

Identificação e caracterização de genes *vip* e *cry* coleóptero-específicos em isolados de *Bacillus thuringiensis*

Meire de Cássia Alves⁽¹⁾, Juliana Regina Rossi⁽¹⁾, Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues⁽²⁾, Eliane Cristina da Cunha Alves⁽¹⁾, Antonio Sergio Ferraudó⁽¹⁾, Manoel Victor Franco Lemos⁽¹⁾, Janete Aparecida Desidério⁽¹⁾ e Odair Aparecido Fernandes⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP. E-mail: meirebiosg@yahoo.com.br, jurossi@fcav.unesp.br, eliane@fcav.unesp.br, fsajago@gmail.com, mvictor@fcav.unesp.br, janete@fcav.unesp.br, oafernandes@fcav.unesp.br ⁽²⁾Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, nº 3.900, Monte Alegre, CEP 14040-900 Ribeirão Preto, SP. E-mail: gabrielafontanetti@hotmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* em uma coleção de 1.078 isolados de *Bacillus thuringiensis* potencialmente tóxicos para larvas de coleópteros. Foram utilizados pares de oligonucleotídeos iniciadores gerais obtidos a partir de regiões conservadas dos genes e do alinhamento de sequências consenso. Posteriormente, os isolados positivos foram caracterizados por meio da técnica de PCR-RFLP, tendo-se utilizado enzimas de restrição específicas, para identificar novas subclasses de genes nos isolados. Cento e cinquenta e um isolados foram positivos para os genes avaliados, com maior frequência para o gene *vip1/vip2* (139 isolados). Pela técnica de PCR-RFLP, foram observados 14 perfis polimórficos, o que indica a presença de diferentes alelos e, conseqüentemente, de distintas subclasses desses genes.

Termos para indexação: bioprospecção, Coleoptera, controle biológico, PCR-RFLP, proteínas inseticidas vegetativas, toxicidade.

Identification and characterization of coleoptera-specific *vip* and *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates

Abstract – The objective of this work was to identify and characterize *cry3*, *vip1*, *vip2* and *vip1/vip2* genes in a collection of 1,078 *Bacillus thuringiensis* isolates potentially toxic against Coleoptera larvae. Pairs of primers derived from conserved regions of genes and from sequence alignment consensus were used. Subsequently, positive isolates were characterized by PCR-RFLP, using specific restriction enzymes to identify new subclasses of genes in the isolates. One hundred and fifty-one isolates were positive for the evaluated genes, with higher frequency for the *vip1/vip2* gene (139 isolates). By PCR-RFLP, 14 polymorphic profiles were observed, indicating the presence of different alleles, and, therefore, of distinct subclasses of these genes.

Index terms: bioprospection, Coleoptera, biological control, PCR-RFLP, vegetative insecticidal proteins, toxicity.

Introdução

Bacillus thuringiensis Berliner é uma bactéria Gram-positiva, comumente encontrada em solos, que vem sendo utilizada como inseticida biológico há algumas décadas. Sua toxicidade é atribuída a inclusões proteicas sintetizadas durante o processo de esporulação, quando a bactéria encontra-se sob condições adversas. As inclusões proteicas são formadas por polipeptídeos denominados de proteínas Cry, que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais e se tornam tóxicos após a ingestão por larvas de insetos suscetíveis. Sua especificidade

é determinada pela ligação a receptores específicos presentes no epitélio do intestino médio dos insetos-alvo (Fiuza, 2010).

Alguns isolados de *B. thuringiensis* são capazes de sintetizar outras proteínas tóxicas durante a fase de crescimento vegetativo, as quais não formam cristais e não têm homologia com as proteínas Cry. Essas toxinas são denominadas de proteínas inseticidas vegetativas (“vegetative insecticidal protein” – Vip) (Estruch et al., 1996), dentre as quais, as proteínas Vip1 e Vip2 formam uma toxina binária que apresenta atividade contra larvas de coleópteros (Leuber et al., 2006; Hernández-Rodríguez et al., 2009).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas para identificar novas proteínas de *B. thuringiensis* com atividade tóxica contra pragas que não são suscetíveis às toxinas conhecidas (Sauka et al., 2006; Hernández-Rodríguez et al., 2009; Costa et al., 2010). Além disso, a resistência a algumas toxinas de *B. thuringiensis* tem sido observada em certas populações de insetos, o que torna importante a busca de novas classes de proteínas inseticidas para programas de manejo da resistência (Hernández-Rodríguez et al., 2009).

