al.* 1992). O estudo da distribuição de genes *cry* dentro de uma coleção de linhagens pode ajudar no entendimento do papel de *B. thuringiensis* no ambiente. Linhagens da bactéria foram estudadas e a correlação com algumas espécies tem sido discutida. Bernhard *et al.* (1997) encontraram correlação entre origem das amostras utilizadas no isolamento de *B. thuringiensis* e atividade bioinseticida. Os autores demonstraram que a presença de *Heliothis virescens* Fabricius pode atuar como fator de seleção positiva para linhagens de *B. thuringiensis* com atividade tóxica frente a esse inseto. Sugere-se no presente trabalho que o fato de os isolados que apresentaram maior efetividade tóxica contra *S. frugiperda* serem oriundos do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, possa estar relacionado com os níveis elevados das populações de *S. frugiperda* nessas regiões. Nesse caso, o controle natural desse inseto por *B. thuringiensis* levaria a uma reciclagem do mesmo, onde o inseto morto seria o ambiente ideal para que esporos fossem reciclados originando células vegetativas de *B. thuringiensis* altamente efetivas no controle de *S. frugiperda* (Lambert *et al.* 1992).

Quanto à identificação de subclasses do gene *cryI*, os iniciadores utilizados revelaram padrões distintos de amplificação entre os isolados de *B. thuringiensis* (Fig. 1). Paralelamente a análise de amplificação para todos os genes *cryI* permitiu verificar a distribuição dos mesmos em diferentes classes de toxicidade contra larvas de *S. frugiperda*, assim como as combinações específicas dos genes *cry* detectadas por PCR (Tabela 2).

Todos os genes foram distribuídos por todas as classes de mortalidade, exceto o *cryIE* na classe de 40-60%. O gene *cryIAb* mostrou-se presente em 80 isolados, o *cryIB* em 69 isolados, o *cryIAc* em todos os 115 isolados, o *cryIV* e o *cryIE* em 93 e 27 isolados, respectivamente. Observa-se na Tabela

2, que tanto para a menor faixa de mortalidade (0-20%) quanto para a maior faixa (90-100%), na qual encontra-se a maior parte dos isolados, houve também maior número de isolados para cada um dos genes analisados. Contudo o gene *cryIE* foi encontrado em somente dois isolados na classe de toxicidade de 90% a 100% e 15 isolados na classe de 0-20% de mortalidade (Tabela 2).

Combinações de genes foram registradas em todas as classes de mortalidade, exceto a combinação dos cinco genes que não esteve presente na classe de 75-90% e 40-60%, apresentando-se em um número reduzido de isolados nas demais, também na classe de 90-100%. Entretanto, na classe de 0-20% de mortalidade, essa combinação ocorreu em 10 dos 33 isolados. As demais combinações apresentaram-se em cerca de 50% dos isolados para cada classe de toxicidade, exceto para as classes de 40-60% e de 75-90%. A combinação *Ab + B + Ac* esteve presente no maior número de isolados e a combinação *AB + B + Ac + V + E*, no menor número de isolados.

Na Tabela 3 têm-se os valores dos parâmetros estimados, os valores de  $R^2$  e o valor de F, que permitem estimar a significância de cada gene e de suas associações. Os valores referentes ao efeito individual de cada gene na mortalidade de larvas foram significativos a 1% de probabilidade, para os genes *cryIAc* e *cryIE*, sendo mais evidente a atuação do gene *cryIE*, por apresentar um efeito de 31,5% na mortalidade média das larvas e explicar 11,4% da variação fenotípica para o traço. Resultados não significativos foram apresentados pelo efeito dos genes *cryIAb*, *cryIB* e *cryIIA*, sugerindo que a mortalidade das larvas independe dessas subclasses. De acordo com Cerón *et al.* (1995), os genes *cryID* e *cryIC* são os mais tóxicos para lagartas de *S. frugiperda*. Entretanto, Bohorova *et al.* (1997) obtiveram os genes *cryID*, *cryIE* e *cryIF* como mais eficientes no controle dessa praga. Praça *et al.* (2004), trabalhando com isolados de *B. thuringiensis* para controle de *S. frugiperda*, relataram que, provavelmente, a mortalidade das lagartas decorre da presença do gene *cryIB*. Valicente *et al.* (2000) analisaram, via PCR, aproximadamente 20 isolados de *B. thuringiensis* eficientes no controle de *S. frugiperda* e relataram que todos os isolados apresentaram os genes *cryIAb*, *cryIB*, *cryID* e *cryIE*, mas não foram encontrados os genes *cryIC* e *cryIF*. Rie *et al.* (1990) afirmaram que espécies de *Spodoptera* são tolerantes às proteínas CryIAa e CryIAb.

