

Application of PCR and culture filtrate toxicity assay to determine potential insecticide activity of *Bacillus thuringiensis* Vip-proteins

Zastosowanie techniki PCR oraz testów aktywności owadobójczej przesączy pochodowlanych do określenia potencjalnej toksyczności białek Vip *Bacillus thuringiensis*

Jakub Baranek, Edyta Konecka, Adam Kaznowski

Summary

By using PCR reactions we assessed the abundance of *vip3A* gene in the genomes of 10 *Bacillus thuringiensis* strains. We estimated Vip toxin activity by adding bacterial culture filtrates into the diet given to *Spodoptera exigua* caterpillars. Nine of ten filtrates caused death among larvae, and the mortality varied between 12 and 100%. The method used in this study allows fast identification of strains producing Vip-proteins and preliminary evaluation of their insecticidal activity.

Key words: insecticidal activity, *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera exigua*, Vip toxins

Streszczenie

Techniką PCR określono występowanie genu *vip3A* w genomach 10 szczepów *Bacillus thuringiensis*. Aktywność toksyn Vip oznaczono w przesączach pochodowlanych, które dodawano do pożywki dla larw *Spodoptera exigua*. Dziewięć na dziesięć filtratów wykazało aktywność insektycydową, a odsetek martwych larw owadów wynosił 12–100%. Zastosowana metoda pozwala szybko określić, które szczepy bakteryjne wytwarzają białka Vip oraz wstępnie ocenić ich aktywność owadobójczą.

Słowa kluczowe: *Bacillus thuringiensis*, aktywność owadobójcza, *Spodoptera exigua*, toksyny Vip

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii, Zakład Mikrobiologii
Umultowska 89, 61-614 Poznań
akazn@amu.edu.pl

Wstęp / Introduction

Bakterie *Bacillus thuringiensis* to chemoorgano-heterotroficzne laseczki powszechnie występujące w środowisku. Drobnoustroje te wytwarzają czynniki o właściwościach owadobójczych. W czasie wegetatywnej fazy wzrostu produkują białka insektycydowe Vip, β -egzotoksynę, chitynazę i fosfolipazę C. W trakcie sporulacji wytwarzane są białka Cry i Cyt w formie kryształów. Najwyższą aktywność względem owadów wykazują białka Cry oraz Vip (Schnepf i wsp. 1998). Odkryto do tej pory 63 grupy białek Cry i Vip o zróżnicowanej aktywności i spektrum działania na owady (Konecka i wsp. 2011; Crickmore i wsp. 2012).

Spory i toksyny Cry i Cyt zawarte w kryształach białkowych *B. thuringiensis* są wykorzystywane do produkcji biologicznych środków ochrony roślin. Biologiczne preparaty owadobójcze są alternatywą dla powszechnie stosowanych pestycydów, które są niewybiórcze i zabijają organizmy nie będące celem zabiegu (Sierpińska 1997). Ponadto, mają długi okres półtrwania i mogą być rozprzestrzeniane na dalekie odległości poza obszar zabiegu agrotechnicznego, np. wraz z płynącymi wodami powierzchniowymi i gruntowymi (Sierpińska 2000). Preparaty takie kumulowane są w tkankach zwierząt, także u człowieka (Singh i Singh 2008) przez co mogą stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia (Bonilla i wsp. 2008; Proskocil i wsp. 2008). W porównaniu do środków chemicznych bioinsektycydy oparte na *B. thuringiensis* są bezpieczne dla organizmów niebędących celem zabiegu, gdyż działają w sposób selektywny, a toksyny owadobójcze nie są kumulowane w środowisku i tkankach zwierząt. Ponadto, nie wykazują negatywnej aktywności w stosunku do kręgowców (Betz i wsp. 2000; Wang i wsp. 2008).

Do tej pory wobec wielu ważnych ekonomicznie szkodników nie opracowano skutecznych środków opartych na czynnikach owadobójczych *B. thuringiensis*. Poza tym niektóre gatunki owadów wykształciły oporność na białka Cry. Niewrażliwość na jeden rodzaj białek krystalicznych często oznacza oporność na całą grupę tych toksyn (Schnepf i wsp. 1998; Sierpińska 2000). Poszukuje się czynników, które zwiększyłyby spektrum aktywności owadobójczej i stanowiłyby element strategii zapobiegającej występowaniu oporności na środki owadobójcze oparte na czynnikach *B. thuringiensis*. Takimi czynnikami mogą być białka Vip, ich mechanizm działania jest zbliżony do toksyn Cry (Konecka i wsp. 2011), jednak oddziałują one z innymi receptorami komórek nabłonka

jelitowego i dlatego owady odporne na białka krystaliczne mogą być wrażliwe na toksyny Vip (Lee i wsp. 2003). Wykazano ponad 300-krotnie wyższą aktywność toksyn Vip wobec niektórych owadów w porównaniu z białkami Cry (Milne i wsp. 2008).

