

BACILLUS THURINGIENSIS: DIVERSIDADE GÊNICA EM ISOLADOS LEPIDOPTERA-ESPECÍFICOS

A.M. Guidelli-Thuler¹, J.A.D. Sena¹, I.L. Abreu¹, C.C. Davolos¹,
S.B. Alves², R.A. Polanczyk³, F.H. Valicente⁴, M.V.F. Lemos¹

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: guidelli@fcav.unesp.br

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente 1.073 isolados de *Bacillus thuringiensis*, de três coleções brasileiras, provenientes da UNESP, Jaboticabal, da ESALQ/Piracicaba e da EMBRAPA. Sete Lagoas, analisando os tipos de genes *cry1* apresentados pelos isolados. Para isso, foram elaborados oligonucleotídeos iniciadores a partir de 16 regiões conservadas e 4 regiões não conservadas das seqüências de cada uma das 16 subclasses do gene *cry1*. Essas seqüências foram amplificadas por PCR e a presença de amplicons para cada subclasse foi calculada em porcentagem por gene e por coleção. Nessa análise, 55,7% dos isolados apresentaram amplificação para o gene *cry1*, e as subclasses *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1Ae*, *cry1Af*, *cry1Ag*, e *cry1Bf*, *cry1Ca* e *cry1Fa* estão presentes em alta proporção de isolados, variando de 43,4% a 54,9%. Verificou-se que existe uma distribuição das subclasses dentro do banco de isolados de *B. thuringiensis* em estudo, com maior porcentagem de isolados portadores dos genes *cry1Ab* (42,12%) e com menor porcentagem de representantes da subclasse *cry1Db* (0,6%). A variabilidade gênica, nas coleções analisadas, destaca as coleções de Jaboticabal e Piracicaba como fontes de isolados promissores para uso em programas de Controle Biológico de pragas da ordem Lepidoptera. A coleção de Sete Lagoas, na qual as freqüências das subclasses estudadas foram relativamente baixas (abaixo de 20%), destaca somente o gene *cry1Ab*, presente em 38,5% dos isolados desta coleção.

PALAVRAS-CHAVE: Variabilidade genética, gene *cry*, *Bacillus thuringiensis*.

ABSTRACT

BACILLUS THURINGIENSIS: GENETIC DIVERSITY OF LEPIDOPTERA-SPECIFIC ISOLATES. The aim of this work was to genetically characterize 1,073 isolates of *B. thuringiensis*, from three Brazilian collections – UNESP/Jaboticabal, ESALQ/Piracicaba and EMBRAPA/Sete Lagoas – with the main emphasis on the analysis of the *cry1* gene types presented by these isolates. To achieve this purpose, oligonucleotide primers were designed based on 16 conserved and 4 unconserved regions of the corresponding sequences from each one of the 16 subclasses of the *cry1* set of genes and used in PCR amplification assays. These sequences were amplified and the presence of amplicons for each subclass was evaluated in terms of percentage of gene type per bacterial collection. As a result, 55.7% of the isolates reacted to the primer Gral *cry1*, and the subclasses *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1Ae*, *cry1Af*, *cry1Ag*, *cry1Bf*, *cry1Ca* and *cry1Fa* were detected in high percentages among the isolates ranging from 43.4 to 54.9%. A subclass distribution was observed among the set of isolates from these collections, with the greater percentage of isolates harboring the *cry1Ab* (42.12%) and the lowest percentage for the *cry1Db* subclass (0.6%). The genetic variability of the analyzed bacterial collections seems to indicate the ESALQ/Piracicaba and the UNESP/Jaboticabal subsets as sources of promising isolates for the control of Lepidoptera pest insects. For the EMBRAPA/Sete Lagoas subset of isolates, in which the evaluated subclasses

²Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Piracicaba, SP, Brasil.

³Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Produção Vegetal, Alegre, ES, Brasil.

⁴EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil.

frequencies were considered low (below 20%), the *cry1B* was the most frequently observed gene type present in 38.5% of the isolates.

KEY WORDS: Genetic variability, *cry* gene, *Bacillus thuringiensis*.

INTRODUÇÃO

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores (MONNERAT; BRAVO, 1999). Nos últimos anos, tem sido alto o investimento na otimização de agentes de controle biológico mas, apesar disso, somente alguns bioinseticidas têm sido empregados. Estatísticas mostram que apenas 1% das pragas agrícolas e vetores de doenças é controlado por compostos originários de organismos vivos. Entretanto, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é responsável por 90-95% desse mercado (VALADARES-INGLIS *et al.*, 1998) e, em 1990, cobria uma área de 150.000 ha no Brasil (ALVES, 1990).

Devido à sua grande importância ecológica, *B. thuringiensis* tem sido amplamente estudado, isolado de todos os ambientes onde foi procurado, apresentando grande variabilidade genética e uma ampla gama de sorotipos diferentes (VILAS-BÔAS, 2002).

VILAS-BÔAS; LEMOS (2004) apresentaram a caracterização do conteúdo de genes *cry* como a principal motivação para a realização de amplos programas de busca de novas linhagens. A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que o *B. thuringiensis* possui. Estes genes codificam para as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. Ao serem ingeridas por um inseto suscetível, as protoxinas são solubilizadas no ambiente alcalino do intestino do inseto, e convertidas em δ -endotoxinas. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, ele para de se alimentar (HOFTE; WHITELEY, 1989; K NOWLES, 1994; COPPING; MENN, 2000).

