



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

CARLA SUZUKI ALTRÃO

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *cry* de
bacillus thuringiensis br58 ENTOMOPATOGÊNICA PARA
LARVAS DE *hypothenemus hampel*, BROCA-DO-CAFÉ**



Universidade Estadual de Londrina
Instituto Agrônomo do Paraná
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

CARLA SUZUKI ALTRÃO

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *cry* de
bacillus thuringiensis br58 ENTOMOPATOGÊNICA PARA
LARVAS DE *hypothenemus hampel*, BROCA-DO-CAFÉ**

CARLA SUZUKI ALTRÃO

**CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *cry* de
bacillus thuringiensis br58 ENTOMOPATOGÊNICA PARA
LARVAS DE *hypothenemus hampel*, BROCA-DO-CAFÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Paula Scaramla Ricietto

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Alirão, Carla Suzuki.

Clonagem e caracterização dos genes cry de *Bacillus thuringiensis* BR58 entomopatogênica para larvas de *Hypothenemus hampei*, Broca-do-café / Carla Suzuki Alirão. - Londrina, 2018.

89 f. : il.

Orientador: Gislayne F. L. T. Vilas Boas.

Coorientador: Ana Paula Scaramal Ricietto.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Genética - Tese. 2. Controle Biológico - Tese. I. F. L. T. Vilas Boas, Gislayne . II. Scaramal Ricietto, Ana Paula . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CARLA SUZUKI ALTRÃO

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES *cry* de *bacillus thuringiensis* br58 ENTOMOPATOGÊNICA PARA LARVAS DE *hypothenemus hampel*, BROCA-DO-CAFÉ

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra Gislayne Trindade Vilas-Bôas
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra Fernanda Fazon
Instituto Federal do Paraná – IFPR

Profa. Dra. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de março de 2018.

Dedico

Dedico este trabalho a minha família,
por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao programa de pós- graduação em Genética e Biologia Molecular, bem como aos coordenadores por toda dedicação e atenção concedida durante o desenvolvimento da minha dissertação.

A Professora Dra. Elisete Pains Rodrigues e a Professora Dra. Fernanda Aparecida Pires Fazon por aceitar o convite para avaliar o presente trabalho.

Ao Professor Dr Rogério Fernandes de Souza e a Professora Dra. Elisete Pains Rodrigues por todas as considerações realizadas durante o exame de qualificação para melhorar este trabalho.

Agradeço aos meus orientadores Professora Dra. Gislayne Trindade Vilas- Bôas e Professor Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas por assumirem a minha orientação. Obrigada por me receberem no laboratório com carinho e por tudo que eu aprendi nestes anos. Obrigada por incentivar o novo, por me aceitar como colega de trabalho e por proporcionar o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a minha co-orientadora Professora Doutora Ana Paula Scaramal Ricietto por sua dedicação e amizade. Obrigada por todos os momentos nos quais pude aprender ao seu lado.

Obrigada aos meus amigos de laboratório, Priscilla, Renan, João, Jonathan, Felipe, Same e Roberta por sempre estarem presente e por proporcionarem um ambiente agradável de trabalho.

Obrigada aos amigos de curso e percurso Cátia, Moema, Amanda, Luana, Jéssica, Ana Camila e Gilberto por todos os momentos compartilhados seja em sala de aula ou laboratório.

Agradeço ao meu namorado Thiago, que esteve comigo durante estes meses de experimentos compreendendo os momentos difíceis.

Obrigada ao meu irmão do coração Mário e a minha cunhada Vanessa por todo o incentivo.

Um agradecimento especial para a minha família, mãe (Cecília), pai (José Carlos), irmão (Lucas), irmã (Vânia). Vocês acreditaram em mim desde o começo e sem este amor e carinho nada disso seria possível.

ALTRÃO, Carla Suzuki. **Clonagem e caracterização dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* BR58 entomopatogênica para larvas de *Hypothenemus hampei*, broca-do-café** 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina. 2018.

RESUMO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleóptera: Curculinoide: Scolytinae), é considerada uma das pragas de maior risco fitossanitário de importância econômica para a cultura do café. A utilização de agentes sintéticos tem sido questionada por apresentarem componentes que podem causar problemas como a contaminação ambiental e humana além de incrementar os custos de produção. Uma saída para a diminuição da sua utilização é a substituição por agentes de controle biológico. Recentemente, foi demonstrado que o isolado *Bacillus thuringiensis* BR58, contém os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B*, apresenta atividade inseticida para *H. hampei*. No presente trabalho objetivou-se caracterizar e clonar os genes *cry* encontrados na linhagem *B. thuringiensis* BR58. Para tanto, as sequências foram submetidas ao alinhamento pela ferramenta BLAST e avaliadas para a confirmação das regiões promotoras e das ORFs pelas ferramentas online BPROM e ORFfinder. Em seguida, foram construídos iniciadores específicos contendo os sítios de enzimas de restrição *BamHI*, *HindIII* e *Sall*, dependendo da estratégia de clonagem adotada para cada gene. Dos seis genes *cry* preditos, cinco foram clonados individualmente no vetor pHT315-PxyIA e transformados na linhagem acristalífera de *B. thuringiensis* 407.1. Até o momento, as proteínas *cry60A* e *cry60B* foram expressas e tiveram o perfil proteico avaliado em SDS-PAGE. Novas etapas de transformação nas linhagens de *Escherichia coli* e *B. thuringiensis* estão previstas para os demais genes como perspectivas de continuidade deste projeto.

Palavras chave: Coleóptera. Praga. Controle biológico.

ALTRÃO, Carla Suzuki. **Clonagem e caracterização dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* BR58 entomopatogênica para larvas de *Hypothenemus hampei*, broca-do-café** 2018. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina. 2018.

ABSTRACT

The coffee borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculinoide: Scolytinae), is considered one of the most important pests of economical importance for coffee cultivation. The use of synthetic agents has been questioned because they present components that can cause problems such as environmental and human contamination besides increasing production costs. One way to reduce its use is to replace biological control agents. Recently, *Bacillus thuringiensis* BR58 isolate, containing the *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry60A* and *cry60B* genes, has been shown to exhibit insecticidal activity for *H. hampei*. In the present work we aimed to characterize and to clone the *cry* genes found in the *B. thuringiensis* strain BR58. To do so, the sequences were submitted to alignment by the BLAST tool and evaluated for the confirmation of the promoter regions and the ORFs by the online tools BPROM and ORFfinder. Next, specific primers containing the restriction enzyme sites *Bam*HI, *Hind*III and *Sal*I were constructed, depending on the cloning strategy adopted for each gene. Of the six predicted *cry* genes, five were cloned individually into the pHT315-PxyIA vector and transformed into the *B. thuringiensis* 407.1 crystal line. To date, the *cry60A* and *cry60B* proteins were expressed and had the protein profile assessed on SDS-PAGE. New transformation stages in the strains of *Escherichia coli* and *B. thuringiensis* are predicted for the other genes as perspectives of continuity of this project.

Key words: Coleóptera. Pest. Biological control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Danos ocasionados ao café, decorrentes do parasitismo de <i>H. hampei</i>	18
Figura 2 - Estádios desenvolvimento de <i>H. hampei</i>	20
Figura 3 - Representação do processo de desenvolvimento e esporulação das células de bt decorrente da escassez de nutrientes ou de condições favoráveis para a sobrevivência das células.....	28
Figura 4 - Estrutura tridimensional da proteína Cry1A indicando as posições dos três domínios	30
Figura 5 - Gráfico representativo da diversidade de proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i>	32
Figura 6 - Representação do modelo clássico de ação das proteínas Cry	34
Figura 7 - Representação do modelo de ligação sequencial das proteínas Cry.....	
Figura 8 - Representação do modelo de ação de via de sinalização.....	36
Figura 9 - Receptores moleculares da proteína Cry1Aa.....	37
Figura 10 - Esquema linear do mapa do plasmídeo pHT315xy/A.....	63
Figura 11 - Representação da estratégia de amplificação e clonagem do gene <i>cry</i>	64
Figura 12 - Esquema circular dos vetores recombinantes	71
Figura 13 - (A). Amplificação dos genes <i>cry</i> clonados em <i>E. coli</i> TG1 e (B) Confirmação dos genes por dupla digestão	72
Figura 14 - (A). Amplificação dos genes <i>cry</i> clonados em <i>E. coli</i> ET e (B) Confirmação dos genes por dupla digestão.	73
Figura 15 - (A). Amplificação dos genes <i>cry</i> clonados em <i>E. coli</i> ET e (B) Confirmação dos genes por dupla digestão.	74
Figura 16 - Microscopia óptica dos recombinantes de <i>B. thuringiensis</i> produzindo esporos.....	75
Figura 17 - Análise da expressão das proteínas Cry60A e Cry60B pelas células recombinantes 407pHT315Pxy/IAcry60A e 407pHT315Pxy/IAcry60B, respectivamente, em eletroforese em gel SDS-PAGE 10%.....	76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Genes *cry* da linhagem de *B. thuringiensis* BR58, iniciadores utilizados neste trabalho, sequência dos iniciadores contendo os sítios das enzimas de restrição, parâmetros de amplificação e tamanho do fragmento amplificado com os oligonucleotídeos específicos. Todas as reações tiveram um passo inicial de desnaturação à 94 °C por 2 min. Sítios enzimáticos em negrito e sublinhados62
- Tabela 2 - Os sinais de (+) indicam que a etapa já está finalizada e os sinais de (-) apontam as etapas que ainda não foram realizadas e que estão em fase de desenvolvimento. Todos os genes foram amplificados com os primers específicos, e são indicados com um sinal de (+). Apenas o gene *cry10A* não foi clonado no vetor pHT315*xyl* e, portanto, não foi submetido aos processos de transformação, eletroforese em SDS-PAGE e Bioensaio. O gene *cry11A* foi transformado em *E. coli* TG1 e está em fase de realização para as etapas de transformação em ET e *B. thuringiensis* 407.1. Os genes *cry4A* e *cry4B*, foram clonados na bactéria 407.1 e estão em fase de análise em SDS-PAGE e, posteriormente, serão bioensaiados.....78

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Cafeicultura brasileira.....	14
1.2 <i>Hypothenemus hampei</i>	17
1.2.1 Manejo da broca-do-café nos cafezais.....	20
1.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
1.3.1 Breve histórico.....	24
1.3.2 Características gerais.....	27
1.3.3 Proteínas Cry.....	29
1.3.4 Mecanismo de ação das proteínas Cry.....	33
1.4 Os genes <i>cry</i>	37
1.4.1 Genes <i>cry</i> dependentes de esporulação.....	39
1.4.2 Genes <i>cry</i> não-dependentes de esporulação.....	40
REFERÊNCIAS	42
2. OBJETIVOS	56
2.1 Objetivos gerais.....	56
2.2. Objetivos específicos.....	56
CAPÍTULO 1: Clonagem e caracterização dos genes <i>cry</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> BR58 entomopatogênica para larvas de <i>Hypothenemus hampei</i>, broca-do-café.	57
RESUMO	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	59
Linhagens de <i>B. thuringiensis</i> e <i>Escherichia coli</i>	59
Extração de DNA genômico.....	60
Amplificação dos genes <i>cry</i>	60
Recombinação dos genes <i>cry</i> em vetor plasmidial pHT315xyIA.....	63
Transformação de células competentes <i>E. coli</i> (TG1 e ET12527).....	64
Sequenciamento de DNA e análise in silico das sequências.....	66
Transferência das construções contendo genes <i>cry</i> para <i>B. thuringiensis</i>	67
Produção de esporos/cristais.....	68
Análise das proteínas Cry através de SDS-PAGE.....	68

RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
Clonagem em <i>E. coli</i> TG1 e ET12527 e análise do sequenciamento	70
Expressão das proteínas Cry60A e Cry60B.....	74
CONCLUSÃO	79
PERSPECTIVAS	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	85

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Cafeicultura brasileira

O cafeeiro é uma planta nativa do Nordeste da África pertencente à Família Rubiaceae e Gênero *Coffea L.* que se divide em quatro sessões (Mascarocoffea, Eucoffea, Paracoffea e Argocoffea). Entre estas, a de maior importância econômica é a *Eucoffea*, que abrange as principais espécies cultivadas para o consumo de café, com destaque para *Coffea arabica L.* e *Coffea canephora* Pierre (MARTINS, 2012; MELO; SOUSA, 2011).

O gênero *Coffea L.* possui cerca de 103 espécies (Davis et al., 2006), sendo que apenas duas delas são cultivadas de maneira extensiva no Brasil: *C. arabica L.*, que representa, atualmente, mais de 70% da produção, e *C. canephora* Pierre com 30% (CECAFE, 2017).

A espécie *C. arábica* é cultivada em 80% dos países produtores de café em regiões com altitude acima de 500 metros. Trata-se de um arbusto grande com folhas ovaladas verde-escuras de clima tropical úmido, nativa das florestas tropicais da Etiópia, Quênia e Sudão, onde a temperatura anual do ar varia de 18 a 22 °C. Produz frutos de formato ovalado que, geralmente, contêm duas sementes achatadas, os grãos de café (ICO, 2017). Estes, fornecem sabor suave, aromático e achocolatado, sendo os únicos que podem ser vendidos puros, sem nenhuma combinação de grãos (MARTINS, 2012).

A espécie *C. canefora*, também conhecida como café Robusta, é uma planta mais resistente a ação de pragas e intempéries e possui ciclos produtivos mais elevados, por isso, apresenta vantagens sobre o Arábica. É um arbusto de até 10 metros de altura que produz frutos arredondados, com sementes ovaladas e menores que as de *C. arabica*. O café Robusta é cultivado na África ocidental e central, em toda o sudeste da Ásia e, até certo ponto, no Brasil, onde ele é conhecido como Conillon (ICO, 2017).

A verdadeira história de como o potencial energético do café foi descoberto é incerta. No entanto, há relatos de que os etíopes, por volta do ano 500 d.C, iniciaram o consumo do fruto na forma de um suco fermentado ou, por vezes, macerado e misturado em banha. A bebida, preparada a partir do café

torrado e moído, passou a ser consumida pelos árabes, no século XIV. Porém, tornou-se hábito de cultura social na Turquia, sendo facilmente disseminado para o ocidente por meio do forte comércio de especiarias do Oriente (MARTINS, 2012).

O interesse da Europa pela bebida impulsionou os holandeses a levar frutos frescos e iniciar as plantações em suas colônias na Ásia em 1699. Das plantações francesas, nas ilhas de Sandwich e Bourbon, os europeus trouxeram mudas da planta para suas colônias na América Latina (CECAFE, 2017).

No Brasil, as primeiras mudas de café foram introduzidas em meados do século XVIII em Belém do Pará. No entanto, como a cultura não foi bem difundida, a produção foi levada para o Estado do Maranhão, chegando à Bahia no ano de 1770. Após algumas sementes do cafeeiro serem levadas para o Rio de Janeiro, a cafeicultura atingiu o Vale do Ribeira, no início do século XIX, chegando à São Paulo, de onde se difundiu para os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná (NICHOLLS, 1970).

Por volta de 1867 a construção da estrada de ferro ligando as cidades de Santos e São Paulo e a iminente conclusão (1877) da ligação ferroviária entre o Rio e São Paulo, permitiu que a produção do café ocupasse rapidamente as partes do centro e do nordeste do Estado (NICHOLLS, 1970). Em meados do século XX, o café era considerado o principal produto do cenário agro-mercantil do país. Além disso, seu plantio em diversos locais proporcionou a diversificação de investimentos e patrocinou movimentos culturais internamente e no exterior (BRESSANI, 2007).

O mercado cafeeiro permaneceu estável durante os anos de 1845 e 1895, com taxa média de crescimento anual da renda per capita de 2,3% (FURTADO, 1969). Contudo, este sofreu a primeira grande intervenção do governo em 1906, no qual o plantio de novas lavouras foi proibido devido à alta produtividade comparada ao baixo consumo mundial (DE MENDONÇA, 2008).

No ano de 1929 a crise da bolsa de valores de Nova York provocou enorme queda nos valores internacionais das commodities, bem como diminuição da renda e do consumo mundial, enfraquecendo ainda mais as vendas do café. No Brasil, com o intuito de controlar a queda dos preços, foi determinada a queima de aproximadamente 80 milhões de sacas de café, além

da erradicação de muitos cafeeiros (CECAFE, 2017).

Em 1962, após outra crise de superprodução, criou-se o “Acordo Internacional do Café”, no qual, uma organização constituída por representantes dos países produtores e consumidores estabeleceram cotas de exportação por país produtor (DE MELO, 1993). No entanto, em 1989, o excesso de oferta do produto no mercado internacional provocou a suspensão do acordo, criando uma disputa entre os países produtores que buscavam compensar a queda no preço do produto (CECAFE, 2017). A queda nos valores do café se manteve até 1993, quando o Governo Federal do Brasil, juntamente, com representantes de cinco países produtores de café da América Latina e 14 da África adotaram um esquema de retenção, no qual 20% da produção para exportação ficaria retida no país de origem (PASTOR, 1993).

Desta maneira, os preços no mercado internacional se mantiveram elevados o suficiente para remunerar os produtores entre os anos de 1994 e 1999. Em decorrência do crescimento de investimentos nas lavouras e consequente aumento da produção de café, em 2002, somente no Brasil, foram produzidos cerca de 48 milhões de sacas de café (ICO, 2017). Desta maneira, o crescimento econômico do mercado mundial de café cresceu aproximadamente 30% até o ano de 2010 (ICO, 2017).

Atualmente, o agronegócio do café representa uma das mais importantes culturas do país ocupando o primeiro lugar no ranking de produção e exportação mundial, sendo responsável por envolver aproximadamente, direta ou indiretamente, 10 milhões de pessoas desde a produção até o processamento do grão (IOC, 2017). Além disto, o café é a segunda bebida mais consumida no Brasil, sendo que o consumo anual é um dos que mais cresceram mundialmente alcançando, aproximadamente, 22 milhões de sacas de 60 kg em 2017 (ABIC, 2017).

De acordo com Souza et al. (2005), a importância da produção cafeeira para o Brasil é indiscutível, considerando que este é um dos principais produtos agrícolas de exportação, agregando considerável volume de recursos à balança comercial. No entanto, as lavouras estão sujeitas à ação de pragas e doenças que contribuem para a redução da produtividade e da qualidade do café produzido ocasionando grandes perdas econômicas (Souza et al., 2012; MAPA, 2016).

1.2 *Hypothenemus hampei*

A broca-do-café, *H. hampei* (Ferrari, 1867) (Coleóptera: Curculinoide: Scolytinae), foi descrita pela primeira vez por Ferrari em 1867 ao analisar amostras de grãos de café provenientes do comércio da França (WATERHOUSE; NORRIS, 1989). Há controvérsias sobre o verdadeiro local de origem do inseto (Damon, 2001; Waterhouse; Norris, 1989). No entanto, acredita-se que seja Uganda, por se tratar do primeiro local onde se constatou a broca como praga importante e porque lá ocorriam seus parasitóides (CANTOR; BENASSI; FANTON, 2001).

A primeira menção à broca como praga foi feita mais de 100 anos depois do inseto ter sido descrito, quando constatou-se a infestação de frutos do café pelo coleóptera em lavouras no Congo Belga. Porém, em virtude do reduzido dano causado, até 1913, nenhuma medida foi adotada em relação ao seu controle (LAURENTINO; COSTA 2004). Neste mesmo ano, ocorreu a introdução deste coleóptera no Brasil proveniente de sementes infestadas importadas da África e de Java (CASCO-GÓMEZ, 2012). A partir de então, o inseto espalhou-se por todas as regiões cafeeiras do país (LAURENTINO; COSTA, 2004)

Atualmente, *H. hampei* é considerada uma das pragas de maior risco para as lavouras de café, podendo ser encontrada parasitando os frutos em praticamente todas as regiões com cafezais, exceto no Nepal e China (JARAMILLO et al., 2011). Responsável por grandes perdas na produtividade das lavouras cafeeiras, principalmente de *C. canefora* (Giordanengo; Brun; Frerot, 1992; Benassi; Carvalho, 1994) esta praga causou perda de, aproximadamente, R\$ 7 milhões nas lavouras do Cerrado mineiro somente no ano de 2015 (SNA, 2015).

O parasitismo pela broca-do-café pode produzir três tipos de danos aos grãos (Figura 1): o primeiro, é decorrente da perfuração do fruto pelas fêmeas seguida da alimentação de sua progênie reduzindo a produção e a qualidade do produto final (MOORE; PRIOR, 1998); o segundo, também é resultante da perfuração do café que deixa os grãos maduros vulneráveis a infestação de outras pragas, principalmente do gênero *Fusarium* e *Penicilium* os quais atacam as sementes (LEEFMANS, 1923; PENATOS; OCHOA, 1979; GALLO, 2002,

REBELLES REIS, 2010); o terceiro tipo de dano é causado aos grãos verdes, que são atacados quando o número de frutos maduros não é suficiente. Neste caso, os insetos não se reproduzem, mas provocam a queda prematura do café (KRAKER, 1988; ORTIZ-PERSICHINO, 1991).

Figura 1 - Danos ocasionados ao café, decorrentes do parasitismo de *H. hampei*. (A) e (B). (C) Fêmea adulta da broca-do-café perfurando grão de café verde.



Fonte: Adaptado de: Vega et al., 2015

A espécie é condicionada, em seu potencial biótico, pela disponibilidade do grão de café, uma vez que se alimenta e se reproduz em diferentes estádios de desenvolvimento (BENASSI, 2000). Em condições ambientais adequadas e disponibilidade constante de frutos, o inseto pode alcançar até 8 gerações no ano (CÁRDENAS, 2007). Além disto, foi sugerido, em estudo realizado por Fernández & Cordero (2007), que dependendo das condições do ambiente, como na baixa disponibilidade de alimento, as fêmeas podem permanecer em estado semi-inativas nos grãos maduros à espera de condições favoráveis e, assim, abandonar o fruto em busca de novas plantas em período de frutificação.

Não há dados completamente elucidados de como a broca-do-café reconhece os frutos, no entanto, estudos demonstram que parte da atração dos insetos é influenciada por ferormônios e pela coloração do fruto (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

As informações sobre as características biológicas da espécie podem apresentar pequenas variações (CÁRDENAS, 2007). Segundo Fernández & Cordero (2007), estas podem ser atribuídas as condições climáticas predominantes durante a realização de cada estudo e ao número de análises realizadas em cada ensaio.

O ciclo de vida completo dos machos pode perdurar de 20 a 87 dias, enquanto as fêmeas podem viver por aproximadamente 5 meses (BARRERA; FRANCISCO, 1994). A reprodução destes insetos ocorre entre machos e fêmeas que nascem na mesma baga. Após a fecundação, somente as fêmeas adultas deixam o interior do café e iniciam um período de oviposição que tem duração de aproximadamente 20 dias, com média de 2-3 ovos depositados por dia (BENAVIDES; GÓRGORA; BUSTILLO, 2012). Uma vez que a fêmea penetra no fruto e inicia a oviposição esta permanece em seu interior cuidando da progênie até sua morte (BERGAMIN, 1943; GALLO et al., 2002). Para Ticheler (1961), esta informação se sustenta com a hipótese de que os músculos da asa da fêmea se degeneram, no momento da oviposição, impedindo a colonização de novas bagas. Em contrapartida, Waterhouse & Norris (1989) sugeriram que a fêmea pode deixar a baga quando a semente é consumida e/ou deteriorada de alguma forma ou quando sua progênie começa a surgir.

Os ovos apresentam coloração leitosa com aspecto brilhoso e possuem formato elíptico ou levemente ovóide, com dimensões em média de 0,59 e 0,31 milímetros nos eixos maior e menor, respectivamente. O período de incubação tem duração de 5 a 7 dias, o estado de larva 15 dias para os machos e 19 dias para as fêmeas, seguidos de 7 dias em fase de pupa a temperatura de 10 a 28°C (BERGAMIN, 1943; BARRERA; FRANCISCO, 1994).

