

Caracterização, Distribuição e Clonagem de Genes *Cry* em Cepas de *Bacillus Thuringiensis* do Banco da EMBRAPA - CNPMS

Fernando Hercos Valiciente^{1*}, Edgard Augusto de Toledo Picoli¹, Maria José Villaça de Vasconcelos¹, Nilton Carneiro¹, Andréia Carneiro¹, Ubiraci G. Lana¹

¹ Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG - 35701-970. * Autor para correspondência: valicent@cnpms.embrapa.br

Palavras chave: “crystal protein”, *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera*, clonagem, milho transgênico,

Insetos como *Spodoptera frugiperda* são responsáveis por perdas significativas na produção de milho, sendo necessário o seu controle que é realizado principalmente pelo uso de inseticidas químicos. O controle biológico e a obtenção de plantas geneticamente modificadas contendo genes de resistência a estes insetos são alternativas a esta prática (Valicente e Barreto, 2003, Praça et al. 2004).

O uso de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) tem se destacado no controle biológico de insetos. O *Bt* é uma bactéria gram-positiva de solo que produz grandes quantidades de proteínas na forma de cristais (δ -endotoxinas). Estas proteínas (Inseticidal Crystal Proteins – ICPs) são tóxicas a uma variedade de insetos entre as ordens Lepidoptera, Diptera, e Coleoptera (Kumar et al. 1996, Schnepf et al. 1998).

Com o advento da biotecnologia, é possível a introdução de genes *cry* (crystal protein) em plantas de milho, dando origem a uma planta geneticamente modificada que apresentam resistência a insetos praga como *S. frugiperda* devido a expressão de proteínas *Bt* (Buntin et al., 2001; Fernandes et al. 2003). Considerando o número de cepas/isolados mantidos nas coleções, o uso de técnicas moleculares pode contribuir para a rápida caracterização e identificação de um grande número de isolados de *B. thuringiensis*.

O presente trabalho foi realizado para a caracterização de cepas, pertencentes ao banco de *Bt* EMBRAPA-CNPMS e que apresentaram taxas de mortalidade maiores que 75% em bioensaios com *S. frugiperda*. Adicionalmente, estas informações foram utilizadas na seleção das cepas utilizadas na clonagem de genes *cryIC* e *cryIF*.

A extração de DNA foi realizada com base no método proposto por Bravo et al. (1998). Uma alçada de bactérias foi transferida para tubos eppendorf contendo 100 μ l de água destilada e autoclavada. Placas com culturas novas, crescidas por 12 a 16 h em estufa a 28°C, foram utilizadas para a retirada desta alçada. Os tubos foram mantidos a -80°C por 10 a 15 min, e em seguida as amostras foram fervidas por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 14.000 rpm, e o sobrenadante utilizado como amostra de DNA, sendo este sobrenadante utilizado em até 48 horas após a extração.

A caracterização das cepas foi realizada com base em PCR utilizando iniciadores específicos (Ceron et al. 1994, 1995) para os genes (*cryIA*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE*, *cryIF* e *cryIG*) que codificam para as proteínas de interesse. Os componentes da reação, ajustada para um volume final de 20 μ L, consistiram de 3 μ l de solução de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 1,25 U Taq DNA polimerase; 0,125 mM dNTPs e 20 pmols de cada iniciador. A amplificação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.), com as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50/53/57 °C por 1 minutos e 72°C por 1

minuto, alongação final a 72°C por 10 minutos, mantendo a reação à 4°C. A temperatura de anelamento dos iniciadores variou de 50 a 57°C dependendo dos pares de utilizados.

Foram avaliadas 166 cepas, onde o gene *cry1D* foi o mais freqüente (58,1%), ao passo que *cry1C* e *cry1F* foram os menos freqüentes nas cepas (1,8%) (Tabela 1). Contrariamente ao presente trabalho, *cry1Ac* foi o gene mais abundante encontrado por Gao et al. (2008) presente em 14,7% dos isolados avaliados por estes autores. Os genes *cry1B* e *cry1E* apresentaram freqüências intermediárias de 13,8 e 14,4%, respectivamente. Dentre as cepas avaliadas, 33 não amplificaram os fragmentos esperados, 103 amplificaram bandas correspondentes a presença de apenas um gene, enquanto 26, 3 e 1 apresentaram um perfil esperado para dois, três e quatro genes, respectivamente (Tabela 2). Os genes *cry1B* e *cry1E* foram, em geral, localizados em uma mesma cepa (Tabela 2). Vale evidenciar que de 41 cepas que apresentaram 100% de mortalidade em *S. frugiperda*, 21 apresentaram um perfil correspondente a presença de mais de um gene *cry1*, 11, 3, 1, 1 e 4 cepas apresentaram somente o gene *cry1D*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1E*, e nenhum dos genes avaliados, respectivamente (dados não apresentados).