Até hoje, cerca de 300 genes *cry* foram sequenciados e classificados em 50 grupos e diferentes subgrupos dependendo da similaridade de seus aminoácidos. Mesmo considerando-se a variabilidade das proteínas Cry até agora descritas, é ainda extremamente necessária a busca por novas toxinas, visando o controle de um número maior de insetos. É também importante encontrar alternativas para o controle da resistência de insetos às toxinas Cry, especialmente

com o advento das plantas transgênicas (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004).

A busca e a caracterização de novos genes *cry* podem resultar em novas alternativas para o controle de espécies de insetos com nenhuma ou pouca susceptibilidade às proteínas Cry atualmente conhecidas, além de poder auxiliar no desenvolvimento de sistemas de manejo que evitem ou minimizem o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de insetos alvo em campo (VILAS-BÔAS, 2002). Atualmente, os casos mais graves de resistência ocorreram com a lagarta *Plutella xylostella* (TABASHNIK *et al.*, 1990; FERRÉ *et al.*, 1991; TABASHNIK, 1994).

A caracterização de coleções de linhagens pode também auxiliar no entendimento do papel de *B. thuringiensis* no ambiente e da distribuição de genes *cry*. Assim, o trabalho de FEITELSON *et al.* (1992) propôs que espécies de insetos e linhagens de *B. thuringiensis* vêm coevoluindo. Seguindo a mesma corrente de pensamento, BRAVO *et al.* (1998) demonstraram que alguns genes *cry* foram distribuídos diferentemente em algumas regiões geográficas analisadas.

A variabilidade genética entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente através da utilização de técnicas que tem como base a PCR. Estas técnicas apresentam aplicações tais como a determinação da persistência da bactéria no ambiente (BOURQUE *et al.*, 1993) e a predição da atividade tóxica de uma linhagem através da determinação do conteúdo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e, direcionando os trabalhos de bioensaio (SAUKA *et al.*, 2006; IBARRA *et al.*, 2003; BRAVO *et al.*, 1998; CERÓN *et al.*, 1994; 1995; CHAK *et al.*, 1994; KALMAN *et al.*, 1993; CAROZZI *et al.*, 1991).

Na busca por novos genes *cry*, várias coleções de linhagens de *B. thuringiensis* foram avaliadas (BERÓN; SALERMO, 2006; JARA *et al.*, 2006; KIM, 2000; ZHANG *et al.*, 2000; BRAVO *et al.*, 1998; BEN-DOV *et al.*, 1997), mas poucas contemplaram amostras brasileiras (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004; IBARRA *et al.*, 2003). Levando-se em consideração o fato de que o Brasil é um país que apresenta regiões com clima tropical e subtropical, contendo uma rica diversidade biológica, espera-se encontrar uma alta diversidade de isolados em solos brasileiros. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente 1.073 isolados de *B. thuringiensis*, com ênfase principal na análise dos tipos de genes *cry1* apresentados pelos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens bacterianas

Foram analisados 1.073 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de vários pontos do território brasileiro, cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP), Piracicaba, SP, pelo Dr. Edilson Paiva (Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo) Sete Lagoas, MG, e pelo Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos (Depto. de Biologia Aplicada a Agropecuária), FCAV/UNESP, Jaboticabal. Todos os isolados encontram-se em estoques no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada na FCAV/UNESP - Jaboticabal.

Extração de DNA

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas contendo meio NA sólido, por 12h a 30° C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1mL de água estéril em tubos de microcentrífuga e o material genético foi extraído utilizando-se o Kit InstaGene Matrix (Bio-Rad), conforme instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram estocadas em freezer -20° C e mantidas até a utilização.

Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram elaborados a partir das regiões conservadas das seqüências

correspondentes à cada uma das 16 subclasses do gene *cry1* para a ordem Lepidoptera, obedecendo à lista de nomenclaturas das delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* que são atualizadas constantemente e publicadas no site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html. Para o alinhamento de todas as seqüências de cada subclasse utilizou-se o programa *Clustal W* (THOMPSON *et al.*, 1994) e o programa Gene Runner 3.0 (Hastings Software, Inc.) para a elaboração dos iniciadores. Para algumas das subclasses *cry1* foram elaborados iniciadores também a partir de regiões não conservadas pela MWG (Ebersberg, Alemanha) e pela Bio Synthesis (Lewisville, EUA).

Comprovação da presença de gene *cry1* nos isolados

Para a confirmação da presença de genes *cry1* nos isolados utilizou-se o par de iniciadores gerais, denominado Gral-cry1, segundo BRAVO *et al.* (1998).

Após as amplificações, as eletroforeses foram realizadas segundo SAMBROOK; RUSSEL (2001).

Identificação de subclasses do gene *cry1*

A identificação das subclasses do gene *cry1*, nos isolados de *B. thuringiensis* estudados, foi realizada para 16 subclasses (Tabela 1). Para tanto, as reações de amplificação foram conduzidas, basicamente, nas mesmas condições realizadas para a verificação do gene *cry1*, anteriormente mencionado. Modificações ocorreram na temperatura de pareamento, para alguns iniciadores, conforme apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Seqüências dos iniciadores para o gene *cry1* e suas subclasses analisadas.

