

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* POR MEIO DE GENES *cyt***

MARIA LUCÍLIA MACHADO DA COSTA<sup>1</sup>, FERNANDO HERCOS VALICENTE<sup>2</sup>, LUCIANO VILELA PAIVA<sup>3</sup>, UBIRACI GOMES DE PAULA LANA<sup>4</sup>

**RESUMO**

A bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* (Bt) é amplamente utilizada no controle biológico de insetos praga, destacando-se por apresentar atividade tóxica contra espécies de diversas ordens, resultante da produção de  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt). O presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de Bt com diferentes toxicidades contra *Spodoptera frugiperda* quanto à presença dos genes *cyt1* e *cyt2*. Para isso, 500 cepas de Bt foram cultivadas em meio LB sólido por dezesseis horas a 28°C. Com uma alça de platina foram coletadas pequenas amostras de colônias e transferidas para um microtubo contendo 100  $\mu$ l de água ultra pura estéril. O DNA das cepas foi extraído utilizando-se a metodologia de choque térmico, sendo o sobrenadante utilizado nas reações de PCR. Para a amplificação, foram utilizados dois pares de primers, correspondendo aos genes *cyt1* e *cyt2*. Adicionalmente, foi feita a extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Das 500 cepas analisadas, sete apresentaram genes *cyt*, destas, três contendo os dois genes, e quatro apenas um deles. As cepas que apresentaram os dois genes são efetivas contra *S. frugiperda*, duas com toxicidade de 100% e uma com 79%. Tendo em vista que os genes *cyt* são efetivos contra dípteros, a sua presença em cepas ativas contra lepidópteros, neste caso, *S. frugiperda*, aponta uma fonte para novos estudos, apresentando-se como uma alternativa no manejo preventivo de resistência de insetos alvos às  $\delta$ -endotoxinas presentes em culturas transgênicas comerciais (Cry e Vip), bem como para a fuga de patentes de genes utilizados nestas culturas.

**Palavras-chave:** PCR, bactérias entomopatogênicas, controle biológico, genes *cyt*

**INTRODUÇÃO**

A lagarta do cartucho, *S. frugiperda* (J. E. Smith), é uma das principais pragas da cultura do milho em todas as regiões do Brasil, reduzindo a produção de grãos em até 37% (FATORETTO et al., 2007). O controle desta praga é realizado, em sua maioria, por inseticidas químicos, cuja utilização abusiva desencadeia vários problemas, que vão desde a falta de especificidade dos produtos à poluição ao meio ambiente, podendo causar também, a seleção de populações de insetos resistentes a estes compostos (PFEIFER & GRIGEIATTI, 1996).

Hoje são conhecidos muitos microrganismos que podem ser empregados no controle biológico de insetos praga. Dentre eles, o *Bacillus thuringiensis* (Bt) destaca-se por apresentar atividade tóxica contra espécies de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, dentre outras, onde se incluem importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Anticarsia gemmatilis* Hübner (LERECLUS et al., 1993). Desta maneira, este microrganismo torna-se uma alternativa viável e econômica para o controle de pragas, evitando a contaminação do meio ambiente, além de preservar os inimigos naturais.

---

<sup>1</sup> Mestranda em Biotecnologia Vegetal, DQI/UFLA, costa.mlm@gmail.com

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, CNPMS, valicent@cnpms.embrapa.br

<sup>3</sup> Professor Adjunto, DQI/UFLA, luciano@ufla.br

<sup>4</sup> Analista da Embrapa Milho e Sorgo, CNPMS, ubiraci@cnpms.embrapa.br

A característica patogênica do Bt deve-se a produção de uma inclusão protéica de formato cristalino. Esse cristal sintetizado durante a fase de esporulação é formado por polipeptídios denominados  $\delta$ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), que vão sendo acumuladas nas células bacterianas (IBARRA et al., 2003). Estes cristais depois de ingeridos pelos insetos sofrem ativação proteolítica, solubilizando-se em decorrência do pH alcalino do intestino (pH ~10), convertendo as protoxinas em endotoxinas. Estas, por sua vez, unem-se às células do epitélio formando poros, causando um desequilíbrio osmótico e iônico, levando à morte do inseto por inanição ou septicemia (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000).