Celem badań było zastosowanie strategii identyfikacji szczepów o najwyższej aktywności toksyn Vip, dzięki której szybko i niskim nakładem kosztów można ocenić przydatność tych białek w opracowaniu nowych preparatów insektycydowych.

Materiały i metody / Materials and methods

Szczepy bakteryjne

Badania przeprowadzono na 9 izolatach *B. thuringiensis* pochodzących z kolekcji bakterii Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu. Ponadto, użyto w analizach referencyjny szczep *B. thuringiensis* HD1 podgatunek *kurstaki*.

Identyfikacja szczepów z genami *vip3A*

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) szczepów *B. thuringiensis* wyizolowano metodą gotowanych lizatów (Brousseau i wsp. 1993). Występowanie sekwencji charakterystycznych dla genu *vip3A* w genomach izolatów określono w reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) przy zastosowaniu dwóch zestawów starterów zaprojektowanych przez Fanga i wsp. (2007) (tab. 1).

Amplifikację prowadzono w następujących warunkach: wstępna denaturacja 95°C (5 min), 34 cykle: denaturacja 95°C (1 min), przyłączenie starterów 50°C w przypadku starterów FAfor i FArev lub 56°C w przypadku starterów FAXfor i FAXrev (1 min), elongacja 72°C (50 s). Reakcję PCR kończono elongacją w 72°C przez 8 min. Amplifikację DNA wykonano w mieszaninie reakcyjnej zawierającej: 1 μ l matrycy DNA, 1 μ l 5mM trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP), 15 pmoli odpowiednich par starterów, 1,5 μ l 25mM MgCl₂, 2,5 μ l buforu reakcyjnego (10 \times); 1 U polimerazy HiFiTaq (Novazym) i demineralizowanej sterylnej wody uzupełnionej do objętości 25 μ l. Rozdział elektroforetyczny zamplifikowanych fragmentów przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym (Basica LE GQT, Prona) przy napięciu 160V przez 1,5 godziny. Do określenia masy cząsteczkowej powielonych produktów PCR wykorzystano marker DNA Mass-Ruler (Fermentas).

Tabela 1. Startery wykorzystane w reakcji PCR do amplifikacji fragmentu genu *vip3A* w DNA szczepów *B. thuringiensis*

Table 1. Primers used in PCR to amplify *vip3A* gene fragments in *B. thuringiensis* isolates

Nazwa startera Primer designation	Sekwencja startera Primer sequence	Pozycja amplifikowanego fragmentu w genie <i>vip3A</i> Position of amplified fragment in <i>vip3A</i> gene	Wielkość produktu (par zasad) Product size (base pairs)
FAfor	5' TTATTTAATGGCATTATGGATTGCC 3'	54 do 498	444
FArev	5' GCAGGTGTAATTTAGTAAGTGTAGAG 3'		
FAXfor	5' CTTCTGAAAAGTTATTAAGTCCAGAAT 3'	2006 do 2370	364
FAXrev	5' TTAATAATAGAGACATCGTAAAAA 3'		

Określenie aktywności insektydowej przesączy pohodowlanych

Hodowlę bakterii prowadzono na podłożu z wyciągiem sercowo-mózgowym (BHI, bioMerieux) z dodatkiem 1,4% agaru. Po 20-godzinnej inkubacji w 30°C zbierano kolonie bakteryjne i zawieszono w 0,85% NaCl do wartości OD₄₂₀ 0,3. Następnie 0,5 ml zawiesiny dodawano do 75 ml bulionu Terrific (trypton 12 g, wyciąg drożdżowy 24 g, K₂HPO₄ 9,4 g, KH₂PO₄ 2,2 g, glicerol 4 ml, H₂O do 1000 ml) i inkubowano w 30°C z wytrząsaniem 150 rpm przez 24 godziny. Po zwirowaniu hodowli (12 500 rpm, 30 min, 4°C), pożywkę sączone przez filtry z polifluorku winylidenu (PVDF) o średnicy porów 0,22 µm (Roth).

