

Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Cristina Lima de Macedo⁽¹⁾, Érica Soares Martins⁽¹⁾, Leonardo Lima Pepino de Macedo⁽²⁾, Aldaléia Carmo dos Santos⁽¹⁾, Lílian Botelho Praça⁽¹⁾, Luiz Avelar Brandão de Góis⁽³⁾ e Rose Gomes Monnerat⁽⁴⁾

⁽¹⁾Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, s/nº, Asa Norte, CEP 70910-900 Brasília, DF. E-mail: crispepi@yahoo.com.br, esmartins@gmail.com, aldaleia.santos@gmail.com, lillian.praça@embrapa.br ⁽²⁾Universidade Católica de Brasília, Campus Asa Norte, SGAN 916, Módulo B, CEP 70790-160 Brasília, DF. E-mail: limapepino@yahoo.com.br ⁽³⁾Triunfo Agro-Industrial Ltda., Boca da Mata, AL. E-mail: avelar.brandao@usinatriunfo.com.br ⁽⁴⁾Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF. E-mail: rose.monnerat@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar estirpes nativas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Cento e seis estirpes pertencentes ao Banco de Bactérias de Invertebrados, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram testadas quanto à toxicidade a *D. saccharalis*, e, as mais tóxicas, caracterizadas por métodos bioquímicos e moleculares. Das 106 estirpes testadas, 16 causaram 100% de mortalidade em 24 horas. As três estirpes mais tóxicas apresentaram concentração letal média entre 8 e 43 ng cm⁻². O perfil proteico das 16 estirpes mostrou a presença de proteínas de 130 e 65 kDa, e a caracterização molecular mostrou a presença dos genes tipo *cry1* e *cry2*: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*. A concentração letal média de esporos e cristais obtidos a partir de estirpes recombinantes, que expressavam individualmente os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2Aa*, variou entre 222 e 610 ng cm⁻², valores muito superiores aos das estirpes nativas mais tóxicas, que apresentavam possibilidade de expressão simultânea desses genes. Este resultado é indicativo de que há sinergia entre as toxinas. Há interação entre as toxinas de *B. thuringiensis* e seus receptores na broca-do-colmo da cana-de-açúcar.

Termos para indexação: *Diatraea saccharalis*, controle biológico, ensaio de ligação, proteínas Cry.

Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* efficient strains against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Abstract – The objective of this work was to select and characterize native strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). A hundred-and-six strains, belonging to the bank of invertebrate bacteria (Brazil), of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, were tested as to their toxicity to *D. saccharalis*, and the most toxic ones were characterized by biochemical and molecular methods. Out of the 106 tested strains, 16 caused 100% mortality within 24 hours. The three most toxic strains showed median lethal concentrations between 8 and 43 ng cm⁻². The protein profile of the 16 strains showed the presence of 130 and 65 kDa proteins, and the molecular characterization showed the presence of *cry1* and *cry2* type genes: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, and *cry2Aa*. The median lethal concentration of spores and crystals obtained from recombinant strains, which individually expressed the genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, and *cry2Aa*, varied between 222 and 610 ng cm⁻², values much higher than the ones of the most toxic native strains, which have the possibility of simultaneously expressing these genes. This result indicates a synergy between the toxins. There are interactions between *B. thuringiensis* toxins and their receptors in the sugarcane borer.

Index terms: *Diatraea saccharalis*, biologic control, binding assays, Cry proteins.

Introdução

Entre as espécies que atacam a cana, *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca-da-cana, é a que causa mais prejuízos à cultura. Seu hábito alimentar, que se caracteriza pela penetração da lagarta nos colmos da

planta, limita seu controle por métodos convencionais (Gitahy et al., 2007). O controle desta praga, no entanto, tem sido realizado com agrotóxicos, apesar dos potenciais riscos desses produtos ao homem e ao ambiente. Assim, agentes de controle biológico são uma alternativa ecológica e economicamente viável (Praça et al., 2004), e o uso de *Bacillus thuringiensis* é uma

estratégia promissora no controle de *D. saccharalis*, conforme relatado por Praça et al. (2004) e Gitahy et al. (2007).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria do solo, Gram-positiva, aeróbia, da família Bacillaceae, que produz inclusões proteicas cristalinas e esporos. Essas inclusões são compostas por proteínas conhecidas como δ -endotoxinas ou proteínas Cry, muito tóxicas a uma ampla variedade de insetos-praga de importância econômica e também a outros invertebrados (Monnerat & Bravo, 2000). Várias estirpes de *B. thuringiensis*, específicas para os insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, têm sido isoladas (Praça et al., 2004).