Há relatos na literatura de que as proteínas Vip ligam-se em diferentes sítios nas células do epitélio intestinal de insetos-alvo, quando comparadas às proteínas Cry, o que as torna excelentes candidatas para a utilização conjunta, podendo ser aplicadas para ampliar o espectro de toxicidade e minimizar o risco de resistência cruzada em organismos geneticamente modificados (Beard et al., 2008; Hernández-Rodríguez et al., 2009).

Neste contexto, o estudo da variabilidade genética de diferentes isolados de *B. thuringiensis* e a busca de novas classes e subclasses de proteínas inseticidas têm sido realizados principalmente com auxílio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), para identificar a presença de genes desconhecidos e direcionar os bioensaios de toxicidade (Bravo et al., 1998; Sauka et al., 2006; Hernández-Rodríguez et al., 2009).

A PCR também tem sido utilizada em combinação com a técnica de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP), na qual o produto de amplificação é clivado com enzimas de restrição e o padrão de bandas obtido em géis determina os tipos de genes *cry* e *vip* presentes nos isolados bacterianos, dentro de uma mesma classe, o que também pode indicar a presença de novos genes (diferentes alelos) (Sauka et al., 2006; Liu et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2*, por meio da técnica de PCR, em uma coleção de 1.078 isolados de *B. thuringiensis* potencialmente tóxicos para larvas de coleópteros.

Material e Métodos

Foram utilizados 1.078 isolados de *B. thuringiensis* pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias, da Faculdade de Ciências Agrárias

e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

O DNA dos isolados foi extraído conforme a metodologia descrita por Letowski et al. (2005). O isolado *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (coleóptero-específico) foi utilizado como controle positivo nas amplificações, para todos os genes avaliados.

A técnica de PCR foi utilizada para identificar os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* no DNA dos isolados de *B. thuringiensis*. Para isso, foram utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores obtidos a partir de regiões conservadas dos genes e do alinhamento de sequências consenso: Gral-Cry3 (Ben-Dov et al., 1997), Gral-Vip1 e Gral-Vip2 (oligonucleotídeos degenerados) (Hernández-Rodríguez et al., 2009). A região intergênica dos genes *vip1* e *vip2* foi analisada, tendo-se utilizado o par de iniciadores Gral-Vip1/Vip2 (Shi et al., 2007) (Tabela 1).

As reações de amplificação para os respectivos pares de iniciadores foram conduzidas em volume total de 20 μ L, constituído por: 20 ng de DNA molde; 2,5 mmol L⁻¹ da solução de dNTP; 2 mmol L⁻¹ de MgCl₂; 0,2 μ mol L⁻¹ de cada iniciador; 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); solução tampão – Tris 200 mmol L⁻¹; 500 mmol L⁻¹ de KCl, pH 8,4 – para reação de PCR (10X); e água destilada grau Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 μ L). A amplificação foi processada em aparelho termociclador (MJ Research, Inc., Watertown, MA, EUA), conforme as seguintes condições: para o par de iniciadores Gral-Cry3, 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 52°C, 1 min a 72°C, com extensão final de 5 min a 72°C; para os pares de iniciadores Gral-Vip1 e Gral-Vip2, 5 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 47°C, 1,5 min a 72°C, com extensão final de 10 min a 72°C; e, para o par de iniciadores Gral-Vip1/Vip2, 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 48°C, 1 min a 72°C, com extensão final de 10 min a 72°C.