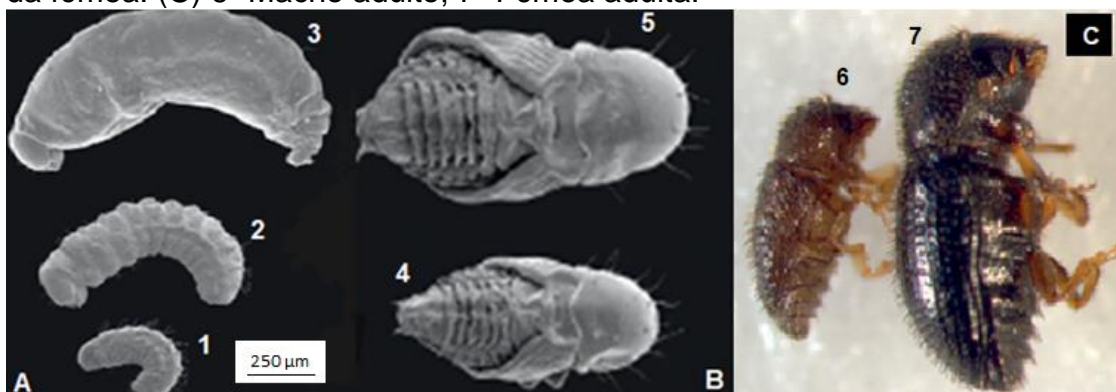
Na fase larval, dividida em primeiro e segundo ínstar e pré-pupa, esta apresenta coloração branca com as peças bucais escuras e tamanho de aproximadamente 0,33 mm (Figura 2) (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007). Esta é a etapa no qual a broca provoca maiores danos ao café pois se alimentam das sementes causando destruição parcial ou total do fruto (TAKEMATSU; JOCYS; POTENZA, 2004; FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007).

As pupas possuem tamanhos diferentes de acordo com o sexo, no qual as fêmeas possuem 1,89 mm de comprimento e os machos 1,22 mm (Figura 2). Inicialmente, apresentam coloração branca e conforme o desenvolvimento dos apêndices externos (antenas, patas e asas) tornam-se marrons (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007).

O inseto adulto apresenta coloração uniforme escura, corpo cilíndrico e élitros (asas anteriores modificadas por endurecimento) truncados. Os machos são menores, medindo aproximadamente 1,24 milímetros e as fêmeas, em média

1,74 milímetros (Figura 2) (Constantino et al., 2011) e não possuem asas, apresentando apenas vestígios membranosos, o que sugere o fato deles nunca saírem do interior do fruto (GALLO et al., 2002).

Figura 2 - Estádios desenvolvimento de *H. hampei*. (A) 1- larva de primeiro ínstar; 2- larva de segundo ínstar; 3- pré-pupa. (B) 4- Pupa do macho; 5 – Pupa da fêmea. (C) 6- Macho adulto; 7- Fêmea adulta.



Fonte: Adaptado de: Vega et al., 2015

1.2.1 Manejo da broca-do-café nos cafezais

As infestações causadas por *H. hampei* podem ser influenciadas por diversos fatores como: clima, colheita, sombreamento, espaçamento e altitude (SOUZA; REIS, 1997). Além disso, a maior parte do ciclo de vida destes insetos ocorre dentro do grão de café, dificultando o manejo nas lavouras, seja empregando estratégias à base de inseticidas sintéticos ou inseticidas não-sintéticos (DAMON, 2000; JARAMILLO et al., 2006, VEJA; INFANTE; JARAMILLO, 2009). Embora o controle à base de agentes sintéticos seja o mais utilizado, outros métodos que possam apresentar menores danos ambientais e melhores respostas quanto ao controle desta praga têm sido explorados, como o controle comportamental, cultural e biológico (BUSTILLO et al., 1998; VILLACORTA et al., 2001; OKUMURA et al., 2003; NEVES; HIROSE, 2005; FORNAZIER et al., 2007; FERNANDES et al., 2014).

O primeiro produto a apresentar eficiência no controle de pragas, foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT), sintetizado por Muller (1939) e manufaturado em 1943. A partir deste momento, diversos compostos mais eficazes e mais seletivos, foram desenvolvidos (HORNE; MCDERMOT, 2001). Sabe-se que o método de controle por agentes sintéticos é um dos fatores que impulsionaram a produção

mundial de alimentos para patamares nunca antes alcançados. Porém, o uso extensivo destas substâncias tem gerado efeitos negativos como a contaminação de solos e mananciais (AGUIAR MENEZES, 2003).

No Brasil, o controle da broca-do-café iniciou-se com a utilização do composto hexaclorociclohexano (BHC). Entretanto, este não apresentava grandes efeitos no controle da praga por se tratar de um pó seco polvilhado nas lavouras facilmente lavado pelas chuvas. Desta maneira, o manejo deste inseto passou a ser eficiente a partir da década de 70, com a iniciativa dos produtores de cultivar as mudas de café com maiores espaçamentos e com o registro de uso do inseticida Endosulfam 350 CE (SOUZA et al., 2015).

Embora o químico Endosulfam apresentasse excelentes resultados frente ao controle da broca, no ano de 2010, o produto foi retirado do mercado norte americano por se tratar de uma substância altamente tóxica para humanos e outros animais (U.S. Environmental Protection Agency, 2010). Neste mesmo ano, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em um processo de reavaliação do ingrediente ativo deste agente, determinou sua retirada do mercado brasileiro em um prazo de quatro anos (MMA, 2010).

Desde então, o controle da broca passou a ser realizado com o químico Ciantranilipole (MAPA, 2015). Este deve ser aplicado em lavouras passíveis de mecanização a níveis de talhões onde a infestação atingir 3 a 5% ou mais de frutos broqueados e em frutos verdes aquosos, na época de trânsito do inseto que se inicia aproximadamente aos 90 dias após as maiores floradas (SOUZA et al., 2015). Entretanto, no Brasil, existem regiões cafeeiras implantadas em topografia acidentada que não permitem a mecanização no controle de pragas (SOUZA et al., 2012).

Embora o método de controle à base de inseticidas sintéticos seja eficiente, o uso intensivo de um mesmo produto durante longo período aliado ao emprego incorreto pode selecionar insetos resistentes (Takematsu; Jocys; Potenza, 2004), além de causar intoxicação dos agricultores e consumidores (NEVES; HIROSE, 2005). Desta maneira, faz-se necessário o uso de outros métodos de controle nas lavouras (FERNANDES et al., 2014).

O controle comportamental é baseado em conhecimentos sobre as atividades dos insetos (FERNANDES et al., 2014). Este método tem sido adotado

com sucesso para o controle de insetos-praga em culturas de *Citrus* sp. (Sharifi et al., 2013), algodão (Miranda; Silva, 2005) e goiaba (AZEVEDO et al., 2012).

Sabe-se que as fêmeas da broca-do-café são atraídas por compostos voláteis do fruto (SILVA; VENTURA; MORALES, 2006). Esta descoberta intensificou a realização de estudos visando a melhor escolha para a confecção de armadilhas como a cor e a proporção de atraentes na mistura (DUFOUR; FRÉROT, 2008). No entanto, enquanto a maioria dos estudos visando o controle da broca são realizados em outros países, no Brasil, destacam-se apenas experimentos de monitoramento do inseto com a utilização de armadilhas confeccionadas com garrafa Pet vermelha (OKUMURA et al., 2003; FERNANDES et al., 2014).

Um outro mecanismo aplicado no manejo da broca-do-café é o “Controle Cultural”. Após a colheita, todas as bagas devem ser coletadas, incluindo as deixadas nas árvores e aquelas que caíram no chão, para interromper completamente o ciclo de vida do inseto (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015). Todos os cafezais velhos e abandonados, nos quais a broca encontra abrigo e se multiplica livremente devem ser eliminados (FORNAZIER et al., 2007). Além disso, há necessidade de que todos os produtores executem os mesmos cuidados nas lavouras (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

O controle cultural também pode ser usado para reduzir a dispersão passiva que ocorre quando os materiais contaminados com o inseto são movidos de um lugar para outro. Estes materiais incluem sacos de café utilizados durante a colheita, implementos agrícolas, veículos, vestuário de trabalhadores e bagas infestadas ou sementes de café para uso doméstico (LEEFMANS, 1923). Este é considerado o método mais eficiente para eliminar as infestações causadas pelo inseto. Entretanto, a menos que a presença de insetos seja muito limitada, o sistema de recolhimento de grãos pode ser difícil de implementar devido aos custos associados, pois estes cuidados exigem a disponibilidade de mão de obra (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

Entre os diferentes agentes naturais utilizados no controle da broca-do-café estão o fungo *Beauveria bassiana*, nematóides e parasitoides da ordem Hymenoptera (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

O modo de ação dos entomopatógenos fúngicos envolve fixação de esporos à cutícula do inseto, seguida de germinação e penetração na cutícula. A

morte é causada pelo crescimento e proliferação das hifas ao longo da hemolinfa, um processo que esgota nutrientes usados e perturba os tecidos internos, ocasionando a sua morte (VEGA et al., 2012).

O fungo *B. bassiana* é considerado o agente mais eficiente no controle biológico microbiano de *H. hampei* (La ROSA et al., 1997; NEVES; HIROSE, 2005). Resultados de experimentos realizados em laboratório e a campo, indicam que este microrganismo tem potencial para ser utilizado, desde que as concentrações do inóculo estejam adequadas para induzir o processo de doença nos insetos (La ROSA, 2000; NEVES; HIROSE, 2005). Em vários experimentos, os níveis de infecção dos cafezais após a pulverização de uma suspensão à base de *B. bassiana* têm sido examinados. Entretanto, nesses estudos não constam dados referentes ao quanto a pulverização é rentável, bem como, se há aumento ou não da mortalidade de insetos em parcelas pulverizadas em comparação com áreas não pulverizadas, impedindo que se determine a eficiência deste método (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

Algumas espécies de nematoides, principalmente dos gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae) podem ser utilizados como agentes no controle biológico da broca-do-café. Nos últimos anos, foi observado o parasitismo natural de espécies desses gêneros contra populações de *H. hampei* em plantações de café na Índia, México e Colômbia (VARAPRASAD et al., 1994; CASTILLO et al., 2002; LÓPEZ et al., 2008). Contudo, ainda não está claro se o uso de nematodos entomopatogênicos é viável no campo (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

Desde a descoberta da praga nas lavouras de café da Costa Rica, um intenso estudo laboratorial relevou *B. thuringiensis* como um potencial agente de controle biológico em agrossistemas de café. Entretanto, há um imenso desafio para que o produto contendo as proteínas entomopatogênicas de *B. thuringiensis* alcance os insetos dentro fruto. Além disso, esses compostos devem ser pulverizados aumentando o custo de sua utilização (VEGA; INFANTE; JOHNSON, 2015).

O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos, através da integração dos genes determinantes de resistência provenientes de *B. thuringiensis* em seu genoma, também tem sido considerado como uma das alternativas contra perdas causadas pela broca-do-café (BARBOSA et al., 2010).

A expressão das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* ocorreria em tecidos das sementes, fonte de alimento de *H. hampei*, permitindo o contato direto entre os insetos e as toxinas (SUREKHA; ROYER; NAIDU, 2002). Desta maneira, surge a proposta de que a construção de plantas geneticamente modificadas através da inserção de genes *cry* obtidos de *B. thuringiensis* pode vir a ser uma estratégia de controle alternativa para *H. hampei* (LÓPEZ-PAZOS; GOMEZ; CERON, 2009).

1.3 *Bacillus thuringiensis*

1.3.1 Breve histórico

O registro do primeiro isolamento de *B. thuringiensis* foi realizado por Sotto Ishiwata em 1901, no Japão, ao reportar uma bactéria que infectava larvas do bicho da seda *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), causando danos à indústria da seda japonesa (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992; ROH et al., 2007). Em referência ao aspecto das larvas infectadas, que apresentavam aparência macia e flácida, o autor passou a chamar o microrganismo de *Bacillus sotto* (ALMEIDA MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2014). Entretanto, a espécie foi descrita após uma década por Ernst Berliner na Alemanha, em homenagem a província de Thuringia, ao isolar o microrganismo de larvas da traça da farinha *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) (MILNER, 1994; ROH et al., 2007). Durante o processo de esporulação da bactéria isolada, Berliner também observou a formação de um segundo corpúsculo e passou a chama-lo de Restkörper (Beegle; Yamamoto, 1992), posteriormente, classificadas como proteínas Cry (HÖFTE; WHITELEY, 1989).

No mesmo ano em que Berliner descreveu a bactéria, Aoki e Chigasaki (1915) estudando isolados de Ishiwata, relataram que a toxicidade de *B. thuringiensis* devia-se a uma toxina presente em culturas esporuladas, mas que não era observada em cultura de células vegetativas. Além disso, constataram que quando tratada com ácidos, fenol, cloreto de mercúrio e calor a toxina era inativada e que, portanto, tratava-se de uma proteína.

A utilização da bactéria como potencial agente de controle de insetos iniciou-se décadas depois da sua descrição. De acordo com Lambert &

Pefereon (1992), uma das justificativas para a ausência de interesse nos estudos com *B. thuringiensis*, foi a bactéria ser considerada um agente patogênico de insetos e uma ameaça a indústria do bicho da seda. Ademais, na Europa, estava em curso a Primeira Guerra Mundial (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992).

O interesse pelo microrganismo ressurgiu quando Mattes em 1927, ao isolar uma cepa da bactéria de um espécime de *A. kuehniella* e realizar testes com o isolado, determinou que uma cepa de *B. thuringiensis* poderia ser utilizada no controle de *Ostrinia nubilalis* (Lepdopetera: Crambidae), uma praga que acometia as plantações de milho européias (HUSZ, 1928). Após sua descoberta, o isolado de Mattes passou a ser distribuído para laboratórios em todo o mundo e utilizado como fonte principal em estudos de controle microbiano (NORRIS, 1970). Além disso, este trabalho levou a formulação do primeiro bioinseticida comercial, Sporeine, produzido na França em 1938 (LÜTHY; CORDIER; FISCHER, 1982), sendo utilizado no controle de espécies de lepidópteros que afetavam diversas plantações francesas (MILNER, 1994).

No decorrer dos anos, o isolamento de novas cepas de *B. thuringiensis* proporcionou a descoberta de estirpes com atividade inseticida mais eficientes para os insetos até então testados bem como para novos organismos (SANCHIS, 2012). No entanto, os bioinseticidas produzidos anteriormente a 1970, por não apresentarem atividade tóxica suficiente e vantagens sobre os custos de produção eram suplantados pelos produtos sintéticos (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992).

A confirmação da linhagem *B. thuringiensis subsp. Kurstaki* por Dulmage (1970) com toxicidade 200 vezes superior as linhagens utilizadas nas formulações de produtos comerciais modificaram a história dos formulados a base de *B. thuringiensis* e aumentou o interesse por novas estirpes da bactéria. Com isso, no final da década de 1970, uma quantidade considerável de produto a base desta linhagem era utilizada no controle de *Heliothis* spp. em plantações de algodão (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). Além disso, no ano de 1977, foi constatada a primeira linhagem tóxica para dípteros (GOLDBERG; MARGALIT, 1977).

Em 1992, milhões de quilogramas de produtos à base de *kurstaki* eram produzidos nos Estados Unidos e utilizados contra mais de 90 espécies de insetos-praga em todo o mundo (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). No ano de

2010, aproximadamente 300 produtos formulados a partir de Bt, representavam 53% do mercado mundial de biopesticidas, gerando um volume de 210 milhões de dólares (CAB International Center, 2010).

No Brasil, a primeira pesquisa no controle de insetos-praga com maior impacto, foi liderada pela EMBRAPA no ano de 1993 com o intuito de controlar a lagarta *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) uma importante praga do milho (POLANCZYK, et al., 2017).

Até o ano de 2012, o mercado brasileiro de produtos à base de *B. thuringiensis* era contemplado com 9 formulações registradas, indicadas para 24 espécies de pragas em 12 tipos de plantações, sendo a maioria para controlar *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera, Noctuidae), *S. frugiperda*, *Ecdyolopha aurantiana* Lima, 1927 (Lepidoptera: Tortricidae) e *Plutella xylostella* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Plutellidae) em plantações de soja, algodão, milho e cítricos (POLANCZYK, et al., 2017).

Com o aumento do conhecimento da estrutura e das funções dos cristais tóxicos e com o desenvolvimento das técnicas da engenharia genética, foi possível a inserção dos genes codificantes das proteínas Cry em plantas, dando origem a cultivares transgênicos resistentes a algumas pragas (ROH, et al., 2007). Após o primeiro evento de organismos expressando toxinas de *B. thuringiensis* em 1987, os genes de *B. thuringiensis* foram utilizados na transformação de diversas plantas, até a obtenção dos primeiros cultivares comerciais de milho, algodão e tomate transgênicos, em 1995, nos Estados Unidos (JOUANIN et al., 1998). Desde então, a área plantada para culturas transgênicas produzindo toxinas Bt cresceu mais de 1 milhão de ha entre os anos de 1996 e 2016 (ISSA, 2016).

Dentre as plantas transgênicas liberadas para uso comercial no Brasil que apresentam genes *cry* de *B. thuringiensis* destacam-se cultivares de milho, algodão e cana-de-açúcar (CTNBio, 2017). Apesar da existência de estudos relacionados a transgenia de diferentes cultivares contendo genes *cry* de *B. thuringiensis* ainda não há nenhum experimento conclusivo em relação a produção de cultivares de café com resistência à *H. hampei*.

1.3.2 Características gerais

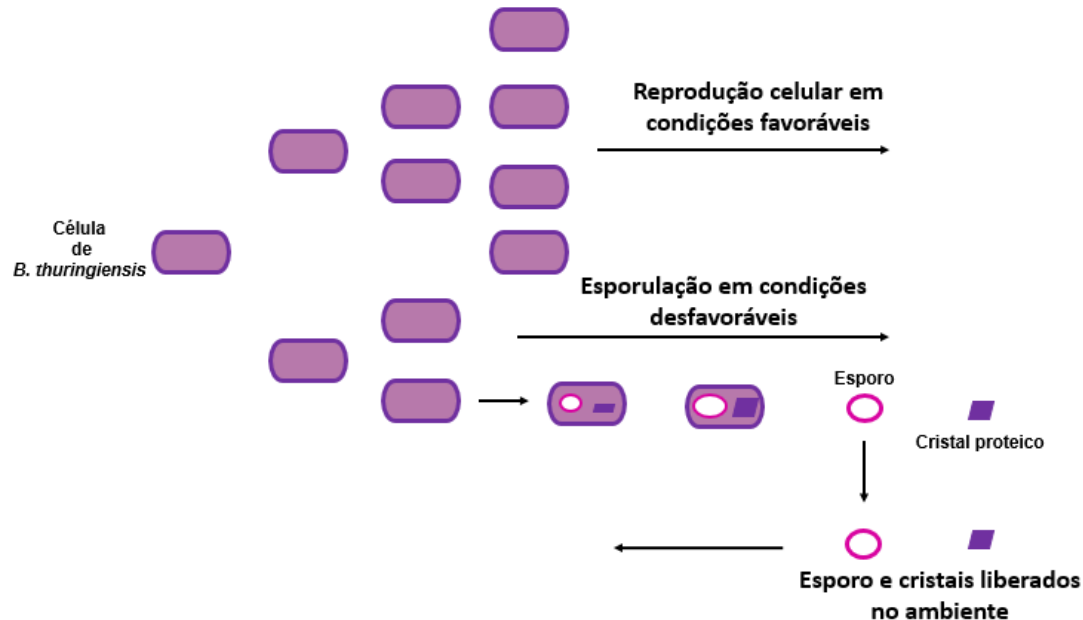
B. thuringiensis é uma bactéria pertencente à família *Bacillaceae*, aeróbica, Gram-positiva, que apresenta em mais de 95% de suas linhagens características como: hemólise em ágar sangue de ovelha, resistência ao antibiótico ampicilina, catalase-positiva, oxidase-negativa e motilidade (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007). Possui faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45°C e ocorre naturalmente em diversos ambientes como insetos, na água de rios e no solo (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009).

Durante seu ciclo de vida, a espécie pode apresentar duas fases: uma de crescimento vegetativo, no qual a célula possui de 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e outra de esporulação (Figura 3), quando ocorre a diferenciação da bactéria em esporo para isolar e proteger o material genético (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

O processo de formação de esporos ocorre devido à exaustão de nutrientes e/ou condições ambientais desfavoráveis para a sobrevivência das bactérias (LAMBERT; PEFEROEN, 1992). Durante este estágio, no interior da célula formam-se esporos normalmente elipsoidais, mas que também podem apresentar formato cilíndrico e se localizam na região central ou paracentral da célula (LERECLUS et al., 1989; ARANTES et al., 2002). Ainda durante este processo, ocorre a produção de inclusões cristalinas (Figura 3) compostas de um ou mais tipos de proteínas (toxinas Cry e Cyt), também chamadas por δ-endotoxina (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005).

As proteínas de inclusão parasporal Cry exibem efeitos tóxicos verificados experimentalmente para um organismo alvo ou possuem similaridade de sequência de aminoácidos significativa com uma proteína Cry já descrita (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005; CRICKMORE et al., 2011). As proteínas Cyt, similarmente as Cry, são proteínas de inclusão parasporal de *B. thuringiensis* que exibem atividade hemolítica (Cyt) ou têm similaridade de sequência com uma proteína Cyt conhecida (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005). Estas inclusões apresentam atividade tóxica para larvas de diferentes ordens de insetos incluindo espécies vetores de doenças em humanos e pragas agrícolas (LAMBERT; PEFEROEN, 1992).

Figura 3 - Representação do processo de desenvolvimento e esporulação das células de *B. thuringiensis* decorrente da escassez de nutrientes ou de condições favoráveis para a sobrevivência das células.



Fonte: Adaptado de Lambert & Peferon, 1992

A patogenicidade e a especificidade de *B. thuringiensis* estão diretamente relacionadas aos tipos de genes *cry* que uma linhagem apresenta (CAPALPO, 2005). Contudo, o potencial patogênico também pode ser atribuído à ação sinérgica dos esporos com as proteínas Cry, além de outras proteínas com atividade inseticida como as VIP que são secretadas na fase vegetativa e têm atividade contra Lepidópteros e Coleópteros (ESTRUCH et al., 1996). Diversos fatores de virulência também contribuem com a patogenicidade desta bactéria tais como enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases (ZHANG et al., 1993), proteases (LÖVEGREN et al., 1990), quitinases, δ -exotoxinas (SCHNEPF; WHITELEY, 1981) e β -exotoxinas (LEVINSON, 1990; BRAVO et al., 1998; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

Apesar da eficiência da toxicidade apresentada pelas proteínas Cry contra diversos insetos, sabe-se que há a ocorrência de espécies que apresentam diversidade em relação à ação de algumas toxinas (SOBERÓN et al., 2012). Estes dados indicam que a busca por novos isolados de *B. thuringiensis* se faz necessária para a descoberta de cristais com atividades inseticidas diferentes

objetivando melhores resultados no controle biológico.

1.3.3 Proteínas Cry

As proteínas Cry apresentam estrutura molecular constituídas por duas regiões distintas: uma porção aminoterminal normalmente variável e associada à toxicidade e uma porção carboxi-terminal, mais conservada e associada à formação do cristal, com massas moleculares que variam de 40 a 140 KDa (CAPALBO et al., 2005).

São classificadas dentro de diferentes grupos e subgrupos de acordo com a similaridade dos aminoácidos que as compõem. Sendo assim, apresentam terminologia específica no qual todas as proteínas recebem o nome Cry seguido de uma hierarquia dependendo de sua filogenia (Cry1Aa, Cry3A, Cry11A, Cry4Ba, Cry1Aa12, entre outras). As proteínas com similaridade menor que 45% entre as sequências são separadas por grupos numéricos em uma primeira classificação (Cry3, Cry4, Cry6...). Dentro de cada grupo, as que possuem similaridade de 78% recebem uma letra maiúscula (Cry4B, Cry5B etc) e para as proteínas que possuem mais de 78%, mas menos de 95% similaridade uma letra minúscula é acrescentada a nomenclatura (Cry4Aa, Cry11Aa...) (CRICKMORE et al., 1998).

Até o momento, três classes de proteínas Cry foram identificadas (Figura 4): as toxinas tipo ETX / MTX, da classe binárias (Bin) e a classe dos três-domínios (3D) (ADANG et al., 2014).

Os membros da família de três domínios compõem o maior grupo de proteínas Cry (ADANG et al., 2014). São moléculas globulares que possuem três domínios estruturais conectados por ligantes únicos (Figura 4). A porção N-terminal possui sete α -hélices, sendo seis de caráter anfipático que se envolvem em torno de uma hélice hidrofóbica central. O Domínio II é composto por três folhas β -pregueadas, enquanto o domínio III, da porção carboxi-terminal C-terminal) apresenta estrutura com duas folhas β -antiparalelas. O Domínio I está relacionado com a inserção da proteína na membrana e com a formação de poros. Os Domínios II e III estão ambos envolvidos no reconhecimento de receptores específicos (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; BRAVO, 2005). Dados gerados a partir da análise

filogenética das toxinas Cry demonstraram que ocorreu coevolução entre os domínios I e II, enquanto as análises do domínio III revelaram uma topologia diferente devido ao fato da ocorrência de maior variação de domínio III entre as toxinas. Estas informações podem indicar a variabilidade da atividade tóxica do grupo 3D e a conseqüente origem de proteínas com modos de ação semelhante mas com diferentes especificidades (BRAVO, 1997; MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001).