O mecanismo de ação desta bactéria envolve vários passos, como solubilização do cristal, processamento das toxinas, interações específicas com receptores, união ao receptor e inserção de uma parte da toxina na membrana apical das células intestinais dos insetos. Os receptores responsáveis pela ligação da toxina à membrana tem sido estudados em lepidópteros, para determinar especificidade, toxicidade e mecanismo de ação das toxinas Cry (Bravo et al., 2004). A união aos sítios receptores tem motivado diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao melhor entendimento desse processo (Monnerat & Bravo, 2000), pois ele é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry.

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Estes podem ser formados por diferentes proteínas Cry, e pode haver casos em que até cinco toxinas são sintetizadas por uma mesma estirpe. A busca por estirpes de *B. thuringiensis* eficazes contra a broca-da-cana é de grande importância para o manejo desta praga, mas estudos sobre este assunto ainda são limitados.

O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar estirpes nativas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Material e Métodos

Foram realizadas triagens de 106 estirpes de *B. thuringiensis*, pertencentes ao Banco de Bactérias de Invertebrados, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, para selecionar aquelas que possuem potencial para o controle da broca-do-colmo da cana-de-açúcar. Destas, seis eram estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* que produzem

toxinas individuais Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1I e Cry2Aa. As estirpes foram cultivadas em meio de cultura Embrapa, conforme Monnerat et al. (2007), em incubador rotativo, Modelo 3595, a 200 rpm (Labline Instruments, Melrose Park, IL, EUA), a 28°C durante 72 horas, até sua completa esporulação.

As culturas bacterianas que causaram mortalidade de 100% foram diluídas 50 vezes e novamente testadas. As que mantiveram a taxa de mortalidade de lagartas acima de 75% foram submetidas a novos ensaios, para determinação da concentração letal necessária para matar 50% da população testada (CL₅₀).

Os ensaios foram realizados em copos de plástico de 50 mL, cobertos com tampas de acrílico, que continham 10 mL de dieta artificial com açúcar (54 g), farelo de soja (42 g), gérmen de trigo (32 g), ágar (18,8 g), água (1.000 mL), ácido ascórbico (2 g), ácido sórbico (1,2 g), nipagin (1,8 g) e solução vitamínica (12 g), conforme descrito por King & Hartley (1985). A dieta foi autoclavada e vertida no fundo dos copos, que foram mantidos sob luz UV por 20 min. A cultura bacteriana (150 μ L) foi depositada na superfície da dieta. Para cada estirpe, foram feitas três repetições e um controle negativo, livre do patógeno. Após a secagem da cultura bacteriana adicionada à dieta, dez lagartas de segundo instar de *D. saccharalis* foram colocadas em cada copo. O bioensaio foi mantido em sala climatizada a 28 \pm 2°C, com umidade a 70% e fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

A primeira avaliação de mortalidade foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copos de plástico de 50 mL com dieta livre do patógeno. No sétimo dia, foi feita a segunda e última avaliação (Praça et al., 2004). Conforme mencionado, as estirpes que mataram 100% de lagartas foram diluídas 50 vezes e novamente testadas. As que mantiveram a taxa de mortalidade de lagartas acima de 75% foram utilizadas para a continuação do ensaio. No cálculo da CL₅₀, foram feitas diluições seriadas da cultura bacteriana liofilizada, e o bioensaio foi preparado nas condições anteriormente descritas. Foram testadas dez diluições de cada estirpe. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Btk) foi utilizado como padrão e controle positivo. Os dados de mortalidade obtidos após sete dias foram analisados mediante análise Probit (Finney, 1971), e a CL₅₀ foi determinada.

Os perfis proteicos das estirpes tóxicas foram avaliados de acordo com o protocolo de extração de proteínas, descrito por Lecadet et al. (1992), com modificações. As preparações de esporos-cristais foram ressuspensas em tampão de amostra de proteína, fervidas a 100°C por 5 min e analisadas por SDS-PAGE a 10% (Laemmli, 1970). Foi utilizado o marcador de massa molecular Rainbow, da GE. Para comparação, a estirpe S1450 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi usada como padrão, por se tratar da estirpe referência para lepidópteros.

