

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 180

ISSN 1676 - 1340
Dezembro, 2007

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS CONTRA LEPIDÓPTEROS
(Characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains active against lepidopteran)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 180

**CARACTERIZAÇÃO DE DUAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS CONTRA LEPIDÓPTEROS
(Characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains active against lepidopteran)**

J.O. Silva-Werneck

D.J. Ellar

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Serviço de Atendimento ao Cidadão
Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –
Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica:

1ª edição

1ª impressão (2007):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

S 586 Silva-Werneck, J. O.

Caracterização de duas estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra lepidópteros (Characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains active against lepidopteran) / J.O. Silva-Werneck, D.J. Ellar. -- Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007.

29 p. -- (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 180).

1. *Bacillus thuringiensis* - *Bacillus* entomopatogênicos - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2. *Anticarsia gemmatalis* - lagarta da soja. 3. *Bacillus thuringiensis* - toxinas Cry. 4. Controle biológico. I. Ellar, D. J. II. Título. III. Série. 579.362 - CDD 21.

CARACTERIZAÇÃO DE DUAS ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* ATIVAS CONTRA LEPIDÓPTEROS
(Characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains active against lepidopteran)

J.O. Silva-Werneck¹

D.J. Ellar²

Resumo

As estirpes S550 e S725 de *Bacillus thuringiensis*, pertencentes à Coleção de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram selecionadas por sua toxicidade para a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). A estirpe S550 produz cristais bipiramidais, cúbicos e esféricos compostos por proteínas de 130 e 65 kDa que são reduzidas a um fragmento de aproximadamente 65 kDa, após ativação por tripsina. Uma proteína Cry1Ac foi identificada por imunodeteccção e confirmada por sequenciamento N-terminal de proteínas (100% de identidade com Cry1Ac). A estirpe S725 produz cristais esféricos compostos por uma proteína de aproximadamente 130 kDa que forma fragmentos entre 50 e 70 kDa após ativação por tripsina. Esta proteína apresenta imunoafinidade e alto grau de homologia com δ -endotoxinas da classe Cry9. Prospecção do DNA de S725 por PCR revelou que a estirpe contém, além de *cry9Bb*, genes *cry11* e *vip3*. Análise de transcrição, através de RT-PCR, mostrou que o gene *cry11* é transcrito em baixos níveis nos estágios T₂ e T₅ da esporulação.

Termos para indexação: *Bacillus thuringiensis*, toxinas Cry, genes *cry*, *Anticarsia gemmatilis*, *Spodoptera frugiperda*, *Manduca sexta*.

¹ Engenheira Agrônoma – PhD em Biologia Molecular – Pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – joseilde@cenargen.embrapa.br

² Biólogo – Pós-Doutor – Pesquisador e Professor - Department of Biochemistry, University of Cambridge, Inglaterra.

Abstract

The *Bacillus thuringiensis* strains S550 and S725, belonging to the Collection of entomopathogenic *Bacillus* of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, were selected for their toxicity to the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). The strain S550 produces bypyramidal, cuboidal and spherical crystals that show two major protein bands of around 130 and 65 kDa, which are reduced to a fragment around 65 kDa upon trypsin activation. A Cry1Ac protein was detected by immunoblotting and confirmed by N-terminal sequencing (100% identity with Cry1Ac). The strain S725 produces spherical crystals showing a major protein of about 130 kDa which yields fragments of between 50 and 70 kDa upon trypsin activation. This protein presents immunoafinity and high level of homology with Cry9 class of δ -endotoxins. PCR screening revealed that in addition to *cry9Bb*, the strain S725 also contains *cry1I* and *vip3* genes. Transcription analysis, using RT-PCR, showed that the *cry1I* gene is transcribed at low levels at T₂ and T₅ stages of sporulation.

Introdução

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria cosmopolita, Gram positiva, que produz inclusões protéicas cristalinas durante o processo de esporulação. Estes cristais são compostos por uma ou mais δ -endotoxinas (proteínas Cry ou proteínas Cyt) (HÖFTE e WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998), as quais são tóxicas para insetos de diferentes ordens como Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (KRIEG e LANGENBRUCH, 1981; DE MAAGD et al., 2003), e outros invertebrados como nematóides (EDWARDS et al., 1990; FEITELSON et al., 1992; KOTZE et al., 2005), protozoários (FEITELSON et al., 1992) e ácaros (PAYNE et al., 1994). As δ -endotoxinas são específicas a certos insetos e invertebrados, não afetando insetos não-alvo, plantas, vertebrados e o meio ambiente (KRIEG e LANGENBRUCH, 1981; SCHNEPF et al., 1998). Bioinseticidas à base de proteínas Cry com diferentes espectros de ação vêm sendo utilizados no controle de vários insetos-praga e vetores de doenças há mais de quatro décadas (FEITELSON et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998). Eles constituem uma alternativa viável ao uso de pesticidas químicos na agricultura, manejo florestal e controle de mosquitos (SCHNEPF et al., 1998).

Isolados de *B. thuringiensis* têm sido obtidos de muitos "habitats" como solo, água, folhas, insetos mortos e grãos armazenados (MARTIN e TRAVERS, 1989; BERNHARD et al., 1997). Programas de prospecção de isolados de Bt são mantidos por laboratórios em todo o mundo e têm levado a um espectro de atividade de toxinas mais amplo, como resultado do isolamento de novas estirpes de Bt com diferentes combinações de proteínas, ou possuindo novas toxinas.

Além da produção de δ -endotoxinas, muitas estirpes de Bt também produzem outros fatores de virulência durante seu ciclo de crescimento, os quais contribuem para sua atividade inseticida (DE MAAGD et al., 2001). As toxinas Vip, por exemplo, são produzidas durante o estágio de crescimento vegetativo e secretadas no sobrenadante da cultura por muitas estirpes de Bt (ESTRUCH et al., 1996; ESTRUCH et al., 1997). Estas proteínas são tóxicas para certas espécies de coleópteros (Vip1 e Vip2) ou para uma gama de insetos lepidópteros (Vip3) (ESPINASSE et al., 2003).

Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia são realizados bioensaios para avaliar a patogenicidade de isolados de Bt pertencentes à Coleção de *Bacillus* entomopatogênicos contra várias ordens de insetos. Duas estirpes de *B. thuringiensis*, S550 e S725, foram selecionadas por sua atividade contra larvas de lepidópteros. Ambas as estirpes mostraram elevada toxicidade para a lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). A estirpe S550 também mostrou elevada toxicidade para a lagarta do cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). A fim de se identificar os genes e

proteínas responsáveis pela toxicidade, as estirpes foram caracterizadas por técnicas bioquímicas e moleculares.

Material e métodos

Estirpes e condições de cultivo

As estirpes de *B. thuringiensis* S550 e S725 foram isoladas de amostras de solo de Corumbá (MT) e da Reserva Ecológica de Águas Emendadas (DF), respectivamente, e estão armazenadas na Coleção de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (MONNERAT et al., 2001). S725 foi sorotipada como subespécie *japonensis* (H23). As estirpes padrões *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* (Btk) HD-1, Btk HD-73, Bt subesp. *tenebrionis* (Btt), Bt JC292, Bt 4412, e outras estirpes de Bt usadas como controles em PCR e imunodeteção foram obtidas da coleção do laboratório do Prof. David Ellar (Departamento de Bioquímica, Universidade de Cambridge, Inglaterra). As estirpes de Bt foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001), ou CCY – meio de esporulação de Bt (STEWART et al., 1981), a 30 °C, com agitação a 200 rpm, ou em placas de LB-ágar, NYSM-ágar (YOUSTEN, 1984) ou CCY-ágar.