As proteínas Cry podem apresentar atividade tóxica restrita a algumas espécies de uma determinada ordem bem como para mais de um grupo de insetos corroborando com a teoria de que a troca de domínios III entre diferentes toxinas pode originar novas especificidades (BRAVO, 1997; MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). Um exemplo clássico de uma proteína com múltipla ação é Cry1Ba, que apresenta atividade entomopatogênica contra larvas de mariposas, moscas e besouros (ROH et al., 2007).

Figura 4 - Estrutura tridimensional da proteína Cry1A indicando as posições dos três domínios.

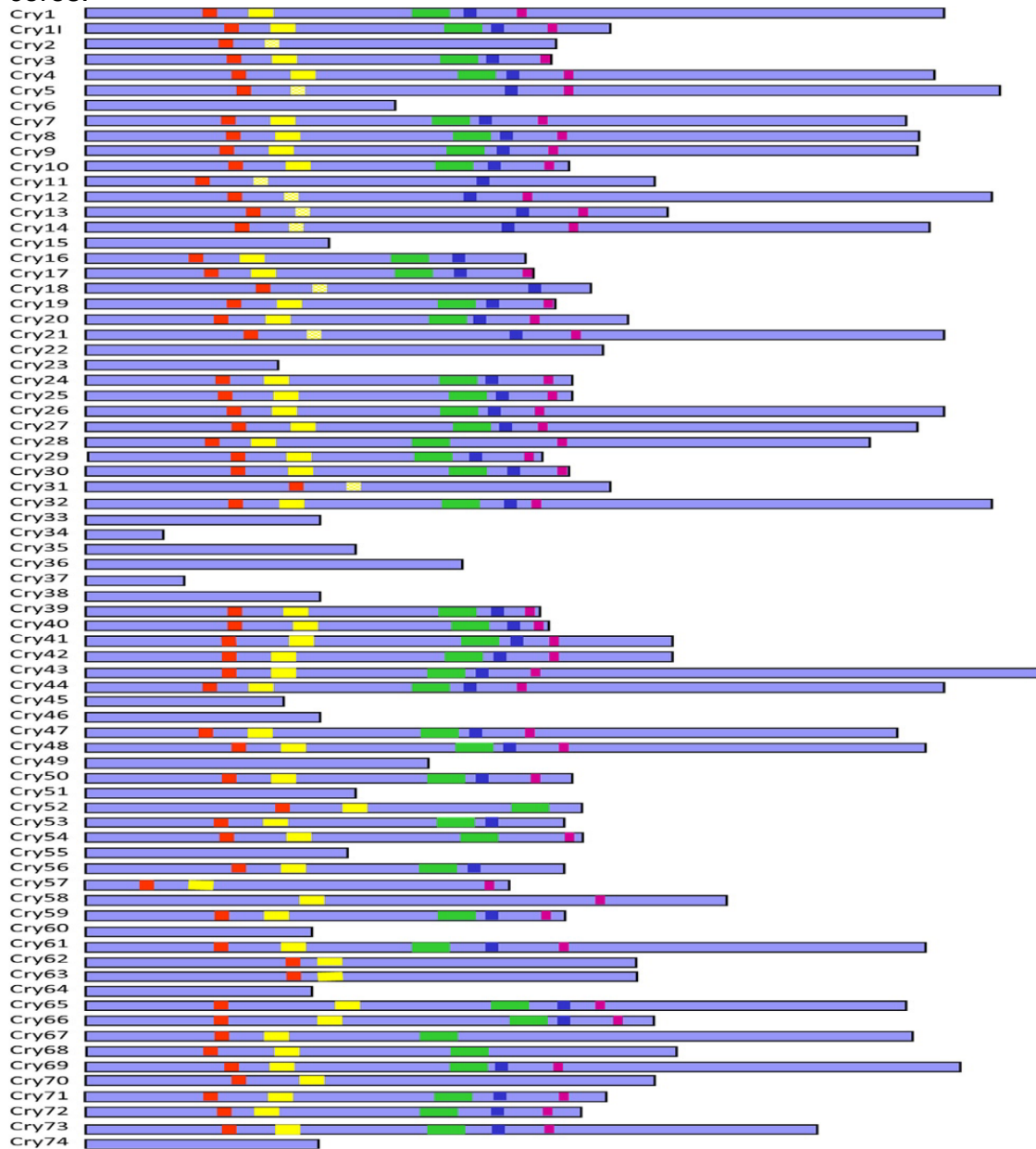


Fonte: Maagd; Bravo; Crickmore, 2001

O alinhamento de seqüências das proteínas Cry revelou a presença de cinco blocos conservados comuns que possivelmente são importantes para alguns aspectos da estabilidade ou função da toxina (HÖFTE; WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998). A maioria das seqüências apresentam os mesmos

blocos conservados, no entanto, algumas toxinas não contêm este conjunto enquanto outras possuem apenas um subconjunto destas regiões conservadas (Figura 5) (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014). Esses blocos são frequentemente encontrados nas porções internas das proteínas e nas regiões de contato entre os três domínios. Desta maneira, em estudos com base nas estruturas e modelagem molecular, indicou-se que as toxinas que contêm todos ou alguns dos cinco blocos de sequências conservadas são suscetíveis a possuir a mesma estrutura dos três-domínios (PARDO-LÓPEZ et al., 2012). O suporte para sustentar esta informação foi a determinação da primeira estrutura tridimensional de uma proteína Cry (Cry3Aa) por técnicas de cristalografia de raios-X (LI et al., 1991). Até o momento, mais seis proteínas Cry da classe dos três-domínios tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas: Cry1Aa (Grochulski et al., 1995), Cry2Aa (Morse et al., 2001), Cry3Ba (Galitsky et al., 2001), Cry4Ba (Boomserm et al., 2005), Cry4Aa (Boomserm et al., 2006) e Cry8Ea (GUO et al., 2009). Apesar destas proteínas apresentarem menos de 20% de similaridade entre as sequências de aminoácidos todas mostram uma dobra similar composta por três domínios (BRAVO et al., 2012).

Figura 5 - Gráfico representativo da diversidade de proteínas Cry de *B. thuringiensis*. O tamanho de cada toxina é representado em escala e os cinco blocos conservados descritos em SCHNEPF et al. (1998) são destacados em cores.



Fonte: Adang; Crickmore; Jurat-Fuentes, 2014

As diferentes classes de proteínas Cry originam cristais de diferentes formatos como bipiramidais, circulares, cuboides, irregulares, ovoides e romboides, o que pode indicar o organismo suscetível à sua ação entomopatogênica (LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993). Sua atividade tóxica é específica, principalmente para os representantes das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera bem como para algumas

espécies de nematoides e ácaros (FEILTELSON; PAYNE; KIM, 1992; BRAVO et al., 2007).

Dentre as proteínas Cry com atividade tóxica para coleópteros, as mais estudadas estão: Cry3, Cry1B, Cry1I, Cry7, Cry9 e Cry8 (TAILOR et al., 1992; SILVA CÍCERO; FERRAUDO; LEMOS, 2009; ALVES et al., 2011). As proteínas Cry18 e Cry14 também estão relacionadas porém, apresentam baixa homologia entre elas e com as outras toxinas (VAN FRANKENHUYZEN, 2009). Algumas proteínas têm sido descritas com atividade tanto para Lepidoptera como para Coleoptera (Cry1B e Cry1I) (TAILOR et al., 1992). Outras toxinas que afetam essa ordem incluem Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 e Cry55 (CRICKMORE et al., 2015; VAN FRANKENHUYZEN, 2009). De acordo com a análise filogenética dos domínios destas proteínas, tem sido proposto que Cry9 e Cry10A também podem ser ativos contra Coleoptera (BRAVO, 1997; MARTINS, 2009).

Atualmente, cerca de 80 subespécies de Bt estão descritas e mais de 700 genes *cry* foram também descritos sendo distribuídos em mais de 70 classes. As atualizações da nomenclatura dos genes *cry* são constantemente depositadas no banco de dados disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/.

1.3.4 Mecanismo de ação das proteínas Cry

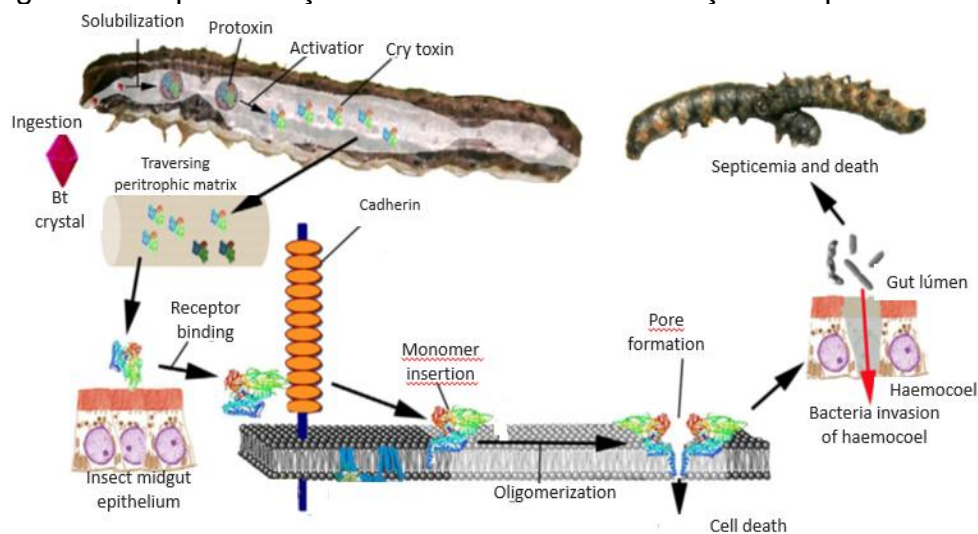
As toxinas Cry de *B. thuringiensis* pertencem a uma classe de toxinas bacterianas conhecidas como proteínas formadoras de poros PFT (pore-forming toxins) que são produzidas como proteínas solúveis em água e que sofrem mudanças conformacionais para se inserir ou para transportar-se nas membranas celulares de seu hospedeiro (BRAVO et al., 2007).

Assim como com outras proteínas, a especificidade das toxinas Cry é determinada por diferentes etapas que, de certa forma, se relacionam com a sua estrutura tridimensional (3D) caracterizando seu modo de ação (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2016). O mecanismo de ação das proteínas Cry tem sido caracterizado, principalmente, em estudos com insetos da ordem Lepidoptera (BRAVO et al., 2007). Desta maneira, alguns mecanismos de toxicidade têm sido determinados indicando que não há apenas um modelo padrão, tratando-se de

processos complexos que podem ocorrer simultaneamente (MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2014). De maneira geral, as PFT interagem com receptores específicos localizados na superfície celular do sistema digestório do hospedeiro. As protoxinas são ativadas pela ação de proteases do hospedeiro seguido por ligação ao receptor induzindo a formação de uma estrutura oligomérica (PARKER; FEIL, 2005). Em revisão, tem-se a descrição de três modelos de ação das toxinas Cry: o modelo clássico (Figura 6), o modelo da ligação sequencial (Figura 7) e o modelo via de sinalização (Figura 8) (VACHON et al., 2012).

O modelo clássico de ação das toxinas “formadoras de poros” parece ser o mais comum entre as diferentes ordens de insetos (Diptera, Lepidoptera e Coleoptera). Neste caso, quando as protoxinas são ingeridas na forma de cristal são solubilizadas em pH alcalino no intestino médio dos insetos liberando protoxinas que são clivadas por proteases específicas resultando em toxinas ativas (SCHNEPF, et al., 1998, CAPALBO et al., 2005, VACHON, et al., 2012). A toxina ativa é capaz de ligar-se a receptores específicos (caderina, N-aminopeptidase, Fosfatase alcalina ou Glicoconjugado) presentes nas células epiteliais das microvilosidades intestinais do inseto formando poros permeáveis (KIROUAC et al., 2002; BRAVO et al., 2007; ROH et al., 2007). A presença desses poros na membrana plasmática interfere na fisiologia celular, anulando gradientes iônicos transmembranares, o que resulta em lise celular (KNOWLES; ELLAR, 1987).

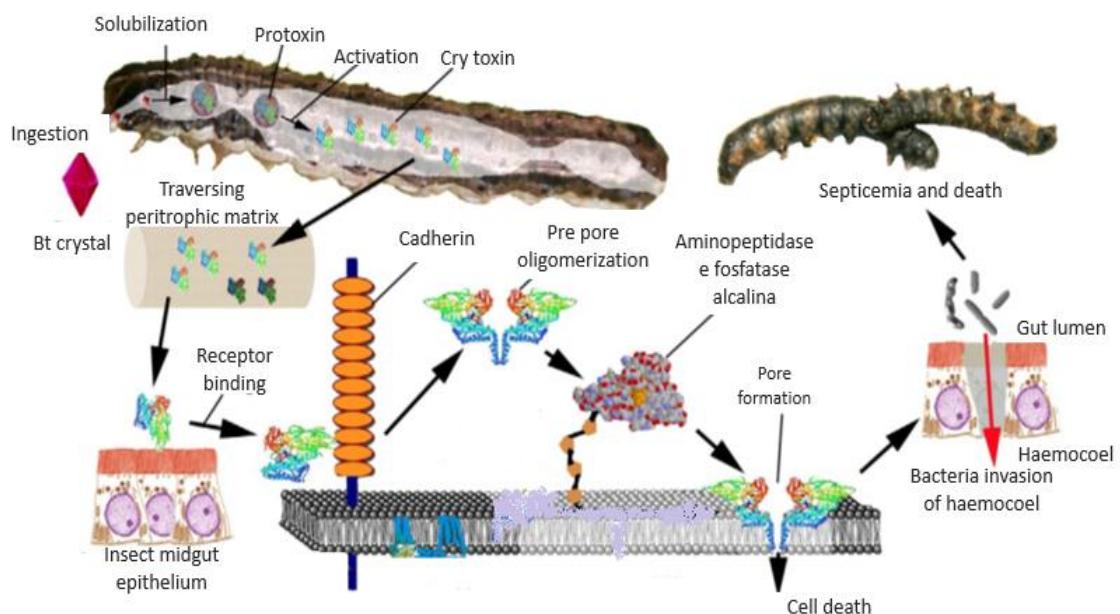
Figura 6 - Representação do modelo clássico de ação das proteínas Cry



Fonte: Adaptado e modificado de Adang; Crickmore; Jurat-Fuentes, (2014)

No segundo modelo, conhecido como “Ligação Sequencial”, os poros se formam na membrana plasmática resultante da ligação sequencial das proteínas Cry com um receptor específico de caderina que danifica o equilíbrio osmótico (MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2014). Detalhes deste mecanismo têm sido elucidados a partir de estudos realizados com a proteína Cry1Ab e da sua atividade tóxica para insetos da Ordem Lepidoptera. Neste caso, as toxinas Cry após serem ingeridas, são ativadas por proteases digestórias tornando-se receptivas às ligações com receptores de caderina que facilitam a proteólise da α -hélice 1, presente na porção N-terminal da proteína Cry, induzindo a formação de oligômeros (DORSCH; CANDAS; GRIKO, 2002; HUA et al., 2004; JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2008). Estas ligações resultam na clivagem proteolítica das toxinas causando mudanças estruturais nas suas cadeias formando oligômeros que funcionam como “pré-poros” na membrana. O receptor de N-aminopeptidase tem afinidade molecular e atua na ancoragem do pré-poro na bicamada lipídica. Em seguida, ocorre a formação de poros na membrana apical das células intestinais promovendo um choque osmótico que conduz à morte do inseto (SOBERÓN, et al., 2009; VACHON, et al., 2012; ALMEIDA MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2014).

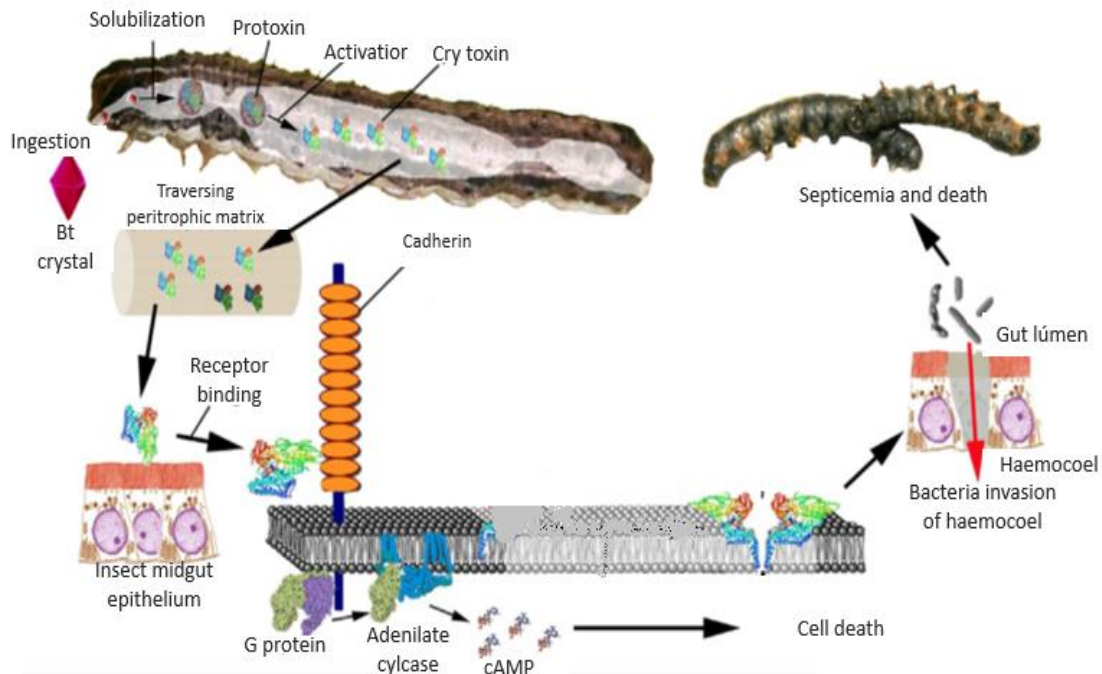
Figura 7 - Representação do modelo de ligação sequencial das proteínas Cry



Fonte: Adaptado e modificado de Adang; Crickmore; Jurat-Fuentes, (2014)

O terceiro modelo descrito, mais recentemente, é denominado “ação de via de sinalização”, no qual a citotoxicidade das proteínas pode afetar a célula de duas maneiras: a primeira, ocorre de forma lítica formando poros na membrana como no modelo de ligação sequencial; e na segunda, produzindo reações sucessivas que alteram o metabolismo celular (ALMEIDA MELO; SOCCOL; SOCCOL, 2014). Na segunda via, a citotoxicidade seria mediada pela ligação das toxinas Cry com receptores de caderina e N-aminopeptidase. Esse processo não está elucidado mas infere-se que neste processo ocorre a transmissão de estímulos que resultam na ativação de uma cascata de sinalização dependente de Mg^{2+} e uma via de sinalização estimulada pela proteína G e a adenilil-ciclase, resultando no aumento de concentração de adenosina monofosfato (AMP) cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A, que desestabiliza o citoesqueleto promovendo a formação de canais iônicos na membrana plasmática ocasionando a morte celular (VACHON, et al., 2012; ZHANG, et al., 2006).

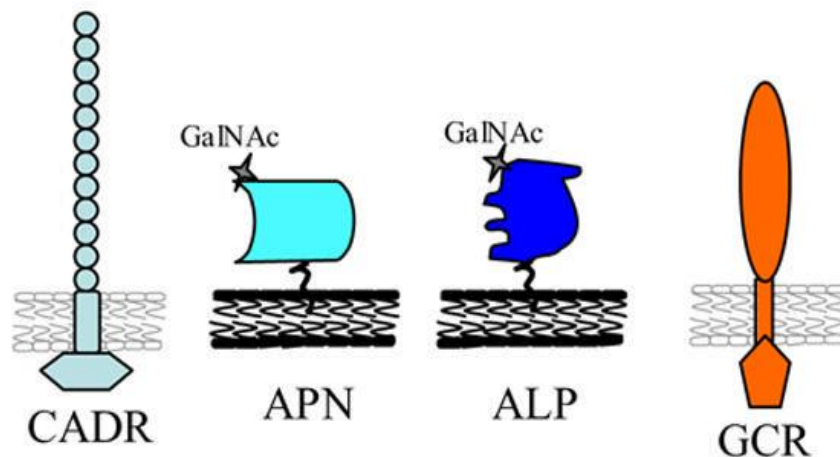
Figura 8 - Representação do modelo de ação de via de sinalização



Fonte: Adaptado e modificado de Adang; Crickmore; Jurat-Fuentes, (2014)

Até o momento, quatro proteínas que agem como receptoras que se ligam às toxinas Cry foram identificadas (Figura 9): a N-aminopeptidase (APN) e a fosfatase alcalina (ALP), ambas ancoradas à membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI); a glicoproteína caderina (CADR) e uma proteína glicoconjugada (GCR).

Figura 9 - Receptores moleculares da proteína Cry1Aa. CADR (caderina); APN (N-aminopeptidase); ALP (fosfatase alcalina) e GCR (glicoconjugado de 270kDa)



Fonte: Bravo et al., (2007)

Independentemente do mecanismo de ação, está bem estabelecido que as toxinas Cry modificam os enterócitos no intestino do inseto hospedeiro para comprometer a barreira epitelial intestinal, o que é fundamental para facilitar o acesso de *B. thuringiensis* à hemolinfa. Além disso, a integridade colapsante do epitélio intestinal durante a intoxicação por Cry também resulta em condições fisiológicas intestinais alteradas, que juntamente com a interação com a membrana do intestino médio favorecem a germinação do esporo de *B. thuringiensis* (DU; NICKERSON, 1996; BRAVO et al., 2007).

1.4 Os genes *cry*

As proteínas Cry são codificadas por genes *cry* que se localizam, principalmente em plasmídeos, preferencialmente em plasmídeos conjugativos (ARANTES; VILAS-BOAS; VILAS-BÔAS, 2002) e, com menor frequência no cromossomo bacteriano (VILAS-BÔAS et al., 2007; ROH et al., 2009). Uma

linhagem de *B. thuringiensis* pode conter uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou diferentes *cry* responsáveis pela síntese de diferentes proteínas Cry que compõem um mesmo cristal (LERECLUS et al., 1993; ARANTES; VILAS-BOAS; VILAS-BÔAS, 2002). A preferência destes genes por plasmídeos conjugativos, somada a associação com sequências de inserção e transposons (Mahillon et al., 1994), pode justificar a diversidade destes genes e as diferentes combinações deles resultando em cristais proteicos com diferentes tipos de proteínas Cry e, conseqüentemente, em diferentes linhagens de Bt com perfil de toxicidade distintos (ARANTES; VILAS-BOAS; VILAS-BÔAS 2002; PÉREZ, 2004; PIGOTT; ELLAR, 2007).

Os genes *cry* possuem elevados níveis de expressão. Em partes, esta característica pode ser explicada devido à alta estabilidade do mRNA, que possui em média meia-vida de 10 min, ao menos 5 vezes maior do que a maioria dos mRNA bacterianos (GLATRON; RAPOPORT, 1972). A presença de um terminador transcricional com sequências repetidas e orientação palindrômica situado na extremidade 3' do mRNA pode atuar como um retro-regulador positivo, protegendo o mRNA da degradação por exonucleases, aumentando assim a meia-vida das transcrições (WONG; CHANG, 1986). Além disso, a análise da expressão do gene *cry3A* de *B. thuringiensis*, revelou que a interação de uma sequência consenso Shine-Delgarno (SD) não transcrita com a extremidade 5' do mRNA também é fator que pode influenciar na estabilidade da molécula (AGAISSE; LERECLUS, 1995).

A classificação dos genes *cry* também pode ser determinada de acordo com os mecanismos de regulação transcricional que os controlam: aqueles, nos quais a expressão é controlada por fatores sigmas (σ) específicos de esporulação σ^K e/ou σ^E , denominados genes *cry* dependentes de esporulação e aqueles nos quais a expressão dos genes ocorre sob o controle do fator σ^A , durante a fase vegetativa, intitulados de genes *cry* independentes de esporulação (AGAISSE; LERECLUS, 1995; YANG et al., 2012). Outros fatores ainda podem contribuir para a regulação transcricional da expressão dos genes *cry*, como as proteínas PDH E2⁽⁺⁾ e Spo0A (DENG et al., 2014).

