

Figura 3 - Crescimento de *Bacillus* sp. em meio seletivo.

Apoio: EEA/IRGA e UNISINOS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- KENNEDY, A.C. & SMITH, K.L. 1995.** Soil microbial diversity and the sustentability of agricultural soil. *Plant and Soil*. 170:75-86
- MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. 1998.** *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA-CNPMA. Jaguariúna. 488p.
- PELCZAR Jr, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.** *Microbiologia: conceitos e aplicações*, Vol 1 e 2. 2 ed. São Paulo: Ed. MAKRON Books do Brasil LTDA.1996.
- SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA. M. & ARAUJO, R.** 1994. *Microrganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectiva Ambiental*. EMBRAPA-CNPAP. 142p.

PREDIÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE NOVOS ISOLADOS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* ATRAVÉS DA PCR

Laura Massochin Nunes Pinto ⁽¹⁾ & Lidia Mariana Fiuza ^(1,2). ¹Laboratório de Microbiologia, Centro 2, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, UNISINOS. C.P. 275, CEP 93001-970, São Leopoldo, RS. E-mail: lau@pro.via-rs.com.br. ²EEA/Instituto do Riograndense do Arroz. C.P. 29, CEP 94930-030, Cachoeirinha, RS. E-mail: fiuza@cirrus.unisinos.br

As propriedades entomopatogênicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) são altamente variáveis, assim, várias pesquisas nesta área buscam a seleção de novos isolados de *Bt* com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos (Schnepf *et al.*, 1998). Atualmente a procura de genes que sintetizam as proteínas inseticidas de *Bt* (Figura 1), genes *cry*, tem sido feita através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), técnica molecular que tem se mostrado uma ferramenta valiosa à predição da atividade inseticida de novos isolados de *Bt*. Este trabalho teve como objetivo verificar a presença de seis famílias de genes *cry* de *Bt* com atividade inseticida às ordens Lepidoptera e Coleoptera.

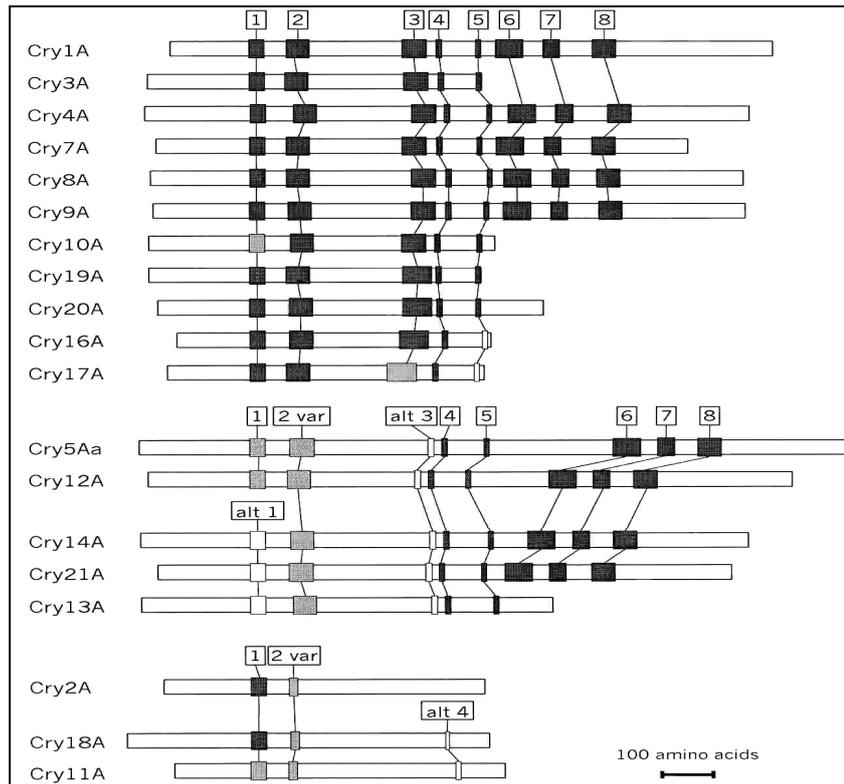


Figura 1 - Regiões conservadas dos genes *cry* que codificam delta-endotoxinas inseticidas (Adaptado de Schnepf *et al.*, 1998).

