



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA APARECIDA PIRES FAZION

**EFEITO DO GENE *cry* SOBRE A CAPACIDADE DE
GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE
Bacillus thuringiensis APÓS INGESTÃO POR LARVAS DE
*Anticarsia gemmatalis***

Londrina
2013

FERNANDA APARECIDA PIRES FAZION

**EFEITO DO GENE *cry* SOBRE A CAPACIDADE DE
GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE
Bacillus thuringiensis INFECTANDO LARVAS DE *Anticarsia*
*gemmatalis***

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F287e Fazion, Fernanda Aparecida Pires.
Efeito do gene *cry* sobre a capacidade de germinação, crescimento e esporulação
de *Bacillus thuringiensis* após ingestão por larvas de *Anticarsia gemmatalis* /
Fernanda Aparecida Pires Fazion. – Londrina, 2013.
70 f. : il.

Orientador: Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Bôas.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis* – Teses. 2. Bactérias – Genética – Teses. 3. Proteínas de
bactérias – Teses. 4. Conjugação (Biologia) – Teses. 5. Plasmídeos – Teses. I. Vilas-
Bôas, Gislayne Fernandes Lemes Trindade. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular. III. Título.

CDU 575.173:579.85

FERNANDA APARECIDA PIRES FAZION

**EFEITO DO GENE *cry* SOBRE A CAPACIDADE DE GERMINAÇÃO,
CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis*
INFECTANDO LARVAS DE *Anticarsia gemmatilis***

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gislayne Fernandes
Lemes Trindade Vilas-Bôas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Prof.^a Dr.^a Gisele Maria de Andrade de Nobrega
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2013.

DEDICO

À Deus

Aos Meus Pais,

Américo José Fazon

Cleusa Maria Netto Pires Fazon

Às Minhas Irmãs,

Mariangela Pires Fazon

Heloisa Pires Fazon

À Deus, acima de tudo, por me abençoar nessa caminhada, me ajudando a superar todos os desafios. Por me proporcionar uma vida maravilhosa, ao lado de pessoas incríveis que me ajudam e que me fazem superar cada dificuldade. Aos meus familiares, por tudo que me ensinaram e principalmente pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Devo essa conquista à eles, que não me deixaram desistir dos objetivos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^a. Dr^a. Gislayne Trindade Vilas-Bôas &

Prof. Dr. Laurival Antonio Vilas-Boas

Pela atenção, apoio e por todo conhecimento que me proporcionaram, me apoiando e ajudando sempre que dúvidas surgiam. Pelos conselhos e principalmente por todo conhecimento que adquiri nesses anos, agradeço a paciência das imensas conversas sobre esse grupo fascinante de bactérias e também pelas conversas pessoais, por sempre entenderem quando estava triste ou precisando de um incentivo, sou muito grata a tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, pela formação profissional e pessoal.

À Universidade Estadual de Londrina, pelo acolhimento nesses últimos anos. Ao Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez e Prof.^a Dr.^a Gisele Maria de Andrade de Nobrega, membros da banca examinadora, pela importante contribuição e disponibilidade em avaliar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Túlio Oliveira de Carvalho por toda ajuda com as análises estatísticas e apoio na interpretação dos resultados.

À EMBRAPA, especialmente ao Prof. Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez, juntamente com os técnicos Fábio e Ivanilda, todos com uma simpatia incrível me proporcionaram estrutura material, conselhos e suporte intelectual para a realização do trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Daniele Sartori, por toda a ajuda e contribuição para melhora deste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Dias com seu trabalho muito competente na coordenação da Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular me apoiou em um momento difícil, com uma conversa e um abraço aconchegantes.

Aos meus pais e irmãs, que sempre com um carinho enorme, me acolheram e me incentivaram com um amor incondicional. Sem essas pessoas maravilhosas não teria conseguido finalizar essa etapa. Por todas as idas na UEL nos finais de semana, por entenderem meu trabalho e nunca me deixarem desanimar.

À minha amiga de mestrado Ana Paula que sempre me apoiou e contribuiu muito com conselhos e principalmente incentivos para que este trabalho fosse finalizado. Apesar de todos os “perrengues” que passamos esses anos, ela sempre estava presente pra

ouvir e acalmar minhas inseguranças. Não posso esquecer do divertimento nas aulas de francês, envolvendo o futuro marido João.

Ao meu amigo Gabriel, que sempre me deu conselhos muito bons, e sempre foi muito preocupado com meus momentos difíceis, agradeço à ele por me ajudar a superar problemas pessoais que surgiram nessa caminhada.

À queridíssima “Roseane”, com quem me divirto muito, com as dormidas de crachá e com cassinos, com os almoços às 10:30 e com idas no laboratório em horários fora do expediente. Sempre me ouvindo a qualquer hora, me dando conselhos, mesmo que pelo telefone, sempre me compreende e me ajuda a superar cada desafio que surge, me dizendo palavras de carinho e aconchego, nas quais me sinto melhor pra continuar meu caminho.

Ao meu amigo Thiago Vidotto, com junto com a Josi me proporcionou momentos muito alegres e teve disposição para me presentear com fotos maravilhosas das minhas queridas lagartas.

À Amanda, vulgo João, que sempre está de bom humor e fazendo as mulheres do lab gastarem no eBay, mas estou totalmente agradecida por toda a ajuda e preocupação que a Amanda dedicou para que nosso trabalho, por todas as lagartas maceradas, diluídas e inoculadas que enfrentamos juntas. Por todo apoio emocional que ela me proporcionou, me animando sempre que as coisas ficavam difíceis.

À mulherada do lab, com quem adoro conviver e que me animam a cada dia e me proporcionam muitas risadas. À Lully que é sempre animada e tem conselhos sensatos pra me apoiar. A Pri que está começando no lab, sendo sempre simpática e prestativa, sem falar nos deliciosos cookies. À querida Fer, que é uma pessoa maravilhosa, que sempre torceu por mim e me incentivou com conversas ótimas que me fizeram sentir conforto e vontade de continuar. À Jana e Kelly, sempre queridas e ajudando a manter o lab muito agradável.

Ao Andrézinho, o melhor músico, sempre que estava presente o lab tudo era muito mais animado, com as “melhores músicas” (sertanejas), e com as conversas mais engraçadas. Ao André Nadal, com seu inglês que me ajudou muito e com as análises de

bioestatística. Ao Shang, que mesmo por ao estar mais no lab ajudou muito com as conversas mirabolantes e assuntos inesperados.

À Edna pelas conversas e incentivos, pelas palavras de carinho e sabedoria que me proporcionou nesses anos.

Ao técnico João Godoy pelos momentos de descontração nesses anos.

À querida amiga Sueli, secretária do Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, por toda disposição em sempre nos ajudar e nos lembrar de todos os prazos possíveis.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

À Deus, por definitivamente tudo. Sempre estando ao meu lado e me dando cada dia mais força e coragem para encarar as dificuldades.

FAZION, Fernanda Aparecida Pires; VILAS-BÔAS, Gislayne Fernandes Lemes Trindade. **Efeito do gene *cry* sobre a capacidade de germinação, crescimento e esporulação de *Bacillus thuringiensis* infectando larvas de *Anticarsia gemmatalis***. 2013. 70 f. Defesa (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A sistemática bacteriana não possui até hoje consenso quanto ao conceito de espécie, o que tem gerado discussões sobre a classificação de diferentes espécies, como as estudadas dentro do grupo *Bacillus cereus sensu lato*, que inclui além de *Bacillus anthracis*, *B. cereus sensu stricto* e *Bacillus thuringiensis*. Essas duas últimas espécies compartilham um grande nível de similaridade genética e são fenotipicamente idênticas. A diferenciação destas espécies é realizada por um gene plasmidial, denominado gene *cry*. Esse gene codifica um cristal paraesporal (composto por proteínas Cry) que confere a atividade entomopatogênica. Uma das formas de dispersão desses plasmídeos é pelo processo de conjugação. Essa troca de material genético entre as espécies de bactérias dificulta a classificação dessas espécies. Com o objetivo de avaliar a influência do plasmídeo pHT73 e do gene *cryIAC* sobre o comportamento de linhagens de *B. thuringiensis*, larvas de 2º instar de *Anticarsia gemmatalis*, foram alimentadas com dietas contendo culturas esporuladas dessa espécie bacteriana. Em seguida, cada larva foi avaliada quanto à germinação de esporos, multiplicação e sobrevivência das linhagens selvagens, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAC* Tet^R, e linhagens exconjugantes *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cryIAC* Tet^R, sendo que cada experimento foi realizado com 10 repetições. As avaliações foram realizadas em diversos tempos, incluindo um tempo antes da morte, t₀, t₂₄ e t₄₈ horas após a morte das larvas. As análises estatísticas evidenciaram que linhagens contendo o plasmídeo pHT73-Em^R se multiplicam em uma taxa maior que linhagens contendo o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R, demonstrando que o gene *cry* confere uma vantagem nas linhagens que o abrigam. As linhagens que possuem o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R se multiplicam a uma taxa maior que linhagens que não apresentam nenhum dos dois plasmídeos estudados. Portanto, as linhagens que possuem o plasmídeo pHT73-Em^R são mais adaptadas ao ambiente larval quando comparadas às linhagens que carregam o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R ou as que não possuem nenhum dos dois plasmídeos. As linhagens que abrigam o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R possuem uma vantagem em relação as linhagens que não contem nenhum dos dois plasmídeos, com isso pode-se inferir que existem outros genes plasmidiais que influenciam no comportamento de linhagens desse grupo bacteriano. Estudos posteriores poderão evidenciar se essa influência do plasmídeo pHT73 e do gene *cryIAC* sobre o comportamento de linhagens de *B. thuringiensis* é espécie específico ou se essa influência ocorre também em linhagens de *B. cereus*, além de apontar o papel desses genes e sua importância no comportamento bacteriano.

Palavras-chave: *Bacillus cereus sensu lato*. Comportamento. Conjugação. Plasmídeo.

FAZION, Fernanda Aparecida Pires; VILAS-BÔAS, Gislayne Fernandes Lemes Trindade. **Effect of cry gene in behavior of *Bacillus thuringiensis* strains in *Anticarsia gemmatalis* larvae.** 2013. 70 p. Defesa (Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The bacterial systematic has so far not consensus about species concept, which has generated discussions on the classification of different species, such as those studied within the group *Bacillus cereus sensu lato*, which includes mainly *Bacillus anthracis*, *B. cereus sensu stricto* and *Bacillus thuringiensis*. These latter two species share a high level of chromosomal similarity and are phenotypically identical. The differentiation of these species is carried by plasmid genes, denominated *cry* genes. These genes encode a paraesporal crystal (composed by Cry proteins) that confers entomopathogenic activity. The dispersion of these plasmids occurs by conjugation process. This exchange of genetic material between bacterial species complicates their classification. Aiming to evaluate the behavior of *B. thuringiensis* strains, second instar *Anticarsia gemmatalis* larvae were fed with diets containing sporulated cultures of this bacterial species. Thus, each larva was assessed for spore germination, proliferation and survival of the strains *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R and *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cry*1Ac Tet^R, and exconjugants strains, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R and *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cry*1Ac Tet^R, and each experiment was performed with 10 repetitions. The evaluations were done at different times, including one time before death, t0, t24 and t48 hours after the death of the larvae. Statistical analyzes showed that strains containing plasmid-pHT73-Em^R multiply at a higher rate than strains containing plasmid pHT73Δ*cry*1Ac Tet^R, demonstrating that the *cry* gene confers an advantage in strains that harbor. Strains that containing the plasmid pHT73Δ*cry*1Ac Tet^R multiply at a higher rate than strains that have none of the two plasmids studied. Therefore, strains containing the plasmid pHT73-Em^R are more adapted to the larval environment when compared to strains that carry the plasmid pHT73Δ*cry*1Ac Tet^R or those without any of the two plasmids. Strains containing the plasmid pHT73Δ*cry*1Ac Tet^R have are more adapted than strains that do not contains any of the two plasmids. Therefore, it can be inferred that there are other plasmid genes that influence the behavior of this group of bacterial strains. Further studies may reveal whether the influence of the pHT73 plasmid and of the *cry*1Ac gene about the behavior of *B. thuringiensis* strains is species specific or whether this effect also occurs in strains of *B. cereus*, besides indicating the role of these genes and their importance in bacterial behavior.