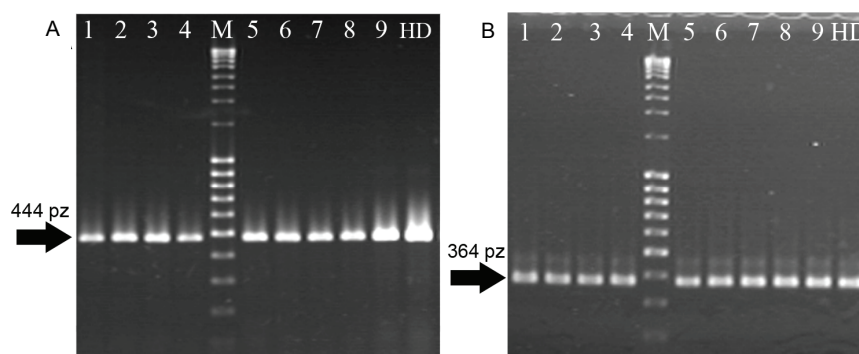
Aktywność insektydową przesączy pohodowlanych określano na larwach światłolówki naziemnicy *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Hodowlę owadów prowadzono w 26°C, przy względnej wilgotności powietrza 40–60% i fotoperiodzie 18:6 (dzień: noc). Cykl życiowy owadów trwa około 5–6 tygodni. Larwy karmiono półsyntetyczną pożywką (Poitout i Bues 1970), a imago dokarmiano rozcieńczonym miodem wielokwiatowym.

W celu określenia aktywności owadobójczej bakterii do pożywki dla larw w stadium L2–L3 dodawano przesączy pohodowlane w objętości 100 µl. Liczbę martwych owadów notowano co 24 godziny przez 8 dni. W próbie kontrolnej zamiast przesączu pohodowlanego podawano owadom jałowe podłoże Terrific.

Do określenia aktywności insektydowej filtratu pohodowlanego każdego szczepu użyto 30 larw. Aktywność owadobójczą wszystkich szczepów określono w trzech powtórzeniach.

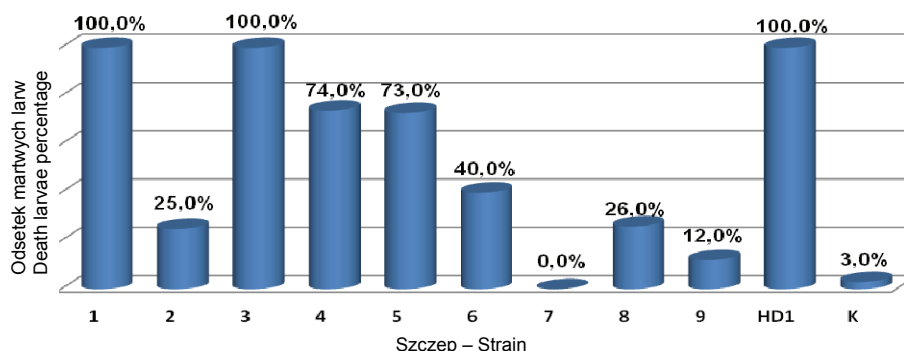
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W reakcji PCR dla wszystkich szczepów uzyskano amplikony o wielkościach 364 i 444 pz, charakterystycznych dla genu *vip3A* (rys. 1). Identyczne produkty uzyskano dla kontroli pozytywnej, którą stanowił szczep *B. thuringiensis* HD1 podgatunek *kurstaki*, w którego genomie występuje gen *vip3A* (Donovan i wsp. 2001).



Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział produktów amplifikacji genów z grupy *vip3A*. Powielano fragmenty genu od pozycji 54 do 498 (A) oraz 2006 do 2370 (B). Poszczególne ścieżki odpowiadają kolejnym szczepom. M – wzorec mas MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas)

Fig. 1. Electrophoretic division of *vip3A* gene amplification products. Amplification was performed with gene fragment from position 54 to 498 (A) and 2006 to 2370 (B). Specific paths are corresponding to successive strains. M – mass standard MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas)



Rys. 2. Średnia śmiertelność larw *S. exigua* w teście aktywności owadobójczej filtratów pohodowlanych. HD1 – szczep referencyjny *B. thuringiensis* HD1 podgatunek *kurstaki*; K – próba kontrolna

Fig. 2. Average mortality of *S. exigua* larvae in insecticidal activity assessment of culture filtrates. HD1 – reference strain *B. thuringiensis* HD1 subspecies *kurstaki*; K – control

Przesącze pochodowlane otrzymane z badanych izolatów wykazały duże zróżnicowanie aktywności insektycydowej. Filtrat jednego ze szczepów nie wykazał żadnego działania toksycznego wobec larw *S. exigua*. Dla pozostałych 9 śmiertelność wahała się od 12 do 100% (rys. 2).