O crescente uso da proteína cristal e sua não-toxicidade aos mamíferos têm impulsionado a busca por novas linhagens com diferentes espectros de ação. Além disso, existe uma grande preocupação com o manejo preventivo de resistência de insetos alvo às  $\delta$ -endotoxinas presentes nos atuais transgênicos comerciais e biopesticidas (CAROZZI et al., 1991). Com isso, torna-se necessária a constante descoberta e caracterização de genes com atividade entomocida, bem como a avaliação da eficiência de genes já descritos. Além disso, novos estudos apresentam-se como uma alternativa para a fuga de patentes de genes utilizados em culturas transgênicas comerciais, auxiliando também no manejo preventivo de resistência de insetos alvos às  $\delta$ -endotoxinas presentes nestas culturas.

Este trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* com diferentes toxicidades contra *S. frugiperda* quanto à presença dos genes *cyt1* e *cyt2*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local do experimento**

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Controle Biológico e de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), localizada em Sete Lagoas, Minas Gerais.

### **Isolados bacterianos**

Foram utilizadas 500 cepas de Bt com diferentes toxicidades para *S. frugiperda* (0% a 100%), de acordo com Valicente et al. (2000), Valicente e Barreto (2003), Valicente e Fonseca (2004) e Valicente et al. (2010), sendo estas pertencentes à coleção da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS). A maioria das cepas é proveniente de coletas realizadas em diversas regiões do Brasil, e em diferentes substratos, como solo, lagartas mortas, folhas, etc. Adicionalmente, foram utilizadas cepas oriundas de outros países, como França e Estados Unidos, pertencentes ao *Institut Pasteur* (Paris, França) e ao USDA (*United States Department of Agriculture*), respectivamente. Como controle positivo foi utilizada uma cepa de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis*, proveniente da Unesp – Jaboticabal, e como controle negativo a cepa HD1, proveniente do USDA.

### **Extração do DNA genômico**

O DNA genômico das cepas de Bt foi isolado de acordo com Bravo et al. (1998) com algumas modificações. As cepas foram plaqueadas em meio LB (Lurian Bertani) sólido por aproximadamente 16 horas à temperatura de 28°C. Com uma alça de platina foi coletada uma pequena amostra e transferida para um microtubo contendo 100  $\mu$ l de água ultra pura estéril. Em seguida, os microtubos foram estocados em freezer -80°C por 15 minutos. Após este período, os tubos foram levados ao banho-maria por 10 minutos na temperatura de 100°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 segundos e o sobrenadante coletado e utilizado nas reações de PCR.

### **PCR**

Nas reações de amplificação foram utilizados *primers* específicos para os genes *cyt1* e *cyt2*, descritos por Ibarra et al. (2003). As reações de amplificação por PCR foram preparadas em um volume final de 20  $\mu$ L, consistindo de 5  $\mu$ l de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U Taq DNA polimerase (Waterville, USA), 0,125 mM de dNTPs e 0,4  $\mu$ M de cada primer. As amplificações foram efetuadas em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany) e os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 1 min,

56 °C (*primers cyt2*) ou 58 °C (*primers cyt1*) por 1 min e 72 °C por 1 min, seguido por uma elongação final de 72 °C por 10 minutos, mantendo a reação à 4 °C.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5 % (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, New York, USA).

Para confirmação da identidade dos fragmentos, estes foram removidos do gel e purificados com “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, Valencia, CA) segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram então eluídas em 50 µL de tampão EB (Qiagen, Valencia, CA), liofilizadas em centrífuga a vácuo e ressuspensas em 10 µL de água ultra-pura.

As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando-se entre 50 e 100 ng do DNA purificado; 2 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 2 µL do tampão 5X (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 5 pmols do iniciador, em um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.

Posteriormente, 40 µL de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 minutos no escuro e centrifugadas por 20 minutos a 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70 % (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 minutos, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A qualidade das sequências foi avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI) e as sequências selecionadas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank por meio do algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

### **Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As proteínas foram isoladas segundo Valicente et al. (2010). As bactérias foram inoculadas em meio líquido LB a 37°C por quatro dias sob agitação 150 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensado em 1 mL de Triton 0,01% (v/v). Esta etapa foi repetida três vezes. Após essa lavagem, o *pellet* foi solubilizado em 500 µl do tampão (0,01% Triton, 10 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 5 minutos, e o *pellet* ressuspensado em 500 µl do tampão (50 mM bicarbonato de sódio e 10mM β-mercapetanol, pH 10,5) e mantido em agitação a 37°C por três horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensado em 250 µl de Tris pH 8,0 0,1M. Ao final da extração, a proteína foi ativada utilizando tripsina (10 µg µl<sup>-1</sup>) na proporção 10 µl por 200 µl de solução. A solução foi mantida em agitador a 150 rpm a 37°C por duas horas. Ao final, a reação foi inativada utilizando 1 mM PMSF (*Phenyl methyl sulfonyl fluoride*) na proporção 30 µl por 200 µl de solução.