Após a realização das amplificações, foi adicionado 3 μ L de tampão de amostra ("loading buffer" – 0,5% de azul de bromofenol em glicerol a 50%) em cada amostra amplificada. O volume final de 10 μ L foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 μ g mL⁻¹) e, posteriormente, submetido à eletroforese horizontal em cuba Sunrise por 2 horas

a 100 V, em tampão TBE 1X (Tris 89 mmol L⁻¹, EDTA 2,5 mmol L⁻¹ e 89 mmol L⁻¹ de ácido bórico, com pH 8,3), adicionado de brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Em todas as eletroforeses realizadas, utilizou-se uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb ("1kb DNA ladder") (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), a qual serviu como referência para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Em seguida, os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com uso do programa Quantity-one (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Após a amplificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2*, procurou-se detectar possíveis polimorfismos nessa região por meio da técnica de PCR-RFLP, para identificar novas subclasses de genes nos isolados. Para tanto, a escolha das enzimas de restrição foi feita com uso do programa pDRAW 32 AcacloneSoftware, (Acaclone, Koge, Sjaelland, Dinamarca), o qual forneceu a localização dos iniciadores gerais, as enzimas de restrição e os seus respectivos sítios, dentro da região amplificada dos genes. Assim, foram identificadas as enzimas de restrição, a quantidade de fragmentos gerados e seus respectivos tamanhos.

As enzimas específicas *EcoRI*, *HincII* e *HpaII* para o gene *cry3* (14 isolados); *AluI* e *MboI* para o gene *vip1* (134 isolados); *HpaII* e *BsaAI* para o gene *vip2* (62 isolados); e *BSaAI* e *Sau96I* para o gene *vip1/vip2* (139 isolados) foram utilizadas, separadamente, para verificar diferenças entre sítios de restrição e identificar novos alelos dentro das famílias gênicas analisadas.

As reações de restrição foram conduzidas no volume total de 10 µL – com 5 µL de água, 1 U da enzima, 1 µL de tampão (10X) Kit da enzima (Uniscience, Ipswich,

MA, EUA) e 3 µL do produto de DNA amplificado – e foram mantidas a 37°C por 120 min. Após a realização das restrições, um volume de 10 µL de cada amostra, acrescido de 3 µL de tampão de "loading buffer", foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹) e, em seguida, foi submetido à eletroforese horizontal em cuba Sunrise por 2 horas a 100 V, em tampão TBE 1X, adicionado de brometo de etídio (0,5 µg mL⁻¹). Utilizou-se uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1 kb ("1 kb DNA ladder") (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), a qual foi utilizada para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de restrição, além de uma amostra do produto amplificado, não restringido, obtido para a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

Em seguida, os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), por meio do programa Quantity-one (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

A combinação de cada produto amplificado de PCR, com presença ou ausência de sítio de restrição para cada enzima, foi utilizada para definir a existência de alelos para um loco particular. A análise de haplótipos por esse método foi representada pela combinação de alelos (amplificação + restrição) para cada um dos locos (Picchi et al., 2006; Faretto et al., 2007).

Para a análise estatística, foi criada uma matriz de amplificação + restrição. Os dados foram agrupados e submetidos à análise de variância molecular (AMOVA), com uso do programa Arlequin (Schneider et al., 2000). A diversidade genética dos isolados, quanto aos genes avaliados, foi estimada e a estrutura de grupos foi analisada.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* de isolados de *Bacillus thuringiensis* e tamanho dos produtos amplificados.

Iniciador	Sequência	Nucleotídeo	Tamanho (pb)
Gral-Cry3 ⁽¹⁾	Direta	5'CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC3'	620
	Reversa	5'CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT3'	
Gral-Vip1 ⁽²⁾	Direta	5'TTATTAGATAAACAAACAAGAATATCAATCTATTMGNTGGATHGG3'	585
	Reversa	5'GATCTATATCTCTAGCTGCTTTTTTCATAATCTSARTANGGRTC3'	
Gral-Vip2 ⁽²⁾	Direta	5'GATAAAGAAAAAGCAAAGAATGGGRNAARRA3'	845
	Reversa	5'CCACACCATCTATATACAGTAATTTTTCTGGDATNGG3'	
Gral-Vip1/Vip2 ⁽³⁾	Direta	5'AAATTAGTGATCCGTTACCTTCTT3'	742
	Reversa	5'CAACTGCTTTTCTTCCCTTAT3'	

⁽¹⁾Ben-Dov et al. (1997). ⁽²⁾Hernández-Rodríguez et al. (2009). ⁽³⁾Shi et al. (2007).