Tabela 1 - Caracterização das cepas de *B. thuringiensis* quanto a presença de genes *cry*. P – presença do fragmento de tamanho esperado, A – ausência do fragmento esperado, BI – presença de bandas inespecíficas, FG – freqüência (percentagem) de cepas apresentando o gene (fragmento do gene), FBI – freqüência (percentagem) de cepas apresentando uma ou mais bandas inespecíficas.

rimers	j 01 e cj 02	j 04 e cj 05	j 06 e cj 07	j 08 e cj 09	j 10 e cj 11	j 12 e cj 13	j 14 e cj 15	j 16 e cj 17	j 18 e cj 19
enes	ry1Aa/ cry1Ad	ry1Ab/ cry1Ac	ry1Ac	ry1B	ry1C	ry1D	ry1Ea/ cry1Eb	ry1Fa/ cry1Fb	ry1G
	.0	.0	.0	3.0	.0	7.0	4.0	.0	1.0
	48.0	59.0	59.0	38.0	9.0	8.0	42.0	63.0	07.0
I	6.0	.0	.0	.0	4.0	.0	.0	.0	8.0
G	.2	.2	.0	3.8	.8	8.1	4.4	.8	.6
BI	.6	.0	.2	.0	0.6	.6	.0	.0	8.9

Tabela 2 – Distribuição dos genes *cry1* amplificados por iniciadores específicos, presentes nas cepas de *B. thuringiensis* utilizadas que apresentaram mais de 75% de mortalidade nos bioensaios com *S. frugiperda*.

perfil	número de cepas	perfis dos genes <i>cry</i>	%
1	33	nenhum gene	19,88
2	1	<i>cry1Aa/cry1Ad</i>	0,60
3	4	<i>cry1B</i>	2,41
4	1	<i>cry1C</i>	0,60
5	90	<i>cry1D</i>	54,22
6	2	<i>cry1Ea/cry1Eb</i>	1,20
7	1	<i>cry1Fa/Cry1Fb</i>	0,60
8	4	<i>cry1G</i>	2,41
9	1	<i>cry1Ab/cry1Ac</i> e <i>cry1Fa/Cry1Fb</i>	0,60
10	2	<i>cry1Ab/cry1Ac</i> e <i>cry1Ea/cry1Eb</i>	1,20
11	2	<i>cry1Ab/cry1Ac</i> e <i>cry1G</i>	1,20
12	1	<i>cry1B</i> e <i>cry1G</i>	0,60
13	1	<i>cry1C</i> e <i>cry1D</i>	0,60
14	13	<i>cry1Bb</i> e <i>cry 1Ea/cry1Eb</i>	7,83
15	5	<i>cry1D</i> e <i>cry1Ea/cry1Eb</i>	3,01
16	1	<i>cry1Fa/Cry1Fb</i> e <i>cry1G</i>	0,60
17	1	<i>cry1Ab/cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry1G</i>	0,60
18	1	<i>cry1Aa/cry1Ad</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry1G</i>	0,60
19	1	<i>cry1B</i> , <i>cry1Ea/cry1Eb</i> e <i>cry1G</i>	0,60
20	1	<i>cry1Ab/cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> , <i>cry1C</i> e <i>cry1D</i>	0,60
total	166		100,00

Iniciativas semelhantes de caracterização de coleções de *B. thuringiensis* foram realizadas com sucesso na obtenção de informações papel de *Bt* no ambiente e da distribuição dos genes *cry* entre os isolados (Bravo et al. 1998, Uribe et al. 2003, Gao et al. 2008). Gao et al. (2008) obtiveram frequências que variaram de 0,4 a 14,7% de cepas de *Bt* apresentando genes *cry1Ac* e combinações de outros genes *cry1*, contudo de um total de 570 isolados, 46,5% não apresentaram produtos de amplificação para nenhum dos genes *cry* avaliados. Uribe et al. (2003) encontraram 17,8% de isolados de *Bt* oriundos da Colômbia que também não amplificaram fragmentos correspondentes aos genes *cry*, enquanto os perfis observados variaram de 1 a mais de cinco genes *cry* com frequências que variaram de 11,67 a 0,56% entre as cepas avaliadas. Interessante foi que a maior frequência foi observada para cepas contendo os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry1B* (Uribe et al. 2003).