O controle da expressão dos genes *cry1A*, *cry1C* e *cry1D* é caracterizado pela presença de dois promotores que se sobrepõem garantindo uma taxa constante de transcrição durante o período de esporulação. A subunidade da

proteína PDH E2⁽⁺⁾ é responsável por vincular regiões de DNA a montante dos promotores destes três genes. Porém, a presença de três sítios de ligação próximos, no gene *cry1A*, não encontrados no gene *cry1C*, sugere que ocorra maior afinidade do oligômero E2 para *cry1A*, diferenciando os mecanismos de expressão gênica entre estes (WALTER; ARONSON, 1999). Além disso, apesar da regulação do gene *cry1A* ser prioritariamente, dependente de esporulação, foi demonstrado que a sua transcrição também pode ser regulada, em níveis baixos, pela proteína Spo0A durante as fases exponenciais e de transição (YANG et al., 2012).

1.4.1 Genes *cry* dependentes de esporulação

O ciclo de vida de *B. thuringiensis* pode ser dividido em quatro estágios: estágio I, de crescimento vegetativo; estágio II, transição para a esporulação; estágio III, de esporulação e estágio IV, no qual ocorre a maturação do esporo e lise celular (HILBERT; PIGGOT, 2004). As proteínas codificadas por genes *cry* dependentes de esporulação começam a ser sintetizadas no início do estágio II e são acumuladas na célula-mãe até a fase IV (RIBIER; LECADET, 1973).

Estudos relacionados ao processo de esporulação da espécie de *B. subtilis*, demonstram que este é regulado temporariamente e espacialmente por um conjunto de fatores σ da RNA polimerase (PIGGOT; HILBERT, 2004). Os fatores σ^A e σ^H atuam na célula pré-divisional, antes da formação do septo que compacta o pré-esporo, σ^E e σ^K atuam na célula-mãe e σ^F e σ^G são ativos no pré-esporo (WANG et al., 2013). Como os fatores σ que controlam o mecanismo de esporulação em *B. thuringiensis* apresentam similaridade funcional aos presentes na espécie *B. subtilis*, é assumido que o mesmo processo de esporulação ocorre em ambas as espécies (DRIKS, 2002; WANG et al., 2013).

O desenvolvimento da esporulação é controlado por sucessivas ativações de fatores que se ligam à RNA polimerase para direcionar a transcrição determinando quais promotores específicos da esporulação serão reconhecidos (MORAN, 1993; AGAISSE; LERECLUS, 1995; SCHNEPF et al., 1998). O processo de diferenciação celular é regulado de maneira temporal e a nível transcricional, devido a ativação do fator σ^A durante a fase vegetativa e de cinco outros fatores (σ^H , σ^F , σ^E , σ^G , σ^K) regulados de forma temporal durante a fase de

esporulação (RIBIER; LECADET, 1973; AGAISSE; LERECLUS, 1995). A ativação constante dos fatores σ^E e σ^K nas células mãe garante a transcrição contínua e intensa dos genes *cry* (DENG et al., 2014).

A regulação da expressão do gene *cry1Aa* de *B. thuringiensis* é um típico exemplo de genes que dependem da esporulação para serem expressos (AGAISSE; LERECLUS, 1995). A sua transcrição é controlada sequencialmente, durante a esporulação, por dois promotores sobrepostos, Btl e BtII (BRAVO et al., 1996). Os promotores Btl e BtII são direcionados pelos fatores sigma σ^{35} e σ^{28} , respectivamente, que apresentam homologia com os fatores sigma σ^E e σ^K de *B. subtilis* (BRAVO et al., 1996). Btl é ativo na fase de esporulação entre T_2 e T_6 (T_n indica o número de horas após o final da fase exponencial) e BtII é ativo de T_5 em diante (SCHNEPF et al., 1998).

Entre os genes dependente de esporulação, como *cry1Aa*, nos quais a transcrição é direcionada por dois fatores sigma, há aqueles em que a regulação da transcrição gênica é controlada por apenas um fator. Como os genes *cry15A* e *cry2* que são regidos pela presença do fator σ^E (WIDNER; WHITELEY, 1989; BROWN, 1993) sendo expressos por um período relativamente mais curto quando comparado com os demais genes *cry* (ARONSON, 2002).

1.4.2 Genes *cry* não-dependentes de esporulação

O gene *cry3Aa*, presente em *B. thuringiensis* subsp *tenebriones*, que codifica a proteína Cry3Aa tóxica para coleópteros tem a fase vegetativa da bactéria como fator determinante da expressão gênica (Deng et al., 2014). Mas também pode apresentar expressão em menores concentrações na fase estacionária (SEKAR et al., 1987; SCHNEPF et al., 1998). A expressão do gene *cry3Aa* é dependente do fator sigma σ^A , que atua na célula pré-divisional, e não é influenciado pelos fatores de esporulação. Além disso, é provável que exista um evento repressor da expressão deste gene em fases mais avançadas da esporulação (AGAISSE; LERECLUS, 1994).

De acordo com Zhou e colaboradores (2014), a sequência STAB-SD que estabiliza o complexo de transcrição do gene *cry3* tem sido utilizada para melhorar os rendimentos das proteínas Cry. Neste caso, a combinação de promotores do gene *cyt1A* com a sequência estabilizadora do mRNA STAB-SD de *cry3A*, pode

aumentar as expressões dos genes *cry2A* e *cry11A*, dependendo da proteína específica produzida (PARK et al., 1999). Em comparação com as linhagens selvagens, observou-se que a produção da proteína Cry2A aumentou, praticamente cinco vezes enquanto a proteína Cry11A apresentou aumento de apenas 1,3 vezes (PARK et al., 1999).

Além disso, vetores construídos com base no promotor do gene *cry3A* têm sido utilizados para expressar genes *cry* e produzir estirpes geneticamente modificadas (ZHOU et al., 2014). Em estudo realizado por Garcia-Gomez et al. (2013), foi demonstrado que as proteínas Cry1AbMod e Cry1AcMod (versões modificadas de proteínas Cry, que apresentam melhores resultados no processo de oligomerização em lepidópteros) podem ser produzidas de forma eficaz em *B. thuringiensis* sob a regulação da região promotora do gene *cry3A*.

Os genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa* em *B. thuringiensis* são expressos, principalmente, durante a fase de esporulação. Entretanto, a transcrição destes genes foi detectada em pequenas proporoes durante a fase de transição da célula-mãe comeando em T₋₂ e seguindo até o início da esporulação. Esta expressão pode ser regulada devido a interação do fator σ^H e da proteína Spo0A, no qual a presena do fator σ^H ativa a expressão dos genes, durante a fase de transição, enquanto Spo0A reprime o processo quando as células iniciam a esporulação (PONCET et al., 1997).

Uma outra característica que difere os genes dependentes de esporulação dos independentes de esporulação é evidenciada na linhagem LM1212. Esta estirpe pode apresentar populaoes que possuem diferenciação entre as células produtoras de cristais e as células formadoras de esporos, de modo que, os cristais são produzidos por uma subpopulação de células que não esporulam. Estudos sobre a expressão dos genes *cry* de LM1212 revelaram que estes são expressos continuamente por várias horas e que os promotores que ativam os genes *cry*, no final da fase exponencial, não são controlados pelos fatores σ^E e σ^K , indicando que existe outro mecanismo de regulação gênica (DENG et al. 2014).

REFERÊNCIAS

ABIC – Associação brasileira da indústria do café. Disponível em: <<http://www.http://abic.com.br/>>. Acesso em: 20 out. 2017.

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: Dadhialla, T. S.; Gill, S. S. **Insect Midgut and Insecticidal Proteins**. 1. ed. USA: Elsevier (Advances in Insect Physiology), 2014. p. 39 - 87.

AGAISSE, L. F.; LERECLUS, D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIIIA toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. *Journal of Bacteriology*, 176: 4734-4741, 1994.

AGAISSE, L. F.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal Crystal protein? *Journal of Bacteriology*, 177: 6027- 6032, 1995.

AGUIAR MENEZES, E. de L. Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

ALMEIDA MELO, A. A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Crit Rev Biotechnol*, 2014.

ALVES, M. D. C.; ROSSI, J. R.; RODRIGUES, M. G. F.; ALVES, E. C. D. C.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A. Identificação e caracterização de genes vip e cry coleóptero-específicos em isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 1053-1060, 2011.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA). **Anvisa**, Brasília, 2010. 22p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d214350042f576d489399f536d6308db/RELAT%c3%93RIO+DO+PARA+2009.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: jan. 2016.

AOKI, K.; CHIGASAKI, Y. Über die pathogenität des sog. **Sotto-Bacillen (ishiwata) bei seidenraupen**, **Mitt. Med Fak. Kaiser Univ. Tokyo**, v. 13, p. 419-440, 1915.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BOAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. **Biotecnologia: Avanços na agricultura e agroindústria**. **Caxias do Sul: EDUCS**, v. 2, p. 269-293, 2002.

ARONSON, A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 59, p. 417–425, 2002.

AZEVEDO, F.R.; GURGEL, L.S.; SANTOS, M.L.L.; SILVA, F.B.; MOURA, M.A.R.; NERE, D.R. Eficácia de armadilhas e atrativos alimentares alternativos na captura de moscas-da-fruta em pomar de goiaba. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.79, p.343-352, 2012.

BARBOSA, E. A. D., et al., Alpha-amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits alpha-amylases from the coffee berry borer pest. **BMC Biotechnology**, v. 10, p. 44. 2010.

BARRERA, G.; FRANCISCO, J. Dynamique des populations du scolyte des fruits de caféier, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae), et lutte biologique avec le parasitoïde *Cephalonomia Stephanoderis* (Hymenoptera: Bethyilidae), au Chiapas, Mexique. 1994.

BEEGLE, C.; YAMAMOTO, T. Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research And Development. **The Canadian Entomologist**, v. 124(4), p, 587-616, 1992.

BENASSI, V.L.R.M. Aspectos bioecológicos da Broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (F., 1867) (Coleóptera: Scolytidae), em frutos de açaí, *Euterpe oleraceae*. In: Simpósio dos cafés no Brasil. **Anais...** p. 1178-1180. 2000

BENASSI, V. L. R. M; CARVALHO, C. H. S. Preferência de ataque a frutos de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* pela broca-do-café (*Hypothenemus hampei* Ferrari, 1867 Coleoptera, Scolytidae). **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 69, n. 1, p. 102, 1994.

BENAVIDES, P; GÓNGORA, C; BUSTILLO, A. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia. In: PERVEEN, F. 2012. **Insecticides – Advances in Integrated Pest Management**. 1º ed. Rijeka, Croacia: InTech, p. 511-540, 2012.

BERGAMIN, J. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleóptera Ipidae). **Arquivos do Instituto biológico**, São Paulo, v. 14, p.31-72, 1943.

BOONSERM, P., DAVIS, P., ELLAR, D.J., LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **J. Mol. Biol**, v. 348, p. 363–382, 2005.

BOONSERM, P., MO, M., ANGSUTHANASOMBAT, C., LESCAR, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. **J. Bacteriol**. 188, 3391–3401, 2006.

BRAVO, A., H. AGAISSE, S. SALAMITOU, AND D. LERECLUS. Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Gen. Genet*, v. 250, p. 734–741, 1996.

BRAVO, A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 9, p. 2793, 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.E., SOBERÓN, M., and QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**.vol. 64, nº 12, p. 4965 – 4972, 1998.

BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier BV, Amsterdam, p. 175–206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n.4, p. 423 – 435, 2007.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B. I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial biotechnology**, v. 6(1), p. 17-26, 2012

BRESSANI, Edgard. Guia do barista: da origem do café ao espresso perfeito. **São Paulo: Café**, 2007.

BROWN, K.L. Transcriptional regulation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* crystal protein gene operon. **J. Bacteriol**, v. 175, p. 7951–7957, 1993.

BUSTILLO, P. A. E.; CÁRDENAS, M.; R.; VILLALBA, G. D. A.; BENAVIDES, M. P.; OROZCO, H. J.; POSADA, F. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) en Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafe). Chinchiná, Colombia, p.134, 1998.

CAB - International Centre. The 2010 worldwide biopesticides market summary. CAB International Centre, Wallingford, p. 40, 2010.

CANTOR, F.; BENASSI, V.L.R.M.; FANTON, C.J. reis. **Ribeirão Preto: Holos**, p. 99-105, 2001.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M.; SUZUKI, M. T. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. Revista Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento, 34, 78 – 84, 2005.

CÁRDENAS, S. I. **Caracterización morfológica y agronómica de la**

colección núcleo de café (*Coffea arabica* L. del CATIE). Tesis (Mestrado em Agricultura Ecológica) – CATIE, Turrialba, Costa Rica, CATIE, p. 117, 2007.

CASCO-GÓMEZ, K. V. **Potencial de pérdidas económicas debido a *Hypothenemus hampei*, en PahalaHawaii y costo/beneficio de usar *Beauveria bassiana* en café.** 2012. Tese (Licenciatura Administração e Agronegocios) - Escuela Agrícola Panamericana ,Francisco Morazán, Honduras,2012.

CASTILLO, A.; INFANTE, F.; BARRERA, J. F.; CARTA, L.; VEGA, F. E. First field report of a nematode (Tylenchida: Sphaerularioidea) attacking the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 79, n.3, p. 199–202, 2002.

CECAFE. Conselho dos exportadores de café do Brasil. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/producao/>> Acesso em: 21 nov. 2017.

CONSTANTINO, L. M.; NAVARRO, L.; BERRIO, A.; ACEVEDO, F. E.; RUBIO, D.; BENAVIDES, P. Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Revista Colombiana de Entomología**. v. 37, n. 2, p. 173-182, 2011.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62(3), p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M; ZEIGLER, D. R. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.** 2015. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 02 Jan. 2015.

CTNBio. Comissão Técnica de Biossegurança. Disponível em: <http://www.ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial> Acesso em: 10 mar. 2018.

DAMON, A. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.90, p.453-465, 2000. DOI: 10.1017/S0007485300000584.

DE LA ROSA W.; ALATORRE, R.; TRUJILLO, J.; BARRERA, J. F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **J. Econ. Entomol**, v. 90, p. 1534-1538, 1997.

DE LA ROSA W.; ALATORRE, R.; TRUJILLO, J.; BARRERA, J. F. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the Coffee Berry Borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. **J. Econ. Entomol**, v, 93, p. 1409-1414, 2000.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **TRENDS in Genetics**,

v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DE MENDONÇA, Sonia Regina. O Convênio de Taubaté e a agricultura fluminense. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 4, p. 88, 2008.

DE MELO, F. H. Café brasileiro: não a um novo acordo internacional. *Revista de economia política*, v. 13, 1993.

DENG, C.; PENG, Q.; SONG, F.; LERECLUS, D. Regulation of *cry* Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, v. 6. p.2194-2209, 2014.

DORSCH, J. A.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B. Cry1A toxins of *Bacillus thuringiensis* bind specifically to a region adjacent to the membraneproximal extracellular domain of Bt-R1 in *Manduca sexta*: involvement of a cadherin in the entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 32, p.1025–36, 2002.

DRIKS, A. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*, v. 59, p. 389–391, 2002.

DU, C., NICKERSON, K.W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 62, p. 3722–3726, 1996.

DULMAGE, H. T. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 15, n. 2, p. 232-239, 1970.

DUFOUR, B.P.; FRÉROT, B. Optimization of coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Col., Scolytidae), mass trapping with an attractant mixture. **Journal of Applied Entomology**, v. 132, n. 7, p. 591-600, 2008.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G.; MULLINS, M.; NYE, G.; CRAIG, J.; KOZIEL, M. 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, n.11, p. 5389-5394, 1996.

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

FERNANDES, F. L.; PICANÇO, M. C. DA SILVA, R. S. DA SILVA, I. W.; FERNANDES, M. H. S.; RIBEIRO, L. H. **Controle massal da broca-do-café com armadilhas de garrafa Pet vermelha em cafeeiro**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.49, n.8, p.587-594, ago. 2014.

FERNÁNDEZ, S.; CORDERO, J. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) em condiciones de laboratorio. **Bioagro**, v. 19, n. 1, p. 35-40, 2007.

FORNAZIER J. M; FANTON J; BENASSI, V. L. M. R; MARTINS; D. dos S. Pragas do café Conilon. In: FERRÃO R.G.; FONSECA A. F. A. da; BRAGANÇA S. M.; FERRÃO, M.A.G., DE MUNER, L. H. (Ed.) **Café Conilon**. Vitória: INCAPER, p. 405-449, 2007.

FURTADO, C. Formação econômica do Brasil. 4ª edição. Rio de Janeiro. Editora Fundo de Cultura, 1969, p. 114-116, 126-127 e 165-171.

GALITSKY, N., CODY, V., WOJTCZAK, A., GHOSH, D., LUFT, J.R., PANGBORN, W., ENGLISH, L. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. Acta Crystallogr. Sec. D Biol. Crystallogr, v. 57, p. 1101–1109, 2001.

GALLO, D.; KANANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, p. 920, 2002.

GIORDANENGO, P.; BRUN, L. O.; FREROT, B. EVIDENCE FOR ALLELOCHEMICAL ATTRACTION OF THE COFFEE BERRY BORER, *Hypothenemus hampei*, BY COFFEE BERRIES. **Journal of Chemical Ecology**, Vol. 19, No. 4, 1993.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety**. Chichester. John Wiley & Sons, Nova Jersey, USA, 368 p., 2000.

GLATRON, M. F.; RAPOPORT, G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. **Biochimie**, v. 54, n. 10, p. 1291-1301, 1972.

GOLDBERG, L.; MARGALIT, J. Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. Mosquito News, v. 37, p. 355-358, 1977.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J. L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. J. Mol. Biol. 54, 447–464, 1995.

GUO, S., YE, S., LIU, Y., WEI, L., XUE, J., WU, H., SONG, F., ZHANG, J., WU, X., HUANG, D.; RAO, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: an insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. J. Struct. Biol, v. 168, p. 259–266, 2009.

HILBERT, D. W.; PIGGOT, P. J. Compartmentalization of gene expression. During *Bacillus subtilis* spore formation. Microbiology and Molecular Biology Review, 68 (2): 234 – 262, 2004.

- HÖFTE H., WHITELEY H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Ver**, v. 53, p. 242–255, 1989.
- HORNE, J. E.; MCDERMOTT, M. The Next Green Revolution: essential steps to a healthy, sustainable agriculture. New York: Food Products Press, p. 312, 2001.
- HUA, G., JURAT-FUENTES, J.L., ADANG, M.J. Bt-R1a extracellular cadherin repeat 12 mediates *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab binding and cytotoxicity. **J. Biol. Chem**, v. 279, p. 28051–28056, 2004.
- HUSZ, B., 1928. *Bacillus thuringiensis* Bed. a bacterium pathogenic to corn borer larvae. Int. Corn Borer Invest. Sci. Rep., v. 1, p. 191-193, 1928.
- ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics>. Acesso em: 21 ago. 2017.
- ICO – INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. Disponível em: http://www.ico.org/pt/botanical_p.asp. Acesso em: 21 nov. 2017.
- ISSA Brief 46, International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, New York. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/infographic/default.asp>. Acesso em: 20 out. 2017.
- JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; BAKER, P.S. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. **Bulletin of Entomological Research**, V. 96, p.223-233, 2006.
- JARAMILLO, J., MUCHUGU, E., VEGA, F. E., DAVIS, A., BORGEMEISTER, C., & CHABI-OLAYE, A. Some like it hot: the influence and implications of climate change on coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee production in East Africa. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24528, 2011.
- JIMÉNEZ-JUÁREZ, N., MUÑOZ-GARAY, C., GÓMEZ, I., GILL, S.S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. **Peptides**, v. 29, p. 318–323, 2008.
- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131(1), p. 1-11, 1998.
- JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of invertebrate pathology**, v. 142, p. 5–10, 2016.

KIROUAC, M.; VACHON, V.; NOËL, J.-F.; GIRARD, F.; SCHWARTZ, J.L.;

KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 924, p. 509–518, 1987.

KRAKER, J. de. **The coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.): factors affecting emergence and early infestation. Report of field experiments.** Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste, Tapachula (México), 1988.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, v. 42, p.112-122, 1992.

LAURENTINO, E.; COSTA, J.N.M. Descrição e caracterização biológica da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*, Ferrari 1867) no Estado de Rondônia. Porto Velho: **EMBRAPA Rondônia** (DOC 90), 21p, 2004.

LEEFMANS, S. The coffee berry borer, *S. hampei*. I. Life history and ecology. **Meded. Inst. Plantenzieken**, v. 57, p. 61-67, 1923.

LERECLUS, D.; ARANTES, O.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Letters**, v. 60, p. 211-218, 1989.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BEILEY, M. J.; HIGGS, S. *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltda., p.37 – 69, 1993.

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.J.; CHIU, S.S.; CURRIER, S.; GONZALES JR, J.M. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid-chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3172-3179, 1990.

LI, J.D., CARROLL, J., ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353 (6347), p. 815–821, 1991.

LÓPEZ-PAZOS, S.A.; GÓMEZ, J. E. C.; CERÓN-SALAMANCA, J. A. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, V.101, p. 242–245, 2009.

LÓPEZ, J. C.; GÓNGORA, C. E.; PLICHTA, K.; STOCK, P. PLICHTA K. A new entomopathogenic nematode, *Steinernema colombiense* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) from Colombia. **Holanda Nematology**, v. 10, n. 4, p. 561-

574, 2008.

LÖVEGREN A.; ZHANG M. Y.; ENGSTRÖM A.; DALHAMMAR G.; LANDÉN R. Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v.4, n.12, p. 2137-2146, 1990.

LÜTHY, P.; CORDIER, J. L.; FISCHER, H. M. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic considerations and application. **Microbial and Viral Pesticides**, E. Kurstak, Ed., Marcel Dekker, NY, p. 37-39, 1982.

MAHILLON, J., REZSÖHAZY, R., HALLET, B., & DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: A review. **Genetica**, v. 93(1-3), p. 13-26, 1994.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ministério da Agricultura prioriza controle de oito pragas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2015/08/ministerio-da-agricultura-prioriza-controle-de-oito-pragas>>. Acesso em: 7 ago. 2016.

MARTINS, Ana Luiza. **História do café**. Editora Contexto, p. 18-40, 2012.

MARTINS, E. S. Estudo da atividade de proteínas cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro. Tese (Doutorado em Biologia Molecular), p, 104-131 – Universidade de Brasília, 2009.

MELO, B.; SOUSA, L. B. Biologia da reprodução de *Coffea arábica*. L. e *Coffea canephora* Pierr. **Revista Verde**, V. 6, n.2, p.01-07, 2011.

MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agric Ecosyst Environ**, v. 49, p. 9–13, 1994.

MIRANDA, J.E.; SILVA, C.A.D. da. Behavioural control of the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), in Northeast Brazil. **Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas**, v.31, p.509-515, 2005.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). **Agrotóxico endossulfan será banido do Brasil**. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/informma/item/7020-agrotoxico-endossulfan-sera-banido-do-brasil>>. Acesso em: 20/11/2017.

MOORE, D.; PRIOR, C. Present status of biological control of the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. In: **Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases-1988. Vol. 3**. British Crop Protection Council, p. 1119-1124, 1988.

MORAN, C. P. RNA polimerase and transcription factors. In: Sonestein, A. L., Hoch, J. A.; Losick, R. (Eds). *Bacillus subtilis* and other gram positive bacteria. Amer. Soc. Microbiol. p. 653-667, 1993.

MORSE, R.J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure (Camb.)* 9, 409–417, 2001.

NEVES, P. M. O. J.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). **Neotropical Entomology** v. 34, n. 1, p. 77-82, 2005.

NICHOLLS, W. H. A fronteira agrícola na recente história do Brasil: O Estado do Paraná, 1920-65. *R. Bras. Econ*, v. 24, p. 113-91, 1970.

NORRIS, J. R. The classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 439-447, 1964.

OKUMURA, A. S. K.; NEVES, P. M. O. J.; POSSSAGNOLO, A. F.; CHOCOROSQUI, V. R.; SANTORO, P. H. Controle da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) em terreiros de secagem de café. *Semina, Londrina*, v.24, n.2, p.277-282, 2003.

ORTIZ-PERSICHINO, C. Pérdidas por la broca del café en el Soconusco, Chiapas. **Informe técnico. CIES**, 1991.

PARDO-LÓPEZ, L., SOBERÓN, M., BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal threedomain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Ver*, v. 37, p. 3–22, 2013.