Método rápido de preparo de inclusões

As proteínas dos cristais das estirpes foram preparadas por um método rápido. Em síntese, uma a três colônias bacterianas, crescidas por 48 horas em CCY-ágar, foram transferidas para 1 ml de NaCl 0.5 M gelado e misturadas em vórtex. A suspensão foi centrifugada a 14.000 x g por 5 minutos (centrífuga Anachem Hyspin 16K), o sedimento foi ressuspendido em 140 μ l de SDS 1% (m/v), β -mercaptoethanol 0.01% (v/v) e fervido por 10 minutos. Após centrifugação a 14.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi coletado e analisado por SDS-PAGE a 13% (eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS). O gel foi corado com Coomassie blue R-250.

Purificação de cristais

Os cristais de Bt foram purificados em gradiente descontínuo de sacarose (THOMAS e ELLAR, 1983) nas concentrações de 2,55, 2,3 e 1,97 M sacarose. A centrifugação foi feita a 37.000 x g por 14-16 h, a 4 °C (Beckman-Coulter Optima L-100 XP, rotor SW28). A concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951),

usando BSA (albumina de soro bovino) como padrão. Os cristais foram distribuídos em alíquotas em tubos de 1,5 ml (Eppendorf) e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Algumas alíquotas de cristais contendo 1 mg de proteína foram liofilizadas (liofilizador Micromodulyo E-C). Os cristais foram armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Microscopia dos cristais

Suspensões esporos-cristais e cristais purificados das estirpes de Bt S550 e S725 foram observados e fotografados em microscópio de contraste de fases (Nikon Optiphot) com aumento de 1000x. Para microscopia eletrônica de varredura, suspensões de cristais de S725 foram depositadas sobre suportes de alumínio e secas ao ar. Em seguida, os cristais foram cobertos com 10 nm de Au/Pd, usando um metalizador Polaron E5100, observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de varredura Philips XL30 FEG. Suspensões de cristais de S550 liofilizados foram depositadas sobre suportes metálicos, secas ao ar, cobertas com ouro por 180 segundos, utilizando metalizados Emitech K550, e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss DSM 962.

Solubilização e ativação das toxinas

Cristais das estirpes S550 e S725 foram sedimentados a 14.000 x g (centrífuga Anachem Hypsin 16K) por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sedimento ("pellet") foi ressuscitado em tampão de solubilização [50 mM Na_2CO_3 , 10 mM DTT (dithiothreitol)], pH alcalino, na concentração de 1 mg/ml, e incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. O pH do tampão de solubilização dependia das condições do ensaio e foi de 8,5; 9,0; 9,5 ou 10,5. O material insolúvel foi removido por centrifugação a 14.000 x g , por 10-15 min, à temperatura ambiente. A concentração da proteína solubilizada foi determinada pelo método de Bradford (1976), com o reagente Bio-Rad, e usando BSA como padrão. A proteína solubilizada foi ativada por tripsina-TPCK (Sigma) a taxas de 1:1, 1:2 ou 1:10 (m/m) de tripsina: toxina, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Após incubação, o material insolúvel foi removido e a concentração protéica determinada pelo método de Bradford, usando BSA como padrão. As proteínas solubilizadas e ativadas foram analisadas por SDS-PAGE e o gel corado com "Comassie blue".

Imunodeteccção de proteínas Cry

Proteínas de cristais purificados foram separadas em SDS-PAGE 12% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (Pall corporation) pelo método de Towbin et al. (1979). Toxinas Cry foram detectadas com anticorpos policlonais anti-Cry1Ac, Cry1B, Cry2A e

Cry9C, seguidos de anticorpos secundários conjugados “goat anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated (Sigma)”. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos 1:1000 em 3% (m/v) leite em pó desnatado em TTS [20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20]. A membrana foi incubada em tampão de bloqueio [3% (m/v) leite em pó desnatado em TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl)] com agitação suave, por 1 hora à temperatura ambiente e, então, incubada com o anticorpo primário, seguido pelo anticorpo secundário, por 1 hora cada. A detecção foi feita com solução fresca de 30 mg de 4-chloro-1-naphtol em 10 ml de metanol, 40 ml de TBS, 100 µl de 30% peróxido de hidrogênio ou com DAB (Sigma “Fast 3,3 Diaminobenzidine”) de acordo com as instruções do fabricante.

Sequenciamento N-terminal de proteínas Cry

Preparações de proteínas ativadas foram submetidas a SDS-PAGE a 7,5 ou 10%. As bandas de proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Applied Biosystems). Depois de lavagem em dH₂O por 10 minutos, a membrana foi corada com 0.1% (w/v) Coomassie blue R-250 em 50% (v/v) metanol, 1% (v/v) ácido acético. Em seguida, a membrana foi descorada em 50% metanol e lavada duas vezes em dH₂O. A membrana foi seca ao ar, as bandas de proteína selecionadas foram cortadas e as sequências N-terminal determinadas (“Protein and Nucleic Acid Chemistry Facility, Department of Biochemistry, University of Cambridge”).

Bioensaios

Bioensaios com cristais da estirpe S725, foram realizados contra insetos da ordem Lepidoptera (*Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Manduca sexta*, *Mamestra brassicae*, *Pieris brassicae*, e *Trichoplusia ni*), Coleoptera (*Anthonomus grandis*) e Diptera (*Aedes aegypti*). Todas as espécies foram testadas no estágio larval, usando metodologias estabelecidas.

Bioensaios com *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*

A. gemmatalis e *S. frugiperda* foram mantidos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR, e fotoperíodo de 14: 10 horas (luz: escuro), em dieta artificial (MONNERAT et al., 2007). Os bioensaios foram realizados conforme descrito por Monnerat et al. (2007), usando suspensão de cristais da estirpe S725 nas concentrações finais de $21,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $2,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *A. gemmatalis* e $17,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e $1,75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *S. frugiperda*.

Bioensaios com *Manduca sexta*

Ovos de *M. sexta* (lagarta da folha do fumo) foram fornecidos pelo "Department of Biology and Biochemistry, University of Bath, UK" e incubados em dieta artificial (BELL e JOACHIM, 1976) a 26 °C, com fotoperíodo de 16: 8 h (luz: escuro). Os bioensaios foram realizados como descrito anteriormente (VILCHEZ et al., 2004), com algumas modificações. A dieta (500 µl) foi vertida em cada poço de uma placa de cultura de células de 48 poços (Costar). Vinte µl de uma suspensão de cristais de S725 a 1 mg/ml foram aplicados na superfície da dieta sólida em cada um de 24 poços (concentração final de 20 µg/cm²). Como controle positivo, foi usada suspensão de cristais de Btk HD-73 (Cry1Ac) a 100 ng/cm². No controle negativo, a suspensão de cristais foi substituída por dH₂O estéril. Após secagem, uma larva neonata de *M. sexta* foi colocada em cada poço, as placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas a 26 °C, fotoperíodo de 16: 8 h (luz: escuro), por 5 dias. A porcentagem de mortalidade média para 3 bioensaios foi obtida.

Bioensaios com *Mamestra brassicae* e *Pieris brassicae*

Ovos de *M. brassicae* (lagarta do repolho) e de *P. brassicae* (borboleta branca da couve) foram fornecidos pelo "Centre for Ecology and Hydrology (CEH), Oxford, UK" e "Warwick Horticulture Research International, Warwick University, UK", respectivamente. As larvas foram mantidas em dieta artificial (LIGHTWOOD, 1999), nas condições descritas para *M. sexta*. Nos bioensaios com *M. brassicae* e *P. brassicae* foram usados os mesmos procedimentos descritos para bioensaios com *M. sexta*, exceto que para *M. brassicae*, uma suspensão de cristais compostos por Cry1Ca a 200 ng/cm² foi usada como controle positivo.

