



Ciência Rural

ISSN: 0103-8478

cienciarural@mail.ufsm.br

Universidade Federal de Santa Maria

Brasil

Pinto Massochin Nunes, Laura; Fiúza, Lidia Mariana

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

Ciência Rural, vol. 33, núm. 4, julho-agosto, 2003, pp. 699-702

Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33133418>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

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 Fiúza²

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 frequente. 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 25 µL que consistiam em 1 µL 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 15 µL 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 amplificações 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

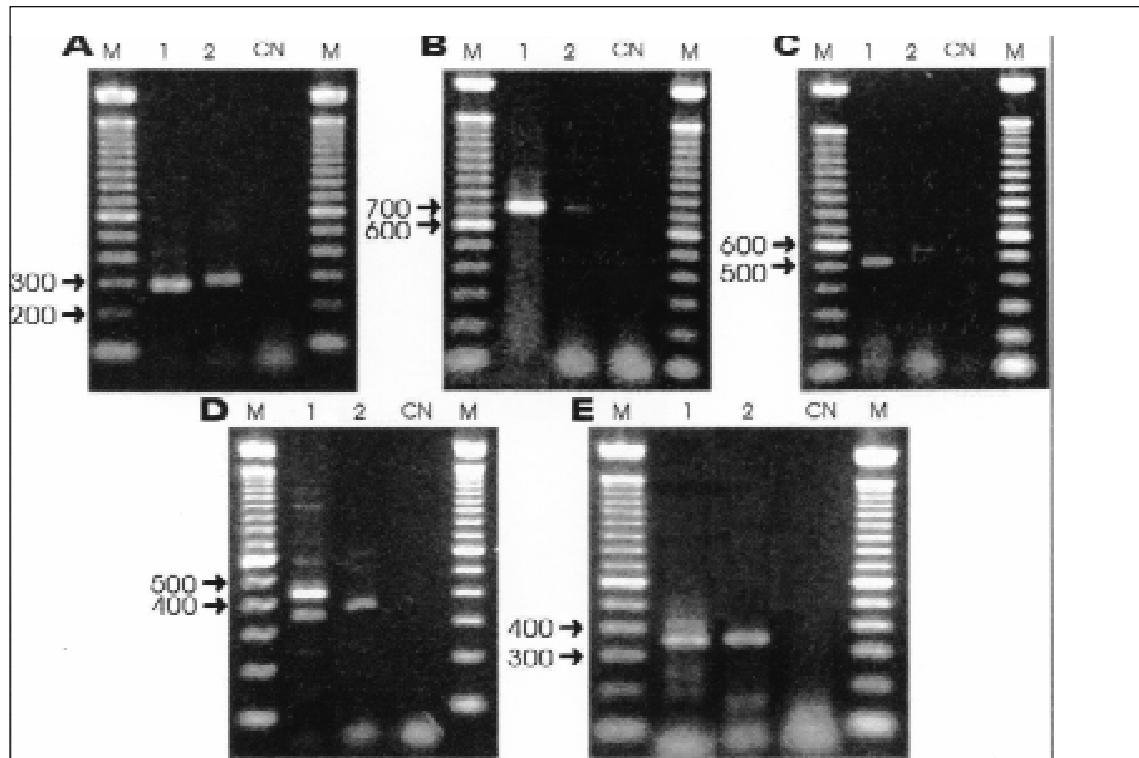


Figura 1 - Géis de agarose (1-1,5%) de produtos amplificados por PCR. (M) Marcador de Peso Molecular 100bp (Gibco BRL); (CN) Controle Negativo. Produtos amplificados de genes (A) *cry1*; A1: *Bt aizawai HA3*; A2: 2023-10. (B) *cry2*; canaletas B1: *Bt aizawai HA3*; B2: 2023-10. (C) *cry3*; C1: *Bt tenebrionis 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 freqüência 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 freqüência 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 enterotoxic *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.