



SELEÇÃO DE LINHAGENS COM ATIVIDADE TÓXICA DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)

*Josiane Aniele Scarpassa*¹; *Fernando Pereira dos Santos*²; *Gabriel Marcos Domingues de Souza*³; *André Rocha Barbosa*³; *Gislayne Trindade Vilas-Bôas*⁴

RESUMO: O uso do bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Aedes aegypti* vem ganhando espaço devido aos benefícios do controle biológico. Neste trabalho foram selecionadas 27 linhagens do banco de bactérias entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina, com o intuito de verificar a eficiência das mesmas na mortalidade de larvas de *A. aegypti*, para isso, foi analisada a presença de genes *cry* codificantes para proteínas Cry ativas sobre insetos da ordem Diptera. Esses dados foram confrontados com os resultados de bioensaios que verificaram a real eficiência dessas linhagens e auxiliaram na seleção de 5 isolados com eficiência de mortalidade a larvas de *A. aegypti*.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus thuringiensis*; Bioensaios; Genes *cry*.

INTRODUÇÃO

O controle profilático da dengue e febre amarela é realizado pela eliminação do vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) que é feito pelo uso de inseticidas químicos. No entanto, esta estratégia leva ao surgimento de populações de mosquitos resistentes, além de não ser específico, apresentando toxicidade para outros animais, ao homem além de prejudicial ao meio ambiente.

Uma alternativa ao uso de inseticidas químicos no controle deste vetor é o uso do controle biológico, com produtos que tem como princípio ativo organismos vivos. A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* vem ganhando espaço como alternativa mais viável no controle de insetos pragas e vetores de doenças por apresentar modo de ação extremamente específico; dificuldade de seleção de insetos resistentes; a inocuidade à natureza e à saúde humana; amplo espectro de ação, decorrente das inúmeras linhagens com especificidades conhecidas.

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica Fundação Araucária. josi_aniele@hotmail.com

² Professor Doutor do Centro de Bioquímica da Universidade Estadual de Londrina e do Centro – UEL e Universitário Filadélfia – UNIFIL, Paraná. fernando.santos@unifil.br

³ Acadêmica do Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas CAPES. g_bradok@hotmail.com

⁴ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. andrecode20@yahoo.com.br

⁵ Orientadora, Professora Doutora do Centro de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Paraná. gtvboas@gmail.com

Esta bactéria tem a capacidade de produzir, durante o processo de esporulação, uma inclusão protéica compostas de proteínas Cry (codificadas por genes *cry*), com atividade tóxica, incluindo atividades citolíticas e hemolíticas, contra larvas de insetos-alvos. Diferentes variedades desta espécie produzem diferentes tipos de cristais que são altamente específicos para diferentes ordens de insetos (Habib e Andrade, 1998).

Em função das características do *B. thuringiensis*, laboratórios do mundo todo têm buscado novos isolados para obtenção de diferentes toxinas e com diferentes perfis de toxicidade, apresentando melhor eficácia em campo incrementando o auxílio em programas de manejo da resistência de insetos. (Monnerat e Bravo, 2000).

O presente trabalho buscou identificar linhagens de *B. thuringiensis* do banco de bactérias da Universidade Estadual de Londrina que apresentam eficiência na mortalidade de larvas de *A. aegypti* verificando a presença de genes que codificam as proteínas Cry ativas sobre insetos da Ordem Diptera. Esses dados foram confrontados com os resultados de bioensaios que verificaram a real eficiência dessas linhagens e auxiliaram na seleção de novos isolados com eficiência de mortalidade a larvas de *A. aegypti*.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho, 27 isolados ambientais de *B. thuringiensis* foram caracterizados por PCR utilizando iniciadores específicos para genes *cry* e *cyt* que codificam para proteínas ativas contra insetos da ordem Diptera (*cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*) conforme descritos por Ibarra *et al.* (2003).

Extração de DNA:

Amostras de DNA genômico de vários isolados de *B. thuringiensis* foram extraídas pelo método de Hansen e Hendriksen, 2001. Os isolados foram cultivados por 15 h em placas contendo meio Luria-Bertani (LB). Com o auxílio de um palito esterilizado, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para microtubos contendo 200 µL de TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA, pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em fervura por 10 min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 12.000 × g por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos, sendo este utilizado para as reações de amplificação por PCR. A linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) foi utilizada como controle positivo para as reações.

Bioensaio:

O método utilizado para os bioensaios foi baseado em Draft, 1999 Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use da OMS, com repetições em dias diferentes. Vinte e cinco larvas de 4º estágio inicial eram transferidas para potes de polietileno circular transparente de 11 cm de diâmetro, 7 cm de profundidade, contendo 150mL de água destilada.