A análise de agrupamento por método hierárquico foi utilizada para classificar os genes *vip* em grupos, para maximizar a similaridade interna entre eles, bem como a heterogeneidade, com base nas informações da PCR-RFLP. As análises foram realizadas com o programa Statistica, versão 7.0 (Statsoft, 2004), tendo-se considerado a distância euclidiana como medida de semelhança e o método de Ward (Hair et al., 2005) como método de ligação entre os grupos.

Resultados e Discussão

O DNA dos 1.078 isolados de *B. thuringiensis* amplificados por PCR apresentaram diferentes tamanhos de produtos. Para o gene *cry3*, o tamanho dos produtos da amplificação foi de 620 pb. Com relação aos genes *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* os tamanhos foram de 585, 845 e 742 pb, respectivamente (Tabela 1 e Figura 1).

Dos 1.078 isolados, 14 isolados (1,29%) apresentaram um produto de amplificação esperado para o gene *cry3*. Quanto ao gene *vip*, 134 isolados (12,43%) apresentaram produto de amplificação correspondente ao gene *vip1* e 62 isolados (5,75%) ao gene *vip2*. Cento e trinta e nove isolados (12,89%) apresentaram produto de amplificação correspondente ao gene *vip1/vip2*, o que indica maior frequência deste gene na coleção analisada. Nenhum isolado apresentou amplificação para os quatro genes simultaneamente.

Hernández-Rodríguez et al. (2009) obtiveram resultados semelhantes quanto à frequência dos genes *vip1* e *vip2*. Ao analisar 507 linhagens, estes autores obtiveram 10,7% de isolados amplificados para o gene *vip1* e 9,1% para o gene *vip2*. Diferentemente, Arrieta et al. (2004), ao avaliar uma coleção de isolados de *B. thuringiensis* de plantações de café na Costa Rica, observaram elevada frequência de genes *vip2*. Arrieta & Espinoza (2006) também obtiveram resultados