Resultados envolvendo o gene *cryIAc* e o *cryIE* foram significativos, com a maior contribuição na mortalidade, dada pelo gene *cryIAc*. Combinações envolvendo o gene *cryIE* com ausência de *cryIAc* foram significativas mostrando o maior efeito deste gene na mortalidade. Loguercio *et al.* (2001) também relataram altos níveis de toxicidade de isolados brasileiros, portadores do gene *cryIE*, às lagartas de *S. frugiperda*. Segundo os autores, um método de seleção baseado somente na presença de produto amplificado *cryIE* parece ser suficientemente efetivo na detecção de cepas com alta atividade inseticida contra *S. frugiperda*. Nesse mesmo trabalho, os autores utilizaram iniciadores para os genes *cryIC-*, *ID-*, *IE-* e *IF-* e verificaram que não houve influência clara sobre o potencial inseticida das cepas testadas.

A combinação dos genes *cryIAc* + *cryIIA* + *cryIE* foi

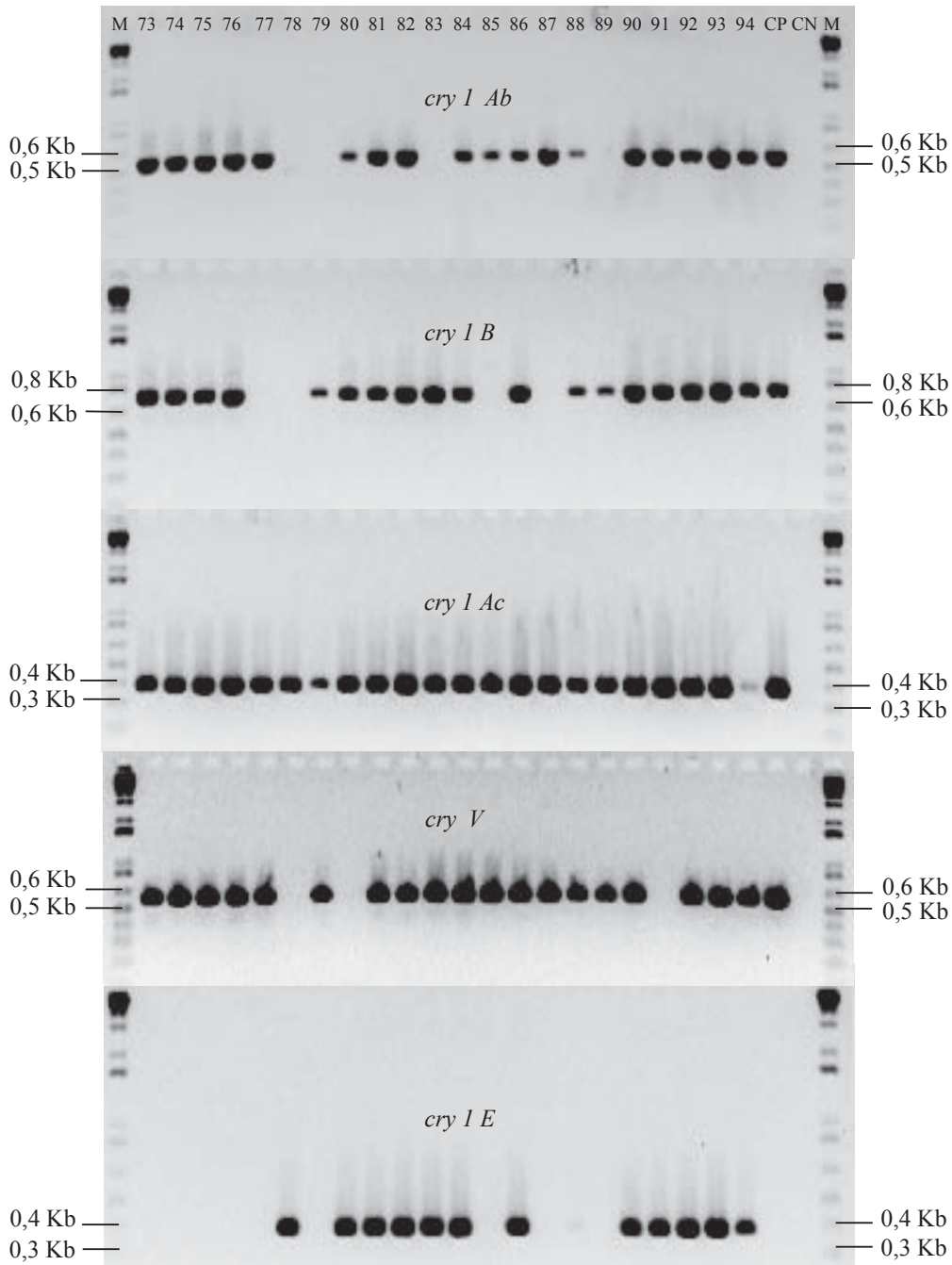


Fig. 1. Exemplo de eletroforograma dos produtos obtidos por PCR com os iniciadores específicos para o gene *cry I*. CP: Controle positivo (HD1 para todos os genes exceto para o gene *cry I E*, cujo CP foi *B. thuringiensis* var. *kenyae*).

a que apresentou maior efeito na mortalidade de larvas, enquanto a combinação dos genes *cryIAb* + *cryIB* apresentou o menor efeito. A caracterização dos isolados com perfis únicos de produto de PCR com iniciadores específicos constatou que o gene *cryIAc* foi o mais abundante, e o menos freqüente foi o gene *cryIE*. Esses resultados corroboram os encontrados por Bravo *et al.* (1998), na análise de distribuição

de genes *cryI* numa coleção mexicana de isolados de *B. thuringiensis*.

A análise conjunta do padrão de distribuição de genes nas diferentes classes de mortalidade, e dos resultados a partir das análises de regressão, fornece significativa evidência do envolvimento dos genes *cryIAc* e *cryIE* nos elevados níveis de toxicidade encontrados nos isolados de *B. thuringiensis*.