Bioensaios com *A. grandis*

Bioensaios com *A. grandis* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. V. Sanchis (Instituto Pasteur, Paris, França). Uma suspensão de cristais da estirpe S725 foi incorporada em dieta artificial (ESPINASSE et al., 2003), em placas de cultura de células de 24 poços, nas concentrações de 60 µg/ml e 120 µg/ml de toxina. A mortalidade de larvas neonatas foi verificada após 3 semanas e a porcentagem de mortalidade calculada para duas repetições.

Bioensaios com *Trichoplusia ni*

Bioensaios com o lepidóptero *T. ni* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. Jorge Ibarra (CINVESTAV-IPN, Irapuato, México). Pequenos pedaços de papel com aproximadamente 100 ovos de *T. ni* colados por pedaço, foram submersos em 2 ml de uma suspensão de cristais de S725 a 1 mg/ml de toxina, contendo Tween 80 a 0,05%. Após secagem, os papéis foram colocados em uma placa de Petri com uma pequena quantidade de dieta. Ao emergirem, as larvas consumiam toxina junto com o córion. Como controle positivo, usou-se uma suspensão de cristais de Btk HD-1, e como controle negativo, usou-se uma solução de Tween 80 a 0,05%. A mortalidade foi verificada 5 dias após o tratamento e expressa em porcentagem.

Bioensaios com *Aedes aegypti*

Bioensaios com o mosquito *A. aegypti* foram gentilmente realizados pelo grupo do Dr. Jorge Ibarra (CINVESTAV-IPN, Irapuato, México). Vinte larvas de 4º instar foram colocadas em 100 ml de água de clorinada, e 200 µl de uma suspensão de cristais a 1 mg/ml, contendo Tween 80 a 0,05%, foram adicionados. Uma suspensão de cristais de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (Bti) foi usada como controle positivo, e Tween 80 a 0,05% como controle negativo. A mortalidade foi verificada 24 horas após o tratamento.

PCR

O DNA total das estirpes S550 e S725 e das estirpes usadas como controle em PCR foi extraído por um método rápido descrito por Bravo e colaboradores (BRAVO et al., 1998). O DNA de S550 e S725 foi primeiramente analisado por PCR para a presença de genes da classe *cry9* com oligonucleotídeos ("primers") gerais para *cry9* e específicos para *cry9Ea*, desenhados usando o programa Vector NTI (Stratagene), e oligonucleotídeos para *cry9A*, *cry9B* e *cry9C* descritos por Bravo et al (BRAVO et al., 1998). A estirpe S725 também foi investigada para a presença de genes que codificam para outras proteínas ativas para lepidópteros e coleópteros. Foram usados oligonucleotídeos gerais para genes *cry1*, e específicos para *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1F*, *cry1G*, *cry1I*, *cry2A*, *cry3*, *cry7Aa*, *cry7Ab*, *cry8* e *vip3*, descritos na tabela 1. Foram adicionados 15 µl do sobrenadante obtido na extração como DNA molde à mistura de PCR contendo tampão de *Taq* DNA Polimerase 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP mix 0,2 mM, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), em um volume final de 50 µl. As reações foram realizadas em um termociclador Techne, modelo Progene, com as seguintes condições gerais: desnaturação inicial a 94 ou 95 °C por 2 min., seguida de

30 ciclos a 94 ou 95 °C por 1 min., temperatura de anelamento (Tabela 1) por 1 min., 72 °C por 1min., e extensão final a 72 °C por 5 min. Para os oligonucleotídeos cry9E, cry9gen, spe-cry9A, spe-cry9B e spe-cry9C as condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min., seguida de 25 ciclos a 94 °C por 1 min., temperatura de anelamento por 30 seg., 72 °C for 1min., e extensão final a 72 °C por 5 min. Uma amostra de 15 µl de cada produto foi submetida a eletroforese em gel de agarose, o qual foi corado com brometo de etídeo. Os genes identificados, as seqüências dos oligonucleotídeos e as temperaturas de anelamento estão descritos na Tabela 1.

Purificação de RNA

O RNA total da estirpe S725 e da estirpe controle Bt aizawai HD-133 foi purificado usando o método do fenol ácido quente, descrito a seguir. Uma amostra de 50 ml da cultura em LB foi coletada na fase exponencial média e nos estágios T₂ e T₅ da esporulação (determinados a partir das curvas de crescimento), e adicionado a igual volume de fenol ácido: clorofórmio (5:1), pH 4,5 (Ambion), em um banho-maria a 95-100 °C. Os tubos foram agitados intermitentemente por 10 min., depois resfriados em gelo por 10 min. Após centrifugação a 8000 x g (centrífuga Beckman Coulter, rotor JA14) por 20 min., a 4 °C, a camada aquosa foi extraída com 1 volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), pH 6,6 (Ambion). A etapa de centrifugação foi repetida. A camada aquosa foi transferida para um novo tubo e precipitada com 1/10 volume de acetado de sódio 3 M, pH 5,5, e dois volume de etanol 100%. Após incubação a – 20 °C durante a noite, a amostra foi centrifugada a 9000 x g (centrífuga Beckman Coulter, rotor JA 14) por 30 min., a 4°C. O sedimento foi lavado em etanol 70% em dH₂O tratada com Dietil pirocarbonato (dH₂O-DEPC), seco ao ar e, em seguida, dissolvido em dH₂O-DEPC. As amostras de RNA foram tratadas com DNase RQ1-sem RNase (Promega) e purificadas usando o “RNeasy mini kit” (Qiagen). A concentração e pureza do RNA foi estimada usando o “GeneQuant RNA/DNA calculator” (Pharmacia Biotech).

Análise de transcrição de *cry1I*

Análise da transcrição do gene *cry1I* foi feita através de RT-PCR (Transcriptase reversa-PCR) usando RNA total da estirpe S725 e de Bt subesp. *aizawai* estirpe HD-133, usada como controle. Os RNA foram extraídos na fase exponencial média e nos estágios T₂ (2 horas após o início da esporulação) e T₅ (5 horas após o início da esporulação). Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi misturado com 1 µl do oligonucleotídeo 1I(r) 10 µM (específico para *cry1I*) em um volume final de 11 µl de dH₂O-DEPC. As amostras foram desnaturadas por incubação a 70°C por 10 min., e rapidamente resfriadas em gelo. Foram adicionados enzima M-MLV-RT (Promega), tampão de M-MLV-RT, dNTPs 10 mM, e dH₂O-DEPC, em um volume de 9 µl e a mistura foi incubada a 42 °C por 1 h. Para a PCR,

2 µl de cDNA foram usados na reação (25 µl) com os oligonucleotídeos 1l(d)/1l(r) (Tabela 1).

Tabela 1. Características de oligonucleotídeos usados para detectar genes *cry* e *vip3* no DNA das estirpes S550 e S725 de *B. thuringiensis*.