Os bioensaios foram realizados em temperatura ambiente com 3 concentrações diferentes do isolado em teste: 10 ppm; 1 ppm e 0,1ppm, sendo 3 repetições em dias diferentes. Neste teste houve a seleção dos 10 melhores isolados baseado na mortalidade apresentada. Na segunda fase, os 10 isolados selecionados foram bioensaiados nas concentrações de 0,1ppm, 0,06 ppm e 0,05 ppm, também em três repetições, para seleção dos cinco isolados com maior toxicidade para larvas de *A. aegypti*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultado de amplificação para as 27 linhagens selecionadas quanto os genes pesquisados que são específicos contra insetos da ordem Diptera (Fig. 1).

CEPAS	GENES <i>Bacillus thuringiensis</i>					
	cry4 A	cry4 B	Cyt 1	Cyt 2	cry 10 spe	cry 11 geral
BR 06						
BR 07						
BR 12						
BR 14						
BR 18						
BR 26						
BR 27						
BR 33						
BR 34						
BR 35						
BR 36						
BR 37						
BR 38						
BR 40						
BR 41						
BR 42						
BR 44						
BR 46						
BR 53						
BR 58						
BR 64						
BR 65						
BR 78						
BR 79						
BR 83						
BR 87						
BR 136						
Bti						

Figura 1 – Perfil de amplificação das linhagens de *B. thuringiensis* com diferentes primers para gene *cry4A* *cry4B* *cry10* e *cry11*. (Células vermelhas positivo e células amarelas negativo quanto a presença do gene).

Testes de bioensaios seletivos, mata não mata foi aplicado para as linhagens selecionadas, 10 (37,04%) causaram 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti* nas concentrações de 1 e 0,1 ppm. Estes 10 isolados foram submetidos a um segundo teste de bioensaio seletivo, onde houve a redução de concentração para 0,06 e 0,05 ppm. A partir deste segundo teste, selecionou-se cinco isolados que apresentaram uma mortalidade de 100% sobre as larvas de *A. aegypti*, que foram as linhagens; Br 14, Br 26, Br 36, Br 46 e Br 64 sendo estas submetidos aos testes de bioensaios quantitativos para cálculo da CL₅₀ e CL₉₅.

As 5 linhagens mencionadas anteriormente que apresentaram maior toxicidade foram submetidas a avaliação com o cálculo da CL₅₀ e CL₉₅. Para todos os bioensaios realizados, foi utilizada a linhagem Bti (IPS 82), na forma liofilizada, como controle positivo, sendo os resultados de 100% de mortalidade em todos os bioensaios realizados.

Os resultados para a CL₅₀ e CL₉₅ obtidos a partir dos experimentos de determinação de doses letais à temperatura ambiente, mostraram que as cinco linhagens selecionadas tiveram toxicidade superior ao IPS 82, sendo para a CL₅₀ significativa pelo teste de Probit, significância esta não observada aos valores da CL₉₅.

Com a análise dos resultados, observou-se que as linhagens apresentaram valores de mortalidades semelhantes, mesmo quando comparadas com a linhagem padrão (IPS 82), o que permite inferir que as mesmas correspondem a linhagens de Bacilos que apresentam os genes *cry* e *cyt*, genes presentes na linhagem *Bacillus thuringiensis israelensis*. Todos os isolados caracterizados geneticamente apresentaram todos os genes, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* e *cyt2* (Fig 1), sendo estes ativos contra insetos da Ordem Diptera. Este complexo gênico pode explicar a elevada eficiência apresentada pelos isolados testados.

A ação letal determinada para os cinco isolados estudados caracteriza-os como promissores para serem utilizados como princípio ativo de bioinseticida para o controle de *A. aegypti*, já que os resultados de toxicidade obtidos em bioensaios são comparativos aos encontrados para o IPS 82, base para a síntese dos produtos comerciais.

CONCLUSÃO

A associação da análise do conteúdo de genes *cry* codificantes para proteínas ativas contra insetos específicos da ordem Diptera de linhagens do Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina com os bioensaios das mesmas contra larvas de *A. aegypti* permitiu, a seleção de cinco isolados (Br 14, Br 26, Br 36, Br 46, Br 64) de *B. thuringiensis*, altamente tóxicos contra essas larvas.

Os outros isolados que não apresentaram atividade ou apresentaram pouca efetividade, serão analisadas para outros genes *cry*, pois podem ser eficientes para o controle de outros grupos de insetos.

Assim este trabalho identificou novas linhagens com potencial uso em campo bem como identificou genes que possam ser empregados para uso em plantas transgênicas resistentes a insetos entre outras aplicações em programas de manejo integrado de pragas.

REFERÊNCIAS

HABIB, M.E.M; ANDRADE, C.F.S. 1998. Bactérias Entomopatogênicas. In ALVES, S. B. (Ed). **Controle Microbiano de Insetos**. FEALQ, Piracicaba, SP. pp 383-446.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Appl. **Environ. Microbiol.**, v. 67, p.185–189, 2001.

IBARRA, J.E.; et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**. V.60, n9, p5269-5274, 2003.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.): **Controle biológico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000**. p.163-200.

World Health Organization, DRAFT, 1999 Guideline Specifications for Bacterial Larvicides for Public Health Use. Geneva:, p.37 **Report of the Informal Consultation**.