Com base nas seqüências disponíveis no banco de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), novos iniciadores foram sintetizados no intuito de se clonar genes *cry1C* e *cry1F*, a serem utilizados na transformação genética de milho. O desenho dos iniciadores foi realizado observando seqüências conservadas no alinhamento dos genes próximas ao início (ATG) e ao final dos genes (TAG ou TAA). Adicionalmente, um sítio de restrição da enzima Bam HI foi adicionado à extremidade 5' dos iniciadores. Os ciclos do programa para a amplificação do gene foram alterados para as seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 4 minutos. Para as reações visando a clonagem dos genes foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen).

As bandas amplificadas que estavam de acordo com o tamanho esperado (aproximadamente 3.500 pb) foram purificadas do gel com o kit “QIAquick Gel Extraction

Kit“ (Qiagen, Valencia, CA) e seqüenciados com kit “Big Dye Terminator v3.1” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), clonadas em vetor (TOPO TA Cloning® pCR 2.1) e transformadas em células competentes. Foram obtidas colônias contendo clones dos genes *cryIF*, *cryICa* e *cryICb*, para duas das cepas utilizadas. O plasmídeo contendo o fragmento correspondente aos genes *cry* foi extraído, e as amostras de DNA submetidas a seqüenciamento no seqüenciador ABI3100 (Applied Biosystems). A qualidade das seqüências avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI) e as seqüências analisadas com o programa BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), selecionando o programa nucleotide blast, e alinhadas pelo programa ClustalW.

O seqüenciamento das extremidades 5’ e 3’, e a tradução dos fragmentos obtidos, permitiram a confirmação da identidade dos genes (Figuras 1 e 2). Algumas das seqüências amplificadas com os iniciadores para a clonagem do gene inteiro, obtidas a partir de cepas que apresentaram bandas inespecíficas na caracterização (Figura 3), também amplificaram fragmentos de tamanho esperado para os genes *cryIC* (Figura 4) e *cryIF*, e apresentaram similaridade com outros genes *cryI*. Isto sugere a possibilidade da presença de outros genes similares com tamanhos diferentes, ou a condições de temperatura que tenham permitido um pareamento parcial dos iniciadores e amplificação dos fragmentos.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Z22512.1	B.thuringiensis encoding crystal protein	641	641	90%	0.0	97%	
AF336114.1	Bacillus thuringiensis crystal delta-endotoxin (<i>cry1Fb</i>) gene, complete cds	641	641	90%	0.0	97%	
AB012288.1	Bacillus thuringiensis gene for CryINA67-1, complete cds	641	641	90%	0.0	97%	
AF062350.1	Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni crystal protein Cry1Fb (<i>cry1Fb</i>) gene, complete cds	630	630	90%	4e-178	97%	
M63897.1	Bacillus thuringiensis insecticidal crystal protein (<i>CryIF</i>) gene, complete cds	630	630	90%	4e-178	97%	
M73254.1	Bacillus thuringiensis (<i>cryIF</i>) gene, complete CDS	630	630	90%	4e-178	97%	

Figura 1 – Comparação da seqüência 5’ da banda amplificada com os iniciadores desenhados com base nas seqüências próximas ao início do gene (ATG) para o gene *cryIF*, cepa 3926, utilizando o programa Nucleotide Blast.

Outros possíveis genes *cryICa* foram amplificados para a cepa 1644, e *cryICa* para as cepas BTX e 3926, porém, não foi obtido sucesso na clonagem destes genes e/ou na transformação em células competentes. As reações realizadas para amplificar o gene inteiro com as cepas que apresentaram 100% de mortalidade das lagartas, porém, que não amplificaram o fragmento esperado para os respectivos genes, também não amplificaram o fragmento correspondente aos genes *cryIC* e *cryIF*.

