



## **PREVISÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* ATRAVÉS DA ANÁLISE DO PERFIL DE PROTEÍNAS Cry**

*Fernanda Aparecida Pires Fazon*<sup>1</sup>; *Josiane Aniele Scarpassa*<sup>2</sup>; *Ana Paula Scaramal Ricieto*<sup>3</sup>; *Luisa Caroline Ferraz Helene*<sup>4</sup>; *Gislayne Trindade Vilas-Bôas*<sup>5</sup>

**RESUMO:** O presente trabalho tem como objetivo a análise do perfil eletroforético das proteínas Cry, encontradas em diferentes linhagens da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt), estocadas no banco de linhagens da Universidade Estadual de Londrina. Portanto, a análise utilizou a metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), sendo que para os experimentos, foi necessária a implantação da técnica no laboratório da Universidade. A análise foi baseada nos cristais protéicos, produzidos pela bactéria durante a fase de esporulação, portanto para a obtenção dos mesmos, as linhagens foram cultivadas em meio de cultivo até completa esporulação ocorrendo então a liberação dos cristais protéicos. Foram analisadas 40 linhagens de *B. thuringiensis*. Os cristais são compostos por proteínas Cry, que proporcionam a atividade entomopatogênica, característica desta bactéria. São descritas uma grande variedade de proteínas Cry, cujo tamanho pode variar de cerca de 30 kDa a 130 kDa, sendo que proteínas Cry de peso molecular semelhantes podem apresentar toxicidade a insetos pertencentes à mesma ordem. Através da metodologia utilizada foi possível identificar proteínas com peso molecular de 130 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 50 kDa, 30 kDa e 25 kDa, entre outros. Diversos projetos do nosso grupo envolvem pesquisas sobre a presença dos genes codificadores para as proteínas Cry através de PCR utilizando iniciadores específicos para os diferentes genes cry. Através desses projetos, pode-se correlacionar os resultados, visando a identificação de novos genes cry ainda não descritos, além de direcionar bioensaios para cada ordem de inseto alvo, conforme o tamanho das proteínas Cry ou o tipo de genes cry identificados.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bacillus thuringiensis*; Pesos moleculares; Proteínas Cry.

## **INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos a utilização de inseticidas químicos vem aumentando, chegando a gastos de cerca de R\$ 10,7 bilhões até novembro de 2010 (AGROLINK, 2009). Além dos gastos, problemas maiores como problemas ambientais gerados pelos pesticidas, como a alta toxicidade e o amplo espectro de ação tem agravado a cada ano (KATHOUNIAN, 2006). Todos esse problemas tem intensificado os esforços para busca por alternativas ao controle químico de

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas CAPES. [fernandafazion@hotmail.com](mailto:fernandafazion@hotmail.com)

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do CNPq. [josi\\_aniele@hotmail.com](mailto:josi_aniele@hotmail.com)

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina – Paraná. Bolsista do Programa de Bolsas CAPES. [ricieto@hotmail.com](mailto:ricieto@hotmail.com)

<sup>4</sup> Graduada em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Londrina – Paraná. [lully\\_verdevale@hotmail.com](mailto:lully_verdevale@hotmail.com)

<sup>5</sup> Orientadora, Professora Doutora do Centro de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina – UEL – Paraná. [gvboas@uel.br](mailto:gvboas@uel.br)

pragas de lavoura ou vetores de doenças, sempre associado a menor ou nenhuma toxicidade para o meio ambiente e para os seres humanos (PRAÇA, 2004).

Vários organismos possuem atividade entomopatogênica, entre eles destacam-se as bactérias do gênero *Bacillus*, como *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis*, sendo a última utilizada no estudo. *B. thuringiensis* é uma bactéria cosmopolita, isolada principalmente do solo e superfície de folhas. Durante a fase de esporulação, além do esporo são produzidas inclusões cristalinas (proteínas cristal) que são responsáveis pela atividade entomopatogênica pela qual a espécie é conhecida. As proteínas cristal ou delta-endotoxinas são codificadas pelos genes *cry*, podendo atingir insetos-praga pertencentes a diversas ordens, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (GLARE & O' CALLAGHAM, 2000). Os genes *cry* encontram-se localizados principalmente em plasmídios, porém podem ser encontrados no cromossomo.

Diversas vantagens são encontradas na utilização de produtos convencionais à base de *B. thuringiensis* destacam-se algumas como a inocuidade à natureza e à saúde humana; amplo espectro de ação, decorrente das inúmeras linhagens com especificidades conhecidas; dificuldade de seleção de insetos resistentes; aproveitamento dos equipamentos utilizados para a aplicação de inseticidas químicos; e produção em fermentadores por meios não-poluentes, ao contrário dos inseticidas químicos, que são produzidos por síntese química em processos que podem poluir o ambiente (VILAS-BÔAS et al. 2007).