Oligonucleotídeos	Gene identificado	Produto (pb)	Ta* (°C)	Sequência (5' → 3')	Nome original do oligonucleotídeo e referência
cry1(d) cry1(r)	<i>cry1</i>	543 - 594	52,0	CTGGATTTACAGGTGGGGATAT TGAGTCGCTTCGCATATTTGAT	gral-cry1(d)/ (r) Bravo et al., 1998
CJ1 CJ2	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ad</i>	246	47,0	TTATACTTGGTTCAGGCCC TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	CJ1/CJ2 Cerón et al., 1994
CJ3 CJ2	<i>cry1Ad</i>	171	47,0	CAGCCGATTTACCTTCTA TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	CJ3/CJ2 Cerón et al., 1994
CJ4 CJ5	<i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i>	216	47,0	AACAACATCTGTTCTTGAC CTCTTATTATACTTACACTAC	CJ4/CJ5 Cerón et al., 1994
CJ6 CJ7	<i>cry1Ac</i>	180	47,0	GTTAGATTAATAGTAGTGG TGTAGCTGGTACTGTATTG	CJ6/CJ7 Cerón et al., 1994
1BCJ8 1BCJ9	<i>cry1B</i>	367	47,0	CTTCATCACGATGGAGTAA CATAATTTGGTCGTTCTGTT	CJ8/CJ9 Cerón et al., 1994
CJ10 CJ11	<i>cry1C</i>	130	47,0	AAAGATCTGGAACACCTTT CAAACCTCTAAATCCTTTCAC	CJ10/CJ11 Cerón et al., 1994
CJ12 CJ13	<i>cry1D</i>	290	47,0	CTGCAGCAAGCTATCCAA ATTTGAATTGTCAAGGCCTG	CJ12/CJ13 Cerón et al., 1994
CJ14 CJ15	<i>cry1E</i>	147	52,0	GGAACCAAGACGAACTATTGC GGTTGAATGAACCCTACTCCC	CJ14/CJ15 Cerón et al., 1995
CJ16 CJ17	<i>cry1F</i>	177	52,0	TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC CGGTTACCAGCCGTATTTCCG	CJ16/CJ17 Cerón et al., 1995
CJ18 CJ19	<i>cry1G</i>	235	52,0	ATATGGAGTGAATAGGGCG TGAACGGCGATTACATGC	CJ18/CJ19 Cerón et al., 1995
1l(d) 1l(r)	<i>cry1I</i>	1137	47,0	ATGAAACTAAAGAATCCAGA AGGATCCTTGTGTTGAGATA	V (+)/V(-) Masson et al., 1998
cry2A(d) cry2A(r)	<i>cry2A</i>	308	45,0	CCTCCCTCCTTTATCAAC GCACAGATACCAAATAGGC	Cry2A/Cry2B De-Souza et al., 1999
cry3(d) cry3(r)	<i>cry3</i>	652- 733	48,0	TTAACCGTTTTTCGCAGAGA TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	CJIII20/CJIII21 Cerón et al., 1995
cry7(d) cry7Aa	<i>cry7Aa</i>	535	48,0	CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC CCTATTCTTTCATTTTGACC	CJIIIcte22/ CJIIIC25

Oligonucleotídeos	Gene identificado	Produto (pb)	Ta* (°C)	Sequência (5' → 3')	Nome original do oligonucleotídeo e referência
					Cerón et al., 1995
cry7(d) cry7Ab	<i>cry7Ab</i>	211	48,0	CAATCCCAGTGTTTACTTGGAC AGTGGAGAGTTTACGGTAGCC	CJIIIcte22/ CJIIICg26 Cerón et al., 1995
cry8(d) cry8(r)	<i>cry8</i>	373- 376	49,0	ATGAGTCCAAATAATCTAAATG TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTC G	gral-cry8(d)/ (r) Bravo et al., 1998
cry9gen (d) cry9gen (r)	<i>cry9</i>	504	51,0	CACCATCATAAAGTCCATCTTGT G GACAAGATTTTGAGCGTCCATAA T	cry9gen (d)/(r) Este trabalho
spe-cry9A (d) spe-cry9(r)	<i>cry9A</i>	571	50,0	GTTGATACCCGAGGCACA CCGCTTCCAATAACATCTTTT	spe-cry9A(d)/spe- cry9(r) Bravo et al., 1998
spe-cry9B (d) spe-cry9(r)	<i>cry9B</i>	402	50,0	TCATTGGTATAAGAGTTGGTGAT AGAC CCGCTTCCAATAACATCTTTT	spe-cry9B(d)/spe- cry9(r) Bravo et al., 1998
spe-cry9C (d) spe-cry9(r)	<i>cry9C</i>	306	50,0	CTGGTCCGTTCAATCC CCGCTTCCAATAACATCTTTT	spe-cry9C(d)/spe- cry9(r) Bravo et al., 1998
cry9E (d) cry9E (r)	<i>cry9Ea</i>	452	51,0	ACAGCTCCAACAATAATAGC CTATCCGCAGTAATTGTGTTC	cry9E (d)/(r) Este trabalho
vip3-F vip3-R	<i>vip3</i>	678	53,0	ACATCCTCCCTACACTTTCTAATA C TCTTCTATGGACCCGTTCTCTAC	vip3-fw/vip3-rev Espinasse et al., 2003

* Ta = temperatura de anelamento

Resultados

Perfil protéico

A análise de SDS-PAGE-13% dos cristais da estirpe S550 mostrou que os mesmos possuem proteínas de aproximadamente 130 e 65 kDa, enquanto os cristais de S725 possuem uma proteína de aproximadamente 130 kDa (Fig. 1). As proteínas dos cristais das estirpes Btk HD-1 e Bt subesp. *tenebrionis* (Btt) foram usadas como referência.

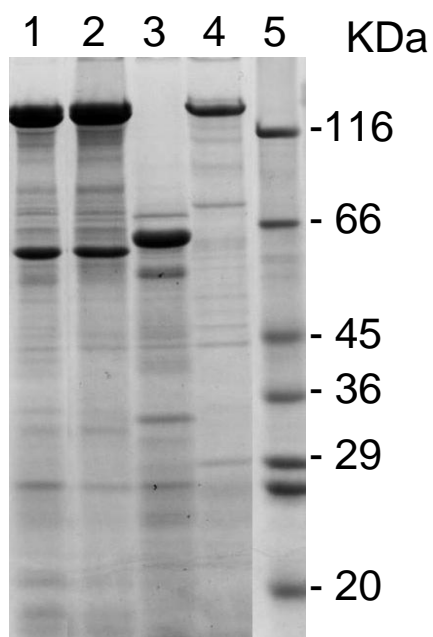


Figura 1. Perfil protéico de cristais de estirpes de *Bacillus thuringiensis*. Amostras de proteínas componentes dos cristais (20 μ l) foram analisadas por SDS-PAGE-13%. 1: Btk HD-1; 2: S550; 3: Btt; 4: S725; 5: Marcador de massa molecular (kDa).

Morfologia dos cristais

Os cristais das estirpes de Bt S550 e S725 foram observados em microscópio de contraste de fases e em microscópio eletrônico de varredura. A microscopia eletrônica permitiu verificar que a estirpe S550 possui cristais bipiramidais, cubóides e esféricos, enquanto a estirpe S725 possui apenas cristais esféricos (Fig. 2).