PARK, H. W.; BIDESHI, D. K.; JOHNSON, J. J.; FEDERICI, B. A. Differential enhancement of Cry2A versus Cry11A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of the cry3A STAB mRNA sequence. **FEMS microbiology letters**, v. 181(2), p. 319-327, 1999.

PARKER, M. W.; FEIL, S.C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Progr Biophys & Mol Biol*, v. 88, p. 91–142, 2005.

PASTOR, L. **Governo deverá definir regras para a retenção até o final da semana**. *Gazeta Mercantil, São Paulo*, p. 2-3, 1993.

PENATOS, R.; OCHOA, H. La consistencia del fruto del café y su importancia en el control de broca. **Revista Cafetalera**, v.181, p. 11-16, 1979.

PÉREZ, V. J. Genética y Biología Molecular de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERÓN, J (Ed) ***Bacillus thuringiensis* en el control biológico**, Bogotá. Colombia, p. 207-232, 2004.

PIGGOT, P.J.; HILBERT, D.W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 7, p. 579–586, 2004.

PIGOTT, C. R., & ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis*

crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71(2), p. 255-281, 2007

PONCET, S.; DERVYN, E.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Spo0A represses transcription of the cry toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology**, v. 143, p. 2743–2751, 1997.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 144 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2004.

REBELLES REIS, Paulo. Controle químico no manejo integrado da broca-do-café. Manejo da broca-do-café. Anais. In: **Workshop Internacional de Manejo da Broca-de-Café 28 Nov-2 Dez 2004 Londrina (Brasil)**. Instituto Agronômico do Paraná, Londrina, PR (Brasil), 2007.

RIBIER, J.; M. M. LECADET. Etude ultrastructurale et cinétique de la sporulation de *Bacillus thuringiensis* var. berliner 1715. Remarques sur la formation de l'inclusion parasporale. **Ann. Microbiol.** (Inst. Pasteur), v. 124, p. 311-344, 1973.

ROH, J.Y., CHOI, J.Y., LI, M.S., JIN, B.R., and JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe and effective tool for insect pest control. **J. Microbiol. Biotechnol.** 17: 547 – 559, 2007.

SANCHIS V. Genetic improvement of Bt strains and development of novel biopesticides. *Bacillus thuringiensis* biotechnology. Netherlands: Springer. Schwartz JL, Laprade R, 2012.

SHARIFI, F.; HOSEINPOOR, R.; SADRI, A.; ANSARI, N. Tests to attract and kill of the fig fruit fly *Drosophila* sp. in Darab as a part of an integrated pest control system. **International Journal of Agriscience**, v.3, p.25-29, 2013.

SCHNEPF, E; CRICKMORE. N.; J; LERECLUS. D; BAUM, J; FEITELSON. J; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. V. 62, p. 775-806, 1998.

SEKAR, V.; THOMPSON, D.V.; MARONEY, M. J.; BOOKLAND, R. G.; ADANG, M. J. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 84, pp. 7036-7040, October 1987 Biochemistry.

SILVA, F.C. da; VENTURA, M.U.; MORALES, L. Capture of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae) in response to trap characteristics. **Scientia Agricola**, v.63, p.567-571, 2006. DOI: 10.1590/S0103-90162006000600010.

SILVA CÍCERO, E. A.; FERRAUDO, A. S.; FRANCO LEMOS, M. V. Identificação de genes cry de *Bacillus thuringiensis* no controle de

Sphenophorus levis, o bicudo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 68, n. 4, 2009.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midguts cells? **Celular and Molecular Life Sciences**; 66:1337-1349, 2009.

SOBERÓN, M., RODRIGUEZ-ALMAZÁN, C., MUÑOZ-GARAY, C., PARDO-LÓPEZ, L., PORTA, H., & BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 104(2), p. 111-117, 2012.

SNA – SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Ataques da broca-do-café já causam prejuízos milionários na atual safra**. Disponível em: <http://www.sna.agr.br/ataques-da-broca-do-cafe-ja-causam-prejuizos-milionarios-na-atual-safra/>. Acesso em: 11 mar. 2018.

SOUZA, JC de; REIS, P. R. Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. **Belo Horizonte: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, 1997.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; SILVA, R.A.; CARVALHO, T.A.F.; PEREIRA, A.B. Controle químico da broca-do-café com Cyantraniliprole. **Coffee Science**, Lavras, v.8, n.4, p.404-410, 2012.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; SILVA, R. A.; TOLEDO, M. A. **Cafeicultor: saiba como monitorar e controlar a broca-do-café com eficiência**. EPAMIG. Circular Técnica, n.205, mar. 2015.

SUREKHA, K.; ROYER, M.; NAIDU, R. Bioassay of *Bacillus thuringiensis* toxins against two major coffee pests, i.e. coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and coffee white stem borer (*Xylotrechus quadripes*). In: SIP, Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Foz de Iguaçu, Brasil. **Program and Abstracts**, Foz de Iguaçu, PR, Brasil, p.85, 2002.

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

TAKEMATSU, A. P.; JOCYS, T.; POTENZA, M. R. Manejo da Resistência da Broca a Inseticidas. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO. **Anais...Mococa**. p.85-88, 2004.

TICHELER, J. Etude analytique de l'épidémiologie du scolyte des graines de café *Stephanoderis hampei* Ferr. en Cote d'Ivoire. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, v.61, p. 1-49, 1961.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency and US Department of Agriculture. 1999. **Report of EPA/USDA workshop on Bt Crop Resistance**

Management in Cootton. Memphis, Tennessee. August 26, 1999. Esther Day, ed. 80p. American Farmland Trust, Center of Agriculture in the Environment. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>>.

VACHON, V; LAPRADE, R; SCHWARTZ, J. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of invertebrate pathology**; 111:1-12, 2012.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal os Invertebrate Pathology**, v.101, n. 1, p. 1–16, 2009.

VARAPRASAD, K. S.; BALASUBRAMANIAN, S.; DINAKAR, B. J.; RAO, R. C. V. R. 1994. First report of an entomogenous nematode, *Panagrolaimus* sp., from coffee-berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) from Karnataka, India. **Plant Protection Bulletin Faridabad**, v. 46, n. 2-3, p. 34-44, 1994.

VEGA, F.E.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews**. V.2.p. 129-147, 2009.

VEGA, F.E., MEYLING, N.V., LUANGSA-ARD, J.J., BLACKWELL, M. Fungal entomopathogens. In: Vega, F.E., Kaya, H.K. (Eds.), *Insect Pathology*, second ed. Academic Press, San Diego, p. 171–220, 2012.

VEGA, F. E.; INFANTE, F.; JOHNSON, A. J. The Genus *Hypothenemus*, with Emphasis on *H. hampei*, the Coffee Berry Borer. Elsevier Inc. **All rights reserved**, p. 427-494, 2015.

VIDAL-QUIST, J.C., CASTAÑERA, P., and GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitiscapitata*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 19, p. 749 – 759, 2009.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 605 – 613, 2004.

VILAS-BÔAS, 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, n. 1, p. 673 – 687, 2007.

VILLACORTA, A., POSSAGNOLO, A.F., SILVA, R.Z., RODRIGUES, P.S. Um modelo de armadilha com semioquímicos para o manejo integrado da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) no Paraná, **Resumos Expandidos, II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Vitória. v, 2, p. 2093–2098, 2001.

WALTER, T.; ARONSON, A. Specific binding of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase to the upstream region of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274(12), p. 7901-7906, 1999.

WANG, J.; MEI, H.; QIAN, H.; TANG, Q.; LIU, X.; YU, Z.; HE, J. Expression profile and regulation of spore and parasporal crystal formation-associated genes in *Bacillus thuringiensis*. **J. Proteome Res**, v. 12, p. 5487–5501, 2013.

WATERHOUSE, D.F.; NORRIS, K.R. Biological control: Pacific prospects. Supplement 1. **Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra**, p. 56–75, 1989.

WIDNER, W.R.; WHITELEY, H.R. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. **J. Bacteriol**, v. 171, p. 965–974, 1989.

WONG, H. C., AND S. CHANG. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 10, p. 3233-3237, 1986.

YANG, H.; WANG, P.; PENG, Q.; RONG, R.; LIU, C.; LERECLUS, D.; ZHANG, J.; SONG, F.; HUANG, D. Weak transcription of the *cry1Ac* gene in nonsporulating *Bacillus thuringiensis* cells. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 78, p. 6466–6474, 2012.

ZHANG, X; CANDAS, M; GRIKO, N. B; TAUSSIG, R; BULLA, JR, L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **PNAS**, v.103 (26), p. 9897-9902, 2006.

ZHOU, C.; ZHENG, Q.; PENG, Q.; DU, L.; SHU, C.; ZHANG, J.; & SONG, F. Screening of cry-type promoters with strong activity and application in Cry protein encapsulation in a sigK mutant. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98(18), p. 7901-7909, 2014.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar e clonar o conjunto dos genes *cry* presentes na linhagem BR58 de *B. thuringiensis* que se demonstrou entomopatogênica para larvas da broca-do-café.

2.2. Objetivos específicos

- Promover a amplificação da sequência completa de cada um dos genes *cry* preditos para a linhagem BR 58;
- Clonar individualmente os genes *cry* presentes nesta linhagem;
- Avaliar a expressão individual de cada gene em linhagens acristalífera de *B. thuringiensis*.

CAPÍTULO 1: Clonagem e caracterização dos genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* BR58 entomopatogênica para larvas de *Hypothenemus hampei*, broca-do-café.

ALTRÃO, Carla Suzuki¹; VILAS-BÔAS, G.T¹; VILAS-BOAS, L.A¹.

Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

RESUMO

A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleóptera: Curculinoide: Scolytinae), é considerada uma das pragas de maior risco fitossanitário de importância econômica para a cultura do café. A utilização de agentes sintéticos tem sido questionada por apresentarem componentes que podem causar problemas como a contaminação ambiental e humana além de incrementar os custos de produção. Uma saída para a diminuição da sua utilização é a substituição por agentes de controle biológico. Recentemente, foi demonstrado que o isolado *Bacillus thuringiensis* BR58, contém os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B*, apresenta atividade inseticida para *H. hampei*. No presente trabalho objetivou-se caracterizar e clonar os genes *cry* encontrados na linhagem *B. thuringiensis* BR58. Para tanto, as sequências foram submetidas ao alinhamento pela ferramenta BLAST e avaliadas para a confirmação das regiões promotoras e das ORFs pelas ferramentas online BPROM e ORFfinder. Em seguida, foram construídos iniciadores específicos contendo os sítios de enzimas de restrição *BamHI*, *HindIII* e *Sall*, dependendo da estratégia de clonagem adotada para cada gene. Dos seis genes *cry* preditos, cinco foram clonados individualmente no vetor pHT315-Pxy/A e transformados na linhagem acristalífera de *B. thuringiensis* 407.1. Até o momento, as proteínas *cry60A* e *cry60B* foram expressas e tiveram o perfil proteico avaliado em SDS-PAGE. Novas etapas de transformação nas linhagens de *Escherichia coli* e *B. thuringiensis* estão previstas para os demais genes como perspectivas de continuidade deste projeto.

Palavras chave: Coleoptera, praga, controle biológico.

INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira, destaca-se mundialmente por ter a maior produção e exportação de grãos de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (MAPA, 2016) com produtividade de 44.774,3 milhões de sacas de 60 kg, de café beneficiado, para a safra de 2017 (CONAB, 2017).

Entretanto, os cafezais são ambientes sujeitos a constantes problemas relacionados a fitossanidade como a ação de insetos, ácaros e plantas daninhas (FERREIRA; LEITE; LASMAR, 2012). A broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleóptera: Curculinoide: Scolytinae), é considerada uma das pragas de maior risco fitossanitário e importância econômica na produção desta cultura em praticamente todos os países produtores da América do Sul, Central e Norte, África e Ásia (MAPA, 2016; ROMERO; CORTINA, 2007). Em revisão realizada por Oliveira et al. (2013), foi demonstrado que os prejuízos econômicos causados pela broca na produção brasileira podem apresentar valores entre 215-358 milhões de dólares por ano.

Atualmente, o controle desta praga é realizado, principalmente, por produtos que contém o princípio ativo de dois grupos registrados no país (Ciantraniliprole, Chlorantraniliprole + Abamectina) (MAPA, 2016). Ciantraniliprole é um inseticida do grupo das diamidas antranílicas (antranilamida), desenvolvido por IE DuPont de Nemours and Company, Inc. que possuem menor toxicidade a organismos não alvos (SOUZA et al., 2012). Como o método de controle mais utilizado em grandes monoculturas seja por meio de inseticidas sintéticos, estes podem causar problemas como a contaminação ambiental, humana e de outros organismos.

Uma saída para a redução da utilização dos agentes sintéticos é a substituição por agentes de controle biológico. Segundo Vilas-Bôas e colaboradores (2007), a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) tem se mostrado como controlador efetivo devido seu poder inseticida e vem sendo utilizada há mais de cinco décadas no controle biológico de diversos insetos-praga (POLANCZYK, 2004).

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva que produz, em concomitância com o processo de esporulação, uma estrutura cristalina

parasporal composta de proteínas denominadas Cry ou δ -endotoxinas (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007). Essas proteínas possuem atividade tóxica altamente específica, de modo que não causam danos a insetos não alvo, a vertebrados e ao meio ambiente. São produzidas em forma de protoxinas, que ao serem ingeridas se ligam a receptores específicos localizados na membrana das células epiteliais dos insetos. Esta ligação promove o rompimento das células liberando o conteúdo intestinal na hemocele causando infecção generalizada e morte do inseto (VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

O mercado mundial de bioinseticidas no ano de 2015 foi avaliado em 3 bilhões de dólares, apresentando crescimento anual composto de mais de 15% desde o ano de 2009, no qual o faturamento rendeu 1,9 bilhões de dólares. Segundo Olson (2015), cerca de 75% dos bioinseticidas produzidos consistem em compostos baseados em *B. thuringiensis* e os valores obtidos no mercado devem ultrapassar 4,5 bilhões de dólares até 2023.

Recentemente, Zorzetti e colaboradores (2015) demonstraram que o isolado *B. thuringiensis* BR58, contém os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry60A*, *cry60B* e apresenta importante atividade inseticida tanto para *Aedes aegypti* (SANTOS et al., 2012) quanto para *H. Hampei*, no entanto não se conhece ainda não foi elucidado o papel de cada uma destas proteínas no processo de patogênese frente aos insetos. Neste contexto, com o presente trabalho objetiva-se a caracterização, clonagem e expressão individual dos genes *cry* encontrados na linhagem *B. thuringiensis* BR58 visando a possibilidade da utilização dos mesmos em novas aplicações biotecnológicas frente as infestações causadas por *H. hampei*.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *B. thuringiensis* e *Escherichia coli*

Os genes *cry* (*cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B*), que ainda não tiveram a sua atividade entomopatogêncica avaliada, fazem parte do genótipo da linhagem BR58 de *B. thuringiensis* pertencente ao Banco de Bactérias do Laboratório de Genética e Taxonomia de Microrganismos da

Universidade Estadual de Londrina.

Para as primeiras etapas de transformação foram utilizadas as linhagens de *E. coli* K-12 TG1 [F' *traD36 proAB lacIqZ ΔM15*] *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK- mK-)* (Gibson, 1984) e ET12527 [F- *dam13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj-202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44*] (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gentilmente, cedidas pelo Doutor Didier Lereclus do Instituto INRA, na França. A linhagem acristalífera de *B. thuringiensis* 407.1 foi utilizada na última etapa para a expressão dos genes *cry* individualmente.

Extração de DNA genômico

A linhagem de *B. thuringiensis* BR58 estocada em papel de filtro foi imersa em 1 mL de água destilada esterilizada e brevemente agitada para promover a suspensão dos esporos. Dessa suspensão, foram retirados 20 µL e inoculados em placas de Petri contendo meio Nutrient Agar (NA) e cultivado por 96 h a 37 °C até a completa esporulação. As culturas foram monitoradas quanto à presença de cristais e possíveis contaminantes a partir da sua observação em microscópio óptico com aumento de 100x. A partir desta cultura, com o auxílio de um palito esterilizado, três colônias foram transferidas para 10 mL de meio Luria-Bertami (LB) e cultivadas por 16 h a 37 °C. Posteriormente, estas foram utilizadas no processo de extração de DNA genômico.

Amostras de DNA genômico da linhagem BR58 de *B. thuringiensis* foram extraídas com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com SYBR Safe e quantificadas por espectrofotometria por NanoDrop (Thermo Scientific).

Amplificação dos genes *cry*

A amplificação dos genes de interesse foi realizada por método de PCR utilizando iniciadores específicos, desenvolvidos a partir do genoma da linhagem BR58 depositada no banco de dados do NCBI (acesso LIIT01000231.1) (ZORZETTI et al., 2015). Com o auxílio do programa Mega6 (TAMURA et al.,

2013) as sequências dos genes *cry* foram alinhadas com outras sequências dos respectivos genes depositados no banco de dados do NCBI para avaliar a similaridade entre as mesmas. Em função da estratégia de clonagem, os iniciadores para os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B* foram construídos incluindo sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *HindIII* e, o gene *cry10A*, com as enzimas *BamHI* e *SphI*. A confirmação das regiões promotoras e das Orfs das sequências foi realizada com a utilização das ferramentas de software Softberry (www.softberry.com/) e Orfinder (www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/).

Para a amplificação dos genes *cry* foi preparada uma reação de PCR com volume total de 50 µL contendo: 1 U de *Taq* Dna High Fidelity (Invitrogen, Brasil), 5 µL de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de KCl), 2 µL MgSO₄ 2,0 mM, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de cada iniciador 10 µM, 2,0 µL de DNA genômico e 38,8 µL de água Milli-Q esterilizada. O ciclo utilizado foi planejado de acordo com o número de pares de base, conteúdo de GC e em função do número de pares de base de cada iniciador e do produto de amplificação esperado (Tabela 1).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão SB (NaOH, H₃BO₃, H₂O destilada), corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizados em fotodocumentador L.PIX EX. O tamanho dos fragmentos foi verificado comparando-se ao marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Para clonagem, estes foram purificados utilizando-se Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek), quantificados por NanoDrop (Thermo Scientific) e armazenados a -20 °C.

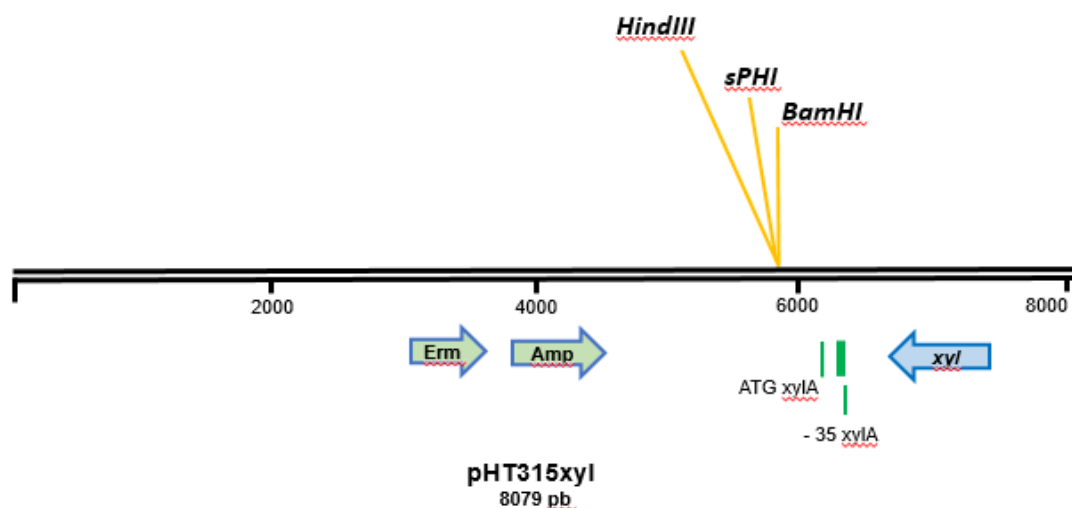
Tabela 1 - Genes *cry* da linhagem de *B. thuringiensis* BR58, iniciadores utilizados neste trabalho, sequência dos iniciadores contendo os sítios das enzimas de restrição, parâmetros de amplificação e tamanho do fragmento amplificado com os oligonucleotídeos específicos. Todas as reações tiveram um passo inicial de desnaturação à 94 °C por 2 min. Sítios enzimáticos em negrito e sublinhados.

Genes	Iniciadores	Sequência	Ciclos	Desnaturação	Pareamento	Extensão	Produto (pb)
<i>cry4A</i>	<i>cry4ARBS</i> e <i>cry4AR</i>	5' <u>CGCGGATCC</u> AGCGAGAAAGGTCGTGAACCCTATG 5' <u>CCCAAGCTT</u> TTACTCGTTCATGCAAATTAA	35	15s, 94 °C	30s, 55 °C	2min, 72°C	1485
<i>cry4B</i>	<i>cry4BRBS</i> e <i>cry4BR</i>	5' <u>CGCGGATCC</u> GAATATGGGAGGAATAAATATG 5' <u>CCCAAGCTT</u> CATTTGTATCTAATGCCCTG	35	15s, 94 °C	30s, 55 °C	3min, 72°C	2640
<i>cry11A</i>	<i>cry11ARBS</i> e <i>cry11AR</i>	5' <u>CGCGGATCC</u> AAAGGTGGAATGAATTATATG 5' <u>CCCAAGCTT</u> CTACTTTAGTAACGGATTAA	35	15s, 94 °C	30s, 55 °C	2min, 72°C	1950
<i>cry10A</i>	<i>cry10ARBS</i> e <i>cry10AR</i>	5' <u>CGCGGATCC</u> AGTTATGGGAGGAATAGATATG 5' <u>CGGCATGC</u> TTAATTAACAAATAAATCATTG	35	15s, 94 °C	30s, 48 °C	2min30s, 72°C	2043
<i>cry60A</i>	<i>cry60ARBS</i> e <i>cry60AR</i>	5' <u>CGCGGATCC</u> TGCGAGGGGGAATATCTTTATGG 5' <u>CCCAAGCTT</u> TTACTCAACTAGCCTCACAGG	35	15s, 94 °C	30s, 55 °C	1min, 72°C	924
<i>cry60B</i>	<i>cry60BRBS</i> e <i>cry60BR</i>	5' <u>CGCGGATCC</u> AGGGAGGCATTTTAATGACAATT 5' <u>CCCAAGCTT</u> TTAAGATCTATCACAATATGG	35	15s, 94 °C	30s, 50 °C	1min, 72°C	972

Recombinação dos genes *cry* em vetor plasmidial pHT315xyI/A

Os produtos da amplificação dos genes *cry4A*, *cry4B*, *cry 10A*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B* foram purificados e digeridos com as enzimas *BamHI*, *HindIII* e *SpHI* de acordo com a sequência dos sítios de restrição utilizadas na construção dos oligonucleotídeos. Em seguida, estes foram purificados utilizando-se Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek), quantificados por NanoDrop (Thermo Scientific) e posteriormente, inseridos no vetor plasmidial pHT315xyI/A, derivado do vetor pHT315 (Figura 10) (ARANTES & LERECLUS, 1991).

Figura 10 - Esquema linear do mapa do plasmídeo pHT315xyI/A. Erm – gene de resistência a eritromicina; Amp – gene de resistência a Ampicilina; Posição das enzimas de restrição *HindIII*, *SpHI* e *BamHI*.