O início dos genes foi clonado corretamente conforme exemplificado para o gene *cryIF* e *cryIC*, contudo, apesar das seqüências serem similares aos genes disponíveis no banco de dados, o alinhamento nos permitiu verificar a falta de uma porção da extremidade 5’ para os genes clonados. Ainda assim, o alinhamento da seqüência consenso com os genes disponíveis, comparação com as informações do banco de dados (Figura 1) e a tradução destas seqüências (Figura 2) nos sugerem que as seqüências clonadas se tratam dos genes *cryIC* e *cryIF* de interesse.

A clonagem dos genes *cry* a partir de outras cepas de *Bt*, o seqüenciamento das seqüências obtidas, e a construção dos vetores de expressão estão em andamento visando a obtenção de genes, ou fragmentos destes, a serem utilizados na transformação genética de milho.

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gb AAF37224.1 AF215647.1 toxin Cry1Ca6 [Bacillus thuringiensis]	347	2e-94
gb AAM00264.1 AF362020.1 insecticidal protein Cry1Ca [Bacillu...]	347	2e-94
gb AAK53094.1 insecticidal crystal protein Cry1C [Bacillus t...]	347	2e-94
emb CAA65457.1 delta-endotoxin [Bacillus thuringiensis]	347	2e-94
gb AAA22343.1 cry1C(b)	347	2e-94
sp POA376 CR1CA_BACTA Pesticidal crystal protein cry1Ca (Inse...)	347	3e-94
gb AAR14533.1 Cry1C [Chloroplast transformation vector pN-IC...]	347	3e-94
emb CAA31951.1 unnamed protein product [Bacillus thuringiensis]	346	3e-94
pir JC7140 prototoxin - Bacillus thuringiensis	346	3e-94
emb CAA67557.1 delta-endotoxin [synthetic construct]	346	4e-94
sp POA375 CR1CA_BACTE Pesticidal crystal protein cry1Ca (Inse...)	345	9e-94
sp PS6953 CR1CB_BACTG Pesticidal crvstal protein crv1Cb (Inse...)	322	8e-87

Figura 2 – Tradução do fragmento consenso 5' do gene *cry1C* (oriundo da cepa 1644) e comparação com o banco de dados.

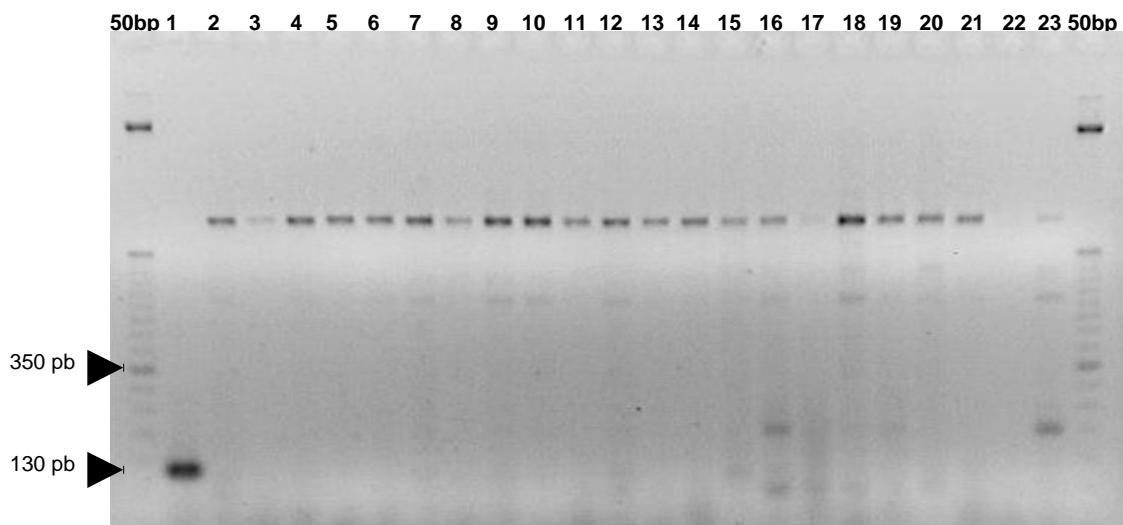


Figura 3 – Gel de agarose apresentando o padrão eletroforético diferentes cepas de *B. thuringiensis* (cepas numeradas de 1 a 23 correspondem respectivamente às cepas 1644, 1944, 1945, 1946, 1948, 1953, 1954, 1956, 1974, 1980, 2051, 2052, 2054, 2060, 2884, 2885, 2886, 2887, 2902, 2915, 2952, 3307, e 3743) em reações visando amplificar um fragmento do gene *cry1C*. 50 bp – marcador de peso molecular 50bp DNA ladder. Observar o controle positivo com um fragmento com 130 pb e outros fragmentos inespecíficos amplificados.