Key words: *Bacillus cereus sensu lato*. Behavior. Conjugation. Plasmid.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – A ecologia complexa de *B. thuringiensis*. Diagrama dos locais em que *B. thuringiensis* tem sido isolado e, onde, pode ocorrer multiplicação celular. Possíveis locais de multiplicação incluem o solo, a rizosfera, o filoplano e outros tecidos das plantas, dentro de insetos vivos ou mortos, ou dentro de outros invertebrados. *B. thuringiensis* é mostrado na forma vegetativa (retângulos vermelhos) e na forma de esporos (elipses amarelas) e cristais (losangos rosas)..... 15
- Figura 2** – Modo de ação das proteínas Cry. (1) Solubilização e ativação da toxina; (2) ligação dos monômeros da toxina no primeiro receptor induzindo a mudança na conformação da toxina (3) formação do oligômero; (4) ligação do oligômero de toxina no segundo receptor; (5) inserção do oligômero da toxina na membrana e formação do poro 17
- Figura 3** – Colônias e fotomicrografias ópticas de (A) *B. thuringiensis* e (B) *B. cereus*. (1) células vegetativas; (2) término da fase estacionária; (3) esporulação completa, com presença de esporos e cristais em *B. thuringiensis* e somente esporos em *B. cereus*..... 26
- Figura 4** – Eletromicrografia de varredura do processo de conjugação em bactérias Gram-positivas, compreendendo células doadoras (linhagem AND801) e células receptoras (linhagem GBJ001)..... 23
- Figura 5** – Representação esquemática dos modelos de retromobilização. (A) Modelo de transferência bidirecional: transferência do plasmídeo conjugativo para a célula receptora ocorre simultaneamente com a transferência do plasmídeo mobilizável para a doadora por apenas um evento de conjugação. (B) Modelo de transferência unidirecional: o primeiro evento conjugativo permite a transferência do plasmídeo conjugativo para a receptora, enquanto que um segundo evento permite a transferência do plasmídeo mobilizável para a doadora. Elipse grande: plasmídeo conjugativo; Círculo pequeno: plasmídeo mobilizável; linha fina: célula receptora; linha grossa: célula doadora; setas brancas: indicação da transferência dos plasmídeos e setas pretas: resultado da transferência..... 25
- Figura 6** – Representação esquemática de conjugação biparental e triparental.

Conjugação refere-se à transferência de plasmídeos conjugativos, enquanto a mobilização e retromobilização refere-se à transferência de plasmídeos mobilizáveis. (A) Conjugação biparental: conjugação para a receptora (1); (B) Mobilização biparental: conjugação para a receptora (1), mobilização para a receptora (2), e transferência de ambos os plasmídeos para a receptora (3). (C) Retromobilização biparental: conjugação para a receptora (1) e retromobilização para a doadora (2). (D) Encontro triparental: conjugação para a receptora (1) e para a linhagem auxiliar (2), mobilização para a receptora (3), transferência de ambos os plasmídeos para a receptora (4), e retromobilização para a doadora (5). Elipse grande: plasmídeo conjugativo; Círculo pequeno: plasmídeo mobilizável; linha fina: célula receptora; linha grossa: célula doadora; setas brancas: indicação da transferência dos plasmídeos; Seta branca em formato de “T”: transferência de ambos os tipos de plasmídeos e setas pretas: resultado da transferência 26

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
δ-endotoxinas	Delta-endotoxinas
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AFLP	Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados
ATP	Adenosina Trifosfato
BP	Bacto-peptona
cm	Centímetro
<i>cry</i>	Gene codificador da proteína Cry
<i>cryIAc</i>	Gene codificador da proteína CryIAc presente no plasmídeo conjugativo pHT73
Cry	Proteína com atividade entomopatogênica produzida por linhagens de <i>B. thuringiensis</i>
CytK	Citotoxina – K
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D. O.	Densidade óptica
Em ^R	Linhagem resistente à eritromicina
h	Hora
HBL	Hemolisina BL
His	Histidina
kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
MGEs	Elementos genéticos móveis
mL	Mililitro
MLEE	Eletroforese de aloenzimas
MPF	Encontro formador de poro
NHE	Enterotoxina não hemolítica
ICEs	Elementos integrativos conjugativos
IMES	Elementos integrativos e mobilizáveis
<i>oriT</i>	Origem de transferência
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
pH	Potencial hidrogeniônico
pHT73 - Em ^R	Plasmídeo conjugativo contendo o gene <i>cry</i> intacto
pHT73Δ <i>cryIAc</i> Tet ^R	Plasmídeo conjugativo com o gene <i>cry</i> deletado
<i>plcR</i>	Gene codificador de um regulador

Rif ^R	pleiotrópico
RNA	Linhagem resistente à rifampicina
rRNA	Ácido ribonucleico
Ser	RNA ribossomal
Sm ^R	Serina
ssDNA	Linhagem resistente à estreptomicina
t	Fita simples de DNA
T4CP	Tempo
T4SS	Proteína de acoplamento do tipo IV
Tet ^R	Sistema de secreção do Tipo IV
Tyr	Linhagem resistente à tetraciclina
UFC	Tirosina
	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
1.1	Características gerais e taxonomia do grupo <i>Bacillus cereus</i>	15
1.1.1	<i>B. thuringiensis</i>	15
1.1.2	Taxonomia do Grupo do <i>B. cereus</i>	18
1.2	Conjugação Bacteriana	22
1.2.1	Características dos Plasmídeos e do Processo de Conjugação	24
1.2.2	Conjugação em <i>B. thuringiensis</i>	27
1.3	ECOLOGIA DE <i>B. thuringiensis</i>	28
2	OBJETIVOS	34
2.1	GERAIS	34
2.2	ESPECÍFICOS	34
	REFERÊNCIAS	35
3	ARTIGO EFEITO DO GENE <i>cry</i> SOBRE A CAPACIDADE DE GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> INFECTANDO LARVAS DE <i>Anticarsia gemmatalis</i>	48
3.1	RESUMO	49
3.2	INTRODUÇÃO	50
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	52
3.3.1	Linhagens utilizadas	52
3.3.2	Características dos experimentos de conjugação	52
3.3.3	Conjugação em suporte sólido	52
3.3.4	Produção da suspensão de esporos-cristais	53
3.3.5	Comportamento de linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Bacillus cereus</i> em Larvas de <i>A. gemmatalis</i>	54
3.3.6	Análise dos resultados	56
3.4	RESULTADOS	57
3.5	DISCUSSÃO	60
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO	69
ANEXO A –	Propriedades das linhagens empregadas neste estudo	70

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Características gerais e taxonomia do grupo *Bacillus cereus*

1.1.1 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis destaca-se, entre as linhagens pertencentes ao grupo *B. cereus*, por ser a bactéria mais conhecida e estudada do grupo (VILAS-BÔAS et al., 2007). Trata-se de um bacilo Gram-positivo, aeróbio, anaeróbio facultativo, quimioheterotrófico e mesófilo com temperatura ótima de crescimento de $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células possuem dimensões de 1,0 - 1,2 μm de largura por 3,0 - 5,0 μm de comprimento, são capazes de se movimentarem por meio de flagelos peritríquios, são resistentes a antibióticos β -lactâmicos, como ampicilina e penicilina. *B. thuringiensis* é cosmopolita, sendo encontrado desde amostras de solo (MORAES; CAPALBO, 1986; OHBA; AIZAWA, 1986; MARTIN; TRAVERS, 1989; APTOSOGLOU; SIVROPOULOU; KOLIAIS, 1997; VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004), filoplano (SMITH; COUCHE, 1991; DAMGAARD et al., 1998), em insetos vivos ou mortos (BERNHARD et al., 1997; CHAUFoux et al., 1997; CHILCOTT; WIGLEY, 1993) e até em grãos estocados (MEADOWS et al., 1992) (Figura 1).

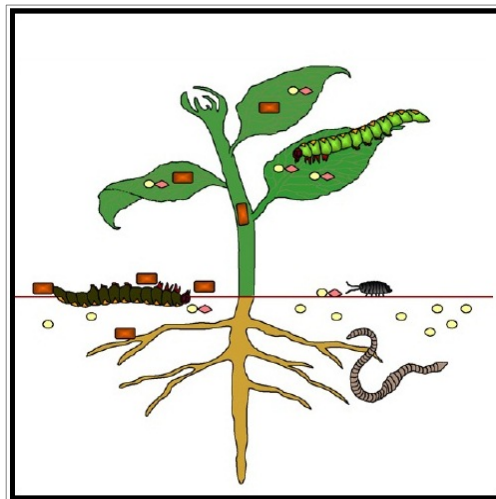


Figura 1 - A ecologia complexa de *B. thuringiensis*. Diagrama dos locais em que *B. thuringiensis* tem sido isolado e, onde, pode ocorrer multiplicação celular. Possíveis locais de multiplicação incluem o solo, a rizosfera, o filoplano e outros tecidos das plantas, dentro de insetos vivos ou mortos, ou dentro de outros invertebrados. *B. thuringiensis* é mostrado na forma vegetativa (retângulos vermelhos) e na forma de esporos (elipses amarelas) e cristais (losangos rosas) (Fonte: RAYMOND, 2010a).

A característica que distingue *B. thuringiensis* de outros bacilos, como *B. cereus*, é que, ao desenvolver o ciclo de esporulação durante a fase estacionária, juntamente

com um esporo elipsoidal, há a formação de proteínas, denominadas Cry, que se juntam e cristalizam ainda dentro da célula vegetativa, formando os cristais proteicos (CRICKMORE et al., 1998; YAMAMOTO; DEAN, 2000). Esses cristais garantem o caráter entomopatogênico às linhagens de *B. thuringiensis* (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). Essas proteínas são codificadas pelos genes *cry*, localizados principalmente em grandes plasmídeos (40-200 MDa), porém podem estar presentes no cromossomo bacteriano, ou ainda nos dois locais (GONZÁLES; BROWN; CARLTON, 1982; SANCHIS et al., 1998).

Uma ou várias cópias de um mesmo gene ou de diferentes genes *cry* podem ser encontradas em uma mesma linhagem bacteriana, sendo que os produtos poderão formar somente um ou diferentes cristais. A linhagem *B. thuringiensis kurstaki* HD73 contém apenas o gene *cryIAc* localizado num plasmídeo de 50 MDa (LERECLUS et al., 1993). A linhagem *aizawai* 7.29, ao contrário, contém cinco genes *cry*, quatro localizados no cromossomo e um num plasmídeo de 45 MDa (SANCHIS et al., 1998), enquanto que a linhagem *israelenses* que também apresenta quatro genes codificadores de proteínas Cry, apresenta todos os genes localizados num único plasmídeo de 72 MDa (GONZÁLEZ; CARLTON, 1984; BOURGOUIN et al., 1988; LERECLUS et al., 1989). A localização preferencial desses genes em plasmídeos conjugativos e a frequente associação a elementos genéticos móveis promovem a grande diversidade de linhagens pela combinação dos diferentes genes (KRONSTAD; WHITELEY, 1984; LERECLUS et al., 1984). Essa combinação resulta na síntese de cristais proteicos com diferentes tipos de proteínas Cry e com perfis de toxicidade distintos (ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002; PIGOTT; ELLAR, 2007).

A maioria dos genes *cry* é expressa na fase de esporulação, portanto o principal modo de regulação é através dos fatores sigma (σ) específicos dessa fase. Outro modo de regulação é independente da esporulação (AGAISSE; LERECLUS, 1995), com a expressão desses genes ocorrendo durante a fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Tanto quando a expressão dos genes *cry* ocorre na fase de esporulação, tanto quando a expressão ocorre durante crescimento vegetativo, a proteína Cry sempre é produto do metabolismo secundário (ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002).

A Figura 2 demonstra as diferentes etapas do modo de ação das proteínas Cry. Inicialmente, os cristais ingeridos pelo inseto susceptível são solubilizados liberando monômeros de proteínas Cry na forma de protoxinas, que através de proteases presentes no intestino do inseto alvo, são clivadas e passam para sua forma ativa. Estas, em seguida, atravessam a membrana peritrófica e ligam-se a receptores específicos presentes na porção apical das microvilosidades das células localizadas no intestino médio do inseto, conduzindo à

formação de poros ou canais iônicos e consequentemente a lise das células epiteliais, levando o inseto à morte. Além disso, os esporos ingeridos juntamente com os cristais podem germinar e as células vegetativas se multiplicarem causando septicemia no inseto hospedeiro (SCHNEPF et al., 1998).