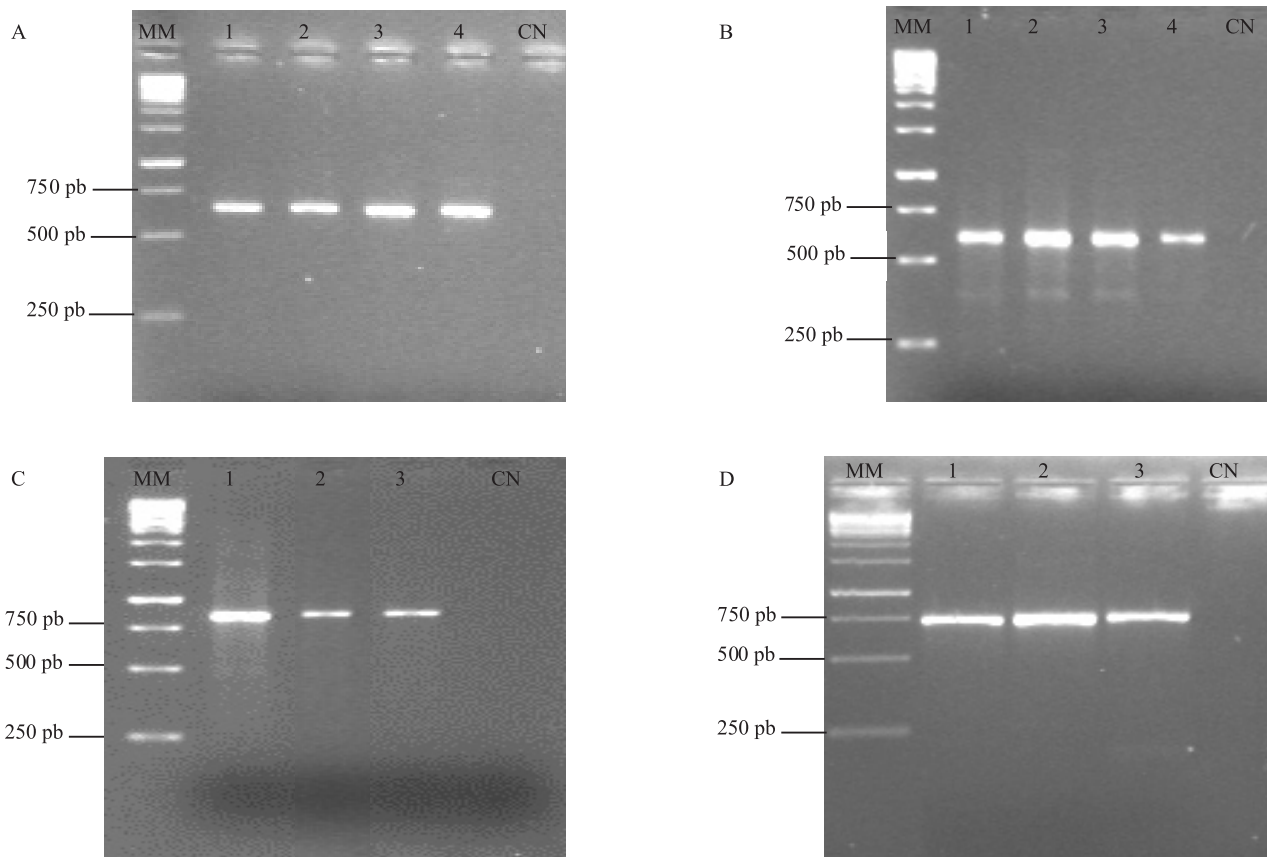


Figura 1. Perfil eletroforético de fragmentos amplificados de DNA de isolados de *Bacillus thuringiensis*. A, iniciador Gal-Cry3 (620 pb); B, iniciador Gal-Vip1 (585 pb); C, iniciador Gal-Vip2 (845 pb); D, iniciador Gal-Vip1/Vip2 (742 pb). MM, 1 kb DNA ladder; 1, *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*; CN, controle negativo da reação.

contrastantes, ao avaliar 146 isolados, com apenas um isolado positivo para o gene *vip2* e ausência do gene *vip1* na coleção analisada.

Para o gene *vip1/vip2*, Warren et al. (1996) obtiveram distribuição de 11,9% entre os isolados avaliados, semelhantemente ao percentual encontrado no presente trabalho. Já Espinasse et al. (2003), ao analisar 125 isolados de *B. thuringiensis*, identificaram os genes *vip1/vip2* em 34,4% dos isolados estudados, percentual superior ao obtido no presente trabalho.

Apenas 1,29% dos isolados foram positivos para o gene *cry3*, o que diferiu de Bravo et al. (1998), Pinto & Fiuza (2008) e Nazarian et al. (2009), que relataram maior presença de genes *cry3* nos isolados testados, com 12,5, 21,70 e 22,34%, respectivamente. Ben-Dov et al. (1997), no entanto, não identificaram esse gene nos isolados avaliados.

As diferenças encontradas entre os trabalhos analisados e os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a ampla distribuição de *B. thuringiensis* em diferentes habitats, além de sua elevada diversidade genética. Entretanto, na maioria das coleções avaliadas, não foi constatada alta frequência de genes coleóptero-específicos. Azambuja et al. (2009) associaram a presença de determinada família gênica, em diferentes coleções, ao local de origem de *B. thuringiensis*. A distribuição de genes na coleção analisada por Pinto & Fiuza (2003), em comparação a outras regiões geográficas, indicou diferenças que também podem estar associadas a fatores abióticos, como características físico-químicas do solo, as quais não foram avaliadas no presente trabalho.

Em relação aos isolados que não amplificaram para os genes avaliados, é importante ressaltar que as sequências oligonucleotídicas iniciadoras utilizadas foram desenhadas a partir de sequências consenso, por meio do alinhamento de poucas subclasses de genes coleóptero-específicos descritas na literatura. Assim, presume-se a existência de subclasses de genes que ainda não foram caracterizadas ou relatadas na literatura, o que explicaria porque as sequências oligonucleotídicas iniciadoras utilizadas não amplificaram para os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* no presente trabalho.