Iniciador	Seqüências(5'-3')	Produto Amplificado (pb)	Temperatura Pareamento(°C)
<i>cry1Aa</i> conservada	ATTCCTTGTCGCTAACGC' CCAAACACTGAAACATCTCTC'	426	50
<i>cry1Aa</i> não conservada	TTCGCATCATTTCTCCTTAG CTGTCCACGATAAATGTTCC'	1035	50
<i>cry1Ab</i> conservada	GAGATGTTTCAGTGTGGAC GTCCCGTCAAGAACAGATAG	799	50
<i>cry1Ab</i> não conservada	CGGGTAATCGCTCGTCTATC CTTACTTCTCGCCATTATCC	640	50
<i>cry1Ac</i> conservada	GGTGCTGGATTGIGTTAGG TTCTTTCTATGCCCTGAGCC	712	50
<i>cry1Ad</i> conservada	GAGATGTTTCAGTGTGGAC GCTGGCACACTATTATCTCTG	750	50

Continua...

Tabela 1 - Continuação

Iniciador	Seqüências(5'-3')	Produto Amplificado (pb)	Temperatura Pareamento(°C)
<i>cry1Ae</i> conservada	GCTCTTACAACCGCTATTCC TATTATCCTGIGGIGGTATTTC	838	50
<i>cry1Af</i> conservada	CCTTACAACCGCTATTCCCTC GTCCCGTCAAGAACAGATAG	729	50
<i>cry1Ag</i> conservada	GAACAGTGCCCTTACAACCG GTGGTTATTIGATGCCCTGAC	558	50
<i>cry1Bb</i> conservada	CTIGIGIGTAGCCGAGGIG TGCGTCTCTCAATAATAATAGG	484	50
<i>cry1Bc</i> conservada	TATTGGGCGTATTAGGTGTG TGCGTCTCTCAATAATAATAGG	401	52
<i>cry1Be</i> conservada	TAGGGATACGGCTCTTGCTC CGATTCAAGTCTATGTCCCAC	742	54
<i>cry1Bf</i> conservada	AACAAACGAGAGATTATTCCG CGTTCGTGTTTCTGGTGG	715	50
<i>cry1Ca</i> conservada	TGGTCAACTAACAAGGGAAG TCTACTCCTCAACACCACG	393	50
<i>cry1Ca</i> não conservada	AGAGCGGAGAAGAAGTGGAG CTTCCCTTCTACACAGTTGC	559	50
<i>cry1Da</i> conservada	GAAGGGAAGGAAATACAGAGC GTTATTGGAGTGAAGAGIGTTG	670	50
<i>cry1Db</i> conservada	TTTATCCGTTTATGTTACAGGC GATGCGGAAATAGTTACGGG	600	50
<i>cry1Ea</i> conservada	GAACTCAGCCATTAGAAGCC CCTCCTGTAAATCCTGGTCC	609	48
<i>cry1Fa</i> não conservada	AATGTAGAGCCGTTTGTAGTIG CCCTCAAGTTATTTAGACCTG	595	50

RESULTADOS

Dos 1.073 isolados de *B. thuringiensis* submetidos à análise, 11,4% eram da coleção da UNESP-Jaboticabal, 28,9% da ESALQ-Piracicaba e 59,7% da EMBRAPA-Sete Lagoas, sendo as amostras coletadas de solo urbano, solos não cultivados e cultivados com cereais, hortícolas e frutíferas, silagem, insetos mortos, poeira acumulada em produtos estocados (cereais como milho, sorgo etc.), entre outros em diferentes estados do Brasil.

Os isolados das coleções foram previamente caracterizados em seus locais de origem como sendo *B. thuringiensis*, após minuciosa observação microscópica para a constatação da presença de inclusões cristalinas. Mesmo assim, uma amostragem realizada nas coleções da ESALQ - Piracicaba e EMBRAPA - Sete Lagoas foi submetida novamente à análise

microscópica antes que elas integrassem o novo banco.

Na nova análise foi confirmada a presença de cristais protéicos, portanto, todas as 1.073 amostras foram devidamente etiquetadas e estocadas no LGBBA (UNESP-Jaboticabal).

Com a confirmação específica dos isolados de *B. thuringiensis* procedeu-se à extração de DNA total em quantidade e qualidade adequadas para as reações de amplificação. Essas amplificações para regiões de cada subclasse do gene *cry1* para alguns dos isolados da coleção podem ser observadas na Figura 1.

Na Figura 2 observa-se a distribuição das 16 subclasses do gene *cry1*, mais a família de genes *cry1*, na coleção de isolados da UNESP - Jaboticabal. Nota-se que as porcentagens de isolados de *B. thuringiensis* para cada subclasse foi relativamente alta em sua maioria, nesta coleção. Assim, 55,7% dos isolados

reagiram com o par de iniciadores gerais Gral *cry1*, e as subclasses *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1Ae*, *cry1Af*, *cry1Ag*, e *cry1Bf*, *cry1Ca* e *cry1Fa* estão presentes em alta proporção de isolados, variando de 43,4% a 54,9%.

Para as subclasses *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ca* e *cry1Fa*, foram observados os maiores números de isolados, quando utilizados os iniciadores provenientes de regiões não conservadas. Para as subclasses *cry1Ca* verificou-se diferença marcante quando utilizados iniciadores de regiões conservadas (8,2% dos isolados) em relação aos iniciadores para regiões não conservadas (54,1% dos isolados) (Fig. 2).

