

Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Distribution of *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of the State of Rio Grande do Sul, Brazil

Laura Massochin Nunes Pinto¹ Lidia Mariana Fiuza²

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) caracteriza-se pela produção de proteínas tóxicas a representantes de diversas ordens de insetos, as quais são codificadas por genes *cry*. Devido a esta característica, mais de 40.000 cepas de Bt foram isoladas e cerca de 190 genes *cry*, caracterizados. Como os dados sobre Bt são limitados no Rio Grande do Sul, essa pesquisa objetivou avaliar a distribuição de seis famílias de genes *cry* de Bt, desse estado, que codificam proteínas ativas contra insetos-praga. O perfil dos 46 isolados de solos do Rio Grande do Sul foi avaliado, por PCR com os primers que detectam os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7*, *cry8* e *cry9* e suas respectivas proteínas foram analisadas por SDS-PAGE a 10%. A presença de genes *cry9* foi detectada em 47,82% dos isolados, seguido de *cry3* (15,21%), *cry1* e *cry7* (ambos com 6,52%) e *cry2* (2,17%). Oito perfis genéticos foram identificados, sendo o perfil *cry9* (39,13%) o mais freqüente. A análise protéica de Bt identificou 14 famílias de proteínas Cry possivelmente codificadas por genes presentes nos isolados, além de proteínas desconhecidas que podem caracterizar novos genes *cry*. Esses isolados revelam a presença de genes que codificam proteínas específicas contra lepidópteros e coleópteros, as quais poderão ser avaliadas quanto à toxicidade *in vivo* contra insetos-praga das plantas cultivadas.

Palavras-chave: controle biológico, entomopatógenos, bactérias, PCR.

ABSTRACT

The *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacterium is characterized by the production of toxic protein to representatives of several insect orders, which are coded by *cry* genes. Due to this characteristic, more than 40.000 Bt strains were isolated and around 190 *cry* genes characterized. As the data on Bt are limited in Rio Grande do Sul, this research aimed the evaluation of the distribution of six Bt

families of *cry* genes, in this state, that codify active proteins against insect-pest. The 46 isolates profiles of soil samples from Rio Grande do Sul were evaluated, by PCR with primers that detect *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7*, *cry8* and *cry9* genes, and its respective proteins were analyzed by SDS-PAGE 10%. The presence of *cry9* genes were detected in 47.82% of the isolates, followed by *cry3* (15.21%), *cry1* and *cry7* (both with 6.52%) and *cry2* (2.17%). Eight genetic profiles were identified, being the profile *cry9* (39.13%) the most frequent one. The Bt proteic analysis identified 14 families of Cry protein that are possibly coded by the genes in these isolates, besides the unknown proteins that can characterize new *cry* genes. These isolates reveal the presence of genes that codify specific proteins against lepidopterans and coleopterans, which can be evaluated for its *in vivo* toxicity against insect-pest of the cultivated plants.

Key words: biological control, entomopathogen, bacterial, PCR.

INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental, incluindo pesticidas na agricultura, tem aumentado a cada ano (SINDAG, 2002), o que tem levado à busca de novas alternativas para o controle de insetos. Nesse contexto, os patógenos, predadores e parasitóides representam ferramenta importante no controle de pragas (ATLAS & BARTHA, 1998).

Bacillus thuringiensis (Bt) é um agente de controle microbiano, cuja principal característica é a produção de cristais inseticidas durante sua esporulação. Estes cristais consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, denominados *cry*,

¹Biólogo, Mestre, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), Laboratório de Microbiologia, Centro 2. CP 275, 93001-970, São Leopoldo-RS. Fone: (51) 590 3333. Ramal 1213. Fax: (51) 590 8122. E-mail: lau@pro.via-rs.com.br. Autor para correspondência.

²Engenheiro Agrônomo, PhD., UNISINOS e EEA/Instituto do Riograndense do Arroz.

os quais conferem ação tóxica de *Bt* a insetos de diversas ordens, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Mais de 40.000 cepas de *Bt* foram isoladas e cerca de 190 genes *cry* caracterizados. (http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). As propriedades entomopatogênicas desta bactéria têm impulsionado pesquisas para selecionar isolados de *Bt* com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos (SCHNEPF et al., 1998). A busca de genes que sintetizam proteínas inseticidas de *Bt* tem sido feita pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), técnica molecular valiosa para a predição da atividade inseticida de novos isolados.