A extração do DNA total das estirpes selecionadas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bravo et al. (1998). Foram utilizados oligonucleotídeos para a identificação dos seguintes genes: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cyt1* e *cyt2* e específicos na identificação de *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry7*, *cry9* e *cry13* (Ceron et al., 1994, 1995; Bravo et al., 1998; Ibarra et al., 2003). Diferentes oligonucleotídeos foram utilizados nas reações em cadeia das polimerases (PCR). Transferiram-se 5 µL do sobrenadante da cultura para um novo tubo de polipropileno de 0,2 mL, que continha 0,5 µmol L⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 0,2 µmol L⁻¹ de dNTP mix, tampão de Taq 1X e 2,5 U de Taq DNA polimerase (5,0 U), o que totalizou 30 µL de volume final. As condições de amplificação foram baseadas nas descrições de Ceron et al. (1994, 1995), Bravo et al. (1998) e Ibarra et al. (2003).

Para a análise da reação da PCR, uma alíquota de 25 µL de cada produto de PCR foi misturada com 5 µL tampão de amostra e aplicada em gel de agarose a 1,5%. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X [Tris-base (0,89 mol L⁻¹), ácido bórico (0,88 mol L⁻¹), EDTA 0,5 mol L⁻¹ (pH 8,0)]. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, diluído em água, à concentração de 1 µg mL⁻¹, por 20 min, e descorado em água destilada por 15 min. O gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotografado em fotodocumentador Stratagene, Eagle Eye, (PennState Science, University Park, PA, EUA).

As estirpes recombinantes S2211 (Cry1Aa), S2210 (Cry1Ab), S2212 (Cry2Aa) e S2209 (Cry1Ac) foram mantidas a 28°C e 200 rpm, durante 72 horas, em meio de esporulação (8 g L⁻¹ de caldo nutriente; 0,25 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 1 g L⁻¹ de KCl; 0,002 g L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O; 0,0732 g L⁻¹ de Fe₂(SO₄).7H₂O;

0,0056% de H₂SO₄; 0,098 g L⁻¹ de CaCl₂) (Lereclus et al., 1995). Na purificação dos cristais, foi utilizado o protocolo de Thomas & Ellar (1983). As proteínas foram quantificadas com protein assay (Bio Rad), pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Utilizou-se tripsina, para simulação e observação da ação das enzimas envolvidas no processo de ativação. As proteínas foram incubadas com a enzima durante duas horas a 37°C, com leve agitação para ativação das toxinas. A concentração da tripsina variou de acordo com a concentração das proteínas, a 10:1 de proteína:enzima. Para inativação da enzima, adicionou-se PMSF a 1 mmol L⁻¹ e, em seguida, foi feita uma centrifugação a 11.180 g por 10 min, e o sobrenadante foi recuperado. A observação da integridade das proteínas e a determinação de sua massa molecular foi realizada em gel de poliácridamida, a 12%.

As proteínas ativas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa foram biotiniladas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (Amersham), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, elas foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida a 12%. Uma vez detectada a atividade tóxica de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, analisaram-se estas proteínas quanto à capacidade de ligação ao intestino médio das lagartas da broca-da-cana. A partir dos intestinos médios de *D. saccharalis* de quarto instar, foram retiradas as vesículas da “borda em escova” da membrana apical das células do intestino (“brush border membrane vesicles” – BBMV), com auxílio de pinça. Essas vesículas foram lavadas e conservadas em solução-tampão (manitol 200 mmol L⁻¹, DDT 1 mmol L⁻¹ e HEPES-Tris 1 mmol L⁻¹, pH 7,4) a -80°C (Wolfesberger et al., 1987).

O ensaio de ligação foi realizado conforme Aranda et al. (1996), para observar a ligação das proteínas testadas às BBMVs extraídas do intestino médio.