Provavelmente, os iniciadores elaborados a partir de regiões não conservadas poderiam amplificar maior número de diferentes genes desta subclasse, visto que, para a subclasse *cry1Aa*, por exemplo, há várias subdivisões: *cry1Aa1*, *cry1Aa2*, *cry1Aa3* etc. Menores porcentagens foram obtidas para as subclasses *cry1Bb*, *cry1Bc*, *cry1Be*, *cry1Da*, *cry1Db* e *cry1Ea*.

Verificou-se que a coleção da UNESP - Jaboticabal é muito rica em isolados portadores de genes para a subclasse *cry1A*, sugerindo uma tendência de manutenção dessa proporção de isolados nas análises futuras com os demais genes desta subclasse. O fato de 55,7% dos isolados, na coleção, serem portadores do gene *cry1* indica sua aplicabilidade em programas de controle de pragas da ordem Lepidoptera.

Deve-se ressaltar que alguns isolados não apresentaram amplificação para a família *cry1*, com o par de iniciadores gerais Gral *cry1*, mas apresentaram para uma ou outra subclasse. Sugere-se, então, que estes iniciadores não são tão gerais e que nem todas as subclasses do gene *cry1* foram contempladas e alinhadas por BRAVO *et al.* (1998), quando da elaboração desse par de iniciadores. O que se confirma pela crescente descoberta de novos genes *cry1*, agregados constantemente aos bancos de dados de seqüências.

Na coleção da ESALQ - Piracicaba (Fig. 3) nota-se que a distribuição das subclasses seguiu um perfil muito próximo ao da coleção de Jaboticabal, porém, com porcentagens menores de isolados dentro de cada subclasse.

Observou-se, nesta coleção, amplificação em 42,6% dos isolados com os iniciadores gerais Gral *cry1*, mas dentre estes, 4,5; 4,2 e 3,2% dos isolados não apresentaram amplificação para as subclasses *cry1Ab*, *cry1Ae* e *cry1Ag*, respectivamente (Fig. 3).

Houve baixa porcentagem de isolados (14,5%) portadores da subclasse *cry1Ad*, quando comparada à coleção de Jaboticabal (43,4%). No entanto, a subclasse *cry1B*, continuou sendo a menos abundante seguida da subclasse *cry1D*.

Para a subclasse *cry1Ca*, o par de iniciadores para a região não conservada apresentou maior porcentagem de isolados (41,9%), como na coleção da UNESP

- Jaboticabal (Fig. 2), contra 0,3% para os iniciadores da região conservada.

Comparando-se a coleção da ESALQ - Piracicaba (Fig. 3) à coleção da UNESP - Jaboticabal (Fig. 2), maior porcentagem (36,1%) de isolados apresentou a subclasse *cry1Ea*, enquanto a proporção de isolados contendo *cry1Fa* foi menor (33,9%).

A coleção da ESALQ - Piracicaba constitui-se também em excelente fonte de isolados efetivos no controle biológico de insetos da ordem Lepidoptera. No entanto, não se descarta a possibilidade de que os isolados das coleções referidas apresentem amplificação para as outras subclasses do gene *cry1*, ou para outras famílias específicas para outras ordens de insetos.

A coleção da EMBRAPA - Sete Lagoas apresentou um perfil de distribuição das subclasses estudadas totalmente diferente das outras duas coleções (Fig. 4). Apesar de ser a coleção com maior número de isolados (641), foi a que apresentou a menor porcentagem de isolados portadores da subfamília *cry1A*, considerada a mais comum entre os isolados de *B. thuringiensis*. Apenas 18,6% dos isolados desta coleção apresentaram amplificação para o gene *cry1* com os iniciadores gerais, e somente para a subclasse *cry1Ab*, com iniciadores para região conservada, é que houve maior porcentagem de isolados (38,5%).

A distribuição de isolados portadores da subclasse *cry1B*, no entanto, apresentou-se mais evidente que nas outras coleções (17 a 19% dos isolados) (Fig. 4). Esta coleção apresenta um conjunto peculiar de isolados caracterizando um banco que deve ser intensamente explorado, visto que estes isolados de *B. thuringiensis* podem ser portadores de outras famílias de genes *cry*, bem como de outras subclasses com diferentes espectros de atuação contra insetos pragas, ou mesmo vetores de doenças.

Na Figura 5 pode ser observada a distribuição das 16 subclasses estudadas e da família *cry1*, considerando as três coleções conjuntamente, ou seja, a distribuição dentro dos 1073 isolados de *B. thuringiensis*. Essa distribuição foi mais homogênea entre as subclasses, com maior porcentagem de isolados portadores dos genes *cry1Ab* (42,12%) e menor porcentagem de isolados que contém *cry1Db* (0,6%), verificando-se ainda que o banco de isolados de *B. thuringiensis* em estudo contempla todas as subclasses do gene *cry1*.

A caracterização específica destes isolados, por PCR, produziu diferentes perfis (combinações) de genes *cry1*. Devido ao tamanho da coleção, os isolados foram agrupados de acordo com o número de subclasses *cry1* exibido por cada um, conforme se observa na Figura 6, e pelas combinações mais frequentes de genes *cry1* encontradas nos isolados (Tabela 2).