Neste estudo, foram utilizados 46 isolados de *Bt* obtidos de solos das quatro regiões produtoras de arroz irrigado do Rio Grande do Sul (RS): Campanha, Depressão Central, Fronteira Oeste e Litoral Norte. Para cada isolado, seis pares de *primers* foram testados visando a seleção de genes *cry1* e *cry9*, os quais codificam proteínas ativas contra lepidópteros, *cry2*, com proteínas ativas contra lepidópteros e dípteros e *cry3*, *cry7* e *cry8*, codificantes de proteínas ativas para coleópteros. Os 46 isolados de *Bt* foram crescidos em Ágar Nutriente durante 12 horas e submetidos a extração de DNA total. A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos de reação cada, onde as amostras foram desnaturadas por 1 min a 94°C, aneladas aos *primers* específicos por 40-50s a 54-60°C, seguida de 50-90s de extensão a 72°C. Como controle positivo os experimentos foram associados a amostras de *Bt* já caracterizadas molecularmente e um controle negativo, sem adição de DNA. Os fragmentos obtidos foram analisados em gel de agarose a 1 e 1,5%.

Os resultados de PCR revelam amplificações de fragmentos de DNA semelhantes aos controles positivos para genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry7* e *cry9* (Figura 2), sendo que os genes *cry8* não foram detectados nas amostras testadas.