Diferentes tipos de proteínas Cry são conhecidas, as quais apresentam toxicidade frente a diferentes insetos alvo. Desta forma, a caracterização do perfil de proteínas Cry de linhagens de *B. thuringiensis*, pode favorecer a identificação de linhagens com capacidade de formação de perfis de proteínas diferentes dos atualmente conhecidos e, portanto, com especificidade entomopatogênica diferente. Estas linhagens podem ser direcionadas para programas de bioensaio mais prioritariamente que outras linhagens, contribuindo para os programas de manejo de pragas e vetores de doenças.

## MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, 40 linhagens do Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Universidade Estadual de Londrina foram recuperadas e inoculadas em meio LB, onde ocorreu a produção dos cristais. As mesmas foram monitoradas quanto à presença de cristais e possíveis contaminantes através da confecção de lâminas e posterior observação ao microscópio óptico. Posteriormente, as linhagens foram cultivadas por 72 horas a 30 °C em 10 mL de meio Bacto-Peptona (BP) (LECADET et al., 1991). Em seguida, as proteínas Cry foram solubilizadas de acordo com a metodologia proposta por Lecadet et al. (1991). Para tanto, 3 mL das culturas bacterianas foram centrifugados a 10.000 x g por 1 min. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram armazenados a -20 °C.

As proteínas presentes nos cristais das linhagens foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida) desnaturante, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Para tanto preparou-se dois géis, um separador e outro empilhador.

A solução estoque de acrilamida 30%, foi utilizada na preparação dos dois géis. Esta solução contém 75 g de acrilamida; 2 g de bisacrilamida e 250 mL de água desmineralizada (q.s.p.). Foram preparadas as soluções tampão de cada um dos géis, separador e empilhador. O tampão do gel separador foi preparado com 75,75 g de Tris-base e 50 mL de água desmineralizada (q.s.p.) e posteriormente ajustado o pH para 8,9. O tampão do gel empilhador contém 7,475 g de Tris-base e 100 mL de água desmineralizada, sendo que seu pH é ajustado para 6,8.

As soluções descritas acima foram armazenadas em geladeira e utilizadas a cada preparo de uma eletroforese. A eletroforese foi realizada uma cuba de eletroforese, na qual os géis são montados. Primeiramente monta-se a cuba, dispondo duas placas de vidro, com isso um espaço de um milímetro é criado para a confecção dos géis. O primeiro gel é o separador, o qual utiliza 3,1 mL de água destilada; 3,9 mL da solução estoque de Acrilamida 30%, 0,8% Bisacrilamida; 0,8 mL de Tris 1M- Tampão do Gel Separador; 80 µL de SDS 10%; 80 µL de Persulfato de Amônio (APS); 3,2 µL de TEMED. Quando polimerizado o gel, a acrilamida e bisacrilamida formam uma malha, pela qual as proteínas migrarão, ocorrendo assim a separação.

A polimerização ocorre em aproximadamente 15 minutos, após é preparado e gel

empilhador, que possui 1,76 mL de água destilada; 400 µL da solução estoque de acrilamida 30%, 0,8 % bisacrilamida; 980 µL de Tris 0,6 M –Tampão do Gel Empilhador; 25 µL de SDS 10%; 25 µL de Persulfato de Amônio (APS) e 25 µL de TEMED. Neste gel coloca-se um pente para a formação das canaletas, onde a amostra será inserida.

Para a corrida foi utilizado o tampão do tanque, que contém 31,60 g de Tris-base; 19,94 g de Glicina; 2,5 g de SDS e 500 mL de água (q.s.p.).

Para a aplicação no gel as amostras devem ser tratadas com tampão de carga, que possui 450 µL de TESA, composto por 0,05 g de azul de bromofenol (0,1%); 0,095 g de EDTA (5 mM); 1,21 g de Tris-HCl pH 8,8 (200 mM) e 17,12 g de sacarose (1 M); esta solução deve ser filtrada e completada para 50 mL de água destilada; aos 450 µL de TESA deve-se adicionar 150 µL de SDS 10% e 6 µL de β-mercaptoetanol, para compor o tampão de carga da proteína. Este tampão é utilizado para marcar o final da corrida no gel de eletroforese.

Para a corrida eletroforética, foram utilizados os sedimentos armazenados, onde inicialmente foram ressuspensos em 25 µL de água destilada e 25 µL da solução de carga de proteína, dessa preparação 15 µL de esporos-cristais solubilizados foram utilizados para a eletroforese. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-glicina, sob voltagem constante de 30 mA por 3 horas. A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1, a qual já tem o perfil protéico conhecido foi utilizada como padrão. Um marcador de proteína, *Precision Plus Kaleidoscope*, 10-250 kDa foi utilizado.