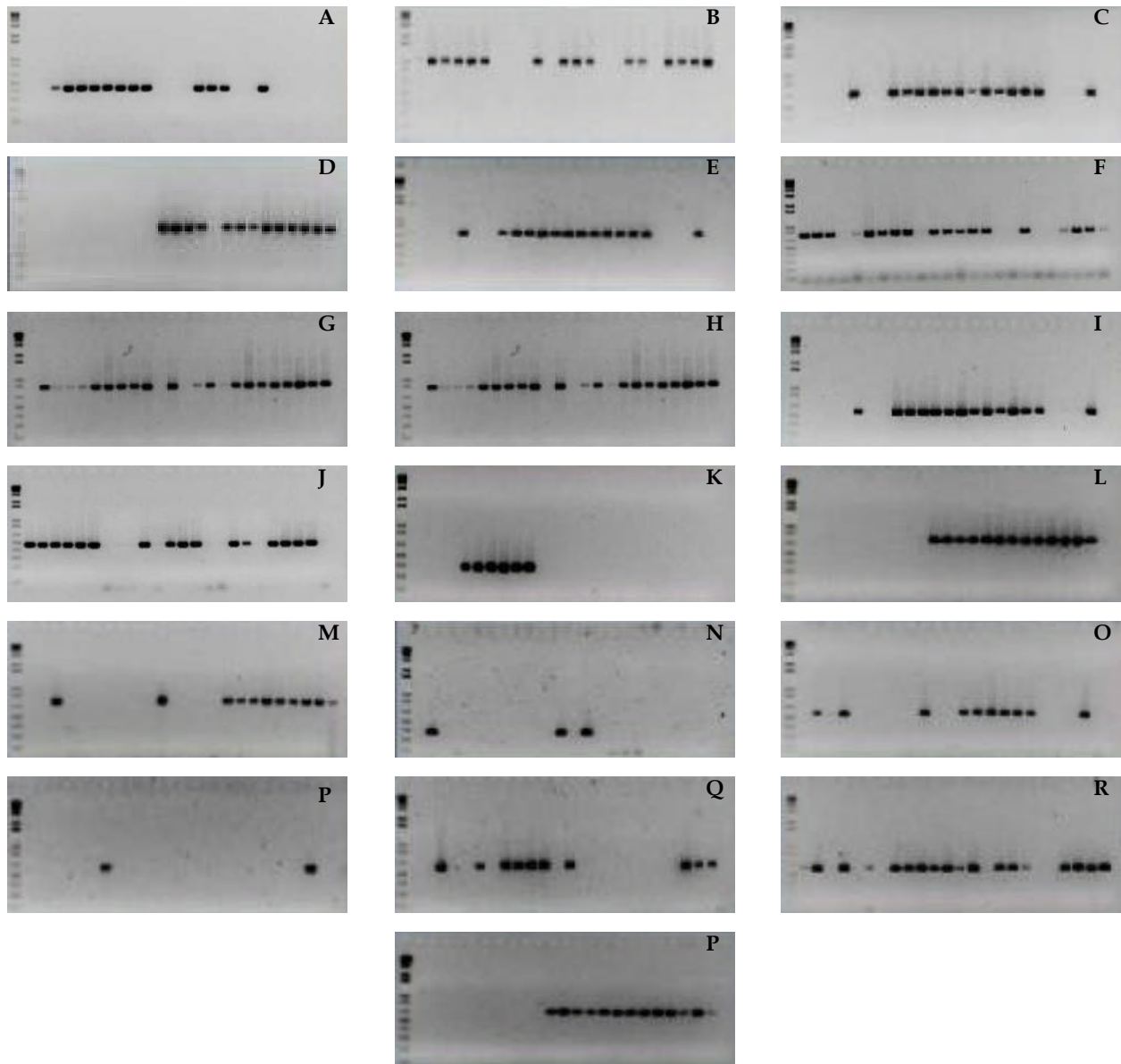


Fig. 1 - Eletroforeses evidenciando a amplificação para regiões de cada subclasse do gene *cry1* para alguns dos isolados da coleção. A) *cry1Aa* conservada; B) *cry1Aa* não-conservada; C) *cry1Ab* conservada; D) *cry1Ab* não-conservada; E) *cry1Ac* conservada; F) *cry1Ad* conservada; G) *cry1Ae* conservada; H) *cry1Af* conservada; I) *cry1Ag* conservada; J) *cry1Bb* conservada; K) *cry1Bc* conservada; L) *cry1Be* conservada; M) *cry1Bf* conservada; N) *cry1Ca* conservada; O) *cry1Ca* não-conservada; P) *cry1Db* conservada; Q) *cry1Ea* conservada; R) *cry1Fa* conservada; S) *cry1Da* conservada.

Apesar da maioria dos isolados ter apresentado uma ou mais subclasses do gene *cry1*, 42,2% deles (453 isolados) não apresentaram amplificação para nenhuma delas. Cerca de 20% apresentaram uma das 16 subclasses analisadas, sendo a *cry1Ab* a mais predominante.