Alíquotas das proteínas foram misturadas a igual volume de tampão (0,0625 M Tris, 2,3% SDS (m/v), 10%(v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol e 0,1%(m/v) azul de bromofenol, pH 6,8). Essa mistura foi mantida em água fervente por cinco minutos e transferida para o gelo até o momento da aplicação no gel. Os géis e sobre géis contiveram 12,5% e 6% de acrilamida:bis 37:1, respectivamente. Ao final os mesmos foram corados com 0,4%(m/v) de azul de comassie. Como padrão de peso molecular das proteínas foi utilizado o BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Das 500 cepas analisadas, sete apresentaram genes *cyt*, destas, três contendo os dois genes, e quatro apenas um deles. A figura 1 mostra o perfil eletroforético das cepas utilizando os *primers* específicos para o gene *cyt1*.

As cepas que apresentaram os dois genes são efetivas contra *S. frugiperda*, duas com toxicidade de 100% (cepas 1646 e 1656, provenientes de Jaboticabal – SP) e uma com 79% (cepa

1168C, proveniente de Jataí – GO). As demais apresentam 0% de toxicidade (cepas 257A, LT09, L7B8, P283, provenientes de Goiânia – GO, Paris – França, Limoeiro – AL e Goiânia – GO, respectivamente).

A maioria dos estudos envolvendo genes *cyt* aponta sua eficiência contra dípteros (BAYYAREDDY et al., 2009), mostrando seu importante papel no controle biológico destes grupos. Entretanto, assim como no presente trabalho, genes *cyt* foram identificados em linhagens de Bt tóxicas a lepidópteros e coleópteros (GUERCHICOFF et al., 1997, 2001). Por exemplo, o gene *cyt2Ba6* foi encontrado no *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, sendo este, efetivo contra coleópteros. Estes resultados mostram a necessidade de mais testes envolvendo outros grupos de insetos como em lepidópteros, direcionando trabalhos de bioensaio, a fim de elucidar o papel real destes genes contra esse grupo e sua possível toxicidade.

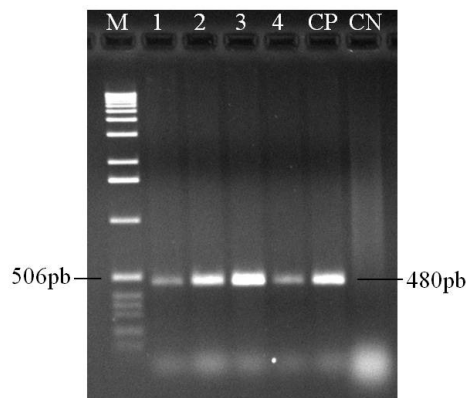


Figura 1 – Produtos de PCR obtidos com os iniciadores específicos para o gene *cyt1*. 1 – 257A, 2 – 1168C, 3 – 1646, 4 – 1656, CP – Controle positivo (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*) e CN – Controle negativo (HD1). M – Padrão de peso molecular (DNA Ladder 1Kb, Invitrogen®).

O sequenciamento dos fragmentos confirmou a identidade dos genes *cyt*. Entretanto, nenhum polimorfismo foi observado entre as cepas avaliadas.

Através da análise de SDS-PAGE realizada nas cepas que possuíam os genes *cyt* (Figura 2), vários padrões de proteínas puderam ser observados além das proteínas Cyt (~27kDa) (BUTKO, 2003), dentre eles, pesos moleculares correspondentes às proteínas Cry (14kDa - 135kDa) (PINTO et al., 2009), responsáveis, assim como as Cyt, pela toxicidade do Bt a insetos.