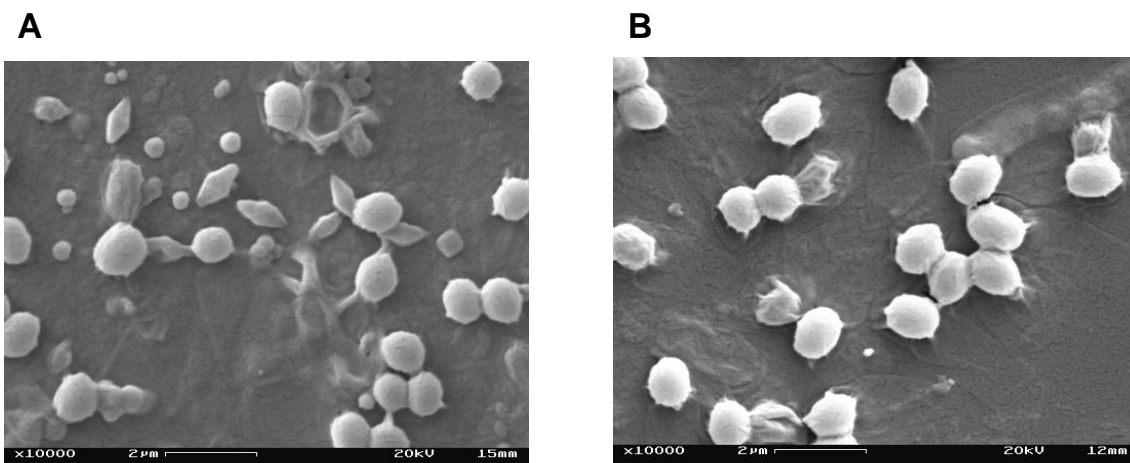


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura de cristais das estirpes de *Bacillus thuringiensis* S550 (A) e S725 (B).

Solubilização e ativação das toxinas

Para analisar o perfil das proteínas processadas *in vitro*, cristais das estirpes S550 e S725 foram solubilizados em pH 10,5 e 9,5, seguido de ativação por tripsina a taxas de 1: 1 e 1: 10 (m/m) tripsina: toxina. As estirpes Btk HD-1 e Btk HD-73 foram usadas como controle. Para S550, observou-se ótimas condições de processamento quando os cristais foram solubilizados em pH 10,5 e ativados a 1: 1 tripsina: toxina, de acordo com análise de SDS-PAGE 12%. A toxina solubilizada apresentou bandas principais com aproximadamente 130 e 65 kDa. A ativação das protoxinas produziu um fragmento por volta de 65 kDa, semelhante ao padrões HD-1 e HD-73 (Fig. 3).

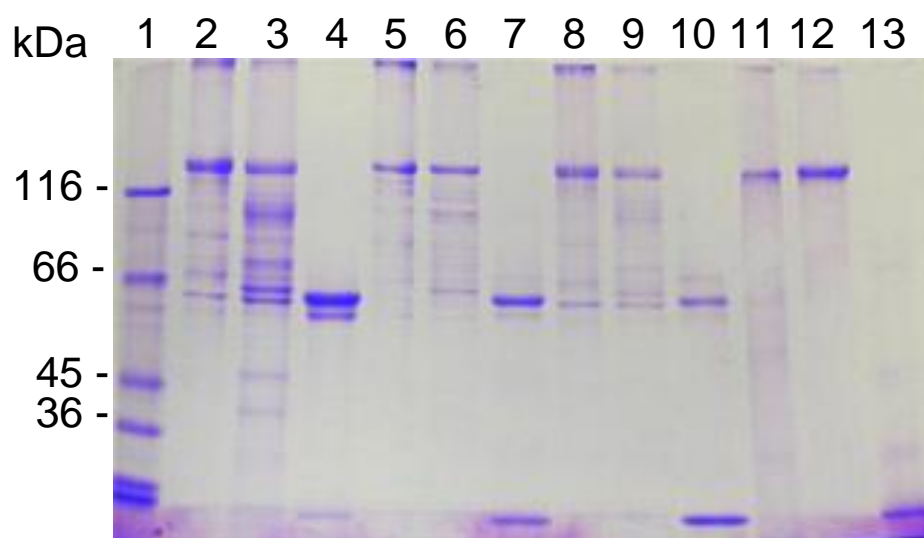


Figura 3. Perfil de produtos de solubilização e ativação de cristais de estirpes de *B. thuringiensis*. Cristais foram solubilizados em pH 10,5 e ativados a 1: 1 (m/m)

tripsina: toxina. Para cada estirpe, 7,5 μg de cristais ou toxina solubilizada, ou 3,5 μg de toxina ativada foram analisados em SDS-PAGE 12%. 1- Marcador de massa molecular (kDa); 2: cristais de HD-1; 3: toxina solubilizada de HD-1; 4: toxina ativada de HD-1; 5: cristais de HD-73; lane 6: toxina solubilizada de HD-73; 7: toxina ativada de HD-73; 8: cristais de S550; 9: toxina solubilizada de S550; 10: toxina ativada de S550; 11: cristais de S725; 12: toxina solubilizada de S725; 13: toxina ativada de S725.

Os cristais de S725 foram também solubilizados em pH 9,0 e 8,5 e ativados por tripsina a 1: 1 e 1: 2 (m/m) tripsina: toxina. A toxina solubilizada produziu uma banda principal de aproximadamente 130 kDa em ambos os pHs. A ativação nas duas taxas tripsina: toxina produziu perfis protéicos diferentes, com fragmentos entre 50 e 70 kDa, como mostrado no figura 4.

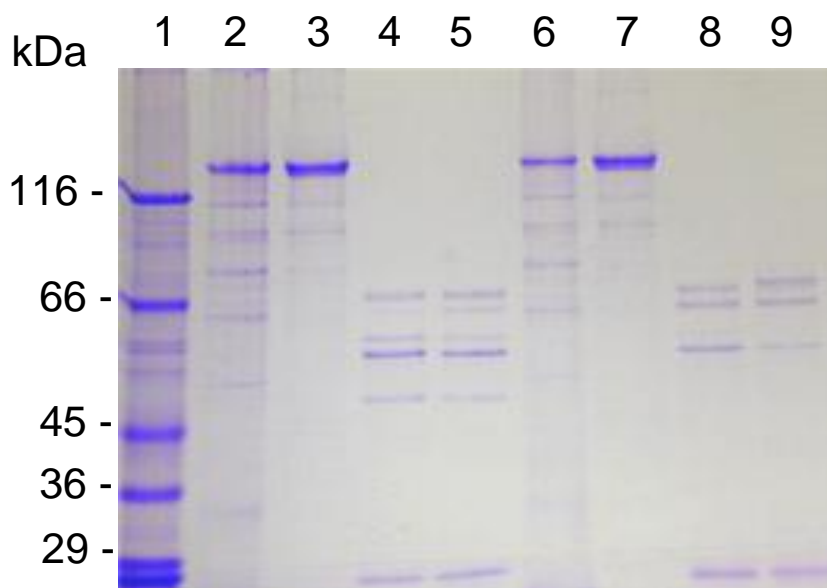


Figura 4. Perfil de produtos de solubilização e ativação de cristais de *B. thuringiensis* estirpe S725. Cristais foram solubilizados em pH 9 (poços 3-5), ou pH 8,5 (poços 7-9), e ativados a 1: 1 (poços 4 e 8) ou 1: 2 (poços 5 e 9) (m/m). Para cada estirpe, 7,5 μg de cristais ou toxina solubilizada, ou 3,5 μg de toxina ativada foram analisados em SDS-PAGE 12%. 1- Marcador de massa molecular (kDa); 2: cristais de S725; 3: toxina solubilizada de S725; 4: toxina ativada de S725; 5: toxina ativada de S725; 6: cristais de S725; 7: toxina solubilizada de S725; 8: toxina ativada de S725; 9: toxina ativada de S725.