Isolados que amplificaram de 9 a 13 genes constituem 22,2% dos isolados, sendo que a maioria apresenta os perfis de combinação de 10 e 11 subclasses. Ressalta-se aqui a presença de um isolado que apresentou amplificação para 14 subclasses, não ampli-

cando apenas para os genes *cry1Ae*, *cry1Be* e *cry1E*. Um número mais reduzido (10%) apresentou perfis contendo de três a oito subclasses.

DISCUSSÃO

Poucos estudos têm relatado uma caracterização detalhada de coleções de *B. thuringiensis* em termos de conteúdo de genes *cry* (BEN-DOV *et al.*, 1996; BRAVO *et al.*, 1998; CHAK *et al.*, 1994; FERRANDIS *et al.*, 1999; URIBE *et al.*, 2003).

Tabela 2 - Combinações (perfis) mais frequentes de genes *cry1*, e seus respectivos isolados, encontradas nesse estudo.

Combinação de genes <i>cry1</i> *	Isolados	nº de isolados
1,2,3,4,5,6,7,8,9,12,13,17	Br69, Br78, Br82, Br83, Br87, Br91	6
1,2,3,4,5,6,7,8,12,13,16,17	Br45, Br61, Br64, Br72, Br86, Br90, R203, R205, R206, R219, R220, R221, R227, R230	14
1,2,3,4,5,6,7,8,12,13,17	Br8, Br9, Br10, Br11, Br12, Br16, Br17, Br58, Br70, Br71, Br84, Br93, 21.5A, SP1, SP8, SP14, MT4, AM2	18
1,2,3,4,5,6,7,8,12,17	MS9, MS10, PR5, PR6, PR11, MT1, MT3, RS1	8
1,2,3,4,6,7,8,12,13,16,17	Br46, Br48, Br60, Br74, R120, R122, R140, R146, R149, R157, R158, R161, R162, R165, R166, R168, R177 R180, R181, R182, R184, R193, R199, R223, R224, R228	26
1,2,3,4,6,7,8,12,13,16	R25, R26, R27, R33, R54, R70, R73, R75, R77, R81, R83, R84, R144	13
1,2,3,4,6,7,8,13,16,17	R232, R233, R235, R240, R248, R249, R254, R258, R259	9
1,2,3,4,6,8,12,13,16,17	R144, R148, R155, R156, MS4	5
1,2,3,6,7,8,12,13,16,17	R121, R123, R125, R139, R164, R169	6
1,2,3,9,10,11,12,13,14,16,17	1139 H, 1140B, 1140C, 1150C, 939FB, 939FC, 1119A, 1119C, 1134B, 1134C, 1136C, 1136B, 1136B, 1138A 1119C, 1139D, 1036C, 1124E, 1128, 1129A, 1130D, 1132A, 1130C	23
1,2,9,10,11,12,13,14	E28, E39, 41.7L, 42.7L, 43.7L, 44.7L, 45.7L, 47.7L	8
1,3	858B2, 933D3, 939E, 939G, 939N, 939S, 940B, 940I, 961B, 965A, 972A, 1010D, 1043N-N	13
1,9,10,11,12,13,14,15	E42, E43, E44, E45, E46, E47, E48, E49, E50	9
1	937BF, 944B, 1008B, 1009A, 1043I	5
3,16	R208, R209, R210, R213, R215, 842C, 862CF1, 889GG, 890BA, 890BB, 941L, 946H, 946JR, 946L, 957A, 964A, 964C, 965C, 969B, 977F, 999, CST23	22
3	884A3B, 1120D, R170, R265, 702, 846J, 851C, 857 AC2, 857B, 858AB4, 858AB5, 858B1, 868C1, 868C2, 868C3, 868C5,868C8, 884A1.C, 884A3.D, 884A3.E, 884A3.G, 887AA, 927A2, 927A3, 927A4, 927A6, 927A7, 927A7.10, 927A9, 927A9.1, 927A9.5, 927A9.7, 927A9.8, 927A9.12, 927A9.13, 927A9.17, 927A9.19, 927C, 927F, 927G, 927N, 927K, 933A, 933D2, 933D2A, 933D2B, 933D2D, 933D2E, 933D2F, 933D2G, 933D2H, 933F, 933L, 937C, 937K, 938A, 938E, 939, 939A, 939B, 939C, 939D, 939D3, 940C, 940CI, 940H, 940J, 941CC, 941CD, 941CG, 941CO, 941CF, 941I, 941K, 941M, 943B, 945D, 945E, 946B, 946F, 946JO, 947A, 948, 948F, 951AG, 951B, 952B, 952C, 955A, 957BB, 957BJ, 957BB, 957BJ, 957BK, 963, 964B, 964D, 965, 965E, 972C, 972CA, 974C, 976B, 976C, 977D, 981, 986H, 986L, 986N, 987B, 993, 1001A, 1007, 1059A, 1060C, 1060D, 1061C, 1063D, 1066B, 1067B, 1067D, 1067I, 1068E, 1068F, 1071, 1072, 1123D, 1148D	128
6	E27, S497, R49, R98, R113, R114, R116, 118, R126, R128, R129, MBT	12
9	S251, S284, S350, S1349, R2, R35, R52, 69.24A, S385, 854, 1133A	11
10	S98, R12, R62, R64, R66, R71, R72, R90, 1033I, 1034D, 970F, 977B	12
12	970, S75, 815C, 816, 856A, 868A, 878A, 1062C	8
16	R160, R171, R196, R197, R198, R201, R225, R274, 933C, 933K, 937F, 937I, 948C, 960, 965M, 971H, 978 ^a 1073B, CST Seiva, Seiva, 106.12A, E13, 6.7L	23

*1: gral *cry1*; 2: *cry1Aa*; 3: *cry1Ab*; 4: *cry1Ac*; 5: *cry1Ad*; 6: *cry1Ae*; 7: *cry1Af*; 8: *cry1Ag*; 9: *cry1Bb*; 10: *cry1Bc*; 11: *cry1Be*; 12: *cry1Bf*; 13: *cry1Ca*; 14: *cry1Da*; 15: *cry1Db*; 16: *cry1Ea*; 17: *cry1Fa*; 18: *cry1Fb*.