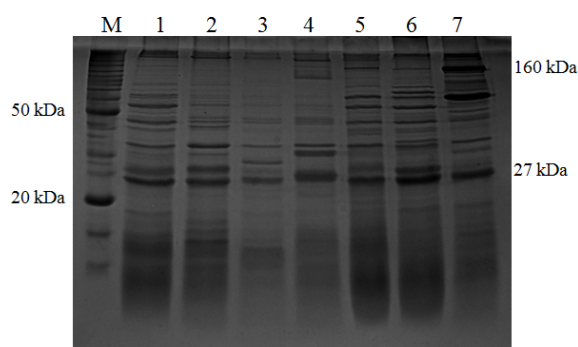


Figura 2 – SDS-PAGE de cepas de *B. thuringiensis* contendo os genes *cyt*. 1 – P283, 2 – 257A, 3 – L7B8, 4 – LT09, 5 – 1168C, 6 – 1646 e 7 – 1656. M – Padrão de peso molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

Estudos apontam que as proteínas Cyt agem na membrana celular do intestino do inseto de forma sinérgica com as proteínas Cry, atuando como receptores adicionais destas, potencializando sua ação (MARGALITH e BEN-DOV, 2000). O mecanismo proposto é que as proteínas Cyt se ligam à membrana deixando expostas regiões que são reconhecidas pelas proteínas Cry, facilitando a oligomerização destas, e consequentemente a formação de poros (PÉREZ et al., 2005). Esta sinergia

Cyt/Cry é maior que as interações entre proteínas Cry. Delécluse et al. (2000) silenciaram o gene *cyt1Aa* do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* na tentativa de eliminar sua atividade inseticida contra dípteros, fato este que não ocorreu. Wu et al. (1994) adotando a estratégia oposta, expressando várias combinações de genes Cyt/Cry, observou um incremento de quatro vezes na atividade tóxica das proteínas, em relação as proteínas Cry utilizadas isoladamente.

A presença conjunta de genes *cyt* e *cry* nas cepas utilizadas no presente estudo aponta uma fonte para novas investigações envolvendo sinergismo, como seu possível efeito contra *S. frugiperda* e outros lepidópteros.

## CONCLUSÃO

A presença de genes *cyt* em cepas eficientes a outros grupos além dos dípteros, evidencia sua importância como fonte para novos estudos envolvendo caracterização molecular e bioensaios, a fim de elucidar o papel real destes genes em lepidópteros e sua possível toxicidade. A descoberta e uso de novo genes, como os genes *cyt*, apresentam-se como uma fonte alternativa no manejo preventivo de resistência de insetos alvos às  $\delta$ -endotoxinas presentes em culturas transgênicas comerciais (Cry e Vip), bem como para a fuga de patentes de genes utilizados nestas culturas.

## REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

BAYYAREDDY, K.; ANDACHT, T. M.; ABDULLAH, M. A.; ADANG, M. J. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.39, p.279-286, 2009.

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.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.

CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain reaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3.057-3.061, 1991.

DELÉCLUSE, A.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; BERRY, C. Vector-active toxins: structure and diversity. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**, Dordrecht: Kluwer, 2000. p.101-125.

FATORETTO, J. C.; SENA, J. A. D.; BARRETO, M. R.; LEMOS, M. V. F.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.36, n.5, p.737-745, 2007.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: biology, ecology e safety**. Chichester: Wiley e Sons, 2000. 350 p.

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied Environmental Microbiology**, v.63, p.2716-2721, 1997.

GUERCHICOFF, A.; DELECLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis* *cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.1090-1096, 2001.

IBARRA, J. et al. 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.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. E.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p.37-69. In: ENWISTLE, P.F.; CORY, J. S.; BAILEY, M.; HIGGS, S. (eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. West Sussex, John Wiley e Sons, 1993. 330 p.

MARGALITH, Y.; BEN-DOV, E. Insect pest management: techniques for environmental protection. In: RECHCIGL, J. E.; RECHCIGL, N. A. (eds.). **CRC Press LLC**, Boca Raton: FL, 2000. p. 243-304.

PÉREZ, C; FERNÁNDEZ, L. E; SUN, J.; FOLCH, J. L.; GILL, S. S; SOBERÓN, M. et al. Bti Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa functions as membrane bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.18303-8, 2005.

PFEIFER, T. A; GRIGEIATTI, T. A. Future perspectives on insect pest management: engineering the pest. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.67, p.109-119, 1996.

PINTO, L. M. N.; BERLITZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.38, p.24-31, 2009.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R.; VASCONCELOS, M.J.V.; FIGUEIREDO, J.E.F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.1, p.147-153, 2000.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. *Bacillus thuringiensis* Survey in Brazil: Geographical Distribution and Insecticidal Activity Against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.32, p.639-644, 2003.

VALICENTE, F. H.; FONSECA, M. M. Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p.21-29, 2004.

VALICENTE, F. H. et al. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cryI* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, v.53, p.360-366, 2010.

WU, D.; JOHNSON, J. J.; FEDERICI, B. A. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v.13, p.965-972, 1994.