A identificação de genes *vip* e *cry* em coleções de *B. thuringiensis* é extremamente importante, pois permite a seleção de isolados específicos, potencialmente tóxicos para determinadas ordens de insetos, para utilização em bioensaios de toxicidade.

As análises realizadas quanto à diversidade de proteínas toxinas nos isolados avaliados indicam o seu grande potencial para o controle de diferentes espécies de pragas de importância econômica, com destaque para aquelas da ordem Coleoptera.

Diversos trabalhos relatam a ocorrência de genes *vip* e *cry* em isolados de *B. thuringiensis*, determinada apenas por PCR (Loguercio et al., 2002; Espinasse et al., 2003; Arrieta & Espinoza, 2006; Nazarian et al., 2009; Baig & Mehnaz, 2010). Embora seja uma técnica importante para avaliar a composição gênica de coleções de *B. thuringiensis* e para prever toxicidade (Thuler et al., 2007; Costa et al., 2010), a PCR permite apenas a identificação da classe do gene amplificado e não da subclasse a qual o gene em estudo pertence. Portanto, a técnica de PCR-RFLP vem sendo utilizada para auxiliar na detecção e na caracterização de diferentes subclasses de genes *cry* e *vip* (Beard et al., 2008; Liu et al., 2009; Hernández-Rodríguez et al., 2009). Contudo, essa técnica não permite diferenciar genes intimamente relacionados, com perfis semelhantes (Hernández-Rodríguez et al., 2009).

Por meio da técnica de PCR-RFLP foi possível identificar polimorfismo em todos os genes analisados, o que indica a presença de diferentes alelos para os respectivos genes. Em relação ao gene *cry3* e *vip1*, três padrões polimórficos foram obtidos após as análises da restrição. Para os genes *vip2* e *vip1/vip2* foram obtidos dois perfis polimórficos. Esses resultados

Tabela 2. Frequência, desvio-padrão e distribuição de haplótipos de *Bacillus thuringiensis* para os genes *cry3* e *vip*.

Nº de haplótipos	Frequência (%)	Desvio-padrão	Haplótipo
Gene <i>cry3</i>			
1	0,2000	0,1069	1 1 1 1
2	0,2000	0,1069	1 2 2 2
3	0,6000	0,1309	1 2 3 3
Gene <i>vip</i>			
1	0,0071	0,0071	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
2	0,4643	0,0423	1 1 1 1 2 2 0 0 0
3	0,0357	0,0157	1 1 1 0 0 0 0 0 0
4	0,0071	0,0071	1 1 1 1 3 2 0 0 0
5	0,4000	0,0416	1 1 1 1 2 2 1 2 1
6	0,0071	0,0071	1 2 2 1 2 2 1 2 1
7	0,0143	0,0101	1 2 2 1 2 2 0 0 0
8	0,0214	0,0123	1 2 2 1 4 2 0 0 0
9	0,0071	0,0071	1 1 1 1 4 2 0 0 0
10	0,0143	0,0101	1 1 1 1 2 2 1 2 0
11	0,0214	0,0123	1 2 2 1 4 3 1 2 2

são indicativos de conservação significativa nas sequências dos produtos amplificados, evidenciada pela identificação de apenas três alelos para as enzimas que obtiveram maior número de sítios de restrição. Entretanto, a variabilidade genética observada pode indicar a possibilidade da existência de mais de uma subclasse de gene *cry3*, *vip1* ou *vip2* nos isolados avaliados.

A análise da estrutura genética por meio do programa Arlequin permitiu a caracterização haplotípica dos isolados de *B. thuringiensis* da coleção (Tabela 2). Entre os 151 isolados avaliados, foram verificados 14 haplótipos: três correspondentes ao gene *cry3* e 11 ao gene *vip* (*vip1*, *vip2* e *vip1/vip2*). Em relação aos haplótipos obtidos para o gene *cry3*, a frequência do haplótipo 3 foi de 0,6% dentro da coleção avaliada. Para os haplótipos 1 e 2, a frequência observada foi de 0,2% cada um. Para os genes *vip* analisados, obteve-se frequência de 0,4% para os isolados agrupados nos haplótipos 2 e 5, o que indica sua elevada frequência na coleção. Os isolados restantes distribuíram-se em nove haplótipos, com frequência inferior.