CHAK *et al.* (1994), trabalhando com amostras de solos provenientes de Taiwan, obtiveram 225 isolados dos quais 221 (98,2%) continham genes *cry1*. Destes, somente cinco diferentes perfis de genes *cry* foram encontrados usando iniciadores específicos para *cry1*, *cry3*, e *cry4*. Nenhum dos isolados apresentou genes *cry3*. BEN-DOV *et al.* (1996), quando analisaram 215 isolados obtidos de amostras de Israel, pelo uso de iniciadores gerais e específicos para genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, e *cry8*, encontraram genes *cry1* representados por 16 diferentes perfis. BRAVO *et al.* (1998) relataram que, de um total de 496 isolados obtidos de diferentes ecossistemas no México, 246 isolados (49,6%) continham genes *cry1* apresentando 35 diferentes perfis usando iniciadores específicos para genes *cry1*, *cry3*, e *cry7*. Também FERRANDIS *et al.* (1999), na Espanha, verificaram que, de 223 isolados de *B. thuringiensis*, 121 (54,3%) continham gene *cry1*, e encontraram ainda 16 diferentes perfis nesses isolados após terem realizado análises com os iniciadores para os genes *cry1*, *cry2* e *cry4*.

O presente estudo relata 16 diferentes subclasses do gene *cry1* em 621 dos 1.073 isolados em estudo, provenientes de diferentes ecossistemas no Brasil, usando iniciadores específicos para os genes *cry1*. A grande variabilidade e distribuição de *B. thuringiensis* nos estudos em diversos países sugerem que as diferenças ecológicas do local de origem e/ou as relações de co-evolução tenham favorecido a expressão de diferentes padrões de genes *cry1*.

CHAK *et al.* (1994) e BRAVO *et al.* (1998) encontraram padrão similar e, em ambos os trabalhos, o perfil mais comum de gene *cry1* correspondeu aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, o que pôde ser observado, também no presente estudo, nas coleções de Jaboticabal e Piracicaba, que apresentaram comportamento semelhante quanto à distribuição dos perfis de genes *cry1*. Ainda, CHAK *et al.* (1994) encontraram importante frequência entre os perfis *cry1Aa/cry1Ac* e *cry1C/cry1D* em 21,3 e 17,7% dos isolados, respectivamente. No mesmo contexto, FERRANDIS *et al.* (1999) mostraram que 93% dos isolados com presença do gene *cry1C* continham o gene *cry1D* no seu genoma, sugerindo então, alta ligação genética entre esses dois genes.

Segundo SANCHIS *et al.* (1988), a linhagem padrão de *B. thuringiensis* subsp. *Aizawai* 7.29 contém genes *cry1C* e *cry1D* no mesmo replicon. As análises aqui apresentadas corroboram com esses autores, visto que nas três coleções, muitos isolados que apresentaram o gene *cry1C* também continham o gene *cry1D* (Tabela 2). Todos esses resultados indicam que os pares de genes mencionados encontram-se juntos na natureza, provavelmente fazendo parte do mesmo replicon, localizados em um megaplasmídeo (GONZÁLES *et al.*, 1982; SANCHIS *et al.*, 1988).

A ocorrência conjunta de alguns desses *cry* pode minimizar problemas relacionados a inseticidas baseados em *B. thuringiensis*, devido ao seu espectro de ação limitado quando comparado aos inseticidas químicos. Este é um fator limitante já que as culturas agrícolas são atacadas simultaneamente por diferentes pragas e, às vezes, por insetos de diferentes ordens. Portanto, uma importante característica encontrada neste estudo é a presença de mais que um gene *cry1* na maioria dos isolados (Fig. 6). De 621 isolados, 399 apresentaram duas ou mais subclasses do gene *cry1*. No entanto, deve-se ressaltar que, para alguns genes *cry1*, os iniciadores elaborados podem ter amplificado mais de uma subclasse, por estarem em uma região de homologia entre elas, levando a um número superestimado de genes em alguns isolados; como exemplo, o isolado que apresentou 14 subclasses (Fig. 6). Isso só poderia ser verificado através do seqüenciamento dos produtos amplificados e comparação com as seqüências depositadas no banco de dados.

Há alguns genes *cry* que são comumente identificados em todas as coleções do mundo, tais como os genes *cry1*; e outros são mais freqüentes em uma região que em outra. Por exemplo, os genes *cry1A*, *cry1C*, *cry1D* e genes *cry2* foram mais comumente encontrados em isolados da Ásia (BEN-DOV *et al.*, 1997; KIM, 2000; ZHANG *et al.*, 2000) que naqueles da América Latina (BRAVO *et al.*, 1998). O mesmo não ocorreu neste trabalho, onde *cry1A* e *cry1C* apresentaram alta freqüência.