Resultados e Discussão

Dezesseis estirpes nativas, das 106 testadas, causaram 100% de mortalidade, e quatro das estirpes recombinantes de *B. thuringiensis*, que expressavam individualmente as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, também apresentaram toxicidade à *D. saccharalis*. As estirpes tóxicas pertenciam aos sorotipos *kurstaki* (S1258, S1264, S2193 e S2195), *tolworthi* (S1303 e S1304), *aizawai* (S1295), *galleriae* (S1298) e *morrissoni* (S1301). Resultados da atividade

tóxica de estirpes de *B. thuringiensis*, pertencentes aos sorotipos *kurstaki* e *tolworthi*, contra *D. saccharalis* já haviam sido relatados por Gitahy et al. (2007). Dados semelhantes foram obtidos por Rosas-García (2006), com isolado de sorotipo *kurstaki*, que demonstrou atividade tóxica contra a broca-da-cana no México. No presente trabalho, as estirpes pertencentes a esses sorotipos também foram tóxicas; além disso, foram detectadas estirpes pertencentes aos sorotipos *aizawai*, *galleriae* e *morrisoni*. As subespécies *aizawai*, *kurstaki* e *galleriae* normalmente apresentam as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry2Ab, descritas como tóxicas a insetos da ordem Lepidoptera (Monnerat et al., 1999).

As estirpes que causaram mais de 75% de mortalidade após diluição por 50 vezes foram: S602, S1264 e S1301. Entre elas, a mais tóxica à *D. saccharalis* foi a S602 (CL₅₀ de 8,96 ng cm⁻²), seguida do padrão Btk (12,46 ng cm⁻²) e da estirpe S1264 (20,43 ng cm⁻²) com valores de CL₅₀ estatisticamente semelhantes, porém diferentes da estirpe S1301 (43,28 ng cm⁻²) (Tabela 1).

Por meio de análise do perfil proteico, foi possível observar que as preparações das estirpes selecionadas eram compostas de dois polipeptídeos principais, de aproximadamente 130 e 65 kDa, que correspondem ao perfil do padrão Btk (Figura 1) (Höfte et al., 1988). O perfil de 130 kDa está relacionado ao padrão característico das proteínas Cry, eficientes contra coleópteros e lepidópteros, e o perfil de 65 kDa é característico das proteínas do grupo Cry2, ativa contra lepidópteros e dípteros (Bravo et al., 2004).

O perfil gênico variou entre as estirpes. Os amplicons produzidos com maior frequência foram os correspondentes aos genes *cry1Ab* e *cry2Ab* (13 estirpes), *cry1Aa* e *cry2Aa* (9 estirpes), *cry1Ad* e *cry1E* (6 estirpes) e *cry1Ac* (5 estirpes). Três estirpes expressaram amplicons correspondentes aos genes *cry1F* e *cry1G*, enquanto amplicons para os genes

cry1B, *cry1C* e *cry1D* foram detectados apenas uma vez (Tabela 2). A variabilidade de genes detectados nas estirpes expande o espectro de hospedeiros da bactéria (Agaisse & Lereclus, 1995). Os outros iniciadores utilizados não produziram fragmentos de tamanho esperado, o que indica que as estirpes não possuem os genes *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry17*, *cry19*, *cry21*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cyt1* e *cyt2*.

As estirpes S602 e S1258 apresentaram perfil gênico e proteico semelhantes entre si, ou seja, proteína de 130 kDa, correspondente aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, e proteína de 65 kDa, correspondente aos genes *cry2Aa* e *cry2Ab*. A estirpe S1264 apresentou os mesmos genes, exceto o gene *cry2Ab*, mas não apresentou no perfil proteico a proteína de 65 kDa (Figura 1). É possível que esta proteína Cry2Aa