Imunodeteccção de proteínas Cry

Foi feita imunodeteccção com anticorpos policlonais para detectar a presença das δ -endotoxinas Cry1Ac (ativa para lepidópteros), Cry1B (ativa para lepidópteros, dípteros e coleópteros) e Cry2A (ativa para lepidópteros e dípteros) nos cristais das estirpes S550 e S725. Cristais de S550 e das estirpes-padrão, usadas como controlos, Btk HD-1, que produz toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A, Btk HD-73, que produz apenas Cry1Ac, e Bt subesp. *thuringiensis* 4412, que produz Cry1B, foram solubilizados em pH 10,5 e a toxina ativada a 1: 1 (m/m) tripsina: toxina. Cristais de S725 foram solubilizados em pH 9,0 e a toxina ativada nas mesmas condições. Reações positivas para Cry1Ac foram obtidas para S550 e os controlos HD-1 e HD-73 (Fig. 5). Reações positivas para Cry2A foram obtidas para HD-1 e S550, enquanto que com anti-Cry1B só a estirpe controle 4412 reagiu (dados não mostrados). Não foi observada reacção das proteínas de S725 com os anticorpos testados, indicando que a estirpe não produz estas δ -endotoxinas.

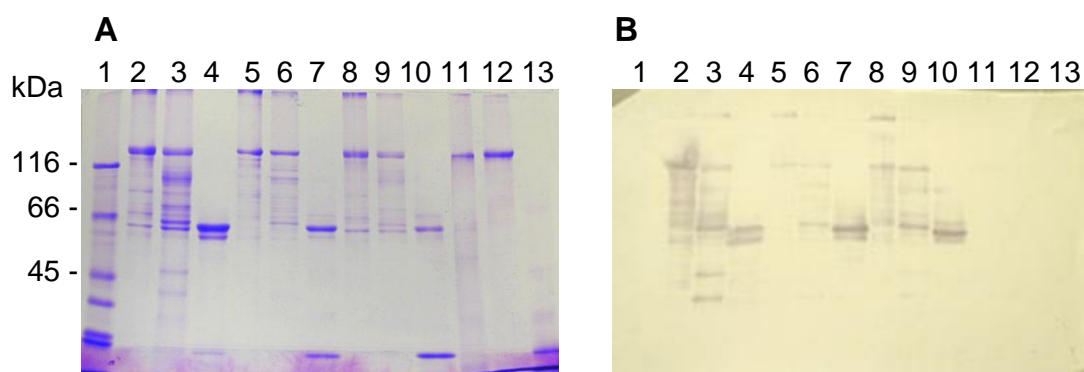


Figura 5. Imunodeteccção de proteína Cry1Ac em estirpes de *B. thuringiensis*. A) Gel de SDS-PAGE 12% de cristais e toxinas solubilizadas e ativadas. Para cada estirpe, 7,5 μ g de cristais ou toxina solubilizada, ou 3,5 μ g de toxina ativada foram aplicados por poço. 1- Marcador de massa molecular (kDa); 2: cristais de HD-1; 3: toxina solubilizada de HD-1; 4: toxina ativada de HD-1; 5: cristais de HD-73; lane 6: toxina solubilizada de HD-73; 7: toxina ativada de HD-73; 8: cristais de S550; 9: toxina solubilizada de S550; 10: toxina ativada de S550; 11: cristais de S725; 12: toxina solubilizada de S725; 13: toxina ativada de S725. B) Membrana de nitrocelulose contendo proteínas de um gel idêntico ao A. 1: sem amostra; 2 a 13: legenda como em A.

Imunodeteccção de proteína Cry9 (ativa para lepidópteros) foi realizada com anticorpo policlonal para Cry9C. Cristais e proteínas solubilizadas e ativadas da estirpe de Bt JC292, que produz Cry9 e Cry2 (HINKS, 1998), foram usados como controle positivo. Reações

positivas fortes foram observadas para as toxinas de JC292 e para cristais e proteínas solubilizadas da estirpe S725, e nenhuma reação foi observada para S550 (Fig. 6).

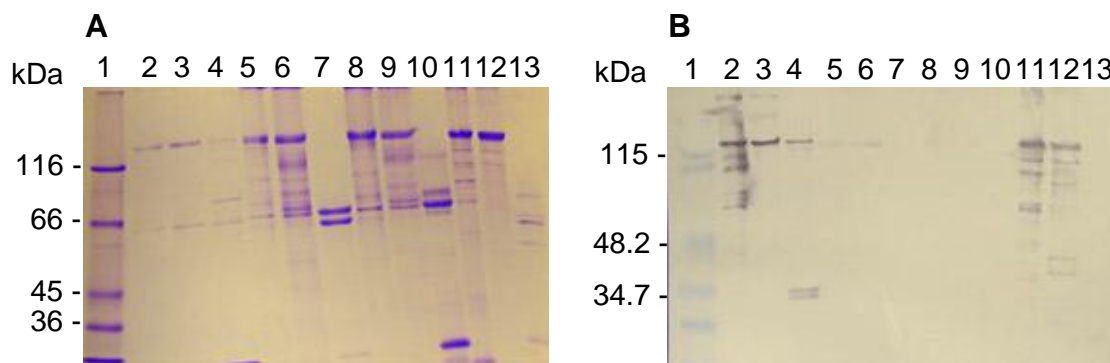


Figura 6. Imunodeteção de proteína Cry9 em estirpes de *B. thuringiensis*. A) Gel de SDS-PAGE 12% de cristais e toxinas solubilizadas e ativadas. Para cada estirpe, 7,5 µg de cristais ou toxina solubilizada, ou 3,5 µg de toxina ativada foram aplicados por poço. 1- Marcador de massa molecular (kDa); 2: cristais de Bt JC292; 3: toxina solubilizada de JC292; 4: toxina ativada de JC292; 5: cristais de HD-1; lane 6: toxina solubilizada de HD-1; 7: toxina ativada de HD-1; 8: cristais de S550; 9: toxina solubilizada de S550; 10: toxina ativada de S550; 11: cristais de S725; 12: toxina solubilizada de S725; 13: toxina ativada de S725. B) Membrana de nitrocelulose contendo proteínas de um gel idêntico A. 1 a 13: legenda como em A.

Sequenciamento N-terminal de proteínas Cry

Com o objetivo de identificar melhor os componentes dos cristais das estirpes, fragmentos de proteínas ativadas de S550 e S725, e solubilizadas de S725, foram separados por SDS-PAGE 7,5 e 10%, respectivamente, e transferidos para membrana de PVDF. Algumas bandas foram selecionadas e sequenciadas na porção N-terminal. As sequências foram submetidas à busca de homologia nos bancos de dados usando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). A sequência da toxina ativada de S550 mostrou 100% de identidade com Cry1Ac. As sequências de fragmentos da toxina ativada de S725 apresentaram alto grau de homologia (70 a 87% de identidade) com toxinas da classe Cry9. As sequências de aminoácidos e as porcentagens de identidade determinadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Análise de sequenciamento N-terminal de toxinas solubilizadas e ativadas das estirpes S550 e S725 de *B. thuringiensis*.

Estirpe/ banda ativada ou solubilizada	Sequência N-terminal	% Identidade (BLAST)
S550/ativada - 63 kDa	MDNNPNINE	100% Cry1Ac
S725/solubilizada - ~ 130 kDa	MNRNNQNE	100% Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Eb 87% Cry9Ea
S725/solubilizada - ~ 128 kDa	NYKDYLQT	87% Cry9Ca, Cry9Da, Cry9Ea
S725/ativada - 56 kDa	SNLELQRFEN	70% Cry9Da, Cry9Ea
S725/ativada - 50 kDa	AILVTQRF	87% Cry9Ea 75% Cry9Da

Baseado nas análises realizadas, a estirpe S550 apresentou características muito semelhantes à estirpe padrão Btk HD-1. A estirpe S725 possui um gene tipo-*cry9* que codifica uma toxina nova. Portanto, decidiu-se continuar a caracterização apenas da estirpe S725.