Tabela 3. Análise de regressão linear e ANOVA para presença de genes *cry* e níveis de mortalidade de *S. frugiperda* na amostra de 115 isolados de *B. thuringiensis*.

Genes <i>cry</i> I	Parâmetro estimado	R <sup>2</sup>	F	Prob> T
AB	8,4769	0,0011	1,13 <sup>NS</sup>	0,2889
B	9,4759	0,0057	1,66 <sup>NS</sup>	0,2006
Ac	59,4647	NE	NE	0,0001
V	15,7933	0,0158	2,84 <sup>NS</sup>	0,0944
E	31,5293	0,1137	15,76**	0,0001
AB+B		-0,0016	0,91 <sup>NS</sup>	
AB	3,9568			0,6833
B	7,4088			0,4096
AB+Ac		0,0011	1,13 <sup>NS</sup>	
AB	8,4769			0,2889
Ac	65,6031			0,0001
AB+V		0,0105	1,61 <sup>NS</sup>	
AB	5,1432			0,5351
V	14,0896			0,1525
AB+E		0,1079	7,96**	
AB	3,8812			0,6120
E	30,8832			0,0002
B+Ac		0,0057	1,66 <sup>NS</sup>	
B	9,4759			0,2006
Ac	65,4279			0,0001
B+V		0,0102	1,59 <sup>NS</sup>	
B	4,8828			0,5546
V	12,9654			0,2209
B+E		0,1097	8,09**	
B	4,9470			0,4854
E	30,5720			0,0002
Ac+V		0,0158	2,84 <sup>NS</sup>	
Ac	72,5350			0,0001
V	15,7933			0,0944
Ac+E		0,1137	15,76**	
Ac	66,8034			0,0001
E	31,5293			0,0001
V+E		0,1176	8,66**	
V	10,9609			0,2237
E	30,1244			0,0003
AB+B+Ac		-0,0016	0,91 <sup>NS</sup>	
AB	3,9568			0,6833

Continua

Tabela 3. Continuação.

Genes <i>cry</i> I	Parâmetro estimado	R <sup>2</sup>	F	Prob> T
B	7,4086			0,4096
Ac	66,9922			0,0001
AB+B+V		0,0025	1,1 <sup>NS</sup>	
AB	3,5711			0,7123
B	3,0627			0,7509
V	12,8366			0,2276
AB+B+E		0,102	5,35**	
AB	1,3425			0,8841
B	4,2590			0,6180
E	30,4817			0,0003
AB+Ac+V		0,0105	1,61 <sup>NS</sup>	
AB	5,1432			0,5351
Ac	74,8495			0,0001
V	14,0896			0,1525
AB+Ac+E		0,1079	7,96**	
AB	3,8112			0,6120
Ac	69,4635			0,0001
E	30,8832			0,0002
AB+V+E		0,11	5,74**	
AB	1,5433			0,8455
V	10,4810			0,2635
E	29,9290			0,0003
B+Ac+V		0,0102	1,59 <sup>NS</sup>	
B	4,8828			0,5546
Ac	73,2674			0,0001
V	12,9654			0,2209
B+Ac+E		0,1097	8,09**	
B	4,9470			0,4854
Ac	69,6938			0,0001
E	30,5720			0,0002
Ac+V+E		0,1176	8,66**	
Ac	75,5474			0,0001
V	10,9609			0,2237
E	30,1244			0,0003
B+V+E		0,1100	5,74**	
B	1,4424			0,8549
V	10,1537			0,3130
E	29,9488			0,0003

Continua

Tabela 3. Continuação.

