

DETECÇÃO DOS GENES INSETICIDAS *CRY1D* E *CRY1AC* EM CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

Déborah Heloísa Bittencourt Machado¹

Jéssica Letícia Abreu Martins²

Lucas Silveira Garcia³

Caio Henrique Vieira Barbosa⁴

Fernando Hercos Valicente⁵

RESUMO

Foi realizado um trabalho de caracterização de quatro cepas de *Bacillus thuringiensis* que possuem toxicidade aleatória contra *Spodoptera frugiperda* e detectar a presença dos genes *cry1D* e *cry1Ac*. Foram realizadas PCR's com os primers para detecção da presença dos genes *Cry1D* e *Cry1Ac*, utilizando as cepas 1644 e HD1 como controles positivos. Foi detectada a presença de *Cry1D* em 3 das 4 cepas testadas, enquanto para *Cry1Ac* não foi identificada a presença do gene em nenhuma das cepas.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*; Genes *Cry*, *Spodoptera frugiperda*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil vem se destacando na produção de milho no cenário mundial, responsável por aproximadamente 10% da produção em 2005, atrás apenas dos Estados Unidos e da China (DUARTE *et. al.*, 2011). O acréscimo na produção dessa cultura se da à aplicação de novas tecnologias de manejo, dentre elas podemos destacar a utilização de agentes promotores de controle biológico, como o *Bacillus Thuringiensis*, no controle populacional de insetos (CUSTODIO, *et al.* 2016).

¹ Graduanda de Biotecnologia; Faculdade Ciências da Vida FCV, Sete Lagoas MG e-mail: deborahbittencourt195@hotmail.com.

² Graduando de Engenharia agrônômica Universidade Federal de São João Del Rei UFSJ, Sete Lagoas-MG; e-mail: jessicaabreu_lam@hotmail.com

³ Graduando de Bacharel Interdisciplinar em Biosistemas; Universidade Federal de São João Del Rei USJ, Sete Lagoas-MG; e-mail: lucassg.bh@gmail.com

⁴ Graduando de Ciências Biológicas; Centro Universitário de Sete Lagoas; UNIFEM, Sete Lagoas-MG; e-mail: caiochvb@yahoo.com.br

⁵ Pesquisador na empresa Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas MG. email: Fernando.valicente@embrapa.br

A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) é considerada uma praga primária da cultura do milho. Além do milho, essa espécie se apresenta como potencial praga de

outras culturas importantes na economia, como: algodão, arroz, tomate, trigo e sorgo (CRUZ *et. al.*, 1999). No milho, as lagartas mais novas dessa espécie provocam o que é conhecido como “raspagem”, por literalmente, rasparem a superfície foliar. Já as lagartas mais velhas buscam a segurança do cartucho do milho (BUSATO *et. al.*, 2006). Segundo Hruska e Gould (1997), a *Spodoptera frugiperda* pode causar danos de 73% na produção de milho em casos de ataque intenso.

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram positiva, se apresenta na morfologia bastonete, capaz de produzir inclusões proteicas durante a fase de esporulação, sendo úteis no controle populacional de insetos (POLANCZYK, 2004). De acordo com Valadares *et al.*, (1998) o *Bacillus thuringiensis* movimenta cerca de 90% do mercado de bioinseticidas. A toxicidade do *Bacillus thuringiensis* se deve a presença de inclusões parasporais, onde os mesmos podem se constituir pelas proteínas Cry, Vip e Cyt (BRAVO *et al.*, 2007). Os cristais proteicos são produzidos no início da esporulação são solubilizados quando em meio alcalino. Após a solubilização dos cristais, na presença de proteases, os cristais proteicos liberam fragmentos proteicos tóxicos denominados d-endotoxinas que atuam no sistema digestivo do inseto, levando-o à morte (POLANCZYK, 2004; VALICENTE, 2009). Desta forma, através de pesquisa experimental de caráter qualitativo e quantitativo o objetivo geral deste trabalho é caracterizar quatro cepas de *Bacillus thuringiensis* que possuem toxicidade aleatória contra *Spodoptera frugiperda*, sendo os objetivos específicos detectar a presença dos genes *cry1D* e *cry1Ac*.