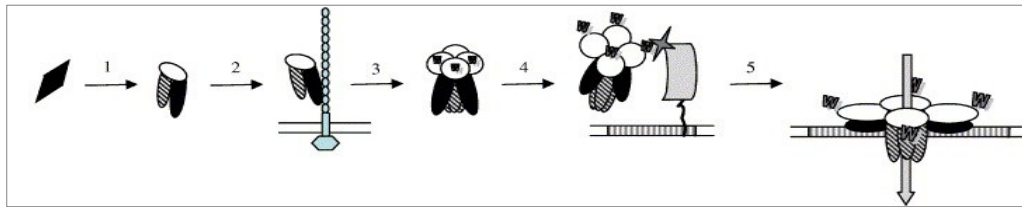


Figura 2 - Modo de ação das proteínas Cry. (1) Solubilização e ativação da toxina; (2) ligação dos monômeros da toxina no primeiro receptor induzindo a mudança na conformação da toxina (3) formação do oligômero; (4) ligação do oligômero de toxina no segundo receptor; (5) inserção do oligômero da toxina na membrana epitelial do intestino anterior, médio ou posterior e formação do poro (Fonte: BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

O intestino dos insetos susceptíveis as toxinas de *B. thuringiensis*, geralmente possuem pH elevado, o que impede a germinação dos esporos ingeridos do patógeno. Porém com a ação das toxinas que destroem a parede do intestino, o pH é reduzido permitindo a germinação dos esporos. O cadáver do inseto serve como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria (COPPING; MENN, 2000).

Os cristais proteicos são tóxicos, principalmente para insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Mallophaga, além de nematóides (Strongylida, Tylenchida), protozoários (Diplomonadida) e ácaros (Acari) (FEITELSON; PAYNE; KIM, 1992; SCHNEPF et al., 1998), sendo esses específicos, pois diferentes toxinas ligam-se a diferentes receptores e com intensidade diferentes nas diversas espécies de inseto (COPPING; MENN, 2000). Essas toxinas não apresentam qualquer dano aos mamíferos, aves, anfíbios, répteis ou outros vertebrados, devido ao modo de ação das mesmas, o qual é específico para as condições presentes no aparelho digestivo de insetos (SCHNEPF et al., 1998).

A utilização de produtos a base de *B. thuringiensis* no controle de insetos pragas da agricultura e vetores de doenças não é recente. Os primeiros produtos começaram a ser comercializados em 1938. Em 1950, houve aumento na produção e na comercialização dos produtos à base de *B. thuringiensis*, através da implementação de novas tecnologias como o uso de fermentadores e com a descoberta de novas subespécies de *B. thuringiensis*, o que ampliou o número de insetos-alvo controlados BRAR et al., 2006; CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004).

A principal característica que diferencia os produtos à base de *B. thuringiensis* de outros produtos comercialmente disponíveis é a atividade entomopatogênica restrita, ou seja, a maioria dos produtos à base de *B. thuringiensis* apresenta espectro de ação somente a um ou poucos insetos. Além disso, os produtos são inócuos a outros animais, além de não contaminar o ambiente e não favorecer a rápida seleção de insetos resistentes, o que acontece frequentemente quando se utiliza produtos agroquímicos sintéticos (ARANTES; VILAS-BÔAS; VILAS-BÔAS, 2002).

Estas características, entre outras, permitem que os produtos à base de *B. thuringiensis* possuam um custo menor tanto no desenvolvimento, quanto no registro. Por exemplo, o custo de desenvolvimento de um bioinseticida à base de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis*, chega a ser 1/40 do custo de um novo pesticida químico sintético (SCHNEPF et al., 1998). Além do mais, pode-se ressaltar que a utilização de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, permite integrar estratégias de manejo no controle de insetos praga, preservando seus inimigos naturais.

1.1.2 Taxonomia do Grupo do *B. cereus*

Atualmente existem 259 espécies descritas no gênero *Bacillus* (COHN, 1872; EUZÉBY, 2012). Porém, a dificuldade de estabelecer um consenso sobre a definição da unidade fundamental da diversidade biológica, a espécie, tem gerado inconvenientes acerca da classificação de micro-organismos. A definição do taxa espécie abrange organismos posicionados numa escala evolutiva maior, sendo difícil aplicar esse conceito em populações bacterianas.

A maior dificuldade da classificação bacteriana é devido a transferência horizontal de genes, que mesmo quando ocorre em baixa frequência na natureza (COHAN, 1994), permite a troca de material genético entre espécies extremamente distantes (LINZ et al., 2000; SMITH; DOWSON; SPRATT, 1991). Estima-se que cerca de 5 a 15% dos genes de um genoma bacteriano típico tenham sido adquiridos de outras espécies através da transferência de segmentos homólogos ou heterólogos, incluindo elementos transponíveis nos plasmídeos ou fagos (MAJEWSKI; COHAN, 1999; OCHMAN; LAWRENCE; GROISMAN, 2000).

Anteriormente à disponibilidade dos testes moleculares, a classificação bacteriana era realizada através de características fenotípicas e testes bioquímicos, o que possibilitou a classificação dos organismos, considerando os graus de similaridade entre os

mesmos. No início dos anos 1970, os bacteriologistas começaram a utilizar dados moleculares para a classificação taxonômica, o que tornou a sistemática bacteriana mais acessível, incluindo bactérias não cultiváveis (COHAN, 2002). Dentre essas técnicas inclui-se a hibridização DNA-DNA, na qual Johnson (1973) determinou que espécies diferentes deveriam compartilhar um nível de similaridade inferior a 70% no genoma completo. Outra técnica inovadora para a classificação foi a variação nucleotídica nos genes de rRNA 16S, onde Stackebrandt e Goebel (1994) encontraram que linhagens com mais de 3% de divergência deveriam ser classificadas como espécies diferentes, e linhagens com menos de 3% de divergência nos genes de rRNA 16S poderiam ou não ser consideradas como membros de uma mesma espécie. Como no caso de *B. cereus* e *B. thuringiensis* que apresentam apenas 1% de divergência, e ainda são classificadas como espécies diferentes.

O termo Grupo do *B. cereus* é um termo não taxonômico e compreende, além de *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* e *B. pseudomycoides*. As três primeiras espécies possuem impactos negativos na atividade humana, sendo *B. cereus* e *B. anthracis* consideradas patógenos de mamíferos, incluindo o homem. Da mesma forma, linhagens de *B. weihenstephanensis* se multiplicam em baixas temperaturas, sendo um risco para conservação de alimentos congelados (MAYR et al., 1999). Linhagens de *B. mycoides* podem melhorar o crescimento de plantas (PETERSEN et al., 1995) enquanto que linhagens de *B. thuringiensis* são utilizadas como inseticida biológico em várias partes do mundo (SCHNEPF et al., 1998). A última espécie, *B. pseudomycoides*, tem sido descrita como responsável por infecções em humanos como endoftalmite (NAKAMURA et al., 1998). No entanto, apesar de não ser taxonômico, o agrupamento destas espécies é legítimo e baseado na similaridade entre as sequências do gene do rRNA 16S destas espécies.

Atualmente, segundo a sequência do gene 16S, o gênero *Bacillus* pode ser dividido em seis grupos, denominado *Bacillus* RNA grupo 1 ao 6, sendo que as espécies do grupo do *B. cereus* ficam agrupadas na subdivisão 3 do grupo 1 (STACKEBRANDT; SWIDERSKI, 2002). No entanto, a extensa similaridade entre as sequências do gene de rRNA 16S apresentada por linhagens destas espécies é uma das principais razões que justificam as discussões taxonômicas envolvendo este grupo de bactérias (VILAS-BÔAS et al., 2007).

As células vegetativas e os esporos das três espécies, vistos ao microscópio óptico, são extremamente semelhantes, entretanto, foi devido às diferenças fenotípicas que *B. thuringiensis*, *B. anthracis* e *B. cereus*, foram inicialmente classificados como pertencentes a espécies distintas. As células de *B. thuringiensis* (Figura 3A), formam um cristal proteico

constituído pelas proteínas Cry, que são liberados junto com os esporos no momento da lise celular. As células de *B. anthracis* apresentam a formação de cápsula e produzem toxinas letais, enquanto que as células de *B. cereus* (Figura 3B), não apresentam nenhum destes fenótipos.

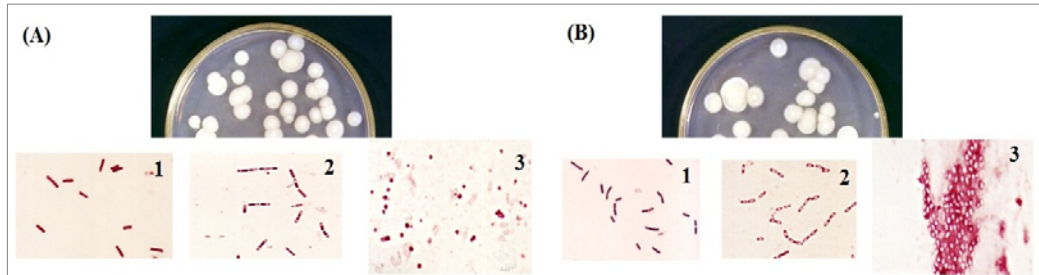


Figura 3 - Colônias e fotomicrografias ópticas de (A) *B. thuringiensis* e (B) *B. cereus*. (1) células vegetativas; (2) término da fase estacionária; (3) esporulação completa, com presença de esporos e cristais em *B. thuringiensis* e somente esporos em *B. cereus*. Fotos 1, 2 e 3: Aumento de 1000 vezes e coloração: Amido-Black e Fucsina.

Contudo, os genes responsáveis pelas características fenotípicas de *B. thuringiensis* e *B. anthracis* estão presentes em grandes plasmídeos que, através de mecanismos de transferência horizontal de genes (conjugação, transdução e transformação) e rearranjos genéticos promovidos por elementos móveis de DNA, podem ser transferidos para outras linhagens do grupo *B. cereus* (VILAS-BÔAS et al., 2007). Como os genes codificantes para essas características são presentes em plasmídeos, a distinção entre essas espécies vem sendo debatida por muitos pesquisadores (SCHNEPF et al., 1998; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; HANSEN; SALAMITOU, 2000).

Gohar e colaboradores (2005), fizeram um estudo comparativo do proteoma extracelular de linhagens de *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* que tiveram os grandes plasmídeos curados. Os resultados mostraram que o proteoma das três espécies foram similares e as únicas diferenças encontradas estavam relacionadas com o peptídeo PlcR, um regulador pleiotrópico descrito por Agaisse e colaboradores (1999), que em *B. cereus* e *B. thuringiensis* controla a expressão de mais de 100 genes potencialmente envolvidos na virulência. Em *B. anthracis* o gene *plcR* é interrompido e portanto não funcional, o que altera a expressão dos genes por ele regulados. Isso demonstra que, embora destituídas dos elementos extracromossômicos, linhagens de *B. anthracis* podem ser diferenciadas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* por mudanças na expressão gênica, como posteriormente relatado por Mignot e colaboradores (2001).

O polimorfismo genético apresentado pelas linhagens de *B. cereus* e *B. thuringiensis* e a extensiva similaridade de seus conjuntos gênicos são os principais fatores que complicam a resolução da questão taxonômica entre essas duas espécies. Linhagens acristalíferas de *B. thuringiensis* são indistinguíveis de *B. cereus* (LYSENKO, 1983), vários estudos iniciais analisando diferentes características, como bioquímicas e análises de DNA (KANEKO; NOZAKI; AIZAWA, 1978; BAUMANN, 1984; LOGAN; BERELEY, 1984; PRIEST, 1988) indicam que essas espécies devam ser consideradas apenas uma. Um dos primeiros estudos para a investigação das relações taxonômicas entre as duas espécies foi conduzido por Carlson e colaboradores (1994) usando eletroforese em campo pulsado (PFGE) e eletroforese de aloenzimas (MLEE). Um alto grau de variabilidade genética foi observado dentro e entre as duas espécies, não sendo possível agrupar separadamente cada espécie, tendo sido sugerido o agrupamento de *B. cereus* e *B. thuringiensis* como única espécie.

Outros estudos usando MLEE e a análise de sequências de genes cromossômicos apresentaram alto grau de similaridade genética e indicaram a falta de diferenciação entre *B. thuringiensis* e *B. cereus sensu stricto* e, assim, os autores sugeriram que essas espécies devem ser consideradas como membros de uma espécie designada *B. cereus sensu lato* (CARLSON, CAUGANT; KOLSTØ, 1994; HELGASON et al., 1998, 2000a, 2000b; DAFFONCHIO et al., 2000; BAVYKIN et al., 2004). Ticknor e colaboradores (2001), baseados em resultados de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), MLEE e dados de sequências de DNAr 16S mostraram que *B. cereus* e *B. thuringiensis* são altamente polimórficos e que uma simples análise de um número limitado de linhagens não é suficiente para caracterizar essas espécies.