Essa pesquisa objetivou detectar e avaliar a distribuição de seis famílias de genes *cry* de *Bt*, já conhecidos como específicos às ordens Lepidoptera (*cry1*, *cry2* e *cry9*) e Coleoptera (*cry3*, *cry7* e *cry8*) a partir de amostras de solos do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

As cepas *Bt tenebrionis cry3A* e *Bt aizawai HA3*, utilizadas como controle positivo, foram fornecidas pelo Instituto Pasteur (França) e os demais 46 isolados de *Bt* utilizados foram obtidos de 29 amostras de solos de áreas cultivadas com arroz irrigado, em dez municípios do Rio Grande do Sul, de julho a novembro de 1999 (ANTONIO et al., 2001).

Preparo das amostras e PCR

Os isolados de *Bt* foram cultivados em Ágar Nutriente, durante 12 horas, a 30°C, e foi realizada a extração de DNA total (HANSEN & HENDRIKSEN, 2001). Os seis pares de *primers* utilizados, visando à detecção de genes *cry1*, *cry2*, *cry9* (específicos para lepidópteros) e *cry3*, *cry7*, *cry8* (específicos para coleópteros), foram descritos por BEN-DOV et al. (1997, 1999) e BRAVO et al. (1998). A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos de reação cada. As reações foram realizadas em volumes de 25µL que consistiam em 1µL de amostra de DNA com o tampão de reação, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 a 0,5 µM de cada primer e 0,5U de *Taq* DNA polymerase (GIBCO-BRL). As amostras foram desnaturadas durante um minuto a 94°C, aneladas aos primers por 40-50s a 60°C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 50-90s a 72°C. Como controle positivo, os experimentos foram associados a amostras de *Bt* caracterizadas molecularmente e um controle negativo, sem adição de DNA. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1 e 1,5%.

Análise protéica por SDS-PAGE

A composição do complexo esporo-cristal foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida de sódio dodecyl sulfato a 10%. Uma alíquota bacteriana, crescida em Ágar Nutriente, foi cultivada em meio LB por 48h, para cada isolado. As amostras foram preparadas com 15µL das suspensões bacterianas, 0,125M Tris-Cl pH6,8, 4% SDS, 20% Glicerol, 10% Mercaptoetanol e 0,1% *Bromofenol Blue*, aquecidas a 100°C por 10 min e centrifugadas 10.000 rpm por 30s. O SDS-PAGE foi realizado de acordo com o método descrito por LAEMMLI (1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de PCR revelaram ampliações de fragmentos de DNA semelhantes aos controles positivos para genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7* e *cry9*, mas os genes *cry8* não foram detectados (Figura 1). Os isolados contendo genes *cry9* foram mais abundantes, representando 47,82% dos isolados analisados, seguido de *cry3* (15,21%), *cry1* e *cry7* (ambos com 6,52%) e *cry2* (2,17%).

Os isolados que não foram amplificados por PCR com nenhum dos seis pares de *primers* de genes *cry*, mas identificados por microscopia com inclusões cristalinas, totalizaram 36,95% das amostras. Isto sugere a presença de isolados de *B. thuringiensis* com genes não identificados pelos *primers* ou novos genes *cry* ainda não caracterizados.

A freqüência de genes *cry9*, encontrada neste trabalho, difere dos resultados de BRAVO et al. (1998) que encontraram apenas, 2,60% dos isolados com esse gene e também da freqüência de 10,20% de BEN-DOV et al. (1997). Os genes *cry1* foram encontrados em apenas 6,52% dos isolados, diferindo de BRAVO et al. (1998), que relataram a presença do mesmo em 49,50% das amostras de *B. thuringiensis*. Os genes *cry3* tiveram a segunda maior freqüência, de forma semelhante aos resultados de BRAVO et al. (1998), que encontraram 21,70% destes genes nos isolados analisados. Mas BEN-DOV et al. (1997) não identificaram esses genes. A distribuição de genes *cry* no Rio Grande do Sul, comparada a outras regiões geográficas, revelou diferenças que podem estar associadas a fatores abióticos, como características físico-químicas do solo, as quais não foram avaliadas nessas pesquisas.