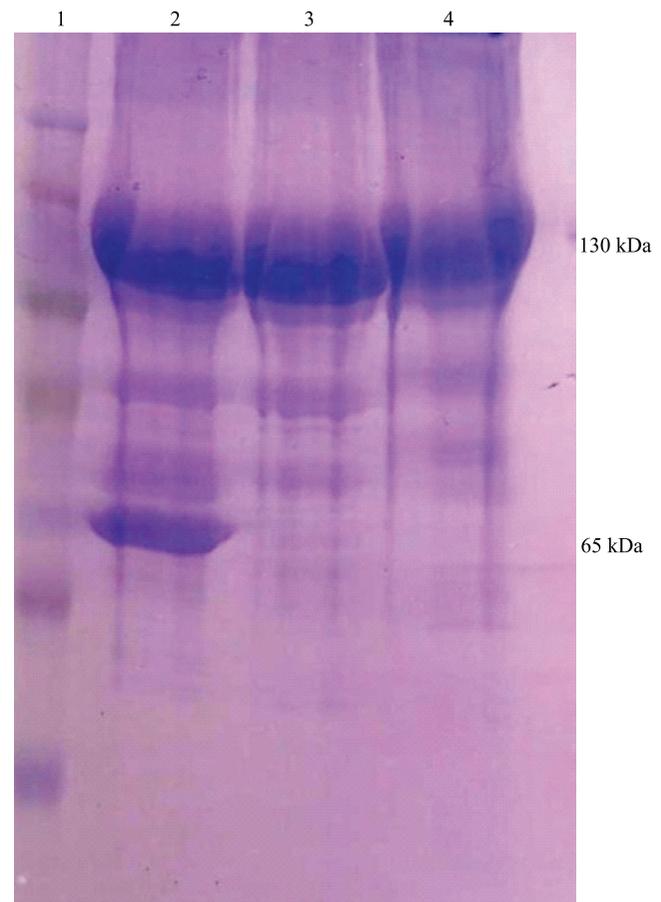


Figura 1. SDS-PAGE (12%) do complexo esporo-cristal das estirpes de *Bacillus thuringiensis* S602, S1264 e S1301. 1, marcador de massa molecular Rainbow (GE); 2, S602; 3: S1264 e 4: S1301.

Tabela 1. Concentração letal para 50% da população testada (CL₅₀) das estirpes de *Bacillus thuringiensis*, no controle de lagartas de segundo instar de *Diatraea saccharalis*⁽¹⁾.

Estirpe	CL ₅₀ (ng cm ⁻²)
S602	8,96 (5,46–14,61)a
S1264	20,43 (14,53–38,71)ab
S1301	43,28 (19,30–72,73)b
S1450(Btk)	12,46 (2,34–20,46)ab

⁽¹⁾Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pela análise Probit, a 5% de probabilidade.

não seja expressa, ou que seja expressa em baixas quantidades, indetectáveis nas preparações. Todas as outras combinações gênicas foram diferentes entre si.

Com os ensaios realizados com as proteínas Cry individuais, observou-se que a CL₅₀ das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa variou entre 222 e 610 ng cm⁻² (Tabela 3). Ainda que as toxinas Cry1Ab e Cry2Aa tenham apresentado resultados de CL₅₀ mais baixos (222 e 278 ng cm⁻², respectivamente) todas as proteínas apresentaram resultados de toxicidade semelhantes.

As estirpes tóxicas selecionadas no presente trabalho e a estirpe padrão Btk apresentaram CL₅₀ de 8 a 43 ng cm⁻² (Tabela 1), bastante inferior e significativamente diferente ao das toxinas puras, o que indica haver sinergia entre as toxinas. Outros autores relataram que a toxicidade das proteínas Cry pode estar relacionada à ação sinérgica existente em algumas estirpes, ou seja, que ela é potencializada quando duas ou mais proteínas Cry agem em conjunto. Isso torna necessária a realização e a análise de ensaios com proteínas individuais e em conjunto, para confirmar a toxina responsável pela mortalidade (Praça et al., 2004).

As toxinas utilizadas neste trabalho foram descritas como tóxicas a vários insetos da ordem Lepidoptera: Cry1Aa para *Manduca sexta*, *Bombyx mori*, *Heliothis*

virescens, *Spodoptera exigua*, *Ostrinia nubilalis* e *Thaumetopoea pityocampa* (Van Frankenhuyzen, 2009); Cry1Ab para *T. pityocampa*, *Earias insulana* e *Chilo suppressalis* (Sharma et al., 2011); Cry1Ac para *Tecia solanivora*, *Lymantria dispar* e *B. mori*, (Pigott & Ellar, 2007); e Cry2Aa para *Plutella xylostella* e *H. virescens* (Monnerat et al., 1999).

As BBMV de *D. saccharalis* apresentaram ligações, quando submetidas à marcação das proteínas biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa (Figura 2). A presença do sinal significa que ocorreu a ligação entre as proteínas Cry e os receptores presentes à superfície do intestino médio das lagartas da *D. saccharalis*. Todas as proteínas solúveis ligaram-se aos possíveis receptores presentes no intestino médio das lagartas. Este tipo de interação depende da conformação em que as duas estruturas se encontram. Segundo López-Pazos et al. (2010) as toxinas Cry1 e Cry2 se ligam a receptores específicos nas microvilosidades de células epiteliais do inseto-alvo.