Outros pesquisadores apoiam a separação das duas espécies. Vilas-Boas et al. (2002) analisaram pela técnica de MLEE e atividade hemolítica, populações simpátricas coletadas de diferentes amostras de solo. Encontraram que populações de uma mesma espécie de *Bacillus* (*B. thuringiensis* ou *B. cereus*) foram mais similares geneticamente entre si do que com as populações da outra espécie de *Bacillus*. Além disso, foi evidenciada uma maior taxa de fluxo gênico entre as linhagens da mesma espécie. Porém, mesmo em baixas frequências, ocorreram trocas genéticas interespecíficas (entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*). Cherif e colaboradores (2003) utilizaram rep-RCR para analisar agrupamentos de linhagens pertencentes ao grupo do *B. cereus*. Os resultados mostraram que linhagens de *B. thuringiensis* exibiram um agrupamento bem diferente das outras linhagens de *B. cereus*, sugerindo que estas espécies podem ser consideradas como unidades taxonômicas separadas.

As análises, utilizando outras ferramentas genéticas, trazem resultados controversos quanto à taxonomia de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, com trabalhos que ora distinguem as três espécies de *Bacillus* como unidades taxonômicas distintas, ora como linhagens de uma mesma espécie. Desta forma, tem se mostrado relevante, acrescentar aos estudos genéticos, estudos relacionados à ecologia das linhagens do grupo *B. cereus*. A soma destas duas áreas pode, contribuir para a definição da taxonomia destas espécies.

1.2 Conjugação Bacteriana

O processo de conjugação foi descoberto por Lederberg e Tatum em 1946, porém foi descrito em detalhes por Lederberg em 1986 (LEDERBERG, 1986). Esse processo foi definido como a transferência do material genético de uma linhagem bacteriana para outra, sendo dependente de contato celular entre os membros de duas linhagens bacterianas (DAVIS, 1950). Essa descoberta foi considerada o mais importante avanço na história da bacteriologia até aquele momento. Atualmente sabemos que o sistema de conjugação envolve a transferência do DNA entre uma ampla gama de gêneros de bactérias, e em alguns casos, de bactérias para fungos e células de plantas (BATTISTI; GREEN; THORNE, 1985; OULTRAM; YOUNG, 1985; KOEHLER; THORNE, 1987; BEIJERSBERGEN et al., 1992; HAYMAN; BOLEN, 1993; MAHMOOD et al., 1996; BERTOLLA; SIMONET, 1999; HEINEMANN, 1999; CHRISTIE; VOGEL, 2000; CHUMAKOV, 2000; CHEN, 2002; BROOHTAERTS et al., 2005).

A partir do contato entre as células doadoras e receptoras são formados os exconjugantes ou transconjugantes, que são capazes de realizar outros processos de conjugação. Assim, a conjugação é um importante componente da evolução bacteriana.

O sistema de conjugação de bactérias Gram-positivas difere do sistema de Gram-negativas por não formar o pili, estrutura que proporciona o contato entre células em bactérias Gram-negativas. Em bactérias Gram-positivas são formados agregados de células em culturas com duas linhagens (Figura 4), os quais não são formados em monoculturas (ANDRUP et al., 1996).

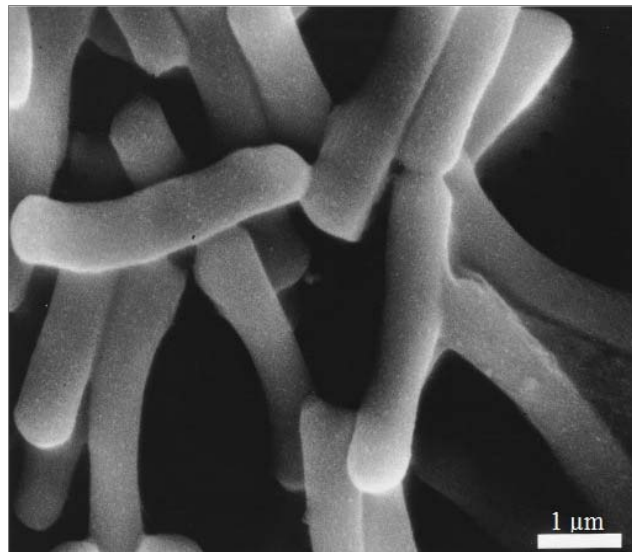


Figura 4 - Eletromicrografia de varredura do processo de conjugação em bactérias Gram-positivas, compreendendo células doadoras (linhagem AND801) e células receptoras (linhagem GBJ001) (Fonte: ANDRUP et al., 1996).

A questão central do processo de conjugação é como o DNA é transferido entre as células envolvidas nesse contato. A conjugação é um conjunto de eventos, que envolvem desde o processamento do DNA até a transferência propriamente dita. O primeiro evento é gerar uma cópia de fita simples do DNA (ssDNA), para isso uma relaxase se liga a origem de transferência do plasmídeo (*oriT*) e cliva a fita de DNA que será destinada a transferência, essa fita é denominada fita-T. A relaxase juntamente com uma ou mais proteína(s) auxiliar(es) formam um complexo multiproteico denominado relaxossomo, o qual permanece ligado a extremidade 5' da fita-T, resultando na formação do complexo relaxase-fita-T (GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003; CHEN; CHRISTIE; DUBNAU, 2005; GARCILLÁN-BARCIA; FRANCIA; DE LA CRUZ, 2009).

O próximo passo é o transporte intercelular, que é realizado pelo sistema de secreção tipo IV (T4SS), também conhecido como *mating pair formation* (MPF). O sistema de secreção tipo IV, ocorre dentro de uma ampla gama de organismos, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e algumas archaea (ZECHNER et al., 2012). O grupo do *B. cereus sensu lato* utiliza esse sistema para efetuar a conjugação (GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003).

O aparato de T4SS de conjugação é um complexo multiproteico que é codificado por genes plasmidiais, envolvidos no transporte do DNA (GROHMANN; MUTH; ESPINOSA, 2003). A relaxase deve permanecer ligada a T-strand para sinalizar o reconhecimento do substrato. Dessa maneira o sistema de conjugação é considerado um

sistema de transporte de proteína, que tem evoluído a capacidade de translocar as relaxases e consequentemente moléculas de DNA à ela ligadas (CHEN; CHRISTIE; DUBNAU, 2005).

O DNA é bombeado ativamente para dentro da célula receptora pela proteína de acoplamento do tipo IV (T4CP) (LLOSA et al., 2002; CHRISTIE, 2004). T4CP é uma proteína integral de membrana homohexamérica pertencente à família de ATPases (FIRTH; IPPEN-IHLER; SKURRAY, 1996; MONCALIÁN et al., 1999; TATO et al., 2005). Essa proteína é responsável por conectar o processamento e translocação do DNA entre as células, sendo que a hidrólise de ATP é a energia necessária para bombear a molécula de DNA através do canal central da mesma (GOMIS-RÜTH, 2006).

1.2.1 Características dos Plasmídeos e do Processo de Conjugação

Os plasmídeos podem ser classificados de acordo com os genes que possuem, sendo esses relacionados com o aparato conjugativo, podendo ser classificados pela habilidade de mobilização. Plasmídeos conjugativos, também denominados auto-transmissíveis, codificam a maquinaria proteica completa para a transferência conjugal. Esses plasmídeos carregam os genes *tra* e codificam seu próprio conjunto de proteínas do complexo MPF ou T4SS que permite a montagem e funcionamento do canal na membrana para a conjugação. Geralmente são grandes, com pelo menos 30 kb, porém com baixo número de cópias. Plasmídeos mobilizáveis contêm o mínimo conjunto de genes que permitem a transferência conjugativa, porém somente quando existem funções conjugativas adicionais. Esses geralmente contêm somente a *oriT*, o gene da relaxase e uma ou mais proteínas acessórias e não possuem as funções requeridas para a formação do poro de conjugação. Possuem até 15 kb, sendo considerados plasmídeos pequenos, porém em um alto número de cópias (GARCILLÁN-BARCIA; FRANCIÁ; DE LA CRUZ, 2009).

Um terceiro tipo, denominado plasmídeo não mobilizável, não possui a região MOB nem o sítio *oriT*, porém consegue se tornar mobilizável pela recombinação com plasmídeos conjugativos (ANDRUP et al., 1996).

A transferência do DNA não é unidirecional, podendo ocorrer o processo de retromobilização, descrito por Ankenbauer (1997). Nesse processo o DNA da célula receptora é capturado pela célula doadora que abriga o plasmídeo conjugativo.

A transferência de plasmídeos mobilizáveis da célula receptora para célula doadora (retromobilização) pode ser explicada de duas maneiras. Existe o modelo de transferência bidirecional, também conhecido como modelo de um passo, no qual ocorre um

evento simples de conjugação, nesse processo o DNA flui livremente e simultaneamente entre as linhagens doadora e receptora (Figura 5A). O outro modelo é unidirecional, conhecido por modelo de dois passos, onde duas etapas de transferência unidirecional ocorrem. A primeira transfere o plasmídeo conjugativo para célula receptora e após a célula doadora transfere o plasmídeo mobilizável para a célula doadora (Figura 5B) (TOP et al., 1992). Estudos em bactérias Gram-negativas sugerem esse último modelo (HEINEMANN; ANKENBAUER 1993; HEINEMANN, SCOTT; WILLIAMS, 1996; SIA; KUEHNER; FIGURSKI, 1996).

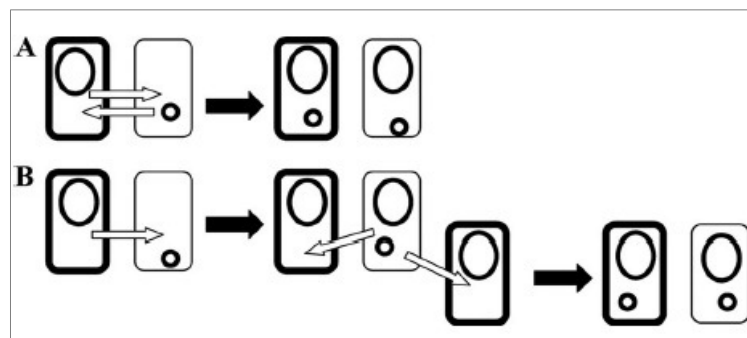


Figura 5 - Representação esquemática dos modelos de retromobilização. (A) Modelo de transferência bidirecional: transferência do plasmídeo conjugativo para a célula receptora ocorre simultaneamente com a transferência do plasmídeo mobilizável para a doadora por apenas um evento de conjugação. (B) Modelo de transferência unidirecional: o primeiro evento conjugativo permite a transferência do plasmídeo conjugativo para a receptora, enquanto que um segundo evento permite a transferência do plasmídeo mobilizável para a doadora. Elipse grande: plasmídeo conjugativo; Círculo pequeno: plasmídeo mobilizável; linha fina: célula receptora; linha grossa: célula doadora; setas brancas: indicação da transferência dos plasmídeos e setas pretas: resultado da transferência (**Fonte:** TIMMERY et al., 2009).

Os sistemas de conjugação podem variar sendo classificados de acordo com a utilização de duas ou três linhagens, conjugação biparental e triparental, respectivamente. A conjugação biparental (Figura 6A e C) envolve a transferência de plasmídeos conjugativos da célula doadora para a célula receptora, onde pode ocorrer a mobilização e a retromobilização de plasmídeos. Nesse processo vários eventos podem ocorrer, a transferência de plasmídeos conjugativos da doadora para receptora; mobilização de plasmídeos mobilizáveis da doadora para receptora; a transferência de ambos os plasmídeos para a receptora (Figura 6B) e a retromobilização de plasmídeos mobilizáveis da receptora para doadora.

O sistema de conjugação triparental transfere plasmídeos conjugativos da doadora para a receptora, com isso a retromobilização de plasmídeos da receptora para a doadora pode ocorrer. Nesse evento de conjugação pode ocorrer a transferência de plasmídeos conjugativos, a mobilização e retromobilização de plasmídeos.