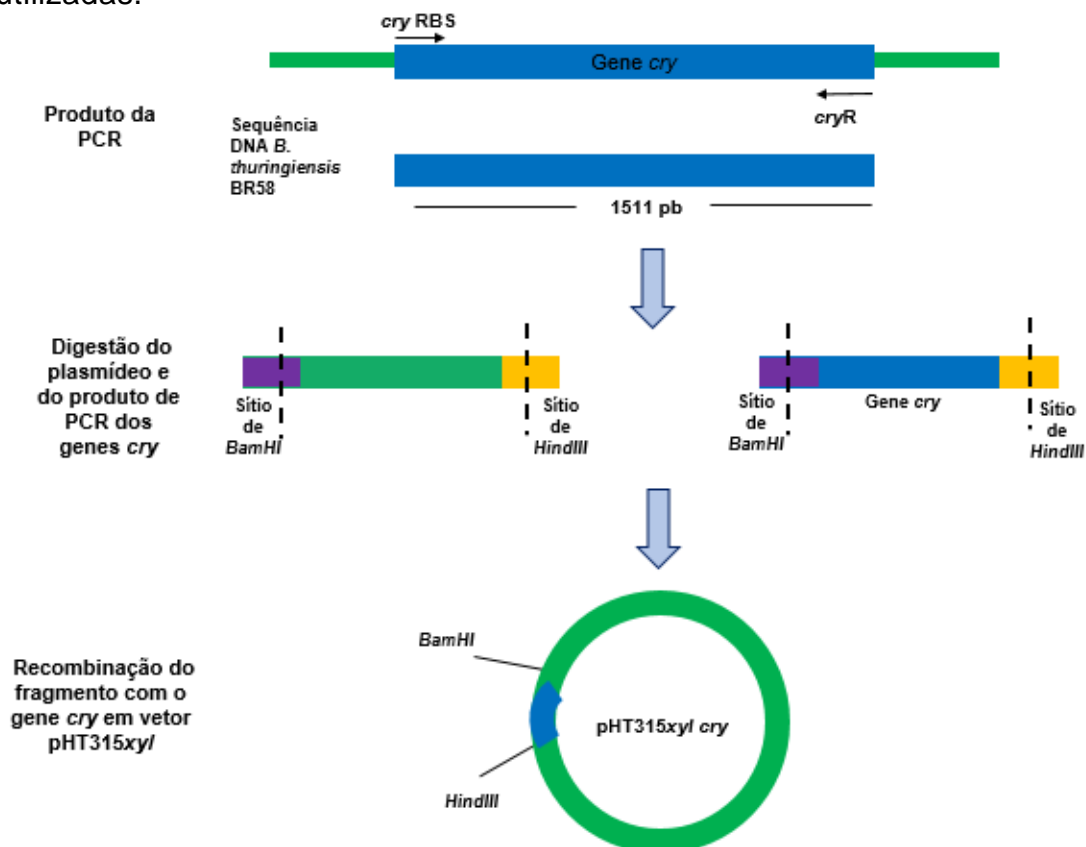


Fonte: Próprio autor

A reação de ligação foi preparada com um volume final de 20 μL contendo: 1 μL de ligase T4 (Invitrogen), 2 μL de tampão 5X (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 1mM DTT, 50% (v/v) glicerol) e 1 μL vetor pHT315PxyI/A. O volume da solução contendo o inserto foi calculado com o auxílio da ferramenta Nebiocalculator (www.nebiocalculator.neb.com/) na proporção de 3:1 (vetor/inserto) de acordo com a concentração de cada produto de PCR e completada com água Milli-Q esterilizada. As soluções foram incubadas a 37°C por uma hora e armazenadas a -20°C até o

momento de uso. O esquema da construção do plasmídeo pHT315P xyI/A está representado na (Figura 11). Os vetores resultantes foram utilizados para a transformação de células competentes de *E. coli* (TG1 e ET12527) e *B. thuringiensis* 407.1.

Figura 11 - Representação da estratégia de amplificação e clonagem do gene *cry*. A primeira etapa consiste na amplificação do gene *cry* com os oligonucleotídeos cry4ARBS e cry4R resultando o fragmento correspondente ao gene *cry*. A segunda fase engloba a reação de restrição do vetor pHT315 xyI e do produto de amplificação do gene *cry* com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. A terceira fase, envolve a reação de ligação do fragmento contendo o gene *cry* no vetor pHT315P xyI/A utilizado no processo de transformação das células *E. coli* (TG1 e ET 12527) e *B. thuringiensis* 407.1. Para todos os genes, foram aplicadas as mesmas estratégias de amplificação e clonagem, com alteração somente das enzimas de restrição utilizadas.



Fonte: Próprio autor

Transformação de células competentes *E. coli* (TG1 e ET12527)

Para a produção das células competentes, utilizadas nas primeiras etapas de clonagem, as linhagens de *E. coli* (TG1 e ET12527) foram

cultivadas até densidade óptica (D.O) entre 0,4 e 0,6, em 10 mL de meio LB (Luria-Bertani) a 37°C sob agitação (180 rpm), imersas em gelo por 2 minutos e centrifugadas a 6000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de TSS (LB, 10% PEG 3350, 5% DMSO, 20 mM MgSO₄), estocadas em alíquotas de 100 µL e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Na primeira etapa de clonagem, os fragmentos correspondentes a ORF dos genes *cry* foram recombinados no vetor pHT315PxyIIA e transformados via choque térmico nas células *E. coli* TG1, utilizada como hospedeira para a replicação dos plasmídeos (SAMBROOK et al., 2001). A primeira etapa de clonagem é considerada mais crítica pois a bactéria deve adquirir um plasmídeo do meio e replicá-lo eficientemente. Neste sentido, a escolha de uma bactéria que apresente níveis de replicação melhores é um fator limitante para a eficiência da transformação. À vista deste motivo, optou-se por utilizar a linhagem *E. coli* TG1 (MACALUSO E METTUS, 1991).

Para cada experimento de transformação foi preparada uma solução contendo 20 µL de KCM 5X (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂), 20 µL de produto de ligação e 60 µL de água milli-Q esterilizada. O volume de 100 µL final foi homogeneizado com 100 µL de suspensão de células competentes, mantido no gelo por 20 min e submetido a choque térmico a 37°C por 5 min. Decorrido os 5 min foram adicionados 800 µL de meio LB, seguido de incubação a 40 rpm por 60 min. Após 60 min, as células foram centrifugadas a 6.000 rpm por 3 min, ressuspensas em 100 µL de meio LB líquido e inoculadas em meio LB sólido suplementado com 100 µg/mL do antibiótico ampicilina, para promover a seleção das bactérias contendo o plasmídeo sendo então incubadas overnight a 37°C.

As colônias selecionadas foram inoculadas em 4 mL de meio LB, contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas por 16 horas a 37°C sob agitação (180 rpm). Após este período, o DNA plasmidial foi extraído utilizando-se innuPREP Plasmid Mini Kit Plus (Analytik Jena), quantificados por NanoDrop (Thermo Scientific) e estocados a -20°C.

Visando comprovar se as células selecionadas continham o plasmídeo com o gene de interesse, foram preparadas reações de PCR e restrição enzimática para todas as soluções de DNA plasmidial. Para as

reações de PCR utilizando o oligonucleotídeo específico para o vetor pHT315P $xyIA$ (PR – AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA e $xyIA$ – GGGGGAAATCACATGGCTCAATC) com um volume total de 20 μ L contendo: 1 U de *Taq* Dna polimerase (Invitrogen, Brasil), 1 μ L de MgCl₂ 50mM, 2 μ L de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1,5 μ L de cada iniciador 10 μ M, 0,5 μ L de DNA plasmidial e água ultrapura esterilizada para o volume final. O ciclo utilizado foi constituído por desnaturação inicial a 94°C/5 min, seguido de 35 ciclos (94 °C por 30s, 55 °C por 30s e 72 °C por 30s) e extensão final de 72 °C por 5 minutos. As soluções de restrição foram preparadas com as enzimas de acordo com o sítio de restrição inserido e submetidas a 37°C por 1 hora; avaliados por eletroforese em gel de agarose 0,7% em tampão SB (NaOH, H₃BO₃, H₂O destilada); corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta utilizando como parâmetro o marcador de peso molecular 1Kb DNA plus *ladder* (Life Technologies).

Embora a transformação inicial em linhagem TG1 seja mais eficiente, esta estirpe metila o DNA plasmidial tornando a transformação em *B. thuringiensis* menos eficaz (MACALUSO E METTUS, 1991). Desta maneira, para a obtenção de um DNA não metilado, o DNA plasmidial obtido da linhagem TG1 foi submetido a uma segunda etapa de transformação com a linhagem *E. coli* ET12527 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) com a utilização do mesmo método aplicado em *E. coli* TG1.

Sequenciamento de DNA e análise in silico das sequências

O sequenciamento foi feito a partir do DNA plasmidial obtido das células transformadas de *E. coli* TG1 com o kit de sequenciamento “BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits” (Applied Biosystems) utilizando o oligonucleotídeo específico para o vetor pHT315P $xyIA$ (PR – AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA e $xyIA$ – GGGGGAAATCACATGGCTCAATC) no sequenciador automático ABI PRISM™ 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A qualidade do sequenciamento foi confirmada pela análise dos cromatogramas no programa Sequencher v.5.0 (GeneCodes Inc., Ann Arbor, MI, USA).

As sequências obtidas foram comparadas às depositadas no banco de dados do GeneBank por BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para as análises da sequência de aminoácidos quanto à confirmação do quadro de leitura aberta foi utilizado a ferramenta ORFFinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Transferência das construções contendo genes *cry* para *B. thuringiensis*

Para produção de células competentes, a linhagem *B. thuringiensis* 407.1 foi cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion) até densidade optica (D.O) entre 4 e 6 a 37°C sob agitação a 180 rpm, sendo recuperadas por centrifugação por 10 min, 4°C em 6.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas por três vezes com água ultrapura a 4°C visando a retirada do excesso de sais. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em 800 µL de solução PEG 6000 40%, aliqüotadas em 300 µL e armazenadas a -20°C até o momento de uso.

Os vetores pHT315PxyIA foram transformados na linhagem *B. thuringiensis* 407.1 para avaliação da expressão individual de cada gene *cry* clonado pelo método de eletroporação (Lereclus, 1989). Para tanto, 15 µL da solução de DNA plasmidial, extraídos das células *E. coli* 12527 foram transferidos para cubetas 10mm 2 mL. Em seguida, foi acrescido 300 µL das células competentes 407.1 e a solução submetida a eletroporação (2,5 KV, 1000 Ω de resistência e capacidade de 25 µF e constante de tempo entre 10 e 20 ms), utilizando Eppendorf® Electroporator 2510. A solução foi homogeneizada com 2 mL de meio LB líquido (não suplementado com antibiótico) submetida a agitação a 40 rpm a 37°C por 60 min e centrifugada por 3 min a 6.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 µL de meio LB líquido. A suspensão de células obtidas foi inoculada em meio LB sólido suplementado com 10 µg/mL do antibiótico eritromicina, para promover a seleção das bactérias contendo o plasmídeo, sendo incubadas overnight a 37°C.

Após a incubação, algumas colônias obtidas foram selecionadas e inoculadas em 4 mL de meio LB líquido suplementado com o antibiótico

eritromicina a 50 mg/ μ L e cultivadas overnight a 37°C, sob agitação a 175 rpm. Após este período, a cultura foi utilizada para a extração do DNA plasmidial utilizando-se innuPREP Plasmid Mini Kit Plus (Analytik Jena). O DNA obtido foi quantificado por NanoDrop (Thermo Scientific) e estocado a -20°C.

Todos os DNA plasmidiais extraídos foram avaliados por amplificação e restrição enzimática com os mesmos padrões e métodos aplicados para as células transformadas de *E. coli* (TG1 e ET12527).

Produção de esporos/cristais

Os clones contendo os genes de interesse foram selecionados para a verificação da produção de esporos/cristais. Neste caso, uma colônia de 407 transformada foi inoculada em 4 mL de meio HCT (Lecadet et al., 1980) líquido suplementado com o antibiótico eritromicina a 50 mg/ μ L e cultivadas overnight a 30°C, sob agitação de a 175 rpm. Após este período, 300 μ L deste pré-inóculo foram inoculados em 30 mL de meio líquido HCT e cultivados até D.O 0,7 a 30°C sob agitação a 175 rpm. À solução foram adicionados 300 μ L de xilose 2M para indução da produção dos cristais concomitantemente à esporulação e a cultura foi novamente incubada a 30°C sob agitação a 175 rpm por aproximadamente 16h. Também foram preparadas culturas não induzidas por xilose, em 30 mL de meio líquido HCT contendo células da BR58 como controle positivo da expressão dos genes e da 407.1 selvagem e dos clones confirmados como controle negativo.

Lâminas da cultura líquida foram preparadas e coradas de acordo com método de Smirnof (1962) utilizando soluções de amido black e fucsina e visualizadas em microscópio óptico para a observação das células durante o processo de esporulação e verificação da produção dos cristais.

Análise das proteínas Cry através de SDS-PAGE

Para a análise das proteínas em gel SD-PAGE, primeiramente, foi preparado um pré-inóculo contendo 4 mL de meio HCT suplementado com

eritromicina contendo três colônias da estirpe recombinante. Este pré-inóculo foi submetido a agitação a 100 rpm a 30°C por 16 horas. Passado este período, 300 µL do pré-inóculo foram transferidos para 30 mL de meio líquido HCT, não suplementado com antibiótico, e incubados a 30°C sob agitação a 100 rpm até D.O 0,7.

A esta cultura, foram adicionados 300 µL de xilose para promover a indução da expressão do gene e a solução foi, novamente, incubada a 30°C sob agitação a 100 rpm até completa esporulação (aproximadamente 96 horas). Após a comprovação da esporulação por visualização em microscópio óptico as soluções de esporo/cristal foram submetidas ao procedimento de caracterização das proteínas produzidas de acordo com o protocolo descrito por Lecadet et al. (1992).

Cerca de 1,5 mL de cada cultura foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 2 mL e submetidos a centrifugação a 12.000 x g por 20 min. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de solução de NaCl 0,5 M, submetidos a nova centrifugação e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos foram lavados a uma temperatura de 4°C em água esterilizada contendo 1 mM do inibidor de protease fluoreto de fenilmetil sulfonilo (PMSF), centrifugados a 12.000 x g por 20 min e o sobrenadante foi descartado. Após o descarte dos sobrenadantes, a massa de esporo-cristal obtida foi ressuspensa em PMSF 1 mM e armazenados a -20 C.

A solução de esporo-cristal foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) em tampão tris-glicina a fim de analisar a massa molecular e a integridade das proteínas produzidas (LAEMMLI, 1970). Foram solubilizadas 15 µL das preparações de esporos-cristais, armazenadas a -20 °C em 25 µL de água destilada e tratadas por 10 min a 100 °C. Em seguida, 25 µL da solução de carga foram adicionados ao preparado e 15 µL de esporos-cristais foram aplicados no gel. A eletroforese foi realizada sob voltagem de 30 mA por 3 horas. O gel foi corado, por 20 minutos, em solução contendo ácido acético (98%), álcool metílico (98%) e comassie blue. Em seguida, submerso em solução descorante (água destilada, etanol absoluto e ácido

acético na proporção de 6:2:1, respectivamente) por 20 minutos, seguido de 24 horas em água destilada.

O tamanho dos fragmentos esperados foi verificado comparando-se ao marcador de proteína, Precision Plus Kaleidoscope, 10-250kD (Bio-Rad).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

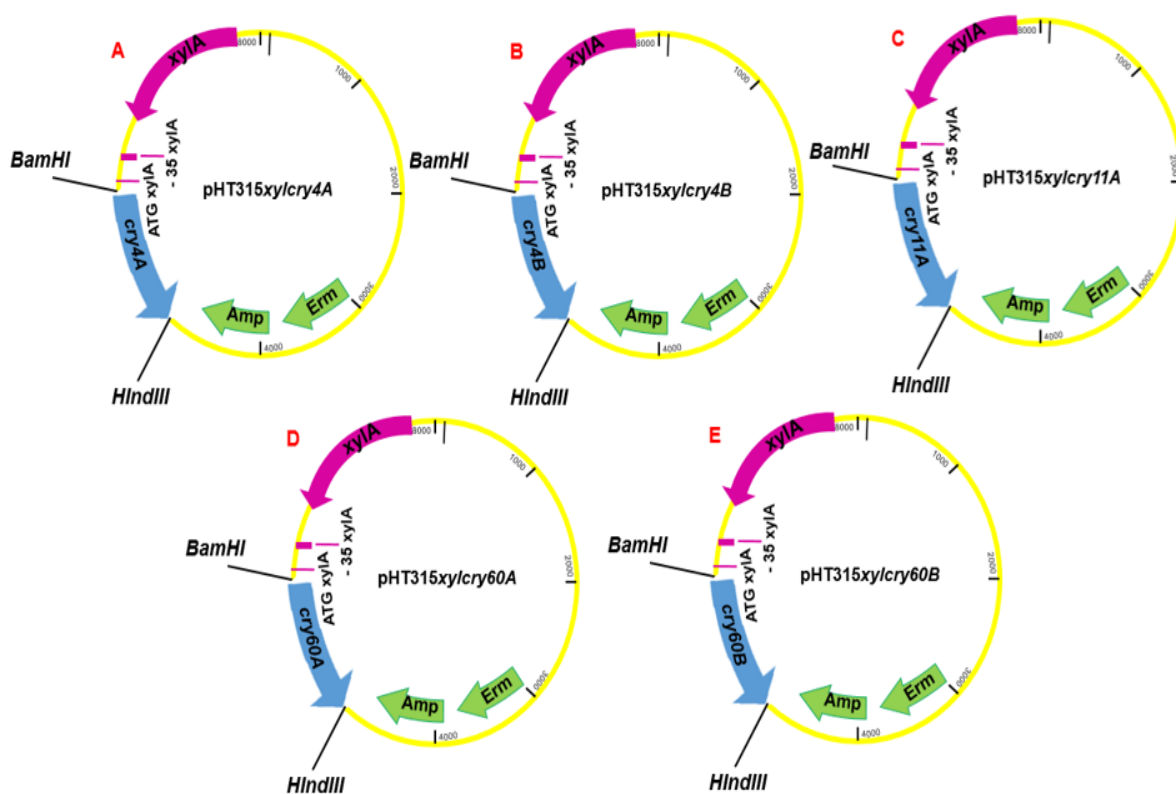
Clonagem em *E. coli* TG1 e ET12527 e análise do sequenciamento

Os resultados para as reações de amplificação a partir do DNA genômico da linhagem de *B. thuringiensis* BR58, mostraram produtos de PCR com 1498, 2460, 2043, 1950, 924 e 972 pares de bases para os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B*, respectivamente, e que estão em acordo com as sequências previstas para esse genoma e depositadas no Genbank (número de acesso LIIT00000000) (ZORZETTI et al., 2015).

Os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry11A* e *cry10A*, produzem as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cry10A respectivamente, as quais foram anteriormente relatadas com atividade entomopatogênica específicas para dípteros (INSELL; FITZ-JAMES, 1985; DELÉCLUSE et al., 1993; DELÉCLUSE; ROSSO; RAGNI, 1995; IBARRA et al., 2003; JOUZANI; VALIJANIAN; SHARAFI, 2017). Contudo, alguns trabalhos têm demonstrado que o espectro de ação destas proteínas pode ser ampliado para alguns lepidópteros (IGNOFFO et al., 1981; VASSAL et al., 1993; SAYYED et al., 2001; DE SOUZA et al., 2009) e coleópteros (MÉNDEZ-LÓPEZ et al., 2003; MARTINS et al., 2007; ASOKAN; SWAMY; THIMMEGOWDA; MAHMOOD, 2013). Os genes *cry60A* e *cry60B* foram encontrados pela primeira vez, após o sequenciamento do genoma de *B. thuringiensis* subsp. *israelenses* ATCC 34646 (ANDERSON et al., 2005) e a identificação e caracterização da atividade das proteínas codificadas por estes genes foram realizadas por Sun e colaboradores (2013), ao observarem pequena atividade tóxica para dípteros.

Dentre os seis genes *cry* previstos na BR58, cinco deles foram clonados no plasmídeo pHT315PxyI/A resultando na construção dos plasmídeos pHT315PxyI/cry4A, pHT315PxyI/cry4B, pHT315PxyI/cry11A, pHT315PxyI/cry60A e pHT315PxyI/cry60B (Figura 12).

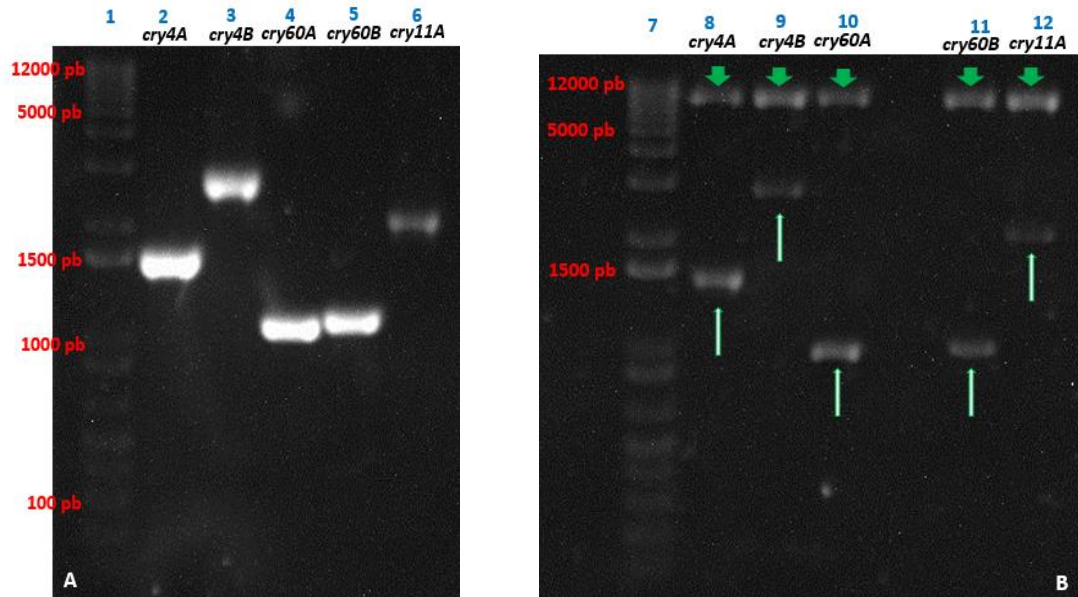
Figura 12 - Esquema circular dos vetores recombinantes. (A) vetor pHT315xylcry4A. (B) vetor pHT315xylcry4B. (C) vetor pHT315xylcry60A. (D) vetor pHT315xylcry60B. (E) vetor pHT315xylcry11A. As setas em preto indicam os sítios das enzimas de restrição utilizadas no processo de recombinação (*Bam*HI e *Hind*III). As setas em roxa indicam a posição e direção do promotor de xilose e as setas em azul indicam a posição e direção dos genes *cry*. Genes que conferem resistência a ampicilina (Amp) e eritromicina (Erm) também estão representados na figura.



Fonte: O próprio autor

Os plasmídeos recombinantes, contendo os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry60A*, *cry60B* e *cry11A* foram transformados em *E. coli* TG1, gerando os clones TG1pHT315PxyIIA*cry4A*, TG1pHT315PxyIIA*cry4B*, TG1 pHT315PxyIIA*cry60A*, TG1pHT315PxyIIA*cry60B* e TG1pHT315PxyIIA*cry11A*. A confirmação da presença dos vetores contendo os genes *cry* por reação de PCR com os iniciadores vetoriais e por dupla digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III é demonstrada na Figura 13.

Figura 13 - **(A)**. Amplificação dos genes *cry* clonados em *E. coli* TG1. (1) Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (2) gene *cry4A* (1498 pb). (3) perfil de amplificação do gene *cry4B* (2460 pb). (4) gene *cry60A* (924 pb). (5) gene *cry60B* (972 pb). (6) gene *cry11A* (1950 pb). **(B)** Confirmação dos genes por dupla restrição. As setas em branco indicam o tamanho do fragmento esperado do gene e as setas em verde indicam o tamanho do fragmento esperado do plasmídeo. (7) Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (8) perfil da dupla restrição *cry4A*. (9), perfil da dupla restrição *cry4B*. (10) perfil da dupla restrição *cry60A*. (11) perfil da dupla restrição *cry60B*. (12) perfil da dupla restrição *cry11A*.