O resultado foi analisado por medida de migração das bandas sendo realizada regressão linear através do programa Excel versão 2007 (Microsoft Office Package).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 como padrão, foram identificadas proteínas Cry de diferentes tamanhos, incluindo 130 kDa, 67 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 50 kDa e 40 kDa, entre outros (Tab. 1).

**Tabela 1-** Pesos moleculares de algumas linhagens de *Bacillus thuringiensis*.

Linhagem	Peso Molecular (K Da)	Linhagem	Peso Molecular (K Da)
HDI	130, 65	Br 125	130 e 70
Br 06	130, 70 e 30	Br 127	130, 65 e 30
Br 11	130, 70 e 30	Br 128	70 e 40
Br 12	130, 75 e 25	Br 130	70, 30 e 25
Br 16	130, 70 e 30	Br 135	130
Br 18	130, 70	Br 136	50 e 25
Br 26	130 e 25	Br 137	130, 65 e 30
Br 33	130	Br138	130, 65 e 30
Br 40	130	Br 139	130 e 30
Br 42	130, 70 e 30	Br 140	130, 65 e 30
Br 43	130 e 25	Br 141A	130 e 45
Br 48	30 e 25	Br 145	130, 70
Br 52	30	Br 146	130, 25
Br 54	130	Br 147	130, 65, 30, 25
Br 58	130, 65, 30 e 25	Br 148	130, 25
Br 78	130, 70 e 25	Br 149	130, 30
Br 80	130, 70	Br 159	130, 65, 30, 25
Br 81	130, 70, 30 e 25	Br 161	130, 65, 30
Br 82	130, 30	Br 164	130, 65, 30
Br 83	130, 30	Br 166	130, 65, 30, 25
Br 87	130, 30 e 25		

Proteínas Cry de 130 kDa possuem ação específica principalmente sobre insetos da ordem Lepidoptera. Proteínas com 65 kDa possuem especificidade principal para insetos ordem Diptera e Lepidoptera. Proteínas de 67 kDa são específicas para Coleoptera. Proteínas Cry de outros

tamanhos também foram identificadas e a possível especificidade tóxica das mesmas será avaliada por bioensaios e por comparação com dados de literatura.

## CONCLUSÃO

A caracterização inicial das proteínas Cry permitiu prever a possível ação bioinseticida das diferentes linhagens pesquisadas, presentes no banco de bactérias analisando a respectiva especificidade para as diferentes ordens de insetos alvo.

Os dados protéicos obtidos serão confrontados com os dados genômicos obtidos através da metodologia de PCR, sendo utilizados iniciadores específicos para os genes *cry*, visando verificar a possível ocorrência de proteínas Cry e/ou genes *cry* não identificados. Em acréscimo, os resultados obtidos serão utilizados para o planejamento de experimentos de bioensaios contra diferentes ordens de insetos alvo, direcionando a realização dos mesmos, conforme o tamanho das proteínas Cry ou o tipo de genes *cry* identificados.

## REFERÊNCIAS

AGROLINK. **Cresceu pouco o mercado de Defensivos Agrícolas no Brasil em 2009.**

Disponível em: < <http://www.agrolink.com.br/Culturas/milho/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=104225>> Acesso em: 22 de dezembro de 2010.

CAPALBO D. M. F., VILAS-BÔAS, G. T., ARANTES, O. M. N. **Bacillus thuringiensis: formulações e plantas transgênicas.** In: BORÉM A., DEL GIÚDICE, M. P. (Eds). *Biotechnology e meio ambiente*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2. ed, 2008, 425 p.

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

KATHOUNIAN, Carlos Armênio. **Os problemas dos agrotóxicos e fertilizantes solúveis.** 2006. Disponível em: <<http://www.amaranthus.esalq.usp.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2010.

LAEMMLI, UK. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, vol. 227, no. 5259, p. 680-685.

LECADET, MM., CHAUFAX, J., RIBIER, J., LERECLUS, D., 1991. **Construction of novel Bacillus thuringiensis strains with different insecticidal activities by transduction and transformation.** *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, no. 3, p. 840-849.

MONNERAT, R.S.; BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria Bacillus thuringiensis: modo de ação e resistência.** In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). *Controle Biológico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v.3, p.163-200.

PRAÇA, Lílian Botelho. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol. 39, n.1, Jan. 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2004000100002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2004000100002)> . Acessado em: 15 de junho de 2011.

VILAS-BOAS, G. T., PERUCA, A. P. S., ARANTES, O. M. N. **Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis and Bacillus thuringiensis.** *Canadian Journal of Microbiology*, v. 53, p. 673-687, 2007.