Recentemente foram descritos dois sistemas diferentes, um utilizando uma linhagem doadora, uma receptora e uma auxiliar, esta pode transferir plasmídeos mobilizáveis e não-mobilizáveis. Nesse sistema três eventos podem ocorrer, a mobilização do plasmídeo da linhagem auxiliar para a receptora; transferência de ambos os plasmídeos para a linhagem receptora e retromobilização do plasmídeo da linhagem auxiliar para a linhagem doadora (Figura 6D) (TIMMERY et al., 2009). O segundo, descrito por Santos et al. (2010) analisa se existe transferência preferencial do plasmídeo conjugativo, utilizando três linhagens; duas receptoras e uma doadora, esse sistema é denominado conjugação com duas receptoras.

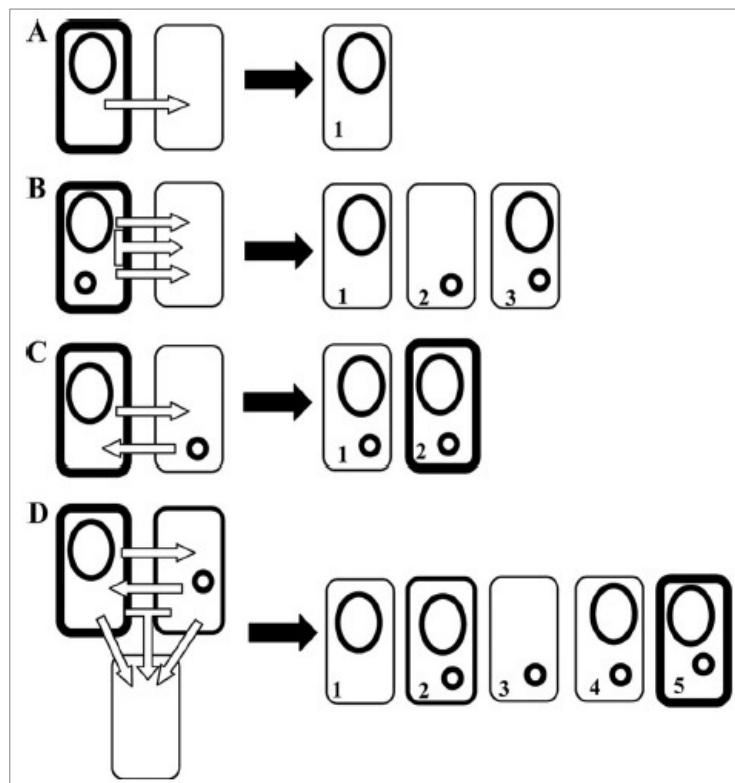


Figura 6 - Representação esquemática de conjugação biparental e triparental. Conjugação refere-se à transferência de plasmídeos conjugativos, enquanto a mobilização e retromobilização refere-se à transferência de plasmídeos mobilizáveis. (A) Conjugação biparental: conjugação para a receptora (1); (B) Mobilização biparental: conjugação para a receptora (1), mobilização para a receptora (2), e transferência de ambos os plasmídeos para a receptora (3). (C) Retromobilização biparental: conjugação para a receptora (1) e retromobilização para a doadora (2). (D) Encontro triparental: conjugação para a receptora (1) e para a linhagem auxiliar (2), mobilização para a receptora (3), transferência de ambos os plasmídeos para a receptora (4), e retromobilização para a doadora (5). Elipse grande: plasmídeo conjugativo; Círculo pequeno: plasmídeo mobilizável; linha fina: célula receptora; linha grossa: célula doadora; setas brancas: indicação da transferência dos plasmídeos; Seta branca em formato de “T”: transferência de ambos os tipos de plasmídeos e setas pretas: resultado da transferência (**Fonte:** TIMMERY et al., 2009).

A transferência de plasmídeos, tanto por conjugação, mobilização ou até mesmo por transformação demonstra a importância da transferência gênica na evolução dos genomas bacterianos, como no caso estudado do grupo do *B. cereus sensu lato*.

1.2.2 Conjugação em *B. thuringiensis*

Genes *cry* são contidos em grandes plasmídeos (GONZÁLEZ; DULMAGE; CARLTON, 1981; KRONSTAD; SCHNEPF; WHITELEY, 1983; GONZÁLEZ; CARLTON, 1984), por isso que o interesse de pesquisadores tem sido voltado principalmente a eles (GONZÁLEZ; CARLTON, 1980; BATTISTI; GREEN; THORNE, 1985; REDDY et al., 1987; JENSEN et al., 1996; WILCKES et al., 1998). Porém, linhagens de *B. thuringiensis* geralmente exibem um conjunto complexo de plasmídeos, podendo chegar a 17 plasmídeos com tamanhos entre 2 – 600 kb (LERECLUS et al., 1982; McDOWELL; MANN, 1991; BERRY et al., 2002; HAN et al., 2006; KASHYAP; AMLA, 2007; AMADIO et al., 2009; ZHONG et al., 2011).

González e Carlton (1984) demonstraram a primeira ocorrência de conjugação entre linhagens de *B. thuringiensis*, pela qual confirmaram a localização dos genes *cry* em plasmídeos. Outros experimentos demonstraram a possível ocorrência de conjugação entre linhagens de *B. thuringiensis* (Cry^+ , doadora) com linhagens de *B. cereus* (Cry^- , receptora), sendo que as linhagens exconjugantes Cry^- passaram a produzir a proteína cristal (GONZÁLEZ; BROWN; CARLTON, 1982).

Anteriormente plasmídeos conjugativos não apresentavam marcas seletivas, assim evidência de transferência era realizada por plasmídeos não-conjugativos que continham genes para a resistência a antibióticos. O plasmídeo pBC16 foi o mais utilizado, esse plasmídeo foi isolado de *B. cereus*, e carrega genes que codificam resistência para antibióticos. O uso desse plasmídeo permitiu caracterizar plasmídeos como pXO11, pXO12, pXO13, pXO14, pXO15 e pXO16, isolados de diferentes subspécies de *B. thuringiensis*, capazes de promover a transferência de pequenos plasmídeos mobilizáveis dentro da variedade de receptoras incluindo linhagens *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* (BATTISTI; GREEN; THORNE 1985; REDDY et al., 1987).

O plasmídeo conjugativo pHT73 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0, foi o primeiro plasmídeo conjugativo marcado com um gene que confere resistência a antibiótico (eritromicina); permitindo monitorar a frequência de conjugação sem necessitar de plasmídeos mobilizáveis (VILAS-BÔAS et al., 1998).

Os estudos anteriormente citados demonstraram apenas a transferência unilateral utilizando linhagens de *B. thuringiensis*. Entretanto Timmerly et al. (2009) demonstrou a capacidade de retromobilização através do plasmídeo conjugativo pXO16 de *B. thuringiensis* subsp. *israelenses*. Neste estudo foram comparados a habilidade de conjugação

e mobilização desses plasmídeos, usando plasmídeos mobilizáveis e elementos não-mobilizáveis que perderam o gene *mob* e o sítio *oriT*.

Experimentos de cinética mostraram que a retromobilização foi atrasada quando comparada com a conjugação de pXO16, sugerindo que a retromobilização de pXO16 ocorreu por transferências sucessivas, como no segundo modelo que é sugerido para bactérias Gram-negativas.

O uso de variáveis e métodos alternativos para transferência de DNA entre células permitiram a detecção da conjugação, mobilização e retromobilização. Diversos trabalhos *in vitro* usando meio líquido, meio sólido, amostras de solo, água e alimentos, combinados com ensaios *in vivo* em larvas de inseto, e com o sequenciamento de grandes plasmídeos, gerou um aumento no interesse do papel dos plasmídeos na biologia de *B. thuringiensis*. Assim, a transferência gênica horizontal, tanto dentro quanto entre espécies, tem sido frequentemente utilizada na investigação da posição taxonômica de *B. thuringiensis* e de outras espécies do grupo do *B. cereus*.

1.3 Ecologia de *B. thuringiensis*

Estudos de abundância, diversidade e distribuição de isolados do grupo do *B. cereus sensu lato* buscam compreender questões ligadas à evolução e as relações ecológicas desse grupo, como exemplo o comportamento dessas bactérias no solo, água e em insetos. Uma questão essencial é a classificação dessa bactéria em taxa diferentes ou como uma única espécie, sendo que *B. thuringiensis* representaria uma subespécie de *B. cereus* (VILAS-BÔAS; SANTOS, 2012).

As características fenotípicas específicas dessas espécies estão presentes em megaplasmídeos conjugativos. A transferência horizontal desses plasmídeos foi descrita para uma variedade de linhagens receptoras que pertencem ao grupo do *B. cereus*. Isso levou a um aumento nos trabalhos *in vitro* e *in vivo*, conduzidos em condições controladas em amostras de solo, insetos, água, alimentos que permitem o acesso ao comportamento dessas bactérias envolvendo germinação de esporos, formação de esporos e persistência, bem como a multiplicação de células vegetativas e conjugação (VILAS-BÔAS; SANTOS, 2012).

O ciclo infeccioso de *B. thuringiensis* tem sido estudado há anos; a primeira evidência de germinação dos esporos, esporulação e produção de toxinas de *B. thuringiensis* foi realizada por Aly, Mulla e Federici (1985) em larvas mortas de mosquitos. Jarrett e Stephenson (1990) infectaram larvas com linhagens de *B. thuringiensis* e verificaram que

larvas de insetos mortos seriam um meio ideal para a troca de material genético, obtendo frequência de 100% na conjugação. Com isso foi evidenciada a ocorrência de troca de material genético na natureza e novas questões surgiram sobre o nicho ecológico de *B. thuringiensis* e o impacto da transferência horizontal de genes no ambiente

A avaliação da conjugação em meio de cultura, microcosmos de solo e larvas de lepidópteros infectados, Vilas-Bôas et al. (1998) verificaram através do plasmídeo pTH73, que a larva de inseto é o ambiente mais favorável para a ocorrência de conjugação, com frequência de 10^{-1} exconjugantes/receptora. Furlaneto et al. (2000), avaliaram a sobrevivência e a transferência conjugal entre linhagens de *B. thuringiensis* em ambiente aquático. A baixa frequência de conjugação detectada permitiu inferir que esse ambiente não é propício para a multiplicação das células vegetativas, permitindo a rápida formação dos esporos.

Suzuki e colaboradores, (2004), avaliaram a especificidade das toxinas e a especificidade de hospedeiros. A primeira se refere a habilidade da toxina produzida por linhagens específicas de *B. thuringiensis* atingir insetos específicos e a segunda se refere a habilidade de linhagens específicas de *B. thuringiensis* colonizarem espécies específicas de larvas de insetos. Resultados mostraram que linhagens de *B. thuringiensis* sem especificidade para matar o inseto podem se multiplicar e transferir material genético no inseto morto mecanicamente, indicando que não há correlação entre a especificidade da toxina e a especificidade do hospedeiro. Portanto, linhagens de *B. thuringiensis* podem colonizar insetos não susceptíveis desde que os insetos sejam mortos mecanicamente. Resultados similares foram descritos por Thomas et al. (2001; 2002) em larvas de insetos não susceptíveis, onde baixas taxas de transferência conjugal foram detectadas e a multiplicação de células vegetativas também foi prejudicada nessa condição.

Guidi e colaboradores (2011) avaliaram a distribuição espacial de esporos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* em um ambiente úmido, onde ocorreu aplicação de produtos a base de *B. thuringiensis* desde 1988. Foi verificado o decréscimo dos esporos perto de 96%, mostrando que o solo natural geralmente não suporta a germinação de esporos ou mesmo a multiplicação de células vegetativas. A ocorrência do processo de conjugação em amostras de solo é também limitada por condições especiais, como de suplementação com nutrientes, valores neutros de pH e esterilização, para a ocorrência de germinação de esporos e a multiplicação de células vegetativas.

As diversas condições ambientais utilizadas para avaliar a ocorrência de transferência conjugal envolvendo linhagens de *B. thuringiensis* demonstraram que o

principal fator limitante é a capacidade de permitir a germinação dos esporos ou simplesmente a presença de células viáveis, embora pareça que a multiplicação dessas células não influenciam drasticamente esse evento (SANTOS et al., 2010).