A maioria dos isolados de *Bt* apresenta diversos genes *cry* em diferentes combinações. Neste trabalho, foi analisado o perfil genético e protéico dos isolados. O perfil genético foi avaliado quanto à distribuição dos genes *cry* entre os isolados. A tabela 1

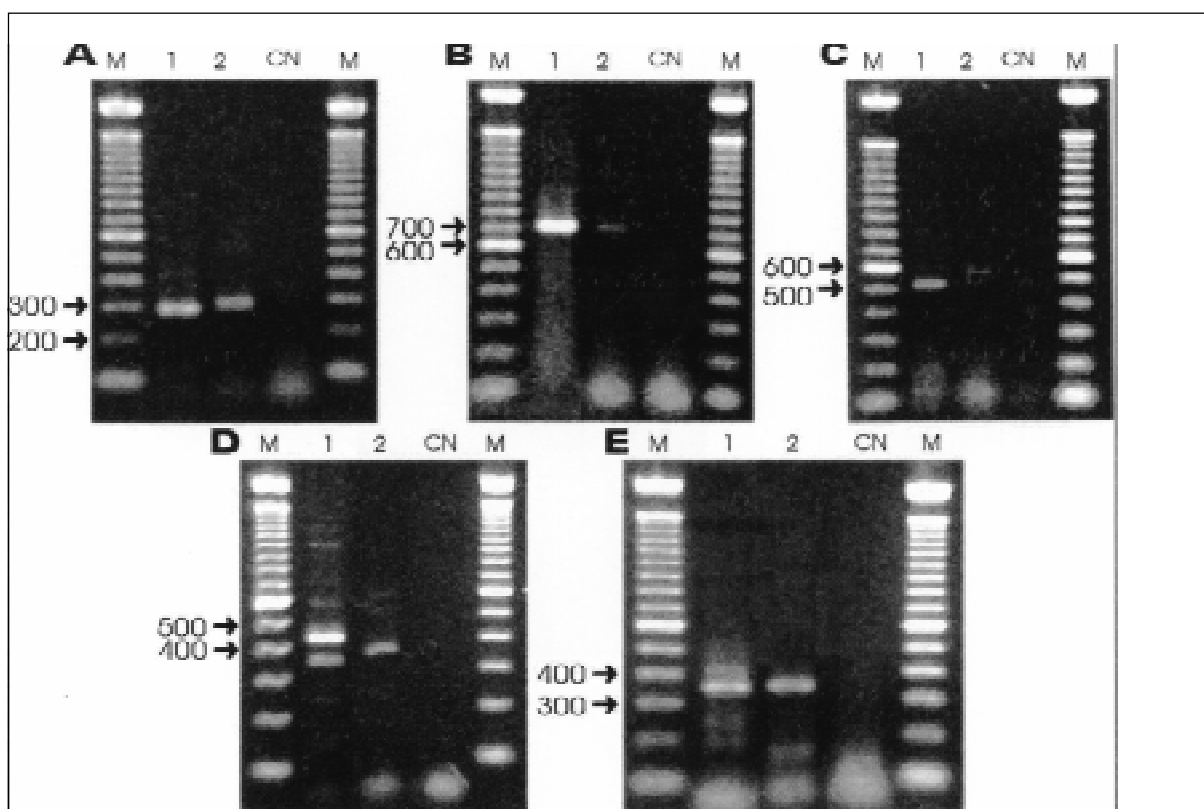


Figura 1 - Géis de agarose (1-1,5%) de produtos amplificados por PCR. (M) Marcador de Peso Molecular 100bp (Gibco BRL); (CN) Controle Negativo. Produtos amplificados de genes (A) *cry1*; A1: *Bt aizawai* HA3; A2: 2023-10. (B) *cry2*; canaletas B1: *Bt aizawai* HA3; B2: 2023-10. (C) *cry3*; C1: *Bt tenebrionis* Cry3A; C2: 2017-9. (D) *cry7*; D1: *Bt aizawai* HA3; D2: 1489-3. (E) *cry9*; E1: *Bt aizawai* HA3; E2: 3420-12.

