

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES *cry1* EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E SUA INTERAÇÃO PARA DISTINTOS NÍVEIS DE TOXICIDADE A *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA).** Vivian Boter Bergamasco, Manoel Victor Franco Lemos, Marta de Campos Neves. – Genética – Ciências Biológicas – Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal.

Cerca de 15% da safra de alimentos do mundo é perdida por causa do ataque de insetos, cujo controle tem sido feito utilizando inseticidas químicos, tóxicos ao homem e ao meio ambiente. Sendo assim, é fundamental empregar o controle biológico através da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que apresenta atividade tóxica específica às ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e também à classe Nematodea. Trata-se de um bacilo entomopatogênico, que apresenta atividade tóxica por meio de proteínas cristal ou  $\delta$ -endotoxinas, codificadas pelos genes *cry*, que podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos ou em ambos. Uma subespécie ou variedade de *B. thuringiensis* pode conter uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou cópias de diferentes genes cujos produtos formarão um mesmo cristal misto. A localização preferencial em plasmídeos determina a grande diversidade destes genes e a conseqüente ocorrência de linhagens contendo diferentes combinações dos mesmos e, portanto, com perfis de toxicidade distintos. A caracterização de novas subespécies e classificação de novas linhagens entomopatogênicas é de grande importância para descoberta de outras estirpes de *B. thuringiensis* produtoras de novas  $\delta$ -endotoxinas para o desenvolvimento de bioinseticidas mais efetivos no controle de pragas.

O presente trabalho objetivou a identificação de genes *cry1* em novos isolados de *B. thuringiensis*, utilizando a técnica de PCR com “primers” específicos para os diferentes genes *cry1* e a comprovação, em bioensaios, da interação entre os genes para diferentes níveis de toxicidade a *Spodoptera frugiperda*. Para isto, foram testados sete novos isolados de *B. thuringiensis* provenientes do solo de fazendas do município de São Paulo-SP, cedidos pelo Laboratório de Análises de Solo (ESALQ/USP), mantidos na coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, no Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV-UNESP de Jaboticabal – SP e comparados a duas linhagens padrões para Lepidoptera (subespécies *kurstaki* HD1 e *aizawai* HD137).

O DNA foi extraído pela resina Instagene Matrix e a identificação de genes *cry1* foi determinada pela técnica de PCR com oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1D*. As reações de amplificação para os pares de iniciadores utilizados foram conduzidas em um volume total de 20  $\mu$ l contendo: 30 ng de DNA total, 250  $\mu$ M de uma solução de dNTP; 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 destilada grau Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 $\mu$ l). As reações de PCR foram realizadas a partir de um único passo de desnaturação de 5 min a 92°C e 30 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 92°C por 1 min; pareamento a 50°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e ao final dos ciclos uma extensão extra a 72°C por 10 min. Ao fim de cada programa foi adicionado um passo único para manutenção da amostra a 10°C até a retirada dos tubos do termociclador. Após as amplificações, 15 $\mu$ l 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 2 horas a uma corrente elétrica de 75 V, adotando-se o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1 kb (1 kb DNA Ladder®). Os géis foram visualizados sob luz UV e documentados em um equipamento fotodocumentador.

As sete linhagens foram submetidas a testes de toxicidade em bioensaios com *S. frugiperda*, com lagartas de primeiro instar (larvas de 2 a 3 dias) alimentadas com cubos de 1 cm<sup>3</sup> de dieta artificial inoculadas com uma solução de esporos de cada uma das linhagens, sendo 10 copos por linhagem a cada repetição, cada uma contendo uma testemunha, para a qual foi fornecido um cubo banhado em água esterilizada. Os bioensaios foram mantidos em uma sala a 25° C, com umidade relativa do ar a 70% e submetidos a um regime de 14 h de luz : 10 h escuro. Posteriormente foi feita a quantificação de lagartas mortas pela ação do *B. thuringiensis*, cujo índice de mortalidade foi calculado. Todas as lagartas mortas foram observadas em microscópio óptico para a comprovação de que os esporos foram causadores da morte. Para a análise estatística nos bioensaios, os dados de porcentagens de

mortalidade foram submetidos à análise de variância, cujo modelo matemático proposto inclui o efeito fixo de linhagens. Foram realizados testes de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância dos grupos (linhagens). Testes de comparação de médias entre as linhagens foram realizados quando verificado o efeito do grupo sobre a porcentagem de mortalidade. Para essa comparação de médias, foi utilizado o teste de Tukey a 5%, para estabelecer a diferença mínima significativa entre as médias de mortalidade dessas linhagens.

Identificou-se uma variedade de combinações de genes nos isolados analisados que, nos bioensaios com *S. frugiperda*, demonstraram perfis de toxicidades distintos.

Comparando a taxa de mortalidade e a presença dos genes *cry1*, nos isolados que apresentaram menores médias de mortalidade (R175 e R177) foi identificado apenas o gene *cry1Aa*. Naqueles que apresentaram médias de mortalidade medianas (R180 e R168), dois genes foram identificados, sendo um deles o gene *cry1Aa* e o outro *cry1Ab* ou o gene *cry1Ac*. Já nos isolados mais efetivos (R157, R158 e R184) assim como os padrões, com médias de mortalidade altas, verificou-se a presença de dois ou mais genes *cry1*, indicando um sinergismo entre eles para a expressão de um maior nível de toxicidade das proteínas *Cry*.

O conjunto de genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac* caracteriza uma grande efetividade contra *S. frugiperda*, como já foi demonstrado (HD1, R158 e R184) e está sendo altamente comercializado no bioinseticida Dipel obtido da subsp. *kurstaki* HD1.

O gene *cry1B* presente nas linhagens com maiores médias de mortalidade demonstrou alta eficiência a *S. frugiperda*, principalmente ao se analisar o isolado R157 que, assim como os de baixa mortalidade, contém o gene *cry1Aa* e a presença de apenas mais o gene *cry1B* torna-o tão eficiente quanto outros com três ou mais genes *cry1*. Isso faz com que esse gene seja de grande interesse para obtenção de novos produtos à base de *B. thuringiensis* para o controle dessa praga.

A presença dos genes *cry1Aa* e *cry1B* nos isolados que apresentaram 100% de mortalidade indica uma interação entre esses genes de modo a formar proteínas com maior toxicidade a *S. frugiperda*, sendo essa característica a mais promissora para uso contra essa praga, comprovando assim, a interação entre os genes para diferentes níveis de toxicidade.

**Bolsa:** FAPESP