Genes <i>cry 1</i>	Parâmetro estimado	R2	F	Prob> T
<i>AB+B+Ac+V</i>		0,0025	1,1 <sup>NS</sup>	
<i>AB</i>	3,5711			0,7123
<i>B</i>	3,0627			0,7509
<i>Ac</i>	74,6014			0,0001
<i>V</i>	12,8366			0,2276
<i>AB+B+Ac+E</i>		0,102	5,35**	
<i>Ab</i>	1,3425			0,8841
<i>B</i>	4,2590			0,6180
<i>Ac</i>	70,2119			0,0001
<i>E</i>	30,4817			0,0003
<i>B+Ac+V+E</i>		0,1100	5,74**	
<i>B</i>	1,4424			0,8549
<i>Ac</i>	75,7462			0,0001
<i>V</i>	10,1537			0,3130
<i>E</i>	29,9488			0,0003
<i>Ac+V+E+AB</i>		0,1100	5,74**	
<i>Ac</i>	76,2224			0,0001
<i>V</i>	10,4810			0,2635
<i>E</i>	29,9290			0,0003
<i>AB</i>	1,5433			0,8455
<i>V+E+AB+B</i>		0,102	4,27**	
<i>V</i>	10,1211			0,3168
<i>E</i>	29,8774			0,0004
<i>AB</i>	1,0902			0,9058
<i>B</i>	0,8950			0,9223
<i>AB+B+Ac+V+E</i>		0,102	4,27**	
<i>AB</i>	1,0902			0,9058
<i>B</i>	0,8950			0,9223
<i>Ac</i>	76,1476			0,0001
<i>V</i>	10,1211			0,3168
<i>E</i>	29,8774			0,0004

\*\* Significância em nível de probabilidade  $P < 0,01$ , NS: não significativo  $P < 0,01$ , NE: não estimado

Como mostrado na Tabela 3, o coeficiente de regressão e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) podem ser interpretados biologicamente como o efeito de cada *cry* na mortalidade média das larvas e a proporção da variação fenotípica explicada pelo gene, respectivamente. Na presente análise, dentre os estudados (*cry1Ab*, *cry1B*, *cry1Ac*, *cry1IA* e *cry1E*), o gene *cry1Ab* não influenciou a eficiência de mortalidade

das larvas de *S. frugiperda*. Aranda *et al.* (1996), em estudos de interações de proteínas cristal com células epiteliais do intestino de *S. frugiperda* relataram que proteínas altamente tóxicas (*Cry1C* e *Cry1D*) promovem interação saturada e específica com as microvilosidades das células epiteliais da larva, e que, proteínas não tóxicas (semelhantes a *Cry1Ab*) interagem inespecificamente com as microvilosidades, sendo assim, somente as interações específicas correlacionam-se com a toxicidade. As proteínas *Cry1Ac* e *Cry1B* são semelhantes a *Cry1Ab*, ligam-se às microvilosidades apicais no intestino do inseto, no entanto não há estreita correlação entre ligação e toxicidade.

Nos resultados de regressão obtidos no presente trabalho, a proteína *Cry1Ac* parece apresentar efeito sobre a mortalidade das larvas, contradizendo resultados encontrado por Aranda *et al.* (1996). No entanto, coincidem com aqueles obtidos por Luo *et al.* (1999), nos quais *Cry1Ac* ligou-se irreversivelmente às células epiteliais de *S. frugiperda*. Esses resultados sugerem que alguns componentes de membrana são necessários para induzir a formação de poros (Schwab & Culver 1990, Schwartz *et al.* 1991).

Finalmente, para uma análise mais detalhada, novas ampliações deverão ser realizadas, utilizando-se iniciadores para os genes *cry1D* e *cry1C* que, segundo Cerón *et al.* (1995), são os mais tóxicos para larvas de *S. frugiperda*, e ainda para *cry1F*, também eficiente para o controle dessas lagartas (Bohorova *et al.* 1997).