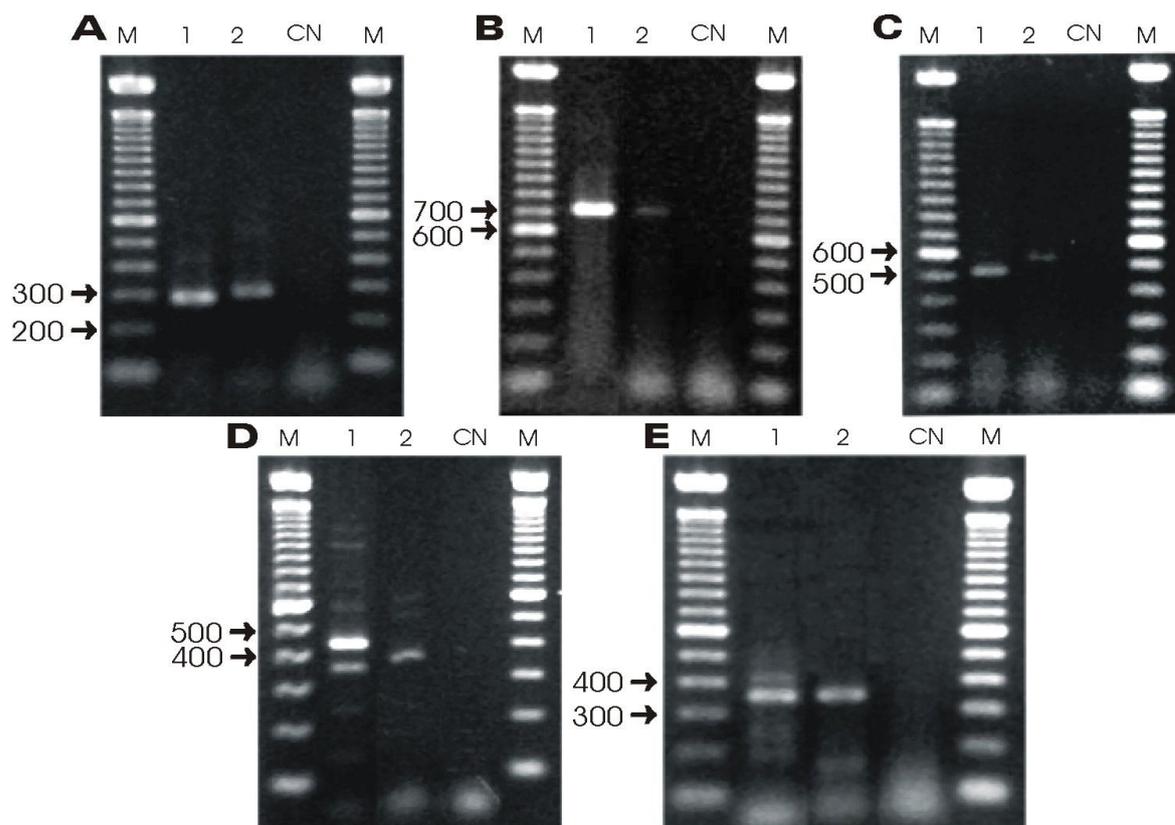


Figura 2 - Géis de agarose (1-1,5%) de produtos amplificados por PCR. **M:** Marcador de Peso Molecular 100bp (Gibco BRL); **CN:** Controle Negativo. **(A)** Produtos amplificados de genes *cry1*; A1: *Bt aizawai* HA3; A2: 2023-10. **(B)** Produtos amplificados de genes *cry2*; canaletas B1: *Bt aizawai* HA3; B2: 2023-10. **(C)** Produtos amplificados de genes *cry3*; C1: *Bt tenebrionis* Cry3A; C2: 2017-9. **(D)** Produtos amplificados de genes *cry7*; D1: *Bt aizawai* HA3; D2: 1489-3. **(E)** Produtos amplificados de genes *cry9*; E1: *Bt aizawai* HA3; E2: 3420-12.

Os resultados apresentados na Figura 3, mostram que os genes *cry9* foram encontrados em 47,82% dos isolados analisados. Estes resultados diferem dos resultados encontrados por Bravo *et al.* (1998) no México que totalizou apenas 2,6% dos isolados analisados e também da frequência de 10,2% encontrada por Para Ben-Dov *et al.* (1999). Os genes *cry1* foram encontrados em apenas 6,52% dos isolados, Bravo *et al.* (1998) relataram sua predominância nos isolados de *B. thuringiensis* analisados, identificando-os em 49,5% das amostras. Os isolados que não foram amplificados por PCR (NA) com nenhum dos seis pares de *primers* de genes *cry*, mas foram identificados por microscopia apresentando inclusões cristalinas, totalizaram 36,95% das amostras. Este resultado sugere que tratam-se de isolados de *B. thuringiensis* contendo novos genes *cry* ainda não caracterizados.

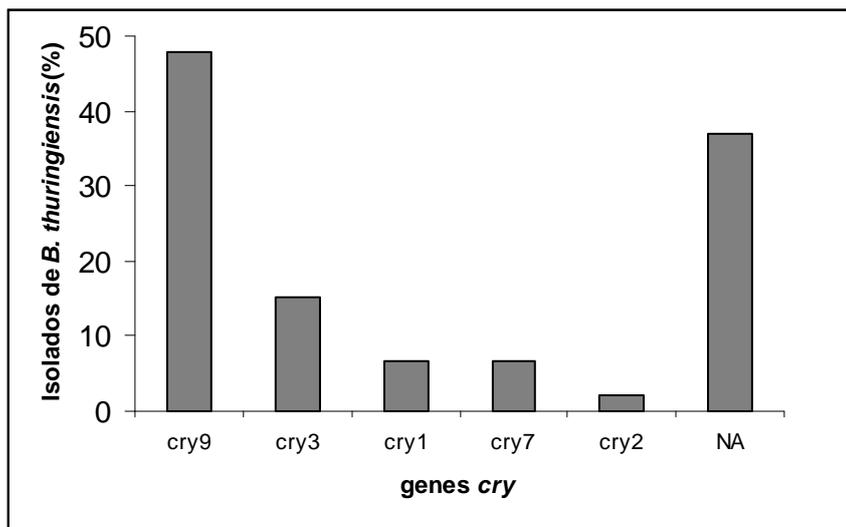


Figura 2 - Distribuição dos genes *cry* presentes nos isolados de *B. thuringiensis* obtidos das regiões orizícolas do RS.

A partir dos resultados obtidos estão sendo realizados testes de patogenicidade em condições laboratoriais com os principais insetos pragas da cultura do arroz irrigado, representantes das ordens Lepidoptera e Coleoptera. Os isolados que revelaram a presença de genes *cry1*, *cry2* e *cry9* estão sendo testados através de bioensaios contra lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Os isolados que amplificaram os genes *cry3* e *cry7* estão sendo utilizados em bioensaios com larvas de *Oryzophagus oryzae*. Os isolados que contêm genes *cry* que codificam delta-endotoxinas ativas e específicas aos insetos-praga alvo do presente estudo, poderão ser utilizados como método de controle no manejo de pragas da cultura do arroz irrigado.

Apoio: EEA-IRGA e UNISINOS

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

- BEN-DOV, E.; WANG, Q.; ZARITSKY, A.; MANASHEROB, R.; BARAK, Z.; SCHNEIDER, B.; KHAMRAEV, A.; BAIZHANOV, M.; GLUPOV, V. & MARGALITH, Y. 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3714-16.
- 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. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4965-72.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **62**:775-806.