Santos e colaboradores (2010) avaliaram, em *B. thuringiensis*, a ocorrência de transferência horizontal triparental preferencial (uma doadora e duas receptoras) e a germinação e multiplicação de linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* em larvas mortas de *Bombyx mori*. A linhagem *B. thuringiensis* KTO não mostrou preferência para troca genética dentro de linhagens receptoras de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Com isso o inseto hospedeiro pode ser considerado como uma fonte de nutrientes, um meio de transmissão, e como um reservatório natural em que as bactérias do grupo *B. cereus* podem ser submetidas à recombinação genética através de diferentes mecanismos de adaptação. Estudos demonstram a grande habilidade de disseminação de plasmídeos entre diferentes espécies do grupo do *B. cereus sensu lato* (JARRETT; STEPHENSON, 1990; VILAS-BOAS et al., 1998; SANTOS et al., 2010). Devido ao mecanismo de conjugação os plasmídeos podem ser considerados como uma entidade biológica autônoma, capaz de se transferir de uma célula bacteriana pra outra, assim um plasmídeo como o pHT73 de *B. thuringiensis* não poderia ser considerado específico para essa espécie bacteriana. Quando condições ambientais são desfavoráveis, a célula bacteriana pode eliminar elementos extracromossômicos e com isso obter vantagem seletiva. Dessa maneira são as trocas genéticas que fazem com que os plasmídeos sejam mantidos nas populações bacterianas, com isso esses podem ser mantidos na população através do mecanismo de conjugação.

Santos e colaboradores (2010) demonstraram que a conjugação entre linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* ocorre de maneira randômica, assim não ocorre preferência na transferência de material genético entre essas duas espécies bacterianas. Entretanto, resultados de germinação e multiplicação, no mesmo trabalho, mostraram que linhagens de *B. thuringiensis* germinaram e multiplicaram mais eficientemente que linhagens de *B. cereus* nas larvas de inseto. Esses resultados mostraram que não existe nenhuma associação positiva entre a eficiência da multiplicação bacteriana com a capacidade de conjugação em insetos infectados nas condições testadas, ou seja, a multiplicação de células vegetativas não é essencial para a ocorrência de conjugação entre linhagens de *B. thuringiensis* ou entre *B. thuringiensis* e *B. cereus* em insetos mortos.

Experimentos de conjugação também foram conduzidos em alimentos, devido ao *B. cereus* ser uma espécie conhecida pelas infecções gastrointestinais. Van der Auwera et al. (2007) avaliaram o comportamento da conjugação de linhagens de *B.*

thuringiensis em meio Luria-Bertani (LB), leite e pudim de arroz usando dois plasmídeos conjugativos, pXO16 e pAW63, bem como o plasmídeo mobilizável pC194, em encontros bi e triparentais. Altas frequências de conjugação foram observadas no leite, quando comparados com o meio LB. Além disso, quando linhagens de *B. cereus* foram utilizadas como doadoras do plasmídeo pXO16 (isolado de *B. thuringiensis*) para outra linhagem de *B. cereus*, a razão de conjugação foi em torno de 10^{-1} exconjugante/receptora, sendo similares com os valores observados na conjugação com linhagens de *B. thuringiensis* em larvas de insetos.

Muitas evidências indicaram que *B. thuringiensis* e *B. cereus* exibem uma variação de comportamento em diferentes ambientes. Essas diferenças são relatadas como a alta taxa de conjugação ambos dentro e entre essas espécies, germinação dos esporos e multiplicação das células vegetativas. Entretanto muitos aspectos da biologia dessas espécies permanecem desconhecidos. Wilcks e colaboradores em 2008 demonstraram que linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de estabelecer o ciclo de vida completo no trato digestório de ratos, incluindo germinação de esporos, multiplicação de células vegetativas e transferência do plasmídeo pXO16. Bizzarri e Bishop (2008) obtiveram o isolamento de células vegetativas do filoplano, indicando novamente a possibilidade do ciclo de vida de *B. thuringiensis* ocorrer em outros ambientes e não somente em cadáveres de insetos.

A maioria dos ambientes onde *B. thuringiensis* é encontrado pode ser considerado reservatório de esporos, mas ocasionalmente células vegetativas podem ocorrer em qualquer um desses ambientes, uma vez que eles fornecem condições ideais como nutrientes, pH, temperatura e umidade. Entretanto, o ambiente onde células de *B. thuringiensis* foram encontradas em melhores condições para multiplicação foram larvas de insetos mortas, que podem ser consideradas como nicho ecológico dessa espécie bacteriana (SALAMITOU et al., 2000; TAKATSUKA; KUNIMI, 2000; THOMAS et al., 2000, 2001, 2002; YUAN et al., 2007; SANTOS et al., 2010; RAYMOND et al., 2012). Conseqüentemente, nesse ambiente provavelmente ocorre a evolução do genoma de *B. thuringiensis* através de diferentes mecanismos como as trocas genéticas.

Outra linha de pesquisa desenvolvida por Raymond e colaboradores investigou a estrutura genética populacional e ecologia do grupo do *B. cereus*. Raymond et al., (2010a) encontraram o que muitos trabalhos anteriores tentavam, verificar a relação da comunidade bacteriana com os insetos. Acreditava-se que em solo de florestas iria existir uma comunidade bacteriana mais diversa que em um campo aberto, devido a diversidade de espécies de insetos. Raymond et al., (2010a) observaram que em solos existe um genótipo bem adaptado de *B. thuringiensis*, encontrado como predominante nas amostras de

comunidades do grupo do *B. cereus*, esse genótipo correspondia ao da espécie *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, linhagem utilizada no bioinseticida DiPel.

Análises mostraram que essa predominância não é devido a aplicações contínuas de bioinseticida, pois ocorreu um decaimento drástico de esporos após 10 dias a partir da aplicação, então concluiu-se que esse genótipo está bem adaptado ao ambiente e possui os genes comuns codificadores das proteínas Cry, Cry1Ab e Cry1Ac. Alguns estudos observaram resistência de alguns insetos a essas duas proteínas Cry (WIRTH; GEORGHIOU; FEDERICI, 1997; FERRÉ; VAN RIE, 2002). Isso é devido, portanto não a aplicação de bioinseticida, mas sim a adaptação desse genótipo bacteriano no ambiente.

Raymond et al., (2010) em experimentos com microcosmos, em filoplano, concluíram que tanto a pulverização de bioinseticida quanto a introdução de insetos no ambiente, alteram a constituição da comunidade bacteriana. A aplicação do bioinseticida é indetectável após 28 dias da aplicação, tendo um efeito transiente na comunidade bacteriana. Já insetos hospedeiros aumentam a densidade bacteriana e a proporção de linhagens que expressam as proteínas Cry, pois as bactérias proliferam dentro dos hospedeiros.

Raymond e colaboradores (2012) evidenciaram a cooperação entre bactérias do grupo do *B. cereus sensu lato*. Experimentos em microcosmos foram realizados com linhagens com e sem o gene *cry*, sendo que as linhagens sem o gene foram obtidas por cura plasmidial através da linhagem com o gene. No início da infecção foi recuperada a mesma quantidade de bactérias sem e com o gene *cry*, porém após a infecção a linhagem sem o gene *cry* se multiplicou melhor e ficou com maior densidade bacteriana que a linhagem com o gene. Porém foi evidenciado que esse evento é de cooperação entre as linhagens e não de competição, pois a multiplicação de bactérias é benéfica para a espécie, onde as linhagens não produtoras da proteína Cry exploram os benefícios gerados pelas produtoras (acesso aos nutrientes do hospedeiro). O aumento na densidade de bactérias sem o gene *cry* pode ser explicado pela “carga” que os plasmídeos, carregados pela linhagem com o gene, geram. A multiplicação da bactéria com o plasmídeo é mais lenta, enquanto que as bactérias que não carregam o plasmídeo, se multiplicam mais rapidamente.

A falta de epizootias por *B. thuringiensis* pode ser explicada por essa multiplicação das linhagens sem o gene *cry*, pois para a ocorrência da transferência direta, requerida para uma epidemia, bactérias produtoras de cristal devem existir em alta quantidade, o que não ocorre nas infecções naturais, onde as não produtoras se multiplicam melhor (RAYMOND, 2012). Outra evidência para a não ocorrência de epizootias é que ao morrer pela ação das proteínas Cry o inseto é depositado no solo, seu reservatório natural.

Assim, para que ocorra a transferência para outros hospedeiros que estejam nas folhas, esporos de *B. thuringiensis* devem germinar, e ocorrer um novo ciclo para que as proteínas Cry sejam produzidas e infectem novamente os insetos hospedeiros (RAYMOND, 2010b).

As características fenotípicas das espécies bacterianas do grupo do *B. cereus sensu lato* estão contidas em plasmídeos conjugativos. Entretanto, plasmídeos são muitas vezes vistos como apoio de elementos genéticos na evolução do genoma destas bactérias e esta é uma forma injusta de se referir a um grupo genético tão importante. Portanto, é preciso entender melhor esses plasmídeos, realizando o sequenciamento e anotação, conhecer tanto o seu papel na bactéria e como as condições favoráveis para sua dispersão, bem como as células vegetativas contendo diferentes plasmídeos interagindo com diferentes ambientes. A natureza é dinâmica e as mudanças ocorrem gradualmente no curso da evolução. Com isso outros estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão da ecologia de *B. thuringiensis* (VILAS-BÔAS; SANTOS, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Verificar a influência da presença dos plasmídeos pHT73-Em^R e pHT73Δ*cryI*Ac Tet^R no comportamento de linhagens de *B. thuringiensis* em larvas de *A. gemmatalis* sobre as habilidades de germinação de esporos, multiplicação de células vegetativas e esporulação.

2.2 ESPECÍFICOS

1- Obter linhagens exconjugantes de *B. thuringiensis* contendo o plasmídeo pHT73-Em^R que possui o gene *cry* intacto e um gene de resistência ao antibiótico eritromicina;

2- Obter linhagens exconjugantes de *B. thuringiensis* contendo o plasmídeo pHT73Δ*cryI*Ac Tet^R no qual o gene *cry* foi substituído por um gene de resistência ao antibiótico tetraciclina;

3- Determinar a capacidade de germinação, crescimento e esporulação de linhagens selvagens de *B. thuringiensis* em larvas de *A. gemmatalis*;

4- Determinar o comportamento de linhagens exconjugantes de *B. thuringiensis* contendo o plasmídeo pHT73-Em^R com o gene *cry* ativo e o plasmídeo pHT73Δ*cryI*Ac Tet^R sem o gene *cry* em larvas de *A. gemmatalis*, verificando a influência dessas linhagens;

5- Fazer um estudo comparativo de germinação, crescimento e esporulação entre as linhagens de *B. thuringiensis* contendo o plasmídeo pHT73-Em^R com o gene *cry* ativo, ou plasmídeo pHT73Δ*cryI*Ac Tet^R sem o gene *cry* ou nenhum dos dois plasmídeos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food Microbiology**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 244-250, 1995.
- AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *B. thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**. v. 177, n. 21, p. 6027-6032, 1995.
- AGAISSE, H.; GOMINET, M.; ØKSTAD, O. A.; KOLSTØ, A. B.; LERECLUS, D. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 1043–1053, 1999.
- AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadedepsipeptide, cerulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 129, n. 1, p. 17-20, 1995.
- ALY, C.; MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**.v. 46, n. 3, p. 251–258, 1985.
- AMADIO, A. F.; BENINTENDE, G. B.; ZANDOMENI, R. O. Complete sequence of three plasmids from *Bacillus thuringiensis* INTA-FR7-4 environmental isolate and comparison with related plasmids from the *Bacillus cereus* group. **Plasmid**. v. 62, n. 3, p. 172–182, 2009.
- ANDRUP, L.; DAMGAARD, J.; WASSERMANN, K. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. **Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 20, p. 6530–6536, 1993.
- ANDRUP, L.; JØRGENSEN, O.; WILCKES, A.; SMIDT, L.; JENSEN, G. B. Mobilization of “Nonmobilizable” Plasmids by the Aggregation-Mediated. **Plasmid**, v. 36, n. 2, p. 75-85, 1996.
- ANKENBAUER, R. G. Reassessing forty years of genetic doctrine: retrotransfer and conjugation. **Genetics**. v. 145, n. 3, p.543–549, 1997.
- APTOSOGLOU, S.G.; SIVROPOULOU, A.; KOLIAIS, S.I. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* strains and isolates. **Microbios**. v. 91, n. 368-369, p. 203 – 214, 1997.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L.A; BARROS, N. M; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária. p. 269-293, 2002.
- ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 32, n. 4, p. 579-606, 2008.
- BATTISTI, L.; GREEN, B.; THORNE, C. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**. v. 162, n. 2, p. 543–550, 1985.