### Agradecimentos

Os autores agradecem aos responsáveis pelos Laboratórios de Genética de Bactérias e de Resistência de Plantas a Insetos, ambos da UNESP-Jaboticabal, SP, ao Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG, pelo apoio técnico a ao programa PIBIC/CNPq pelo apoio financeiro.

### Referências

- Aranda, E., J. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca & A. Bravo. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212.
- Barreto, M.R., L.L. Loguercio, F.H. Valicente & E. Paiva. 1999. Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae. *An. Soc. Entomol. Brasil* 28: 675-685.
- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers & H.D. Burges. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70: 59-68.
- Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* *Cry1*-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412-415.



- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Peña, M. Nuñez-Valdez, M. Soberón & R. Quintero. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, A.C. de Oliveira, E.A. Vieira, P.D. Zimmer, M.M. Kopp, J. de M. Bandeira & T.R. Magalhães. 2004. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) asociadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotrop. Entomol.* 33: 709-716.
- Cerón, J., A. Ortíz, R. Quintero, L. Guereca & A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826-3831.
- Herrnstadt, C., G.G. Soares, E.R. Wilcox & D.L.A. Edwards. 1986. New strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran insects. *Bio/technol.* 4: 305-308.
- Johnson, S.F. 1987. Migration and the life history strategy of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *Insect Sci. Appl.* 8: 543-549.
- Labrador, J.R. 1967. Estudio de biología y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda* (S & A). Maracaibo, Universidad del Zulia, 83p.
- Lambert, B., H.R. Hofte, A. Katrien, S. Jansens, P. Soetaert & M. Peferoen. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2536-2542.
- Lereclus, D., A.E. Delécluse & M.-M. Lecadet. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p.37-69. In P.F. Enwistle, J.S. Cory, M. Bailey & S. Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. West Sussex, John Wiley & Sons, 330p.
- Lima, A.S.G., A.M. Guidelli, I.L. Abreu & M.V.F. Lemos. 2002. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and  $\delta$ -endotoxin electron microscopy. *Genet. Mol. Biol.* 25: 225-229.
- Loguercio, L.L., C.G. Santos, M.R. Barreto, C.T. Guimarães & E. Paiva. 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. Appl. Microbiol.* 32: 362-367.
- Luo, K., D. Banks & M.J. Adang. 1999. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* CryI  $\delta$ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 457-464.
- McMichael, M. & D.P. Pashley. 1999. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 175-181.
- Meadows P.M., D.J. Ellis, J. Butt, P. Jarret & H.D. Burges. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1344-1350.
- Pashley, D.P., T.C. Sparks, S.S. Quisenberry, T. Jamjanya & P.F. Dowd. 1987. Two fall armyworm strains feed on corn, rice and bermuda grass. *Louis. Agric.* 30: 8-9.
- Pfeifer, T.A. & T.A. Grigeiatti. 1996. Future perspectives on insect pest management: Engineering the pest. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 109-119.
- Praça, L.B., A.C. Batista, E.S. Martins, C.B. Siqueira, D.G. de S. Dias, A.C.M.M. Gomes, R. Falcão & R.G. Monnerat. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq. Agropec. Bras.* 39: 11-16.
- Rie, J. van, W.H. Mcgaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett & H. van Mellaert. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Sci.* 247: 72-74.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 250p.
- Schwab, G.E. & P. Culver. 1990. In vitro analyses of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action p.36-45. In L.A. Hicle. & W.L. Fitch (eds.), *Analytical chemistry of Bacillus thuringiensis*. American Chemical Society, Miami Beach, 149p.
- Schwartz, J.L., Garneau, L., Masson, L. & R. Brosseau. 1991. Early response of cultured lepidopteran cells to exposure to delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*: Involvement of calcium and anionic channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1065: 250-260.
- Sekar, N., K.K. Madhavan, R.V. Yadav & R.N. Kataria. 1987. Primary retroperitoneal hydatid cyst (a report of 3 cases and review of the literature). *J. Postgrad Med.* 28: 112-114.
- Valadares-Inglis, M.C.C., M.T. De-Souza & W. Shiler. 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico, p.201-230. In I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.), *Controle biológico*. EMBRAPA, Jaguariúna, 264p.
- Valicente, F.H., M.R. Barreto, M.J.V. Vasconcelos, J.E.F. Figueiredo & E. Paiva. 2000. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagartado-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 147-153.
- Vilas-Bôas, G.F.L.T. 2002. Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus*. Tese de doutorado, FCAV/UNESP, Jaboticabal, 102p.

Received 13/VII/05. Accepted 04/IV/07.