A variabilidade gênica nas coleções analisadas destaca as coleções de Jaboticabal e Piracicaba, como fonte de isolados promissores para uso em programas de Controle Biológico de pragas da ordem Lepidoptera, diferentemente do observado para a coleção da EMBRAPA - Sete Lagoas, na qual as freqüências das subclasses estudadas foram relativamente baixas (abaixo de 20%), com destaque somente para o gene *cry1Ab*, presente em 38,5% dos isolados desta coleção.

Desde que a resistência a *B. thuringiensis* em populações de insetos da ordem Lepidoptera tem sido relatada (FERRÉ *et al.*, 1991; TABASHNIK, 1994), há um grande interesse no isolamento de novas linhagens de *B. thuringiensis* cujas propriedades tóxicas diferem daquelas já usadas como bioinseticidas. Os resultados obtidos aqui mostram que o Brasil apresenta-se como uma fonte potencialmente rica em isolados de *B. thuringiensis*, mas a possibilidade em usar essas toxinas a partir de novos isolados requer ainda estudos mais detalhados.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro. Ao Dr. Edílson Paiva (CNPMS/EMBRAPA) pelo envio dos isolados da coleção de Sete Lagoas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, S.B. Controle microbiano de insetos. In: CROCOMO, W.B. (Ed.). *Manejo integrado de pragas*. São Paulo: Editora Unesp, 1990. p.147-176.
- BEN-DOV, E.; EIVAN, M.; PERLEG, N.; BOUSSIBA, S.; ZARISTSKY, A. Restriction map of the 125-kilobase plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* carrying the genes that encode delta-endotoxins active against mosquito larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, n.9, p.3140-3145, 1996.
- BEN-DOV, E.; ZARISTSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.63, n.12, p.4883-4890, 1997.
- BERÓN C.M.; SALERNO, G.L. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl*, Netherlands, v.51, n.6, p.779-794, 2006.
- BOURQUE, S.N.; VALERO, J.R.; MERCIER, J; LAVOIE, M; LEVESQUE, R. C. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.2, p.523-527, 1993.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.12, p.4965-4972, 1998.
- CAROZZI, N.B.; KRAMER, V.C.; WARREN, G.W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M.G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.
- CERÓN, J; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.1, p.353-356, 1994.
- CERÓN, J; ORTIZ A.; QUINTERO, R., GÜERECIA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, n.11, p.3826-3831, 1995.
- CHAK, K.F., CHAO, D.C., TSENG, M.Y., KAO, S.S., TUAN, S.J., FENG, T.Y. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.7, p.2415-2420, 1994.
- COPPING, L.G.; MENN, J.J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, v.56, n.88, p.651-676, 2000.
- FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Nature Biotechnology*, v.10, p.271-275, 1992.
- FERRANDIS, M.D.; JUÁREZ-PÉREZ, V.M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. *Systematic and Applied Microbiology*, v.22, n.2, p.179-185, 1999.
- FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, n.12, p.5119-5123, 1991.
- GONZALEZ, J.M JR; BROWN, B.J; CARLTON, B.C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.79, n.22, p.6951-6955, 1982.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, v.53, n.2, p.242-255, 1989.
- IBARRA, J.E.; DEL RINCON, M.C.; ORDUZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SANCHEZ, J.; PENNA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin América with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n.9, p.5269-5274, 2003.
- JARA, S.; MADUELL, P.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. *Journal of Applied Microbiology*, v.101, n.1, p.117-124, 2006.
- KALMAN, S.; KIEHME, K.L.; LIEBS, J.L; YAMAMOTO, T. Cloning of a novel *cryIC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n.4, p.1131-1137, 1993.
- KIM, H.S. Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. *Current Microbiology*, v.41, n.4, p.250-256, 2000.

- KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, v.24, p.275-308, 1994.
- MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELLO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Coord.). *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1999. v.3, p.163-200.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M.M. Multiplicity of δ -endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Molecular Microbiology*, v.2, n.3, p.393-404, 1988.
- SAUKA, D.H.; COZZI, J.G.; BENINTENDE, G.B. Detection and identification of *cryII* genes in *Bacillus thuringiensis* using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Current Microbiology*, v.52, n.1, p.60-63, 2006.
- TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual review of entomology*, v.39, p.47-79, 1994.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.
- TABASHNIK, B.E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, v.83, n.5, p.1671-1676, 1990.
- URIBE, D.; MARTINEZ, W.; CERÓN, J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.82, n.2, p.119-127, 2003.
- VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; DESOUZA, M.T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I.S., AZEVEDO, J.L. (Coord.). *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1998. v.1, p.201-230.
- VILAS-BÔAS, G.F.L.T. *Diversidade e estrutura genética de populações de Bacillus thuringiensis e de Bacillus cereus*. 2002. 103p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- VILAS-BÔAS, G.T.; LEMOS, M.V. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, v.50, n.8, p.605-613, 2004.
- ZHANG, H.Y.; YU, Z.N.; DENG, W.X. Composition and ecological distribution of *Cry* proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.76, n.3, p.191-197, 2000.

Recebido em 23/2/07

Aceito em 02/10/08