2 METODOLOGIA

O estudo foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas - MG, foram selecionadas quatro cepas de *Bacillus thuringiensis* provenientes do banco de entomopatógenos do laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo que apresentavam toxicidades contra *Spodoptera frugiperda* variando entre 0% a 95%. Inicialmente foi realizada a extração do DNA genômico das cepas através do kit *Wizard Genomic DNA purification*. As amostras foram quantificadas em aparelho nanodrop e diluídas a 100 ng/μl para a realização das PCR's.

As sequencias de primers iniciadoras foram correspondentes aos genes *cry1D* e *cry1Ac*. As reações constituíam em um volume final de 20 μl, compostas por 2μl de tampão 10x, 0.8 μl de MgCl₂, 1μl de DNTP, 0.2 μl de Taq polimerase KAPA, 1 μl de cada par de

primer, 3 µl de DNA das cepas e 11 µl de H₂O para completar o volume final da reação. O programa de amplificação constituiu-se de 95° C de desnaturação inicial por dois minutos, seguida por 30 ciclos de 95° C de desnaturação por um minuto, 55° C de anelamento por um minuto, 72° C de extensão por um minuto, tendo um tempo de extensão final de 72° C por 10 minutos. As amostras de PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% a 80 Volts por aproximadamente uma hora, os fragmentos obtidos foram visualizados em luz ultra violeta no aparelho fotodocumentador.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da PCR para identificação da presença dos genes Cry1D foram satisfatórios, onde as cepas 939FB, 1145D e 1058A amplificaram na região esperada de aproximadamente 290pb de acordo com o controle positivo 1644, detectando a possível presença do gene Cry1D. A cepa 1168G não amplificou na região esperada, não apresentando nenhuma banda (figura1), porém nas cepas testadas para amplificação do gene Cry1Ac apenas o controle positivo foi amplificado, no entanto, as demais amostras não apresentaram bandas, comprovando a possível ausência do gene Cry1Ac (figura2).

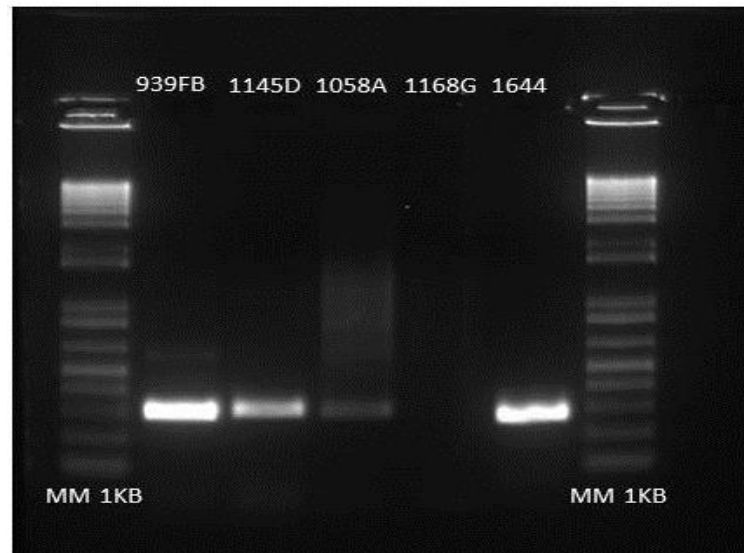


Figura 1: Amplificação das quatro cepas de *Bacillus thuringiensis*, para detecção do gene Cry1D, cepa 1644 foi utilizada como controle positivo para presença do gene.