mostra os oito perfis genéticos obtidos e sua frequência entre os 46 isolados analisados. A ocorrência dos genes *cry9* foi observada como o perfil único em 39,13% dos isolados e também associada à presença dos demais genes *cry* detectados. Entretanto,

Tabela 1 - Composição e frequência dos perfis de genes *cry* presentes nos isolados de *Bacillus thuringiensis*, provenientes de solos cultivados com arroz do estado do Rio Grande do Sul.

Número de isolados	Genes	% de detecção
18	<i>cry9</i>	39,13
17	Não amplificaram	36,95
4	<i>cry3</i>	8,70
2	<i>cry9, cry3</i>	4,35
1	<i>cry9, cry7</i>	2,17
1	<i>cry3, cry1</i>	2,17
1	<i>cry1, cry7</i>	2,17
1	<i>cry9, cry1, cry2</i>	2,17
1	<i>cry7</i>	2,17

os genes *cry1* e *cry2* foram encontrados somente em perfis associados com outros genes, sem ocorrência isolada.

A análise protéica por SDS-PAGE dos isolados de *Bt* mostrou perfis altamente variáveis, com a identificação de 14 classes de proteínas Cry que possivelmente sejam codificadas pelos isolados analisados (Tabela 2), através de comparações entre os pesos moleculares obtidos e os pesos conhecidos para as proteínas Cry.

Diversas outras proteínas que não correspondem às proteínas Cry já conhecidas (SCHNEPF et al., 1998) foram encontradas, o que pode representar novos genes *cry* ainda não conhecidos. Além disso, quatro isolados apresentaram várias bandas pequenas com baixo peso molecular, que pode ser devido à degradação das proteínas do cristal de *Bt* (OHBA et al., 1987).

Os isolados de *Bt* de solos do Rio Grande do Sul apresentaram grande diversidade de genes *cry*, com cinco famílias identificadas molecularmente, além

Tabela 2 - Classes de proteínas Cry identificadas nos isolados de *Bacillus thuringiensis*, provenientes de solos cultivados com arroz do estado do Rio Grande do Sul.

Peso molecular (~kDa)*	Classe	Nº de isolados	Peso molecular (~kDa)*	Classe	Nº de isolados
130-140	Cry1	2	72-84	Cry11	3
70-71	Cry2	1	88	Cry13	1
128-135	Cry4	2	38	Cry15	1
135-152	Cry5	1	76-79	Cry18	3
129-130	Cry7	2	75-78	Cry19	1
130-134	Cry8	2	86	Cry20	8
78	Cry10	1	79	Cry22	3

* kiloDaltons.

da caracterização de proteínas que indicam a presença de novos perfis genéticos e protéicos dessa bactéria.

AGRADECIMENTOS

À UNISINOS, ao Instituto Riograndense do Arroz e à FAPERGS, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIO, A.C. et al. Levantamento de bactérias entomopatogênicas em amostras de solos de áreas orizícolas do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 2 e REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 24, 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, RS: Instituto Rio Grandense do Arroz, 2001. p.255.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4 ed. Redwood: Cummings Science, 1998. 694p.

BEN-DOV, E. et al. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.63, p.4883-4890, 1997.

BEN-DOV, E. et al. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.65, p.3714-3716, 1999.

BRAVO, A. et al. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.64, p.4965-4972, 1998.

HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v.67, p.185-189, 2001.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington DC, v.53, p.242-255, 1989.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

OHBA, M.; YU, Y.M.; AIZAWA, K. Non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis* producing parasporal inclusions with unusual protein components. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.5, p.29-32, 1987.

SINDAG - Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola. **Estatísticas do setor de defensivos agrícolas**. Capturado em 13 jun. 2002. Online. Disponível na Internet: <http://www.sindag.com.br/html/estatistica.html>.

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