Nas ligações obtidas com as proteínas e os receptores intestinais, ficaram evidentes as variações da intensidade de marcação. Diferentes toxinas Cry podem compartilhar o mesmo receptor ou podem ligar-se a diferentes receptores presentes na membrana intestinal do inseto. Aminopeptidases e caderinas foram relatadas como possíveis receptores das toxinas Cry em lepidópteros (Hernández et al., 2004).

A variação da suscetibilidade às toxinas de Bt foi descrita em populações de *Plutella xylostella* (González-Cabrera et al., 2003). Além disso, proteínas entre 65 e 71 kD, como Cry2Aa e Cry2Ac, apresentam toxicidade a lepidópteros e dípteros, enquanto Cry2Ab tem atividade somente contra lepidópteros (Bravo et al., 2004). As proteínas Cry2Aa não possuem os mesmos receptores das proteínas Cry1Aa para alguns lepidópteros (Karim & Dean, 2000).

Tabela 2. Perfis proteicos (kDa) e conteúdo gênico, presentes em estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a lagartas de segundo estágio de *Diatraea saccharalis*.

Estirpe	Conteúdo gênico	Perfil proteico
S602	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa, cry2Ab</i>	130–65
S1258	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa, cry2Ab</i>	130–65
S1264	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa</i>	130
S1287	<i>cry1Ab, cry1Ad, cry1F, cry1G</i>	130
S1289	<i>cry1Ab, cry1Ad, cry2Ab</i>	130–65
S1295	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ad, cry1C, cry1E, cry2Ab</i>	65
S1298	<i>cry1F, cry1G, cry2Ab</i>	130–65
S1301	<i>cry1Ab, cry1F, cry1Ac, cry1D, cry1G, cry2Aa, cry2Ab</i>	130
S1303	<i>cry1Ab, cry1E, cry2Aa</i>	130–65
S1304	<i>cry1Ab, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130–65
S1307	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1B, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130–65
S1664	<i>cry1Aa, cry2Ab</i>	130
S1979	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ad, cry2Aa, cry2Ab</i>	130–65
S2021	<i>cry1Aa, cry1Ad, cry2Ab</i>	130
S2193	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1E, cry1F, cry2Ab</i>	130
S2195	<i>cry1Ab, cry1Ad, cry1E, cry2Aa, cry2Ab</i>	130–65
S1450 ⁽¹⁾	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2Aa, cry1B</i>	130–65

⁽¹⁾Estirpe padrão btk.

Tabela 3. Concentração letal das toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* necessária para matar 50% da população testada (CL₅₀), avaliadas individualmente, contra lagartas de segundo instar de *Diatraea saccharalis*⁽¹⁾.

Toxina pura	CL ₅₀ (ng cm ⁻²)
Cry1Aa (S2211)	610,75 (364,76–1.037,10)a
Cry1Ab (S2010)	222,5 (50,58–681,10)a
Cry1Ac (S2009)	327,56 (186,90–615,83)a
Cry2Aa (S2212)	278,28 (136,32–533,25)a

⁽¹⁾Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pela análise Probit.