- BAUMANN, L.; OKAMOTO K.; UNTERMAN B. M.; LYNCH M. J.; BAUMAN, P. Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 44, n. 3, p. 329-341, 1984.
- BAVYKIN, S.G.; LYSOV, Y.P.; ZAKHARIEV, V.; KELLY, J. J.; JACKMAN, J.; STAHL, D.A.; CHERNI, A.; 2004. **Journal Clinical of Microbiology**. 42, 3711 – 373, 2004.
- BEECHER, D. J., SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**. v. 63, n. 11, p. 4423–4428, 1995.
- BEIJERSBERGEN, A.; DEN DULK-RAS, A.; SCHILPEROORT, R. A.; HOOYKAAS, P. J. J. Conjugative transfer by the virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Science**. v. 256, n. 5061, p. 1324–1327, 1992.
- BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* worldwide distribution, characterization and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 70, p. 59 - 68, 1997.
- BERRY, C.; O' NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T. G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 10, p. 5082–5095, 2002.
- BERTOLLA, F.; SIMONET, P. Horizontal gene transfers in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfers between transgenic plants and microorganisms. **Research in Microbiology**. v. 150, n. 6, p. 375–384, 1999.
- BIZZARRI, M. F.; BISHOP, A. H. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the Phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. **Microbial Ecology**. v. 56, n. 1, p. 133–139, 2008.
- BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal Bacteriology**. v. 170, n.8, p. 3575-3583, 1988.
- BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**. v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *B. thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**. v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
- BROOHAERTS, W.; MITCHELL, H. J.; WEIR, B.; KAINES, S.; SMITH, L. M.; YANG, W.; MAYER, J. E.; ROA-RODRIGUEZ, C.; JEFFERSON, R. A. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. **Nature**. v. 433, n. 7026, p. 629–633, 2005.

- CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotechnologia e meio ambiente**. Viçosa: Folha de Viçosa, 2004. p. 309-350.
- CARLSON, C. R.; CAUGANT D. A.; KOLSTØ, A. B. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, n. 6, p. 1719-1725, 1994.
- CHAUFAUX, J.; MARCHAL, M.; GILOIS, N.; JEHANNO, I.; BUISSON, C. Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. **Canadian Journal Microbiology**. v. 43, p. 337 - 343, 1997.
- CHEN, L.; CHEN, Y.; WOOD, D. W.; NESTER, E. W. A new type IV secretion system promotes conjugal transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**. v. 184, n. 17, p. 4838–4845, 2002.
- CHEN, I.; CHRISTIE, P. J.; DUBNAU, D. The Ins and Outs of DNA transfer in bacteria. **Science**. v. 310, n. 5753, p. 1456–1460, 2005.
- CHERIF, A.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; BOUDABOUS, A.; HYAMI-HORANI, H. DAFFONCHIO, D. Genetic relationship in the “*Bacillus cereus* group” by rep-PCR fingerprint and sequencing of *Bacillus anthracis*- specific rep-PCR fragment. **Journal Applied Microbiology**. v. 94, p. 1108-1119, 2003.
- CHILCOTT, C. N.; WIGLEY, P. J. Isolation and toxicity of *B. thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 61, n. 3, p. 244-247, 1993.
- CHRISTIE, P. J.; VOGEL, J. P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends in Microbiology**. v. 8, n. 8, p. 354–360, 2000.
- CHRISTIE, P. J. Type IV secretion: the *Agrobacterium virB/D4* and related conjugation systems. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1694, n. 1-3, p. 219-234, 2004.
- CHUMAKOV, M. I. Transfer of genetic information from agrobacteria to bacterial and plant cells: membrane and supramembrane structures involved in transfer. **Membrane and Cell Biology**. v. 14, n. 3, p. 309–331, 2000.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**. v. 56, n. 5, p. 651-676, 2000.
- COHN, F. Ueber die Bakterien, die kleinsten lebenden Wesen. **Sammlung Gemeinverständlicher Wissenschaftlicher Vorträge**, Carl Habel, Berlin, 1872.
- COHAN, F. M. The effects of rare but promiscuous genetic exchange on evolutionary divergence in prokaryotes. **The American Naturalist**. v. 143, n. 6, p. 965–86, 1994.
- COHAN, F. M. What are bacterial species? **Annual Reviews of Microbiology**. v. 56, p. 457-487, 2002.

- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECUS, D.; BAUM, J. and DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, n.º. 3, p. 807-813, 1998.
- DAFFONCHIO, D.; CHERIF, A.; BORIN, S. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S–23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the “*Bacillus cereus* group.” **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 12, p. 5460–5468, 2000.
- DAMGAARD, P.H.; ABDEL-HAMEED, A.; EILENBERG, J.; SMITS, P.H. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on grass foliage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 14, p. 239-242, 1998.
- DAVIS, B. D. Nonfiltrability of the agents of recombination in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 60, n. 4, p. 507-508, 1950.
- DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.
- EUZÉBY, J. P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Bacillus***. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html> > Acesso em: 04 de setembro de 2012.
- FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, v.10, p.271-275, 1992.
- FIRTH, N.; IPPEN-IHLER, K.; SKURRAY, R. A. Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation. In: ***Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology**. Edited by NEIDHART, F. C.; CURTISS, III R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. C. American Society for Microbiology. p. 2377-2401, 1996.
- FURLANETO, L. M.; SARIDAKIS, H. O.; ARANTES, O. M. N. Survival and conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* strains in aquatic environment. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, n. 4, p. 233-238, 2000.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**. v. 47, p. 501-533, 2002.
- GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; FRANCIA, M. V.; DE LA CRUZ, F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 33, n. 3, p. 657-687, 2009.
- GLARE, T. R.; O’CALLAGHAN, M. ***B. thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 350 p., 2000.

- GOHAR, M.; GILOIS, N.; GRAVELINE, R.; GARREAU, C.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. **Proteomics**. v. 5, p. 3696–3711, 2005.
- GOMIS-RÜTH, F. X.; COLL, M. Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 16, n. 6, p. 744-752, 2006.
- GONZÁLEZ, J. M. Jr.; CARLTON, B. C. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**. v. 3, n. 1, p. 92–98, 1980.
- GONZÁLEZ, J. M. Jr., DULMAGE, H. T.; CARLTON, B. C. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**. v. 5, n. 3, p. 352–365, 1981.
- GONZÁLES, J. M. Jr.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *B. thuringiensis* plasmids coding for d-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **Proceedings of the National Academic of Science**. v. 79, n. 10, p. 6951-6955, 1982.
- GONZÁLEZ, J. M. Jr.; CARLTON, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid**. v. 11, n. 1, p. 28-38, 1984.
- GRANUM, P. E. *B. cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**. v. 76, n. S 23, p. 61S-66S, 1994.
- GRANUM, P. E.; LUND T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**. v. 157, n. 2, p. 223–228, 1997.
- GRANUM, P.E.; BAIRD-PARKER, A.C. *Bacillus* spp. In: The Microbiological Quality and Safety of Food. Edited by LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. Aspen Publishers, Maryland. pp. 1029 – 1039, 2000.
- GROHMANN, E.; MUTH, G.; ESPINOSA, M. Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 2 , p. 277–301, 2003.
- GUIDI, V.; PATOCCHI, N.; LÜTHY, P.; TONOLLA, M. Distribution of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in soil of a Swiss Wetland reserve after 22 years of mosquito control. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77, n. 11, p. 3663–3668, 2011.
- HAN, C. S.; XIE, G.; CHALLACOMBE, J. F.; ALTHERR, M. R.; BHOTIKA, S. S.; BROWN, N.; BRUCE, D.; CAMPBELL, C. S.; CAMPBELL, M. L.; CHEN, J.; CHERTKOV, O.; CLELAND, C.; DIMITRIJEVIC, M.; DOGGETT, N. A.; FAWCETT, J. J.; GLAVINA, T.; GOODWIN, L. A.; GREEN, L. D.; HILL, K. K.; HITCHCOCK, P.; JACKSON, P. J.; KEIM, P.; KEWALRAMANI, A. R.; LONGMIRE, J.; LUCAS, S.; MALFATTI, S.; McMURRY, K.; MEINCKE, L. J.; MISRA, M.; MOSEMAN, B. L.; MUNDT, M.; MUNK, A. C.; OKINAKA, R. T.; PARSON-QUINTANA, B.; REILLY, L. P.; RICHARDSON, P.; ROBINSON, D. L.; RUBIN, E.; SAUNDERS, E.; TAPIA, R.; TESMER, J. G.; THAYER, N.; THOMPSON, L. S.; TICE, H.; TICKNOR, L. O.; WILLS, P.

- L.; BRETTIN, T. S.; GILNA, P. Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**. v. 188, n. 9, p. 3382–3390, 2006.
- HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *B. thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic publishers, p. 41-64, 2000.
- HAUGE, S. **Matforgiftninger fremkalt av *Bacillus cereus***. **Nordisk Hygienisk Tidsskrift**. v. 31, n. 6, p. 189-206, 1950.
- HAYMAN, G. T.; BOLEN, P. L. Movement of shuttle plasmids from *Escherichia coli* into yeasts other than *Saccharomyces cerevisiae* using trans-kingdom conjugation. **Plasmid**. v. 30, n. 3, p. 251–257, 1993.
- HEINEMANN, J. A.; ANKENBAUER, R. G. Retrotransfer in *Escherichia coli* conjugation: bidirectional exchange or de novo mating? **Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 3, p. 583–588, 1993.
- HEINEMANN, J. A.; SCOTT, H. E.; WILLIAMS, M. Doing the conjugative two-step: evidence of recipient autonomy in retrotransfer. **Genetics**. v. 143, n. 3, p. 1425–1435, 1996.
- HEINEMANN, J. A. Genetic evidence of protein transfer during bacterial conjugation. **Plasmid**. v. 41, n. 3, p. 240–247, 1999.
- HELGASON, E., D. A.; CAUGANT, M. M.; LECADET, Y.; CHEN, J.; MAHILLON, A.; LÖVGREN, I.; HEGNA, K.; KVALOY, A. B.; KOLSTØ. Genetic diversity of *Bacillus cereus/Bacillus thuringiensis* isolates from natural sources. **Current Microbiology**. v. 37, p. 80–87, 1998.
- HELGASON, E.; CAUGANT, D. A.; OLSEN, I.; KOLSTØ, A. B. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 4, p. 1615-1622, 2000a.
- HELGASON, E.; ØKSTAD, P. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KØLSTO, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000b.
- HEYNDRICKX, M.; SCHELDEMAN, P. Bacilli associated with spoilage in dairy products and their food. In Applications and Systematics of *Bacillus* and Relatives, Edited by Berkeley, R. C. W.; Heyndrickx, M.; Logan, N. A.; De Vos, P. **Oxford: Blackwell Science**. p. 65–82, 2002.
- JARRETT, P.; STEPHENSON, M. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 1608–1614, 1990.
- JENSON, I.; MOIR, C. J. ***Bacillus cereus* and other *Bacillus* species**. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JENSON, I.; NEWTON, K.; SUTHERLAND, P. (ed.), *Foodborne*

Microorganisms of Public Health Significance, 5th ed. Australian Institute of Food Science and Technology Inc., Sydney, Australia, 1997.

JENSEN, G.B.; WILCKES, A.; PETERSEN, S. S.; DAMGAARD, J.; BAUM, J.A.; ANDRUP, L. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. **Journal Bacteriology**. v. 177, p. 2914–2917, 1995.

JENSEN, G. B.; ANDRUP, L.; WILCKES, A.; SMIDT, L.; POULSEN, O. M. The aggregation-mediated conjugation system of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: host range and kinetics. **Current Microbiology**. v. 33, n. 4, p. 228–236, 1996.

JOHNSON, J. L. Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 23, n. 4, p. 308–315, 1973.

KANEKO, T.; NOZAKI, T.; AIZAWA, K. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Immunology** 22:639-641, 1978.

KASHYAP, S.; AMLA, D. V. Characterisation of *Bacillus thuringiensis kurstaki* strains by toxicity, plasmid profiles and numerical analysis of their *cryIA* genes. **African Journal of Biotechnology**. v. 6, n. 15, p. 1821–1827, 2007.

KOEHLER, T. M.; THORNE, C. B. *Bacillus subtilis* (natto) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. **Journal of Bacteriology**. v. 169, n. 11, p. 5271–5278, 1987.

KOTIRANTA, A. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. **Microbes and Infection**, v.2, n° 2, p.189-198, 2000.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *B. cereus* and other *Bacillus* species. In: Foodborne Bacterial Pathogens (DOYLE, M. P., Ed.), p. 21-70. Marcel Dekker, New York, 1989.