A partir dos perfis polimórficos dos genes *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2*, por análise de agrupamento por método hierárquico, constatou-se a formação de dois grupos de isolados (G1 e G2), que foram subdivididos em dois grupos cada um: G1_1, G1_2, G2_1 e G2_2. O grupo G1 foi subdividido nos subgrupos G1_1 (isolados I_1 e I_3) e G1_2 (isolados I_27, I_28, I_125 e I_135). O grupo G2 foi subdividido nos subgrupos G2_1 (isolados I_2 e I_4) e G2_2 (isolados I_32, I_33 e I_36). Os isolados pertencentes ao mesmo agrupamento apresentaram padrões de amplificação + restrição semelhantes, o que indica a variabilidade genética entre os grupos formados. A análise multivariada de agrupamento contribui para a caracterização gênica de isolados de *B. thuringiensis* e deve ser utilizada na fase exploratória na busca e na identificação de proteínas inseticidas de bactérias entomopatogênicas.

Diversos estudos de análise de diversidade genética de bactérias vêm sendo realizados nos últimos anos. Costa et al. (2010), ao avaliar a estrutura de grupos de 45 isolados de uma coleção, identificaram 21 haplótipos em relação aos genes *cry* e *cyt*, dos quais 13 haplótipos são exclusivos dos isolados pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias, da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. Thuler et al. (2007),

ao analisar a estrutura genética de 650 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões brasileiras, com base em resultados de amplificação e restrição, obtiveram 78 haplótipos para diferentes subclasses do gene *cry1*, definidos para as populações.

Cabe destacar que, entre os 151 isolados amplificados para os genes *cry* e *vip*, foi observada maior frequência de isolados com origem em Minas Gerais (35,48%), seguido de Goiás (30,96%), São Paulo (7,09%) e Paraná (0,64%). Cerca de 23,87% dos isolados amplificados são de regiões geográficas não identificadas. Com base nos estudos de distribuição de *B. thuringiensis* em diferentes ecossistemas (Pinto & Fiuza, 2003; Azambuja et al., 2009), foi observada variabilidade regional para os genes *cry* entre os isolados analisados.

As análises de agrupamento haplotípica para os genes *vip* permitiram identificar dois importantes grupos que apresentaram maior frequência (haplótipos 2 e 5) e se distribuem entre Minas Gerais e Goiás, respectivamente, consideradas importantes regiões agrícolas e alvo de inúmeros insetos-praga, inclusive da ordem Coleoptera.

Embora ainda escassos, estudos de coevolução de isolados de *B. thuringiensis* e seus hospedeiros suscetíveis (insetos-alvo) têm sido propostos. A prospecção de isolados de *B. thuringiensis*, associada às características do habitat e à sua diversidade genética, consiste em estratégia importante para a identificação de novas proteínas Cry e Vip, com diferentes especificidades (Arrieta & Espinoza, 2006). Portanto, a presença de *B. thuringiensis* em diferentes ecossistemas pode estar relacionada aos fatores bióticos e abióticos presentes no hábitat (Pinto & Fiuza, 2003; Arrieta & Espinoza, 2006; Azambuja et al., 2009). Consequentemente, análises de toxicidade em larvas de insetos da ordem Coleoptera constituem importante ferramenta para corroborar a possível correlação existente entre origem dos isolados, sua coevolução e a presença de polimorfismos gênicos em coleções de *B. thuringiensis*.

Conclusões

1. Há diferentes subclasses de genes *cry* e *vip* coleóptero-específicos na coleção de isolados de *Bacillus thuringiensis*.

2. A técnica de PCR-RFLP permite a identificação de haplótipos para os genes *cry3* e *vip* na coleção de *B. thuringiensis*.

3. Há maior frequência do gene *vip1/vip2* (região adjacente) na coleção analisada, em comparação aos outros genes em estudo.