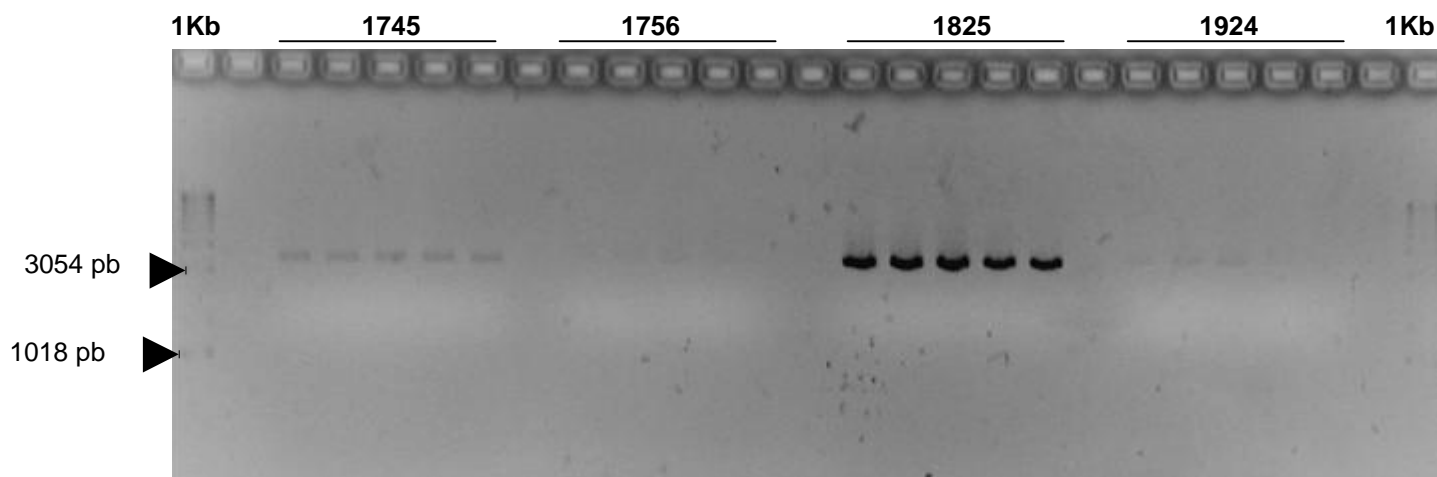


Figura 4 – Gel de agarose apresentando a amplificação do gene *cry1Ca* em reação *cry1CaF* manual e *cry1CaR* manual utilizando Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity para as cepas que apresentaram ampliações inespecíficas para o gene *cry1C* (1745, 1756, 1825 e 1924). 1Kb – marcador de peso molecular.

Referências bibliográficas

- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVIEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑES-VALDEZ, M-E.; SOBERÓN, M. e QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4965-4972, 1998.
- BUNTIN, G. D.; LEE, D.; WILSON, D. M. e MCPHERSON, R. M. Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 84, p. 37-42, 2001.
- CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L., e BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal cristal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 353-356, 1994.
- CERÓN, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECAL, L. e BRAVO, A. Specific PCR primers to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3826-3831, 1995.
- FERNANDES, O. D.; PARRA, J. R. P.; NETO, A. F.; PÍCOLI, R.; BORGATTO, A. F. e DEMÉTRIO, C. G. B. Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, p. 25-35, 2003.
- GAO, M.; LI, R.; DAI, S.; WU, Y. e YI, D. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. **Biological Control**, v. 44, p. 380-388, 2008.
- KUMAR, P. A.; SHARMA, R. P. e MALIK, V. S. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 42, p. 1-43, 1996.
- PRACA, L. B.; BATISTA, A. C. e MARTINS, É. S.. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 11-16, 2004.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R. e DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.
- URIBE, D.; MARTINEZ, W. e 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, p. 119-127, 2003.
- VALICENTE, F. H. e 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.