Bioensaios

Foram realizados bioensaios com cristais purificados da estirpe S725 contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Nas concentrações testadas, os cristais de S725 causaram mortalidade dos lepidópteros *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *M. sexta*. Baixa ou nenhuma mortalidade foi observada contra os outros insetos testados. A porcentagem de mortalidade dos insetos testados e as maiores concentrações das toxinas usadas nos bioensaios são mostradas na Tabela 1.

Tabela 3. Atividade inseticida (% de mortalidade) da toxina dos cristais de *B. thuringiensis* S725 contra larvas de lepidópteros, coleópteros e dípteros.

Inseto-alvo	Estirpe			
	S725		Controle positivo	
	Concentração	% mortalidade	Identidade e concentração	% mortalidade
Lepidoptera				
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	21,4 µg/cm ²	100	Btk HD1 21,4 µg/cm ²	100
<i>Spodoptera frugiperda</i>	17,5 µg/cm ²	29	Btk HD1 17,5 µg/cm ²	100
<i>Manduca sexta</i>	20 µg/cm ²	72	Cry1Ac 100 ng/cm ²	100
<i>Mamestra brassicae</i>	20 µg/cm ²	0	Cry1Ca 200 ng/cm ²	45,8
<i>Pieris brassicae</i>	20 µg/cm ²	4,2	Cry1Ac 100 ng/cm ²	75
<i>Trichoplusia ni</i>	1 mg/ml	0	Btk HD1 1 mg/ml	44,4
Coleoptera				
<i>Anthonomus grandis</i>	120 µg/ml	0	-	-
Diptera				
<i>Aedes aegypti</i>	2 µg/ml	0	Bti 2 µg/ml	100

Detecção de genes *cry* e *vip3* por PCR

PCRs para detectar genes *cry9* no DNA de S550 e S725 foram feitas usando os oligonucleotídeos descritos na Tabela 1. A estirpe Bt JC292 foi usada como controle positivo nas reações. DNA de S550 não amplificou nenhum produto. Produtos do tamanho esperado para a classe *cry9* (504 pb) e para *cry9Ea* (452 pb) foram amplificados pelo DNA de S725. Com os oligonucleotídeos para *cry9A*, *cry9B* e *cry9C* não foram obtidos produtos para as estirpes testadas (dados não mostrados).

Além do gene *cry9*, o DNA genômico da estirpe S725 foi analisado por PCR para os seguintes genes que codificam proteínas ativas para lepidópteros e coleópteros: *cry1*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1F*, *cry1G*, *cry1I*, *cry2A*, *cry3*, *cry7Aa*, *cry7Ab* e *cry8*, usando os oligonucleotídeos e as temperaturas de anelamento descritos na Tabela 1. Estirpes padrões de Bt foram usadas como controles positivos e negativos nas reações. Foram obtidos produtos de PCR para genes da classe *cry1* e da subclasse *cry1I* (dados não mostrados). Como foi relatada existência de ligação entre a presença de *cry1I* e *vip3* em estirpes de Bt (ESPINASSE et al., 2003), o DNA de S725 também foi analisado para a presença de *vip3*. Um produto de tamanho esperado para *vip3* foi obtido, indicando a presença deste gene (dados não mostrados).

Análise de transcrição de *cry1I*

Análise de transcrição do gene *cry1I*, usando RNA total de S725 e do controle positivo Bt subsp. *aizawai* HD-133, mostrou que o gene era transcrito nos estágios T₂ (determinado como 5 horas após a inoculação para ambas as estirpes) e T₅ (determinado como 8 horas após a inoculação), embora em níveis mais baixos para S725 (dados não mostrados).

Discussão

A análise do conteúdo de proteínas Cry através de SDS-PAGE mostrou que a estirpe S550 produz cristais bipiramidais, cúbicos e esféricos compostos por proteínas de 130 e 65 kDa. Proteínas de 130-140 kDa são comumente mostradas por estirpes de Bt produzindo cristais bipiramidais compostos de proteínas Cry1 (HÖFTE e WHITELEY, 1989; LERECLUS et al., 1993). Os cristais bipiramidais de Btk HD-1, por exemplo, consistem das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, ativas para lepidópteros, enquanto os cristais cubóides consistem de proteínas Cry2A, ativas para lepidópteros e dípteros (HÖFTE e WHITELEY, 1989; BAUM e MALVAR, 1995). A solubilização dos cristais de S550 produziu duas bandas principais de aproximadamente 130 e 65 kDa que foram proteoliticamente ativadas, resultando em um fragmento por volta de 65 kDa, semelhantemente ao padrões Btk HD-1 e HD-73.

A imunodeteção de proteínas Cry permitiu identificar as toxinas Cry1Ac e Cry2A nos cristais da estirpe S550. A análise do sequenciamento N-terminal da toxina ativa de S550 confirmou a presença de uma proteína 100% idêntica a Cry1Ac. Assim, as análises realizadas indicam que a estirpe S550 apresenta características semelhantes à estirpe padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ativa para lepidópteros.

A estirpe S725 produz uma proteína-cristal de 130 kDa e cristais esféricos. Estirpes japonesas de Bt específicas para a ordem Lepidoptera e que produzem cristais esféricos

compostos de proteínas de aproximadamente 130-140 kDa já foram descritas (WASANO et al., 1998). Estas estirpes pertencem a vários serovares, incluindo a estirpe-tipo de Bt serovar *japonensis* (84-F-31-31) e os cristais são compostos de Cry9D ou Cry9Ec (WASANO et al., 1998; WASANO et al., 2005). Cristais esféricos também são produzidos pela estirpe Buibui de Bt *japonensis*, específica para Coleoptera (Scarabaeidae), os quais são compostos por proteínas Cry8Ca (WASANO et al., 1998). Solubilização dos cristais de S725 nas diversas condições, seguida de ativação por tripsina produziu fragmentos entre 50 e 70 kDa. Um perfil protéico similar foi relatado por Wasano e colaboradores (WASANO et al., 1998) para a solubilização e ativação da toxina da estirpe-tipo de Bt *japonensis*. Os autores relataram que a proteína solubilizada de 130 kDa gerou vários produtos de proteólise, variando de 50 a 75 kDa após 30 minutos de digestão com tripsina a 1: 25 (m/m) enzima: toxina.

Através de imunodeteção de proteínas Cry, identificou-se uma proteína tipo-Cry9 nos cristais da estirpe S725. O sequenciamento N-terminal de fragmentos da proteína ativada da estirpe S725 confirmou a presença de uma nova proteína com homologia à classe Cry9 (70 a 87% de identidade). A classe Cry9 de δ -endotoxinas compreende as subclasses Cry9A a Cry9E (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt), a maioria ativa para lepidópteros. Como exceção nesta classe, Asano et al. (1997) e Iizuka et al. (1996) relataram que um gene da estirpe N141 de *B. thuringiensis* serovar *japonensis*, atualmente designado *cry9Da*, codifica uma proteína tóxica para Coleoptera (Scarabaeidae).

Como as análises realizadas até então mostraram que a estirpe S550 apresenta características muito semelhantes à estirpe padrão Btk HD-1, enquanto S725 possui uma δ -endotoxina nova, decidiu-se continuar a caracterização apenas da estirpe S725. O potencial entomopatogênico da estirpe S725 foi avaliado através de bioensaios dos cristais contra insetos de diferentes ordens. A estirpe mostrou toxicidade para larvas de *A. gemmatalis* e *M. sexta*, a qual deve ser melhor avaliada.