Referências

- ARRIETA, G.; ESPINOZA, A.M. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. **Revista de Biología Tropical**, v.54, p.13-27, 2006.
- ARRIETA, G.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOZA, A.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista de Biología Tropical**, v.52, p.757-764, 2004.
- AZAMBUJA, A.O. de; ALLES, G.C.; FRITZ, L.L.; RECHE, M.H.R.; FIUZA, L.M. Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos. **Biociência**, v.38, p.14-23, 2009.
- BAIG, D.N.; MEHNAZ, S. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. **Microbiological Research**, v.165, p.376-383, 2010.
- BEARD, C.E.; COURT, L.; BOETS, A.; MOURANT, R.; VAN RIE, J.; AKHURST, R.J. Unusually high frequency of genes encoding vegetative insecticidal proteins in an Australian *Bacillus thuringiensis* collection. **Current Microbiology**, v.57, p.195-199, 2008.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, 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, p.4883-4890, 1997.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4965-4972, 1998.
- COSTA, J.R.V. da; ROSSI, J.R.; MARUCCI, S.C.; ALVES, E.C. da C.; VOLPE, H.X.L.; FERRAUDO, A.S.; LEMOS, M.V.F.; DESIDÉRIO, J.A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, p.757-766, 2010.
- ESPINASSE, S.; CHAUFAX, 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**, v.47, p.501-507, 2003.
- 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**, v.93, p.5389-5394, 1996.
- FATORETTO, J.C.; SENA, J.A.D.; BARRETO, M.R.; LEMOS, M.V.F.; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.36, p.737-745, 2007.
- FIUZA, L.M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biociência**, v.38, p.32-35, 2010.
- HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2007. 593p.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.219-225, 2009.
- LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of cry1 gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5391-5398, 2005.
- LEUBER, M.; ORLIK, F.; SCHIFFLER, B.; SICKMANN, A.; BENZ, R. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. **Biochemistry**, v.45, p.283-288, 2006.
- LIU, T.; GUO, W.; SUN, W.; SUN, Y. Biological characteristics of *Bacillus thuringiensis* strain Bt11 and identification of its cry-type genes. **Frontiers of Agriculture in China**, v.3, p.159-163, 2009.
- LOGUERCIO, L.L.; BARRETO, M.L.; ROCHA, T.L.; SANTOS, C.G.; TEIXEIRA, F.F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.269-277, 2002.
- NAZARIAN, A.; JAHANGIRI, R.; JOUZANI, G.S.; SEIFINEJAD, A.; SOHEILIVAND, S.; BAGHERI, O.; KESHAVARZI, M.; ALAMISAEID, K. Coleopteran-specific and putative novel cry genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, p.101-109, 2009.
- PICCHI, S.C.; VILAS-BOAS, L.A.; CERESINI, P.C.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F. Strain variability in the DNA immigration control region (ICR) of *Xylella fastidiosa*. **Research in Microbiology**, v.157, p.254-262, 2006.
- PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Distribuição de genes cry de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.33, p.699-702, 2003.
- PINTO, L.M.N.; FIUZA, L.M. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, v.3, p.159-168, 2008.

- SAUKA, D.H.; COZZI, J.G.; BENINTENDE, G.B. Detection and identification of *cry1I* genes in *Bacillus thuringiensis* using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Current Microbiology**, v.52, p.60-63, 2006.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: a software for population genetics data analysis: user manual. Version 2.0. Geneva: University of Geneva, 2000.
- SHI, Y.; MA, W.; YUAN, M.; SUN, F.; PANG, Y. Cloning of *vip1/vip2* genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.23, p.501-507, 2007.
- STATSOFT. **Statistica**: data analysis software system. Version 7. Tulsa: StatSoft, 2004. Available at: <www.statsoft.com>. Accessed on: 27 Oct. 2011.
- THULER, A.M.G.; THULER, R.T.; CICERO, E.A.S.; DE BORTOLI, S.A.; LEMOS, M.V.F. Estudo da variabilidade gênica em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* para emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*. **Boletín de Sanidad Vegetal**, v.33, p.409-417, 2007.
- WARREN, G.W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M. (Ed.). **Advances in insect control**: the role of transgenic plants. London: Taylor and Francis, 1996. p.109-121.

Recebido em 14 de janeiro de 2011 e aprovado em 5 de setembro de 2011