Fonte: Dados do autor

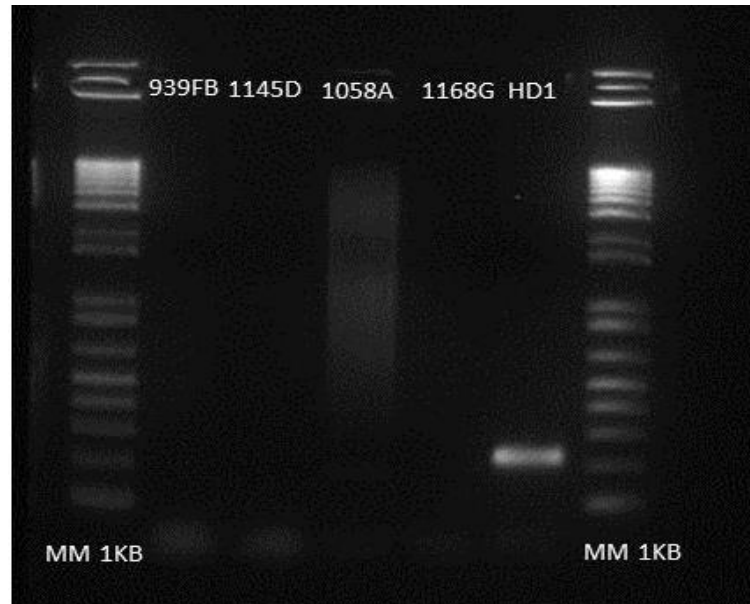


Figura 2: Amplificação das quatro cepas de *Bacillus thuringiensis*, para detecção do gene *Cry1Ac*, cepa HD1 foi utilizada como controle positivo para presença do gene.

Fonte: Dados do autor.

De acordo com Bravo *et al.*, (1998) os isolados compostos por proteínas *Cry1* são mais frequentes, estando em alta proporção em coleções de *Bacillus thuringiensis*. Vilas-Bôas 2002 destaca que as toxinas codificadas pelos genes *Cry1* são específicas para lepidópteros. A toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos. Portanto, se torna necessário realizar e analisar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade (LEE *et al.*, 1996; SCHENEPFS *et al.*, 1998)

4 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, a presença dos genes *Cry1D* nas cepas 939FB, 1145D e 1058 pode indicar que o material possui grande viabilidade no controle de lepidópteros praga. A utilização da cepa na formulação de biopesticidas pode ser uma estratégia interessante para ser inserida no manejo integrado de pragas, reduzindo-se assim a necessidade de utilização de agroquímicos para realizar o controle.

REFERÊNCIAS

BRAVO, Alejandra *et al.* **Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection.** Applied and environmental microbiology, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control**. *Toxicon*, v. 49, n. 4, p. 423-435. 2007.

BUSATO, Gustavo Rossato *et al.* **Adequação de uma dieta artificial para os biótipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Bragantia*, v. 65, n. 2, p. 317-323, 2006.

CRUZ, Ivan; FIGUEIREDO, M. de; MATOSO, Marcos Joaquim. **Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma***. Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E), 1999.

CUSTODIO, Cleberti José Silva *et al.* **Fatore que contribuíram para o crescimento da produtividade de milho no Brasil**. *Revista Eletrônica Interdisciplinar*, v. 1, n. 15, 2016.

DUARTE, J. de O.; GARCIA, J. C.; MIRANDA, RA de. **Cultivo do Milho: economia da produção**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

HRUSKA, Allan J.; GOULD, Fred. **Fall armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) and *Diatraea lineolata* (*Lepidoptera: Pyralidae*): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua**. *Journal of Economic Entomology*, v. 90, n. 2, p. 611-622, 1997.

LEE, M.K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.A.; DEAN, D.H. **Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar***. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.583-586, 1996.

POLANCZYK, Ricardo Antônio. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith)**. 2004. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2004.

SCHNEPF, E. *et al.* ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, p.775-806, 1998.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, MT DE. **Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico**. Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v. 1, p. 201-230, 1998.

VALICENTE, Fernando Hercos. **Controle biológico de pragas com entomopatógenos**. Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009.

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.