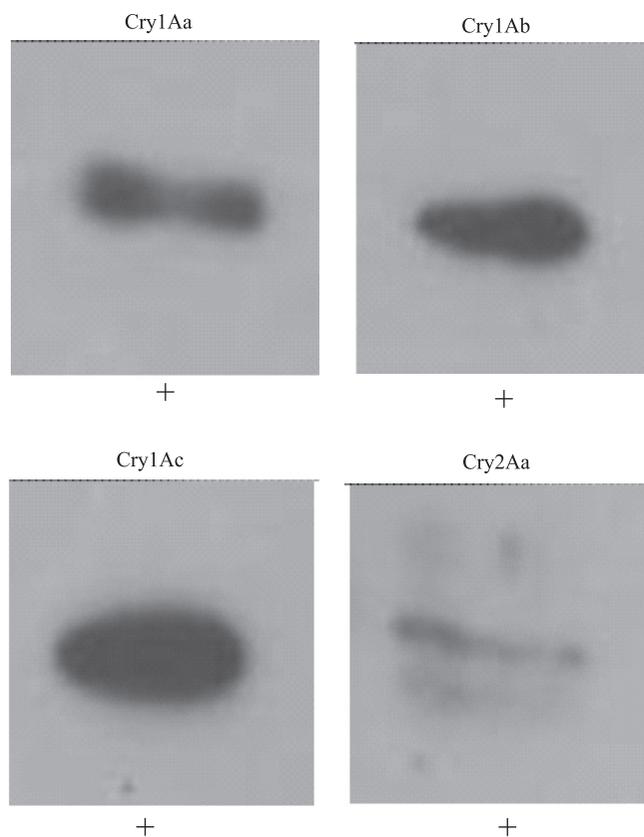


Figura 2. Proteínas ativadas e biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, ligadas aos receptores intestinais de *Diatraea saccharalis*. Os sinais positivos (+) indicam a ligação das proteínas aos receptores.

Conclusões

1. Há interação entre as toxinas de *B. thuringiensis* e seus receptores na broca-do-colmo da cana-de-açúcar.
2. As estirpes de *Bacillus thuringiensis* S602, S1264 e S1301 são eficientes contra lagartas de *Diatraea saccharalis*.
3. As proteínas testadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa se ligam aos receptores de membrana do intestino médio das lagartas de *D. saccharalis*, o que mostra a ação tóxica destas proteínas contra este inseto.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pelo apoio financeiro.

Referências

- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v.177, p.6027-6032, 1995.
- ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PERFEROEN, M.; GÜERECAL, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta/Biomembranes**, v.1667, p.38-46, 2004.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4965-4972, 1998.
- CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.353-356, 1994.
- CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECAL, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3826-3831, 1995.
- FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University, 1971. 333p.
- GITAHY, P. de M.; SOUZA, M.T. de; MONNERAT, R.G.; ARRIGONI, E.B.; BALDANI, J.I. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.531-537, 2007.
- GONZÁLEZ-CABRERA, J.; ESCRICHE, B.; TABASHNIK, B.E.; FERRÉ, J. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, p.929-935, 2003.
- HERNÁNDEZ, C.S.; RODRIGO, A.; FERRÉ, J. Lyophilization of lepidopteran midguts: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.85, p.182-187, 2004.
- HÖFTE, H.; RIE, J. van; JANSSENS, S.; HOUTVEN, A. van; VANDERBRUGGEN, H.; VAECK, M. Monoclonal

- antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2010-2017, 1988.
- IBARRA, J.E.; RINCÓN, M.C. del; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENNINTENE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F. de; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, S.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5269-5274, 2003.
- KARIM, S.; DEAN, D.H. Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. **Current Microbiology**, v.41, p.276-283, 2000.
- KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook of insect rearing**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p.265-270.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LECADET, M.M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.840-849, 1992.
- LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GOMINET, M.; CHAUFAX, J. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. **Nature Biotechnology**, v.13, p.67-71, 1995.
- LÓPEZ-PAZOS, S.A.; ARIAS, A.C.R.; OSPINA, S.A.; CERÓN, J. Activity of *Bacillus thuringiensis* hybrid protein against a lepidopteran and a coleopteran pest. **FEMS Microbiology Letters**, v.302, p.93-98, 2010.
- MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T. de; MARTINS, É.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v.41, p.291-295, 2007.
- MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-200.
- MONNERAT, R.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v.39, p.159-162, 1999.
- PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, p.255-281, 2007.
- PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, É.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G. de S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.11-16, 2004.
- ROSAS-GARCÍA, N.M. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. **Pest Management Science**, v.62, p.855-861, 2006.
- SHARMA, P.; NAIN, V.; LAKHANPAUL, S.; KUMAR, P.A. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with brush border membrane vesicles of maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, p.333-335, 2011.
- THOMAS, W.E.; ELLAR, D.J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **FEBS Letters**, v.154, p.362-368, 1983.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, p.1-16, 2009.
- WOLFERSBERGER, M.G.; LUETHY, P.; MAURER, P.; PARENTI, P.; SACCHI, V.F.; GIORDANA, B.; HANOZET, G.M. Preparation and partial characterization of amino-acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.86, p.301-308, 1987.

Recebido em 24 de abril de 2012 e aprovado em 5 de novembro de 2012