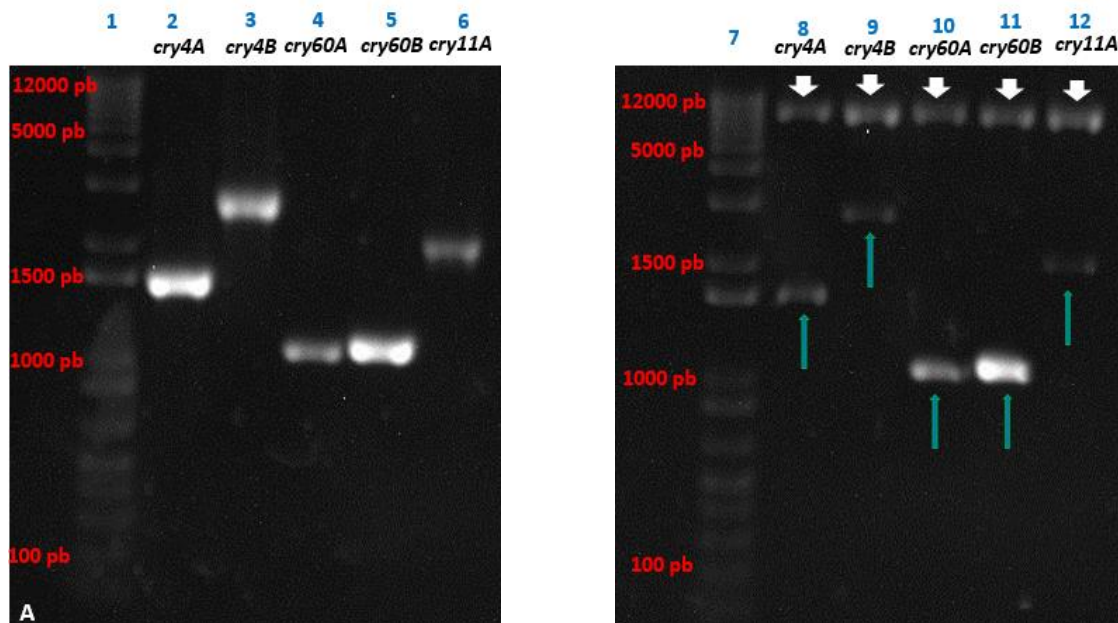
Fonte: próprio autor

As sequências obtidas pelo sequenciamento do DNA plasmidial dos transformantes TG1 pHT315PxyII*Acry4A*, TG1 pHT315PxyII*Acry4B* e TG1 pHT315PxyII*Acry60B* foram comparadas por *Blastn* e apresentaram 95% de similaridade em comparação com os genes *cry4A* (número de acesso LIIT01000238.1), *cry4B* (número de acesso LIIT01000231.1) e *cry60B* (número de acesso LIIT01000228.1) respectivamente, TG1pHT315PxyII*Acry60A* apresentou 94% de identidade em comparação com o gene *cry60A* (número de acesso LIIT01000228.1) e TG1pHT315PxyII*Acry11A* apresentou 98% de identidade em comparação com o gene *cry11A* (número de acesso LIIT000204.1). Os resultados obtidos a partir do alinhamento das sequências obtidas para os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry60A* e *cry60B* estão dispostos nos anexos 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente.

Os plasmídeos recombinantes, contendo os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry60A*, *cry60B* e *cry11A* extraídos da linhagem TG1, foram transformados em *E. coli*

ET, gerando os clones ETpHT315PxyIIAcry4A, ETpHT315PxyIIAcry4B, ETpHT315PxyIIAcry60A, ET1pHT315PxyIIAcry60B e ETpHT315PxyIIAcry11A e confirmados com os mesmos métodos aplicados aos clones em TG1 (Figura 14).

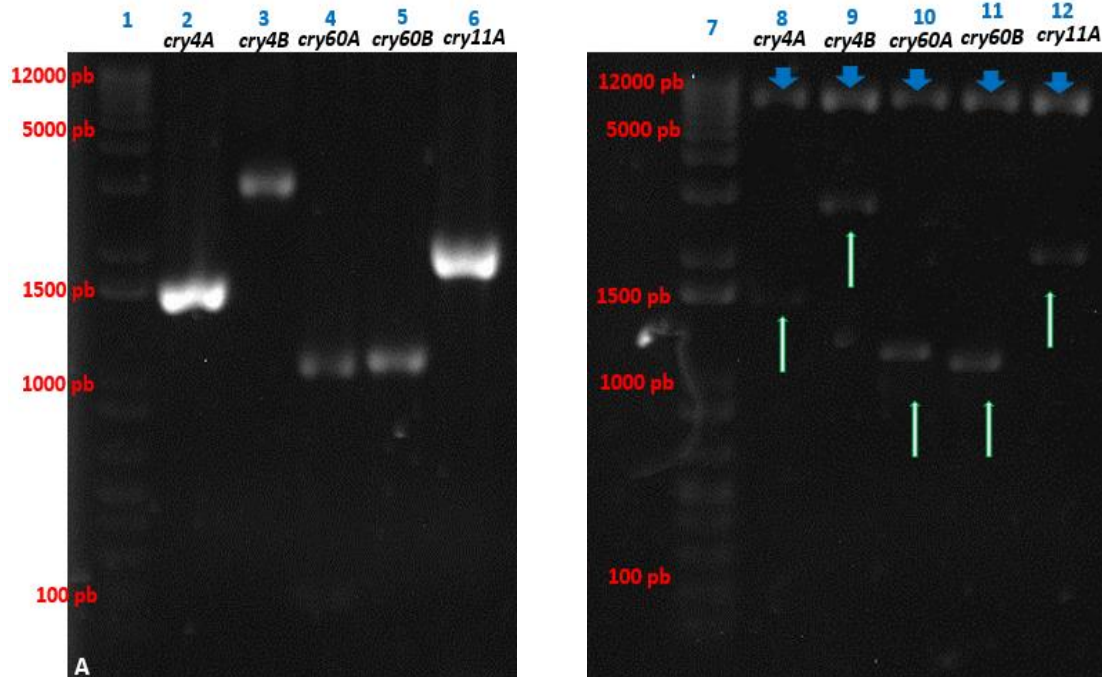
Figura 14 - **(A)**. Amplificação dos genes *cry* clonados em *E. coli* ET. (1) Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (2) gene *cry4A* (1498 pb). (3) perfil gene *cry4B* (2460 pb). (4) gene *cry60A* (924 pb). (5) gene *cry60B* (972 pb). (6) gene *cry11A* (1950 pb). **(B)** Confirmação dos genes por dupla restrição. As setas em azul indicam o tamanho do fragmento do gene e as setas em branco indicam o tamanho do fragmento do plasmídeo. (7) Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (8) perfil da dupla restrição *cry4A*. (9), perfil da dupla digestão *cry4B*. (10) perfil da dupla restrição *cry60A*. (11) perfil da dupla restrição *cry60B*. (12) perfil da dupla restrição *cry11A*.



Fonte: próprio autor

A transformação dos plasmídeos extraídos da linhagem ET em *B. thuringiensis* 407.1 deram origem aos clones 407pHT315PxyIIAcry4A, 407pHT315PxyIIAcry4B, 407pHT315PxyIIAcry60A, 407pHT315PxyIIAcry60B e 407pHT315PxyIIAcry11A (Figura 15).

Figura 15 - **(A)**. Amplificação dos genes *cry* clonados em *B. thuringiensis* 407.1. (1) Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (2) gene *cry4A* (1498 pb). (3) gene *cry4B* (2460 pb). (4) gene *cry60A* (924 pb). (5) gene *cry60B* (972 pb). (6) *cry11A* (1950 pb). (B) Confirmação dos genes por dupla restrição. As setas em branco indicam o tamanho do fragmento esperado do gene e as setas em azul indicam o tamanho do fragmento esperado do plasmídeo. (7) Marcador de massa molecular 1 Kb Plus DNA Ladder. (8) perfil da dupla restrição *cry4A*. (9), perfil da dupla restrição *cry4B*. (10) perfil da dupla restrição *cry60A*. (11) perfil da dupla restrição *cry60B*. (12) perfil da dupla restrição *cry11A*.

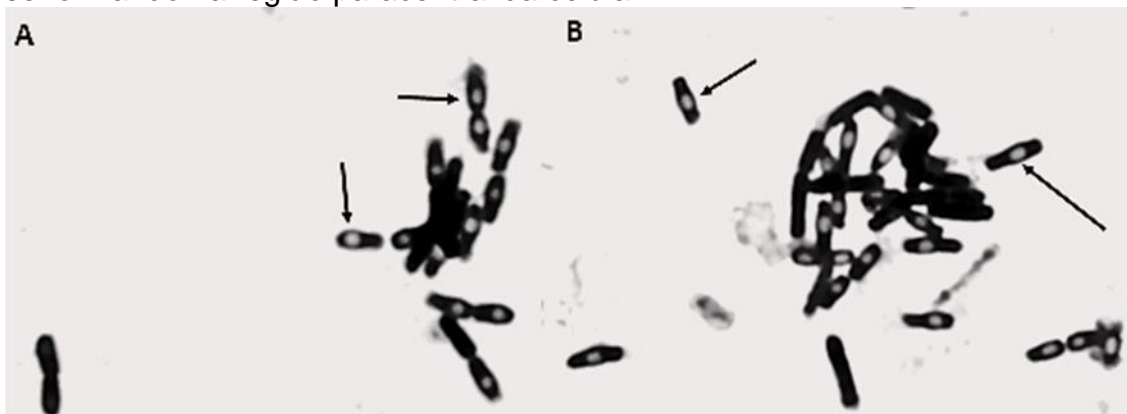


Fonte: Próprio autor

Expressão das proteínas Cry60A e Cry60B

As células recombinantes de *B. thuringiensis* 407.1 contendo os genes *cry60A* e *cry60B* apresentaram esporulação normal em meio HCT (Figura 16). Entretanto, não foi possível verificar a formação de nenhuma inclusão proteica sob visualização em microscópio óptico de luz em lente com aumento de 100x.

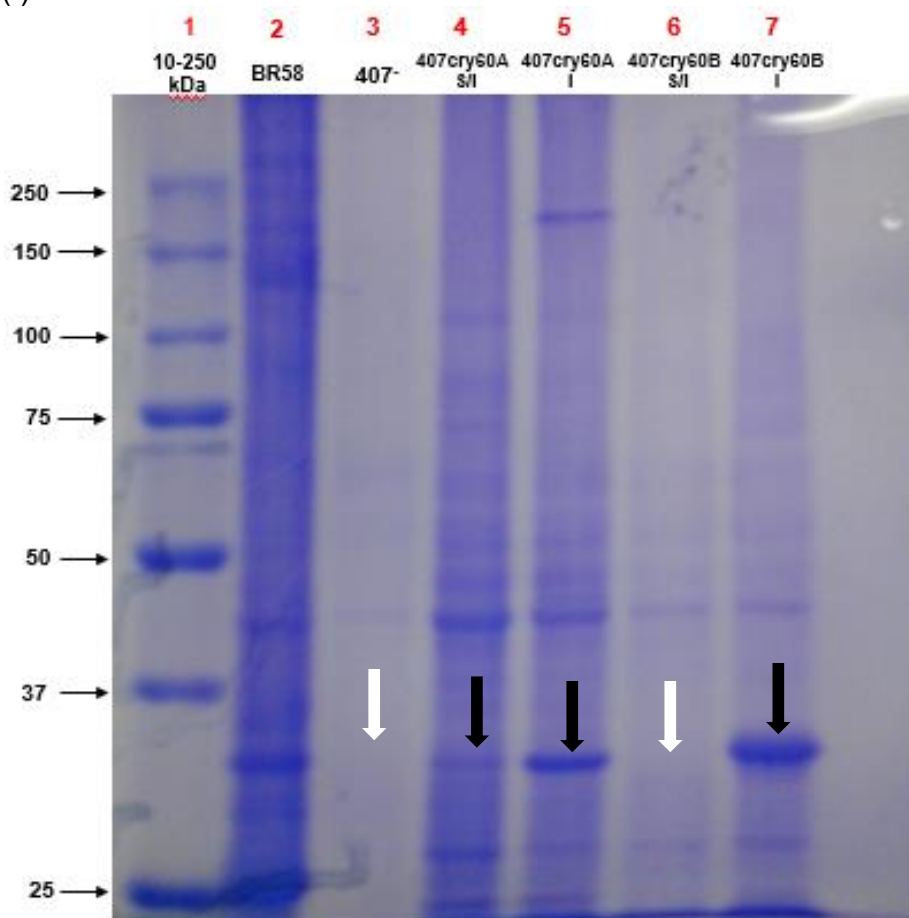
Figura 16 - Microscopia óptica dos recombinantes de *B. thuringiensis* produzindo esporos. (A) e (B), células recombinantes contendo o gene *cry60A* e *cry60B* em fase de esporulação, respectivamente. As setas indicam o esporo se formando na região paracentral da célula.



Fonte: Próprio autor

A eletroforese em gel SDS-PAGE demonstrou que as células recombinantes 407pHT315PxyIIA*cry60A* e 407pHT315PxyIIA*cry60B*, expressam um polipeptídeo de 33 kDa e 35 kDa, respectivamente. Esta proteína não foi visualizada nas linhagens 407.1 e 407pHT315PxyIIA*cry60B* não induzidas por xilose, enquanto na estirpe 407pHT315PxyIIA*cry60A* observou-se pequena produção das inclusões, mesmo sem indução por xilose (Figura 17).

Figura 17. Análise da expressão das proteínas Cry60A e Cry60B pelas células recombinantes 407pHT315PxyIIAcry60A e 407pHT315PxyIIAcry60B, respectivamente, em eletroforese em gel SDS-PAGE 10%. A presença de proteínas é indicada com as setas pretas, enquanto as setas brancas representam a ausência das mesmas. (1) marcador de massa molecular Precision Plus Kaleidoscope, 10-250kDa (Bio-Rad). (2) perfil proteico da linhagem *B. thuringiensis* BR58. (3) perfil proteico da linhagem acristalífera de *B. thuringiensis* 407.1. (4) perfil proteico do recombinante 407pHT315PxyIIAcry60A, não induzido por xilose (S/I). (5) perfil proteico do recombinante 407pHT315PxyIIAcry60A, induzido por xilose (I). (6) perfil proteico do recombinante 407pHT315PxyIIAcry60B, não induzido por xilose (S/I). (7) perfil proteico do recombinante 407pHT315PxyIIAcry60B, induzido por xilose (I).



A expressão das proteínas pelos recombinantes *cry60A* e *cry60B* são similares as proteínas produzidas na linhagem selvagem de *B. thuringiensis* BR58 e apresentam peso molecular semelhantes aos relatados por Sun et al. (2013) ao estudarem os genes *cry60A* e *cry60B* presentes em *B. thuringiensis* subsp. *jegathesan*. A produção de polipeptídeo pelo recombinante 407pHT315PxyIIAcry60A não induzido pode ser explicada por um possível

“escape” no sistema de expressão gênica, no qual a expressão gênica ocorre na ausência do indutor, porém, em níveis baixos.

Em resumo, do total de seis genes *cry* anteriormente identificados na linhagem BR58, cinco genes (*cry4A*, *cry4B*, *cry11A*, *cry60A* e *cry60B*) foram clonados no vetor pHT315xyIA. Os plasmídeos recombinantes (TG1pHT315PxyIAcry4A, TG1pHT315PxyIAcry4B, TG1 pHT315PxyIAcry60A, TG1pHT315PxyIAcry60B e TG1pHT315PxyIAcry11A) obtidos foram então transformados em *E. coli* TG1 enquanto que em *E. coli* ET foram transformados os plasmídeos recombinantes ETpHT315PxyIAcry4A, ETpHT315PxyIAcry4B, ET pHT315PxyIAcry60A, ET1pHT315PxyIAcry60B e ETpHT315PxyIAcry11A. Da mesma forma, na linhagem *B. thuringiensis* 407.1 foi possível a transformação com o plasmídeos 407pHT315PxyIAcry4A, 407pHT315PxyIAcry4B, 407pHT315PxyIAcry60A, 4071pHT315PxyIAcry60B e 407pHT315PxyIAcry11A.

A tabela 2 indica as etapas realizadas dos experimentos do trabalho:

Tabela 2 - Os sinais de (+) indicam que a etapa já está finalizada e os sinais de (-) apontam as etapas que ainda não foram realizadas e que estão em fase de desenvolvimento. Todos os genes foram amplificados com os primers específicos, e são indicados com um sinal de (+). Apenas o gene *cry10A* não foi clonado no vetor pHT315*xyl* e, portanto, não foi submentido aos processos de transformação, eletroforese em SDS-PAGE e Bioensaio. O gene *cry11A* foi transformado em *E. coli* TG1 e está em fase de realização para as etapas de transformação em ET e *B. thuringiensis* 407.1. Os genes *cry4A* e *cry4B*, foram clonados na bactéria 407.1 e estão em fase de análise em SDS-PAGE e, posteriormente, serão bioensaiados.

Etapas	Genes					
	<i>cry4A</i>	<i>cry4B</i>	<i>cry10A</i>	<i>cry11A</i>	<i>cry60A</i>	<i>cry60B</i>
Amplificação	+	+	+	+	+	+
Clonagem no vetor pHT315P <i>xyl</i>	+	+	-	+	+	+
Transformação <i>E. coli</i> TG1	+	+	-	+	+	+
Transformação <i>E. coli</i> ET	+	+	-	+	+	+
Transformação <i>B. thuringiensis</i> 407.1	+	+	-	+	+	+
Eletroforese em SDS-PAGE	-	-	-	-	+	+

CONCLUSÃO

Os iniciadores desenvolvidos nesse trabalho permitiram a amplificação dos seis genes *cry* anteriormente descritos para a linhagem BR58 de *B. thuringiensis* e poderão ser utilizados posteriormente por outros autores para a clonagem de genes *cry* de outras linhagens que apresentem os mesmos genes.

Dois genes *cry* (60A e 60B) da linhagem BR58 passaram por todas as etapas de clonagem e transformação previstas nesse trabalho e foram transformados individualmente em células de *B. thuringiensis* 407.1, sendo expressos nessa linhagem. Ensaios biológicos com *H. hampei* poderão confirmar o potencial tóxico desses genes frente a esta espécie.

Embora o sistema de expressão gênica dos genes *cry60A* e *cry60B*, ainda não tenha sido elucidado não foi verificado a produção de toxinas durante a fase vegetativa das células transformadas em 407.1 sugerindo que o mecanismo que controla a expressão destes genes pode ser dependente de esporulação.

Os demais genes *cry* da linhagem BR58 foram submetidos às etapas de clonagem e transformação em linhagens de *E. coli*, tendo sido possível avançar em diferentes níveis para diferentes genes. Para a maioria desses genes faltam poucas etapas para a obtenção de clones de *B. thuringiensis* 407.1 transformados individualmente com os mesmos, o que irá permitir, posteriormente, a realização de ensaios biológicos com *H. hampei*.

O único gene *cry* que não pode ser clonado no vetor pht315pxyl (*cry10*) já teve atividade bioinseticida demonstrada frente a larvas de coleóptero *Anthonimus grandis* (Martins, 2009), podendo este também apresentar atividade entomogênica para *H. hampei*. O conjunto de resultados de bioensaios a serem obtidos com todos os genes irá contribuir para a possível aplicação biotecnológica dos genes dessa linhagem visando o controle de larvas dessa espécie de insetos.

Dessa forma, os experimentos realizados neste trabalho geraram grandes avanços visando a caracterização da atividade inseticida proveniente de cada gene *cry* da linhagem BR58 frente a *H. hampei*, visando o possível emprego de genes dessa linhagem em aplicações biotecnológicas como o

desenvolvimento de novos bioinseticidas e/ou plantas de café geneticamente modificadas apresentando resistência ao ataque dessa praga.

PERSPECTIVAS

A clonagem e expressão dos demais genes *cry* da estirpe BR58 associados à realização de bioensaios frente a larvas de *H. hampei* poderão indicar qual ou quais genes *cry* presentes nesta linhagem são responsáveis pela entomopatogenicidade contra esse inseto-praga.

A realização dos bioensaios seletivos contra larvas de *H. hampei* com a utilização dos esporos-cristais produzidos pelas estirpes contendo os genes *cry60A* e *cry60B* de *B. thuringiensis* BR58 bem como demais toxinas Cry, permitirá verificar se as proteínas isoladas seguem com as propriedades inseticidas, tais como as evidenciadas na linhagem selvagem.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, I.; SOROKIN, A.; KAPATRAL, V.; REZNIK, G.; BHATTACHARYA, A.; MIKHAILOVA, N.; BURD, H.; JOUKOV, V.; KAZNADZEY, D.; WALUNAS, T.; MARKD'SOUZA LARSEN, N.; PUSCH, G.; LIOLIOS, K.; GRECHKIN, Y.; LAPIDUS, A.; GOLTSMAN, E.; CHU, L.; FONSTEIN, M.; EHRLICH, S.D.; OVERBEEK, R.; KYRPIDES, N.; IVANOVA, N. Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, p. 175–184, 2005.
- ARANTES, O; LERECLUS, D Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**, V. 108, p. 115-119, 1991.
- ASOKAN, R.; SWAMY, H. M. M.; THIMMEGOWDA, G. G.; MAHMOOD, R. Diversity analysis and characterization of Coleoptera-, Hemiptera- and Nematode-active cry genes in native isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Annals of microbiology**, v. 64, n. 1, p. 85-98, 2014.
- CONAB – COMPANIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253>> Acesso em: 29 mar. 2017.
- DELÉCLUSE, A.; PONCET, S.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Expression of cryIVA and cryIVB Genes, Independently or in Combination, in a Crystal-Negative Strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelenses*. **American Society for Microbiology**, v. 59, P. 3922-3927, 1993.
- DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M-L.; RAGNI, A. Cloning and Expression of a Novel Toxin Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* Encoding a Highly Mosquitocidal Protein. **American Society for Microbiology**, v. 61, p. 4230–4235, 1995.
- DE SOUZA, J.D.; JAIN, S.; DE OLIVEIRA, C.; AYRES, C.; LUCENA, W.A. Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperda*. **BioControl**, v. 54, p. 467-473, 2009.
- FERREIRA, M. C.; LEITE, G.J.; LASMAR, O. Cobertura e depósito de calda fitossanitária em plantas de café pulverizadas com equipamento original e adaptado para plantas altas. **Biosci. J.**, V. 29, p.1539-1548, 2012.
- GIBSON, T. J. Studies on the Epstein–Barr virus genome. PhD thesis, University of Cambridge, 1984.
- GRANDVALET, C.; GOMINET, M.; LERECLUS, D. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis inhA* metalloprotease gene at the onset of sporulation. **Microbiology**. V. 147. p.1805-1813, 2001.
- IBARRA, J.E.; RINCÓN, M. C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENNITENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.

H.; SÁNCHEZ, S.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

IGNOFFO, C. M.; COUCH, T. L.; GARCIA, C.; KROHA, M. J. Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Heliothis virescens*. **J. Econ. Entomol**, v. 74, p. 218-222, 1981.

INSELL, J.P.; FITZ-JAMES, P.C. Composition and toxicity of the inclusion of *Bacillus thuringiensis* subso. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 50, p. 56-62, 1985.

JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and findings. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** v. 227, n. 5259, p. 680 – 685, ago.1970.

LECADET, M.-M.; BLONDEL, M.-O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP-54Ber. **Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 203-212, 1980.

LECADET, M. M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n.3, p. 840-849, 1992.

LERECLUS, D.; ARANTES, O.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Transformation and expression of a cloned 6-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Letters**, v. 60, p. 211-218, 1989.

MACALUSO, A.; METTUS, A. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* requires nonmethylated plasmid DNA. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 3, p. 1353-1356, 1991.

MÉNDEZ-LÓPEZ, I.; BASURTO-RÍOS, R.; IBARRA, J. E. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). **FEMS Microbiol. Lett**, v. 226, p. 73-77, 2003.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Ministério da Agricultura prioriza controle de oito pragas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/noticias/2015/08/ministerio-da-agricultura-prioriza-controle-de-oito-pragas>>. Acesso em: 7 ago. 2016.

MARTINS, E. S. Estudo da atividade de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-pragas do algodoeiro. Tese (doutorado em Biologia Molecular) Universidade de Brasília, Brasília, Brasil, 2009

MARTINS, E.S.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V. F.; SILVA-WERNECK, J. O.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; BERRY, C.; MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biol. Control**, v. 40, p. 65-68, 2007.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Economic impact of exotic insect pests in Brazilian agriculture. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, v. 137, n. 1-2, p. 1-15, 2013.

OLSON, S. An Analysis of Biopesticide Market Now and Where it is Going. Research Information Ltd. All rights reserved. 2015.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 144 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 2004.

ROMERO, J.V.; CORTINA, H.A. Life tables of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on three coffee ccessions. **Revista Colombiana de Entomologia**, v.33, p.10-16, 2007

SANDALJ, V. **O café: ambientes e diversidade**. Casa da Palavra. Rio de Janeiro, 2003.

SANTOS, F.P.; LOPES, J; VILAS-BÔAS, G.T.; ZEQUI, J.A.C. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**, V.122, p. 64–70, 2012.

SAMBROOK, J.; FRISTCH E.F.; MANIATIS T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SAYYED, A. H.; CRICKMORE, N.; WRIGHT, D. J. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, 5859-5861, 2001.

SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; SILVA, R.A.; CARVALHO, T.A.F.; PEREIRA, A.B. Controle químico da broca-do-café com Cyantraniliprole. **Coffee Science**, Lavras, v.8, n.4, p.404-410, 2012.

SUN, Y.; ZHAO, Q.; XIA, L.; DING, X.; HU, Q.; FEDERICI, B. A.; PARK, H. W. Identification and characterization of three previously undescribed crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 11, p. 3364-3370, 2013.

- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**: 30 2725-2729, 2013.
- VASSAL, J. M.; DE BARJAC, H.; FRUTOS, R.; FEDERICI, B. A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from diseased field-collected larvae of the saturniid moth, *Hylesia metabus*, in French Guiana. **FEMS Microbiology Letters**, v. 107, p. 199-203, 1993.
- VIDAL-QUIST, J.C., CASTAÑERA, P., and GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitiscapitata*. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 19, p. 749 – 759, 2009.
- VILAS-BÔAS, 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, n. 1, p. 673 – 687, 2007.
- ZORZETTI, J.; RICIETO, A. P. S.; SILVA, C. R. ; WOLF, I.; VILAS-BÔAS, G. T.; NEVES, P. M. O. J. ; MENEGUIM, A. M. ; VILAS-BOAS, L. A. . Genome sequence of the mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain BR58, a biopesticide product effective against the coffee berry borer (*Hypothenemushampei*). **Genome Announcements**, 2015.

ANEXO 1. Análise da sequência de nucleotídeos do gene *cry4A* adquiridas a partir do sequenciamento utilizando-se o iniciador específico para o vetor pHT315PxyIIA. A comparação por Blastn mostrou 95% de similaridade com a sequência do gene *cry4A* (número de acesso LIIT01000238.1) de *B. thuringiensis* BR58.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1223 bits(662)	0.0	766/808(95%)	40/808(4%)	Plus/Plus
Query 71	ATGTTTACAAGTGGTGCGAAAAATAGGTTAAAGCTAGAAACGACAGATTATGAAATAGAT			130
Sbjct 1	ATGTTTACAAGTGGTGCGAAAAATAGGTTAAAGCTAGAAACGACAGATTATGAAATAGAT			60
Query 131	CAAGTGGCTAATGCTATAGAATGTATGTCAGATGAACAATATTCAAAAGAAAACTGATG			190
Sbjct 61	CAAGTGGCTAATGCTATAGAATGTATGTCAGATGAACAATATTCAAAAGAAAACTGATG			120
Query 191	TTATGGGATCAAGTAAAACATGCAAAATACCTTAGTCAGTCTCGAAATTTGCTTCAAAAT			250
Sbjct 121	TTATGGGATCAAGTAAAACATGCAAAATACCTTAGTCAGTCTCGAAATTTGCTTCAAAAT			180
Query 251	GGTGATTTTGAAGATGTATTTTCATGGATGGACTACAAGTGATCATATGTACATTCAGTCG			310
Sbjct 181	GGTGATTTTGAAGATGTATTTTCATGGATGGACTACAAGTGATCATATGTACATTCAGTCG			240
Query 311	GATAATTCTACTTTTAAAGGAAATTATCTGAATATATCTGGGGCGGAGACATATACTTA			370
Sbjct 241	GATAATTCTACTTTTAAAGGAAATTATCTGAATATATCTGGGGCGGAGACATATACTTA			300
Query 371	ACGATATTTCCAACATACATTTACCAAAAAATTGATGAATCAAAATTTAAACCGTATACA			430
Sbjct 301	ACGATATTTCCAACATACATTTACCAAAAAATTGATGAATCAAAATTTAAACCGTATACA			360
Query 431	CGTTACCTAGTAAGGGGATTTGTAGGAAGTAGTAAAGATGTAGAACTAGTGGTTTCACGC			490
Sbjct 361	CGTTACCTAGTAAGGGGATTTGTAGGAAGTAGTAAAGATGTAGAACTAGTGGTTTCACGC			420
Query 491	TATGGAAAAGAAATAGATACAGTCATGAATGTACCATTTGATATCCCGTATGTATCTTCT			550
Sbjct 421	TATGGAAAAGAAATAGATACAGTCATGAATGTACCATTTGATATCCCGTATGTATCTTCT			480
Query 551	AGGCCTGTTTGTAAATGAATTATATGATGGTGAACAACAACCGTATCCAAATGGGAATGTA			610
Sbjct 481	AGGCCTGTTTGTAAATGAATTATATGATGGTGAACAACAACCGTATCCAAATGGGAATGTA			540
Query 611	GGATATTATAATCCAATGTCAGCTTTTACGCCTTCTTACACATCTGATGCTCGTCAGTGT			670
Sbjct 541	GGATATTATAATCCAATGTCAGCTTTTACGCCTTCTTACACATCTGATGCTCGTCAGTGT			600
Query 671	ATGCCAGGGAAAAACAGAATAGTTCCTGTTCAAGAATTCCTCATTGATTTTAAAGTTC			730
Sbjct 601	ATGCCAGGGAAAAACAGA-TAGT-C-TGT-CAAGA-TTCTC-AT-CAGTTT--AAGTTC			651
Query 731	CATAATTGATTACAGGGGTGGAAAGTAGATTTAATAAATTACAAATATAGGGGATTTTGG			790
Sbjct 652	CATA-TTGAT-ACAGG--TG-AA-GTAGATT-A-TAA--TACAAATATAGGG-ATTT-GG			699
Query 791	GGTCATGTTTTTAAAAAATCCTTCCCCAGAATGGGATACCGCAATTTATTAAGATAAA			850
Sbjct 700	G-TCATGTTT--AAAATA-TC-TTCCCC-AGA-TGG-ATAC-GCA-TT-ATTA-GATAA-			746
Query 851	TTTTAAAAAGGTAATTTGAAAGAAAGGG	878		
Sbjct 747	TTT-AGAA-G-TAATT-GAA-GAA-GGG	768		

ANEXO 2. Análise da sequência de nucleotídeos do gene *cry4B* adquiridas a partir do sequenciamento utilizando-se o iniciador específico para o vetor pHT315PxyIIA. A comparação por Blastn mostrou 95% de similaridade com a sequência do gene *cry4B* (número de acesso LIIT01000231.1) de *B. thuringiensis* BR58.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1290 bits(698)	0.0	813/860(95%)	42/860(4%)	Plus/Plus
Query 68	ATGAATTTAGGCTATCCGTTAGCGAATGACTTACAAGGGTCAATGAAAAACACGAACTAT			127
Sbjct 1	ATGAATTCAGGCTATCCGTTAGCGAATGACTTACAAGGGTCAATGAAAAACACGAACTAT			60
Query 128	AAAGATTGGCTAGCCATGTGTGAAAAAACCACAGTATGGCGTTAATCCAGCTGCGATT			187
Sbjct 61	AAAGATTGGCTAGCCATGTGTGAAAAAACCACAGTATGGCGTTAATCCAGCTGCGATT			120
Query 188	AATTCCTTCTTCAGTTAGTACCGCTTTAAAAGTAGCTGGAGCTATCCTTAAATTTGTAAC			247
Sbjct 121	AATTCCTTCTTCAGTTAGTACCGCTTTAAAAGTAGCTGGAGCTATCCTTAAATTTGTAAC			180
Query 248	CCACCTGCAGGTACTGTCTTAACCGTACTTAGCGCGGTGCTTCCTATTCTTTGGCCGACT			307
Sbjct 181	CCACCTGCAGGTACTGTCTTAACCGTACTTAGCGCGGTGCTTCCTATTCTTTGGCCGACT			240
Query 308	AATACTCCAACGCCTGAAAGAGTTTGGAAATGATTTTCATGACCAATACAGGGAATCTTATT			367
Sbjct 241	AATACTCCAACGCCTGAAAGAGTTTGGAAATGATTTTCATGACCAATACAGGGAATCTTATT			300
Query 368	GATCAAACCTGTAAACAGCTTATGTACGAACAGATGCAAAATGCAAAAATGACGGTTGTGAAA			427
Sbjct 301	GATCAAACCTGTAAACAGCTTATGTACGAACAGATGCAAAATGCAAAAATGACGGTTGTGAAA			360
Query 428	GATTATTTAGATCAATATACAACCTAAATTTAACACTTGGAAAAAGAGAGCCTAATAACCAG			487
Sbjct 361	GATTATTTAGATCAATATACAACCTAAATTTAACACTTGGAAAAAGAGAGCCTAATAACCAG			420
Query 488	TCCTATAGAACAGCAGTAATAACTCAATTTAACCTAACCAAGTGCACAACTTCGAGAGACC			547
Sbjct 421	TCCTATAGAACAGCAGTAATAACTCAATTTAACCTAACCAAGTGCACAACTTCGAGAGACC			480
Query 548	GCAGTTTATTTTAGCAACTTAGTAGGTTATGAATTATTGTTATTACCAATATACGCACAA			607
Sbjct 481	GCAGTTTATTTTAGCAACTTAGTAGGTTATGAATTATTGTTATTACCAATATACGCACAA			540
Query 608	GTAGCAAATTTCAATTTACTTTTAAATAAGAGATGGCCTCATAAATGCACAAGAATGGTCT			667
Sbjct 541	GTAGCAAATTTCAATTTACTTTTAAATAAGAGATGGCCTCATAAATGCACAAGAATGGTCT			600
Query 668	TTAGCACGTAGTGCTGGTGACCAACTATATAACACCTATGGGTGCCAGTACCACTAAAG			727
Sbjct 601	TTAGCACGTAGTGCTGGTGACCAACTATATAA-CAC-TATGG-TGC-AGTAC-ACTAAAG			655
Query 728	AAATTATATTTGCACATAGCCATTAACATGGTAATAAATAAAAGGTTTTAGATGTACTT			787
Sbjct 656	AA-T-ATATT-GCACATAGC-ATTA-CATGGTA-TAA-T-AAA-GGTTT-AGATGTACTT			705
Query 788	TAGAAAAATAAATCTTAATGGAACAAATGGGATTAACGTTTTAATGAATTATAAAAAGAAG			847
Sbjct 706	-AGAAA--TAAATCT-AATGGA-CAA-TGG-ATTA-CGTTT-AATGA-TTATAAAAAGA-G			754
Query 848	AAGATGAACCTATTCCAAGTTTTTTAGATATTACTTCCCCTCtttttttGCCAGTTTTT			907
Sbjct 755	A-GATGA-CT-ATTC-AAGTATT--AGATAT-ACT-CGC-TCTTTTT--GCC-AGTTAT-			801
Query 908	GAATCCACGTCCAATACCC	927		
Sbjct 802	GA-TCC-ACGTGGA-TACCC	818		

ANEXO 3. Análise da sequência de nucleotídeos do gene *cry60A* adquiridas a partir do sequenciamento utilizando-se o iniciador específico para o vetor pHT315PxyIIA. A comparação por Blastn mostrou 94% de similaridade com a sequência do gene *cry60A* (número de acesso LIIT01000228.1) de *B. thuringiensis* BR58.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1208 bits(654)	0.0	772/819(94%)	47/819(5%)	Plus/Minus
Query 69	ATGGAAATTACAGATATTGTATTAATAATATATGATTTTATCGAGTGGGATTACGTAAC	128		
Sbjct 912	ATGGAAATTACAGATATTGTATTAATAATATATGATTTTATCGAGTGGGATTACGTAAC	853		
Query 129	AATCAAGATGGAATACCTTATACTCTTTTTGATAAAGCCATCTATGAATATGAACCTAAT	188		
Sbjct 852	AATCAAGATGGAATACCTTATACTCTTTTTGATAAAGCCATCTATGAATATGAACCTAAT	793		
Query 189	GATACGGTACTATTCCAGAACTAAAGTTTTCAAACACTCCGATTCCAATTGCTTCC	248		
Sbjct 792	GATACGGTACTATTCCAGAACTAAAGTTTTCAAACACTCCGATTCCAATTGCTTCC	733		
Query 249	GCCCTAACTATAACTGAAATAGGTCATCACAAACACAGCTTCACTATAAAAAATTTCC	308		
Sbjct 732	GCCCTAACTATAACTGAAATAGGTCATCACAAACACAGCTTCACTATAAAAAATTTCC	673		
Query 309	GaaaaaaaaTGGAAATCGGTACCAACACTACTGTTTCATGGTTTTAAAATTGGTGGTGCA	368		
Sbjct 672	GAAAAAAAAATGGAAATCGGTACCAACACTACTGTTTCATGGTTTTAAAATTGGTGGTGCA	613		
Query 369	ATTAAGTTGGTGCAAAAGGTACAGTAACTGCAAATTTTTTAGTATCAGGCGGAACAGCG	428		
Sbjct 612	ATTAAGTTGGTGCAAAAGGTACAGTAACTGCAAATTTTTTAGTATCAGGCGGAACAGCG	553		
Query 429	GAAGCGAATGTTGAACTTTCTTTAACAGGAGAATATAATTATAGTTCGACTACAGCAAAT	488		
Sbjct 552	GAAGCGAATGTTGAACTTTCTTTAACAGGAGAATATAATTATAGTTCGACTACAGCAAAT	493		
Query 489	GTCAATCAACAGAAAAACATGGGAAATAACAGAAACGTAAGTGTTCCTCACATACT	548		
Sbjct 492	GTCAATCAACAGAAAAACATGGGAAATAACAGAAACGTAAGTGTTCCTCACATACT	433		
Query 549	AGTTTAACGAGCCAACCTTATAATTATGCAAGCAGACATCAGAGTTCCTATGATATTAAC	608		
Sbjct 432	AGTTTAACGAGCCAACCTTATAATTATGCAAGCAGACATCAGAGTTCCTATGATATTAAC	373		
Query 609	TCTAATCTTATAGGAAAGCGATATTATGATGACTATGCCAATATGTTTTTTTCGTATATT	668		
Sbjct 372	TCTAATCTTATAGGAAAGCGATATTATGATGACTATGCCAATATGTTTTTTTCGTATATT	313		
Query 669	TTCCAAAGTAAAAAAGGCGGTGCAACAGAAATGAATTTCTCCAGGCTTAAGTAGATTT	728		
Sbjct 312	TTCCAAAGTAAAAAAG-CGGTCGAAACAGAAATGA-TTTCT-CCAG-CT-A-GTAGATT-	260		
Query 729	AGGCTAAATCAAATCAATGGGCCCTGGAAAAACCCCTTATAAGGTTTTTTAAAAATCCT	788		
Sbjct 259	AG-CTAA-TCAA-TCA-TGG-CC-TGGAAAA--CC-T-ATA-G-TTTTT--AAA--TC-T	217		
Query 789	GGGAGGGTTTTCAAATGGGATCTTCTGAAATTTTAAAGTGGGAATTTTCGGGATATTTCTG	848		
Sbjct 216	GG-AGG-TT-CAAATGG-ATCT-CTGAA-TTT-AA-GTGG-A-TT-CGG-ATATT--CTG	171		
Query 849	ATTTTATTATTAAAGGGTCTTATAATGCCAATTTTATTA	887		
Sbjct 170	ATTT-AT-AT-AAAGG-TCT-ATA-TGC-A-TTT-ATTA	141		

ANEXO 4. Análise da sequência de nucleotídeos do gene *cry60B* adquiridas a partir do sequenciamento utilizando-se o iniciador específico para o vetor pHT315PxyIIA. A comparação por Blastn mostrou 95% de similaridade com a sequência do gene *cry60B* (número de acesso LIIT01000228.1) de *B. thuringiensis* BR58.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1240 bits(671)	0.0	777/820(95%)	40/820(4%)	Plus/Minus
Query 62	ATGACAATTACCATTATCGAATTAGCTATACGAGATTATACAAATTGGGATGGTACTCGT			121
Sbjct 960	ATGACAATTACAAATATCGAATTAGCTATACGAGATTATACAAATTGGGATGGTACTCGT			901
Query 122	GAAATTCGGGATACATCAATCGTCAGGTTATAGATGGGCCAAATATATATGACTATGTA			181
Sbjct 900	GAAATTCGGGATACATCAATCGTCAGGTTATAGATGGGCCAAATATATATGACTATGTA			841
Query 182	ATTAGTGACTCTGTAGCTGTTCCAAAACTGTAATTTTCAATGTAATCCAACCTCCATAT			241
Sbjct 840	ATTAGTGACTCTGTAGCTGTTCCAAAACTGTAATTTTCAATGTAATCCAACCTCCATAT			781
Query 242	ACCGGGCCTAATATAATATCAGAAAAATAACAGATGTAATCAAATAAACGTATTAAG			301
Sbjct 780	ACCGGGCCTAATATAATATCAGAAAAATAACAGATGTAATCAAATAAACGTATTAAG			721
Query 302	TTTTCTGAAAAAGTAGTTGAAACTACTACACATACTACTACAAAGGGTTTTAAAATTGGC			361
Sbjct 720	TTTTCTGAAAAAGTAGTTGAAACTACTACACATACTACTACAAAGGGTTTTAAAATTGGC			661
Query 362	GGTGGAAATTAATCTACTACAAAAGGAACTTAAAATTAAAATTTCTGTAGGAGAACTA			421
Sbjct 660	GGTGGAAATTAATCTACTACAAAAGGAACTTAAAATTAAAATTTCTGTAGGAGAACTA			601
Query 422	GGGTTTGAGCAAACCTTTGAGCTACCTCTTACAGGAGAATACAATAGTAGTCCACTACG			481
Sbjct 600	GGGTTTGAGCAAACCTTTGAGCTACCTCTTACAGGAGAATACAATAGTAGTCCACTACG			541
Query 482	GGGAACACTTGTGCAAAATGAAAAATTATGGGAAATAACAGATAATATAACTGTACCTCCA			541
Sbjct 540	GGGAACACTTGTGCAAAATGAAAAATTATGGGAAATAACAGATAATATAACTGTACCTCCA			481
Query 542	CATTACGTGTAACCTTCAACTTTAATAATTATGAAAACGGAAAGTAAGGGTTCCAATGGAA			601
Sbjct 480	CATTACGTGTAACCTTCAACTTTAATAATTATGAAAACGGAAAGTAAGGGTTCCAATGGAA			421
Query 602	TTAACCACTAATCTTAGAGGAACTAATTCTAGTGGTGAAGGCTCGTTCCCTACTAGTAAT			661
Sbjct 420	TTAACCACTAATCTTAGAGGAACTAATTCTAGTGGTGAAGGCTCGTTCCCTACTAGTAAT			361
Query 662	GGTCTTTTTTTCATATACTACTTTCAGCTCGTGGAAGTGTAGGCGGTTATTTTTTTGTTTAG			721
Sbjct 360	GGTCTTTTTTTCATATACTACTTTCAGCTCGTGGAAGTGTAGGCGGT-ATTTTT--GTT-AG			305
Query 722	TTTATTACGTTGAAGGGCCTTGCCTTCTGGCATTGTAAATTAACCTTCCTTGGGCC			781
Sbjct 304	TT-ATTACGT-GA-GG-CCT-GC-TTCTG-CATT-GTA-TAAT-A-CCT-C-TTGG-CC-			260
Query 782	TGAATAAAACCTGCAACTTTTTAATTTCTATTTGGCCTCAAATAAATGAAATCTTCTTAA			841
Sbjct 259	TGA-TAAA-CC-TGCAACTTTT-AATT-CTATT-GGC-TCAA--TGAA-T-CT-CT-AA			213
Query 842	ATTTTATTTGGGGAATCTGGGATTATTCTTGAACGTAATT		881	
Sbjct 212	ATTT-ATT-GGG-A-TCTGG-AT-ATTCT-GA-CGTAGTT		181	

ANEXO 5. Análise da sequência de nucleotídeos do gene *cry11A* adquiridas a partir do sequenciamento utilizando-se o iniciador específico para o vetor pHT315PxyIIA. A comparação por Blastn mostrou 98% de similaridade com a sequência do gene *cry11A* (número de acesso LIIT01000204.1) de *B. thuringiensis* BR58

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1716 bits(929)	0.0	980/1001(98%)	17/1001(1%)	Plus/Plus
Query 24	CTACTTTAGTAACGGAATTAATTTGCGTCGTAAAGGCCGATTCTTTTACTAAAAACAAC			83
Sbjct 1	CTACTTTAGTAACGG-ATTAATTTGCGTCGTAAAGGCCGATTCTTTTACTAAAAACAAC			59
Query 84	GCGATAAATACCACTCTTCTCCAGAATTTAAACTATCTGAAGAAATACTAAATAAAGCAT			143
Sbjct 60	GCGATAAATACCACTCTTCTCCAGAATTTAAACTATCTGAAGAAATACTAAATAAAGCAT			119
Query 144	TTGTACTTGAAGTTGTAATCCCTAAATCGTTAAATGTAATGCATCTGTGACAAAATCCA			203
Sbjct 120	TTGTACTTGAAGTTGTAATCCCTAAATCGTTAAATGTAATGCATCTGTGACAAAATCCA			179
Query 204	CCCATTCTGGATTAGCATTTCAGTAAACTGCCTAGCATTCTATTATTTCCCGAATTCT			263
Sbjct 180	CCCATTCTGGATTAGCATTTCAGTAAACTGCCTAGCATTCTATTATTTCCCGAATTCT			239
Query 264	GAGATTGTACCCGTATTCCAGCAGGTAAGCGATAAGGTACTCTTACCCTGATAATTAATT			323
Sbjct 240	GAGATTGTACCCGTATTCCAGCAGGTAAGCGATAAGGTACTCTTACCCTGATAATTAATT			299
Query 324	TATATCTAGTTGCCGTATTAACCCGGTGTGTTAGTCTAATAGAGTACTTAGCTTCATTAC			383
Sbjct 300	TATATCTAGTTGCCGTATTAACCCGGTGTGTTAGTCTAATAGAGTACTTAGCTTCATTAC			359
Query 384	TAATGAAAGTACGTGCAAAATTAATACTGCCGTCTGTTGCTTGATCTGGCGTATCTTCTA			443
Sbjct 360	TAATGAAAGTACGTGCAAAATTAATACTGCCGTCTGTTGCTTGATCTGGCGTATCTTCTA			419
Query 444	AAAAATGATCTATCTGAAACTTCAGCAAATTCAGAGCAGGAATTACATAACTATCATTCTG			503
Sbjct 420	AAAAATGATCTATCTGAAACTTCAGCAAATTCAGAGCAGGAATTACATAACTATCATTCTG			479
Query 504	TTTCACTTAAATAGTGAGATTTTTAGAAATAAAAGTCCTTAGTATTATCTGGTGCAAACC			563
Sbjct 480	TTTCACTTAAATAGTGAGATTTTTAGAAATAAAAGTCCTTAGTATTATCTGGTGCAAACC			539
Query 564	CTACAATAATATTTTCTGTAGTAGGTGAATCATACTCTATTCTATTATATGTTAGTGTTG			623
Sbjct 540	CTACAATAATATTTTCTGTAGTAGGTGAATCATACTCTATTCTATTATATGTTAGTGTTG			599
Query 624	TAAGATCGTGATTATATGCAAGTGAGACTCCTCTTGGGCAAGCTGAAATAGCACGAATAT			683
Sbjct 600	TAAGATCGTGATTATATGCAAGTGAGACTCCTCTTGGGCAAGCTGAAATAGCACGAATAT			659
Query 684	AATATCCATCATATGCTAAATAATTTGGTGGTATTGTTCCGGTTCTACTACTTAAACCG			743
Sbjct 660	AATATCCATCATATGCTAAATAATTTGGTGGTATTGTTCCGGTTCTACTACTTAAACCG			719
Query 744	TTTGTGTACCGAGTTTAAATGTTCCACCCATATAGAGTAGACTGAAACCACTGTGTGAAC			803
Sbjct 720	TTTGTGTACCGAGTTTAAATGTTCCACCCATATAGAGTAGACTGAAACCACTGTGTGAAC			779
Query 804	TTACATTTATATCTGCATTTTAAAAAATAGGTCTGCTGGTGCTGGCGCAGTTAAAAAT			863
Sbjct 780	TTACATTTATATCTGCATTTTAAAAAATAGGTCTGCTGGTGCTGGCGCAGTTAAAAAT			839
Query 864	GATTTATAATATCTCTAGGCGCTATAGGCTCATTATTTGGATTTTGATAAAAAGTTTGT			923
Sbjct 840	GATTTATAATATCTCTAGGCGCTATAGGCTCATTATTTGGATTTTGATAAAAAGTTTGT			898
Query 924	GTTCCCTAACCCATAAAATTTATAACCCATTTGTTATCAGCAAAAATAAAAATTTGGTT			983
Sbjct 899	GTT-CTAACTCCATAA-TTTCATTGCC-A-TTGTATCAGCAAAA-TTAAAA-TTG-TT			951
Query 984	TGTTTCTTCCGTTTTTCCCTAATCCCTCCCTGGTAAGCCC 1024			
Sbjct 952	TGTT-CTT-CCGTTT--CCTA-TCCAT-CC-TG-TAAGCCC 984			