Chociaż w reakcji PCR zidentyfikowano fragmenty genu *vip3A* w genomach wszystkich szczepów to testy aktywności owadobójczej wykazały znaczne różnice aktywności insektycydowej toksyn wydzielanych przez te bakterie do podłoża hodowlanego. Przyczyną tych różnic może być polimorfizm sekwencji aminokwasowej białek Vip odzwierciedlający różnorodność genów kodujących ich syntezę. Aktywność insektycydowa przesączy może także wynikać ze zróżnicowanego poziomu ekspresji genów *vip* lub sekrecji białek Vip poza komórkę. Możliwe jest także, że niektóre szczepy wydzielają do pożywki także inne czynniki szkodliwe dla owadów, które wspomagają działanie białek Vip. Wyniki niniejszej pracy wykazały, że identyfikacja izolatów bakteryjnych produ-

kujących aktywne toksyny powinna opierać się zarówno na wynikach PCR, jak i testów aktywności owadobójczej przesączy pochodowlanych.

Wnioski / Conclusions

1. Zastosowanie reakcji PCR i testów aktywności owadobójczej przesączy pochodowlanych stanowi dobrą strategię we wstępnej ocenie toksyczności białek Vip poszczególnych szczepów *B. thuringiensis*.
2. Przy wykorzystaniu tej metody można szybko ocenić spektrum aktywności owadobójczej.
3. Opisana strategia badawcza pozwala wytypować szczepy do dalszych badań mających na celu opracowanie nowych bioinsektycydów.

Praca naukowa finansowana z grantu GDWB-01/2011.

Literatura / References

- Betz F., Hammond B., Fuchs R. 2000. Safety advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32 (2): 156–173.
- Bonilla E., Hernández F., Cortés L., Mendoza M., Mejía J., Carrillo E., Casas E., Betancourt M. 2008. Effects of the insecticides malathion and diazinon on the early oogenesis in mice in vitro. Wiley Periodicals, Inc. Environ. Toxicol. 23 (2): 240–245.
- Brousseau R., Saint-Onge A., Prefontaine G., Masson L., Cabana J. 1993. Arbitrary primer Polymerase Chain Reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strain. Appl. Environ. Microbiol. 59 (1): 114–119.
- Crickmore N., Zeigler D., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A., Dean D. 2012. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/, dostęp: 30.03.2012.
- Donovan W., Donovan J., Engleman J. 2001. Gene knockout demonstrates that *vip3A* contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. J. Invertebr. Pathol. 78 (1): 45–51.
- Fang J., Xu X., Wang P., Zhao J.-Z., Shelton A., Cheng J., Feng M., Shen Z. 2007. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. Appl. Environ. Microbiol. 73 (3): 956–961.
- Konecka E., Kaznowski A., Baranek J. 2011. Wykorzystanie bakterii *Bacillus thuringiensis* do produkcji bioinsektycydów. Post. Mikrobiol. 50 (4): 303–311.
- Lee M., Walters F., Hart H., Palekar N., Chen J.-S. 2003. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 69 (8): 4648–4657.
- Milne R., Liu Y., Gauthier D., van Frankenhuyzen K. 2008. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). J. Invertebr. Pathol. 99 (2): 166–172.
- Poitout S., Bues R. 1970. Élevage de plusieurs espèces de Lépidoptères *Noctuidae* sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. Ann. Zool. Écol. Anim. 1: 79–95.
- Proskocil B., Bruun D., Lorton J., Blensly K., Jacoby D., Lein P., Fryer A. 2008. Antigen sensitization influences organophosphorus pesticide – induced airway hyperreactivity. Environ. Health Persp. 116 (3): 381–388.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D., Dean D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3): 775–806.
- Sierpińska A. 1997. *Bacillus thuringiensis* – stan obecny i perspektywy wykorzystania w ograniczeniu liczebności owadów liściożernych. Sylwan 141 (9): 63–70.
- Sierpińska A. 2000. *Bacillus thuringiensis* w ochronie lasu – alternatywa dla insektycydów chemicznych. Prac. Inst. Bad. Leś. A, 2 (899): 71–99.
- Singh P.B., Singh V. 2008. Pesticide bioaccumulation and plasma sex steroids in fishes during breeding phase from north India. Environ. Toxicol. Pharmacol. 25 (3): 342–350.
- Wang G., Zhang J., Song F., Gu A., Uwais A., Shao T., Huang D. 2008. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting nontarget species in the field. J. Appl. Microbiol. 105 (5): 1536–1543.