O método de PCR tem sido amplamente usado para detecção e identificação de genes *cry* novos ou conhecidos em estirpes de Bt (CERÓN et al., 1994; CERÓN et al., 1995; BRAVO et al., 1998; IBARRA et al., 2003). PCR do DNA de S725 para diversos genes revelou que, além de um gene tipo *cry9*, esta estirpe contém os genes *cry11* e *vip3*. O produto do gene *cry11* foi primeiramente relatado como tendo atividade larvicida dupla contra espécies das ordens Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992). Entretanto, proteínas tipo-Cry11 descobertas depois tiveram atividade somente contra insetos lepidópteros (SHIN et al., 1995; CHOI et al., 2000; SONG et al., 2003). A detecção do gene tipo-*vip3* confirmou a existência da ligação entre *cry11* e *vip3* em estirpes de Bt, sugerida por Espinasse et al. (2003). Os genes *vip3* codificam para proteínas ativas para lepidópteros, as quais são

expressas durante a fase vegetativa de algumas estirpes de Bt e secretadas no meio de cultura (ESTRUCH et al., 1996).

Análise da expressão, por RT-PCR, do gene *cry1I* em S725 revelou que este gene é transcrito em baixos níveis durante a esporulação (estágios T₂ e T₅), ao contrário do sugerido por alguns autores que afirmam que muitos genes tipo-*cry1I* são silenciosos (TAILOR et al., 1992; GLEAVE et al., 1993; SHIN et al., 1995). O resultado do presente trabalho está de acordo com autores que descreveram transcrição de genes *cry1I* nestes estágios para algumas estirpes de Bt, como Bt subesp. *aizawai* HD-133 (MASSON et al., 1998; TOUNSI e JAOUA, 2002; TOUNSI et al., 2003). Outros autores mostraram que a proteína Cry1I é expressa no início da fase estacionária e é secretada da célula (KOSTICHKA et al., 1996; TOUNSI et al., 2003).

Conclusões

A estirpe S725 possui uma nova proteína homóloga às δ -endotoxinas Cry9 de *B. thuringiensis* e com toxicidade para *A. gemmatilis*, *S. frugiperda* e *M. sexta*. Esta toxina deve ser melhor investigada e caracterizada quanto às características moleculares e propriedades tóxicas. A expressão e atividade das proteínas codificadas pelos genes *cry1I* e *vip3* presentes nesta estirpe também devem ser investigadas.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro e aos pesquisadores que colaboraram na realização de bioensaios.

Referências

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ASANO, S. I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUKA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, 1997.

BAUM, J. A.; MALVAR, T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Salem, US, v. 18, p. 1-12, 1995.

BELL, R. A.; JOACHIM, F. G. Techniques for rearing laboratory colonies of tobacco hornworms and pink bollworms. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, US, v. 69, p. 365-373, 1976.

BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 70, p. 59-68, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; 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**, Washington, DC, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTÍZ, A.; ORTÍZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, n. 1, p. 353-356, 1994.

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, n. 11, p. 3826-3831, 1995.

CHOI, S. K.; SHIN, B. S.; KONG, E. M.; RHO, H. M.; PARK, S. H. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis cry1I*-type crystal protein gene. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 1, p. 65-69, 2000.

DE-SOUZA, M. T.; LIMA, M. I.; SILVA-WERNECK, J. O.; DIAS, J. M. C. S. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, Mendoza, AR, v. 23, n. 1, p. 43-49, 1999.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, US, v. 37, p. 409-433, 2003.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics: DNA Differentiation & Development**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. **Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes**. US Patent 4,948,734 1990.

ESPINASSE, S.; CHAUFaux, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, p. 501-507, 2003.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, n. 2, p. 137-141, 1997.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1992.

GLEAVE, A. P.; WILLIAMS, R.; HEDGES, R. J. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, n. 5, p. 1683-1687, 1993.

HINKS, D. A. **Molecular analysis of a *Bacillus thuringiensis* strain toxic to *Ceratitis capitata***. 1998. Thesis (Doutorado) - University of Cambridge, Department of Biochemistry, Cambridge.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, 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.; DE OLIVEIRA, C. M.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SANCHEZ, J.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, 2003.

IIZUKA, T.; SASAKI, J.; ASANO, S.; YAMAMOTO, T. Screening and cloning of novel toxin genes from *Bacillus thuringiensis* strains encoding a highly scarabecidal protein. In: ANNUAL MEETING OF THE SIP, 29.; INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON *BACILLUS THURINGIENSIS*, 3., 1996, Cordoba, Spain. 1996. [Proceedings...]. [S.l.: s.n], 1996. 38 p.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G. W.; MULLINS, M.; MULLINS, A. D.; PALEKAR, N. V.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. Cloning of a *cryV*-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 7, p. 2141-2144, 1996.

KOTZE, A. C.; O'GRADY, J.; GOUGH, J. M.; PEARSON, R.; BAGNALL, N. H.; KEMP, D. H.; AKHURST, R. J. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, GB, v. 35, p. 1013-1022, 2005.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant diseases 1970 - 1980**. London: Academic Press, 1981. p. 837-896.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. New York: John Wiley & Sons, 1993. p. 37-69

- LIGHTWOOD, D. J. **Potency determinants of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins**. 1999. 284 p. Thesis (Doutorado) - University of Cambridge, Department of Biochemistry, Cambridge.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, US, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 55, p. 2437-2442, 1989.
- MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; FRUTOS, R. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, n. 12, p. 4782-4788, 1998.
- MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, Orlando, US, v. 41, p. 291-295, 2007.
- MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60).
- PAYNE, J.; CANNON, R. J. C.; RALPH, A. L. ***Bacillus thuringiensis* isolates for controlling acarides**. US Patent 5,350,576 1994.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SHIN, B. S.; PARK, S. H.; CHOI, S. K.; KOO, B. T.; LEE, S. T.; KIM, J. I. Distribution of *cryV*-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cryV*-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 61, n. 6, p. 2402-2407, 1995.
- SONG, F.; ZHANG, J.; GU, A.; WU, Y.; HAN, L.; HE, K.; CHEN, Z.; YAO, J.; HU, Y.; LI, G.; HUANG, D. Identification of *cry1I*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry1I*-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 69, n. 9, p.5207-5211, 2003.
- STEWART, G. S. A. B.; JOHNSTONE, K.; HAGELBERG, E.; ELLAR, D. J. Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction. **Biochemistry Journal**, v. 196, p. 101-106, 1981.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, London, v. 60, p. 181-197, 1983.

TOUNSI, S.; JAOUA, S. Identification of a promoter for the crystal protein-encoding gene *cry1Ia* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 208, n. 2, p. 215-218, 2002.

TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1Ia*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 95, n. 1, p. 23-28, 2003.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VILCHEZ, S.; JACOBY, J.; ELLAR, D. J. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of lambda phage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 11, p. 6587-6594, 2004.

WASANO, N.; KIM, K.-H.; OHBA, M. Delta-endotoxin proteins associated with spherical parasporal inclusions of the four Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 84, p. 501-508, 1998.

WASANO, N.; SAITOH, H.; MAEDA, M.; OHGUSHI, A.; MIZUKI, E.; OHBA, M. Cloning and characterization of a novel gene *cry9Ec1* encoding lepidopteran-specific parasporal inclusion protein from a *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* strain. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 51, n. 11, p. 988-995, 2005.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 315-343, 1984.