



Análise da estabilidade genética de *Bacillus thuringiensis* S76 expressando uma proteína de fluorescência verde na ausência de pressão de seleção

Juliana C de Orem, Tayana Kariya, Mariana T R Lira e Marlene T De-Souza*

Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília - DF

*marlts@unb.br

Palavras-chave: **Bacteria; Bacillaceae; *Bacillus thuringiensis***, estabilidade genética, *Gfp*, plasmídeos de Gram positivas

Coletivamente, *Bacillus thuringiensis*, *B. Cereus* (*sensu stricto*) e *B. anthracis* representam espécies de elevada importância econômica, médica e de biodefesa. Embora facilmente distinguíveis de outras formadoras de endósporos são de difícil distinção entre si. Enquanto estirpes de *B. anthracis* apresentam elevado grau de similaridade, inclusões paraesporais (proteínas Cry ou Cyt) entomopatogênicas de *B. thuringiensis* consistem na única característica para distinguir essa de *B. Cereus*. Os cromossomos das três espécies são extremamente similares, compartilhando mesmo núcleo de fatores de virulência. Apesar de alto nível de sintonia e identidade de proteínas, esses microrganismos ocupam diferentes nichos ecológicos. *B. Cereus*, espécie ubíqua, é patógeno oportunista e não-específico de seres humanos e insetos. *B. anthracis* é agente etiológico do antraz, letal para humanos, eventualmente utilizado como arma biológica. *B. thuringiensis* é especificamente patogênico para insetos, sendo utilizado como bioinseticida há mais de 50 anos, embora pelo menos uma estirpe tenha sido associada à infecção humana. Os diferentes fenótipos e mecanismos de regulação da expressão gênica dessas bactérias são atribuídos largamente à alta diversidade e complexidade plasmidial e a reguladores transcricionais pleiotrópicos comuns. Até 20% do genoma de estirpes de *B. thuringiensis* pode ser constituído por elementos extracromossomais. Os genes *cry*, codificadores de proteínas Cry, estão localizados em plasmídeos grandes, muitos conjugativos. Anteriormente, construímos um organismo para rastreamento de estirpes ativas de *B. thuringiensis* no ambiente por eletrotransferência de um vetor contendo seqüência funcional de um gene de proteína de fluorescência verde (*gfp*) para a estirpe brasileira selvagem S76 de *B. thuringiensis*, que contém onze plasmídeos, dois dos quais portadores de genes *cry*. O recombinante S76GFP+ resultante expressa constitutivamente a Gfp e, durante a esporulação, os genes *cry* residentes. Na ausência do fator de seleção, portar um plasmídeo é deletério para uma bactéria, podendo levar, entre outros eventos, a seleção específica de genes codificados pelo plasmídeo. Portanto, é conveniente testar interações entre plasmídeos residentes e vetores recombinantes transferidos para uma hospedeira e as possíveis interações entre esses elementos e o cromossomo da hospedeira. Neste trabalho foi analisada a estabilidade genética da estirpe Gfp+80g, obtida pelo crescimento da estirpe S76GFP+ por cerca de 80 gerações e na ausência da marca de seleção do plasmídeo recombinante. Células verdes brilhantes foram detectadas por microscopia de fluorescência em ambas S76GFP+ e Gfp+80g desde a fase inicial de crescimento até o fim da esporulação. Análises do perfil proteico e plasmidial indicaram, respectivamente, a manutenção da expressão das proteínas Cry e do elenco de plasmídeos residentes. Além do potencial dessas estirpes como organismos marcadores em estudos de interação bactéria-planta, a eficiência de produção e estabilidade de Gfp fazem desses sistemas de expressão modelos experimentais apropriados para estudar relações em mudanças adaptativas entre hospedeira-plasmídeo(s) e plasmídeo-plasmídeo, em uma população de células estressada pela produção de uma proteína recombinante.

Apoio Financeiro: Funpe/UnB e FAPDF