KRONSTAD, J. W.; SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Journal of Bacteriology**. v. 154, n. 1, p. 419–428, 1983.

KRONSTAD, W.; WHITELEY, H. R. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal Bacteriology**. v.160, n.1, p.95-102, 1984.

LEDERBERG, J. Forty years of genetic recombination in bacteria. **Nature**. v. 324, n. 6098, p. 627–628, 1986.

LERECLUS, D. LECADET, M. M.; RIBIER, J.; DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. **Molecular and General Genetics**. v. 186, n. 3, p. 391–398, 1982.

LERECLUS D.; RIBIER, J.; KLIER, A.; MENOU, G.; LECADET, M. M. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **EMBO Journal**. v.3, n.11, p.2561-2567, 1984.

LERECLUS, D.; BOURGOIN, C. LECADET, M. M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-toxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R. A., SETLOW, P. (Ed.). **Regulation of prokaryotic development**. Washington: American Society for Microbiology. p. 255-276, 1989.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes**. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester : J. Wiley E Sons, 1993. p.37-70.

LINZ, B.; SCHENKER, M.; ZHU, P.; ACHTMAN, M. Frequent interspecific genetic exchange between commensal Neisseriae and *Neisseria meningitides*. **Molecular Microbiology**. v. 36, n. 5, p. 1049-1058, 2000.

LLOSA, M.; GOMIS-RUTH, F. X.; COLL, M.; de la CRUZ, F. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. **Molecular Microbiology**. v. 45, n. 1, p. 1–8, 2002.

LOGAN, N. A.; BERELEY R. C. W. Identification of *Bacillus* strains using the API system. **Journal of General Microbiology**. v. 130, n. 7, p. 1871-1882, 1984.

LUND, T., DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**. v. 38, n. 2, p. 254–261, 2000.

LYSENKO, O. *Bacillus thuringiensis*: evolution of a taxonomic conception. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 42, n. 3, p. 295-298, 1983.

McDOWELL, D. G.; MANN, N. H. Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* strain HD1-DIPEL. **Plasmid**. v. 25, n. 2, p. 113-120, 1991.

MAHMOOD, A.; KIMURA, T.; TAKENAKA, M.; YOSHIDA, K. The construction of novel mobilizable YAC plasmids and their behavior during trans-kingdom conjugation between bacteria and yeasts. **Genetic Analysis**. v. 13, n. 2 ,p. 25–31, 1996.

MAJEWSKI, J.; COHAN, F. M. Adapt globally, act locally: the effect of selective sweeps on bacterial sequence diversity. **Genetics**. v.152, n. 4, p.1459-1474, 1999.

MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *B. thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, n. 10, p. 2437-2442, 1989.

MAYR, E. What is a species, and what is not? **Philosophy of Science**. v. 63, n. 2, p. 262-277, 1996.

MAYR, R.; EPPERT, I.; SCHERER, S. Incidence and identification of psychrotrophic (7 °C-tolerant) *Bacillus* spp. in German HTST pasteurized milk. **Milchwissenschaft**. v. 54, p. 26–30, 1999.

- MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRET, P.; BURGESS, H. D.; Distribution, frequency, and diversity of *B. thuringiensis* in animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 59, n. 4, p. 1344-1350, 1992.
- MEER, R. R.; BAKER, J.; BODYFELT F. W.; GRIFFITHS, M. W. Psychrotrophic *Bacillus* spp in fluid milk products: A review. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 12, p. 969-979, 1991.
- MIGNOT, E.; LIN, L.; ROGERS, W.; HONDA, Y.; QIU, X.; LIN, X.; OKUN, M.; HOHJOH, H.; MIKI, T.; HSU, S.H. Complex HLA-DR and DQ interactions confer risk for narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. **The American Journal Human Genetics**. v. 68, p. 686–699, 2001.
- MONCALIÁN, G.; CABEZÓN, E.; ALKORTA, I.; VALLE, M.; MORO, F.; VALPUESTA, J. M.; GOÑI, F. M.; de La CRUZ, F. Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. **Journal Biology Chemical**. v. 274, n. 51, p. 36117-36124, 1999.
- MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole. p. 127-170, 1986.
- NAKAMURA, L.K. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 48, n. p. 1031–1034, 1998.
- OCHMAN, H.; LAWRENCE J. G.; GROISMAN, E. A. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**. v. 405, p. 299 - 304, 2000.
- OHBA, M.; AIZAWA, K. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.47, n. 3, p. 277-282, 1986.
- OULTRAM, J. D.; YOUNG, M. Conjugal transfer of plasmic pAMB1 from *Streptococcus lactis* and *Bacillus subtilis* to *Clostridium acetobutylicum*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 27, n. 1, p. 129–134, 1985.
- PETERSEN, D.J.; SHISHIDO, M.; BRIAN HOLL, F.; CHANWAY, C.P. Use of species- and strain-specific PCR primers for identification of conifer root-associated *Bacillus* spp. **FEMS Microbiology Letters**. v. 133, n. 1-2, p. 71–76, 1995.
- PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.
- PRIEST, F. G.; GOODFELLOW M.; TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **Journal of General Microbiology**. v. 134, n. 7, p. 1847-1882, 1988.
- RAYMOND, B.; WYRES, K. L.; SHEPPARD, S. K.; ELLIS, R. E.; BONSALE, M. B. Environmental Factors Determining the Epidemiology and Population Genetic Structure of the *Bacillus cereus* Group in the Field. **PLoS Pathogens**. v. 26, n. 6(5), e1000905, 2010a.

- RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**. v. 18, n. 5, p. 183-232, 2010b.
- RAYMOND, B.; WEST, S. A.; GRIFFIN, A. S.; BONSALE, M. B. The Dynamics of Cooperative Bacterial Virulence in the Field. **Science**. v. 337, n. 6090, p. 85-88, 2012.
- REDDY, A.; BATTIST, L.; THORNE, C.B. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. **Journal Bacteriology**. v. 169, p. 5263–5270, 1987.
- SALAMITOU, S.; RAMISSE, F.; BREHÉLIN, M.; BOURGUET, D.; GILOIS, N.; GOMINET, M.; HERNANDEZ, E.; LERECLUS, D. The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**. v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.
- SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENO, G.; CHAUFAX, J.; LECADÉ, M. M. Multiplicity of d-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *B. thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 393-404, 1998.
- SANTOS, C.; VILAS-BÔAS, G. T.; LERECLUS, D.; SUZUKI, M. T.; ANGELO, E. A.; ARANTES, O. M. N. Conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains is not directly correlated with growth of recipient strains. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 105, n. 2, p.171–175, 2010.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *B. thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SENESI, S.; GHELARDI E. Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. **Toxins**. v. 2, n. 7, p. 1690-1703, 2010.
- SIA, E. A.; KUEHNER, D. M.; FIGURSKI, D. H. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. **Journal of Bacteriology**. v. 178, n. 5, p. 1457–1464, 1996.
- SMITH, R. A.; COUCHE, G. A. The phylloplane as a source of *B. thuringiensis* variants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, n. 1, p. 311-315, 1991.
- SMITH, J. M.; DOWSON, C. G.; SPRATT, B. G. Localized sex in bacteria. **Nature**, v. 349, p. 29-31, 1991.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 846– 849, 1994.
- STACKEBRANDT, E.; SWIDERSKI, J. From phylogeny to systematics: the dissection of the genus *Bacillus*. In: Berkeley, R.; Heyndrickx, M.; Logan, N.; De Vos, P. **Applications and systematics of Bacillus and relatives**. p. 8-22, 2002.

SUZUKI, M. T.; LERECLUS, D. ARANTES, O. M. Fate os *B. thuringiensis* strains in different insect larvae. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 50, n. 11, p. 973-975, 2004.

TAKATSUKA, J.; KUNIMI, Y. Intestinal bacteria affect growth of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the oriental tea tortrix, *Homona magnanima* diakonoff (Lepidoptera: tortricidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 73, n.3, p. 222-226, 2000.

TATO, I.; ZUNZUNEGUI, S.; de la CRUZ, F.; CABEZÓN, E. TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, n. 23, p. 8156-8161, 2005.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 118–124, 2000.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies. *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 330–338, 2001.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Transfer of plasmid pBC16 between *Bacillus thuringiensis* strains in non-susceptible larval. **FEMS Microbiology**. v. 40, p.181–190, 2002.

TICKNOR, L. O.; KØLSTO, A.; HILL, K. K.; KEIM, P.; LAKER, M. T.; TONKS, M.; JACKSON, P. J. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, nº 10, p.4.863-4.873, 2001.

TIMMERY, S.; MODRIE, P.; MINET, O.; MAHILLON, J. Plasmid Capture by the *Bacillus thuringiensis* Conjugative Plasmid pXO16. **Journal of Bacteriology**. v. 191, n. 7, p. 2197–2205, 2009.

TOP, E. M.; VANROLLEGHEM, P.; MERGEAY, M.; VERSTRAETE, W. Determination of the mechanism of retrotransfer by mechanistic mathematical modeling. **Journal of Bacteriology**. v. 174, n. 18, p. 5953-5960, 1992.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. EMBRAPA: Jaguariúna, p. 102-225, 1998.

VAN DER AUWERA, G.A.; TIMMERY, S.; HOTON, F.; MAHILLON, J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 164–172, 2007.

- VILAS-BÔAS, G. F. L. T.; VILAS-BÔAS, L. A.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. **FEMS Microbiology**. v. 25, p. 369–374, 1998.
- VILAS-BÔAS, G.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; LEMOS, M.; BOURGUET, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 1414–1424, 2002.
- VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *B. 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. 6, p. 673-687, 2007.
- VILAS-BÔAS, G. T.; SANTOS, C. A. Conjugation in *B. thuringiensis*: Insights into the Plasmids Exchange Process. In: ***B. thuringiensis* Biotechnology**. SANSINENEA, E. (ed.) Springer, 2012, p. 159-174.
- YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacterial pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to fiels application**. Netherlands; Kluwer Academic Publichers, p. 81-100, 2000.
- YUAN, Y. M.; HU, X. M.; LIU, H. Z.; HANSEN, B. M.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Kinetics of plasmid transfer among *Bacillus cereus* group strains within lepidopteran larvae. **Archives of Microbiology**. v. 187, n. 6, p. 425–431, 2007.
- WIJNANDS, L. M.; DUFRENNE, J. B.; VAN LEUSDEN, F. M. **Characterization of *Bacillus cereus***. Disponível em: <<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912002.pdf>>. Acesso em 28 de setembro de 2012, 2002.
- WILCKS, A.; JAYASWAL, N.; LERECLUS, D.; ANDRUP, L. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73. **Microbiology**. v. 144, p. 1263–1270, 1998.
- WILCKS, A.; SMIDT, L.; BAHL, M. I.; HANSEN, B. M.; ANDRUP, L.; HENDRIKSEN, N. B.; LICHT, T. R. Germination and conjugation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the intestine of gnotobiotic rats. **Journal Applied of Microbiology**. v. 104, n. 5, p. 1252–1259, 2008.
- WIRTH, M. C.; GEORGHIOU, G. P.; FEDERICI, B. A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. **Agricultural Sciences**. v. 94, n. 20, p. 10536-10540, 1997.
- ZECHNER, E. L.; LANG, S.; SCHILDBACH, J. F. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. **Biological Science**. v. 367, n. 1592, p. 1073-1087, 2012.

ZHONG, C.; PENG, D.; YE, W.; CHAI, L.; QI, J.; YU, Z.; RUAN, L.; SUN, M.
Determination of Plasmid Copy Number Reveals the Total Plasmid DNA Amount Is Greater than the Chromosomal DNA Amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520.
PLoS ONE. v. 6, n. 1, e16025, 2011.

3 ARTIGO

**EFEITO DO GENE *cry* SOBRE A CAPACIDADE DE
GERMINAÇÃO, CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE
Bacillus thuringiensis INFECTANDO LARVAS DE *Anticarsia*
*gemmatalis***

3.1 RESUMO

A sistemática bacteriana não possui até hoje consenso quanto ao conceito de espécie, o que tem gerado discussões sobre a classificação de diferentes espécies, como as estudadas dentro do grupo *Bacillus cereus lato sensu*, que inclui além de *Bacillus anthracis*, *B. cereus stricto sensu* e *Bacillus thuringiensis*. Essas duas últimas espécies compartilham um grande nível de similaridade cromossômica e são fenotipicamente idênticas. A diferenciação destas espécies é realizada por um gene plasmidial, denominado gene *cry*. Esse gene codifica um cristal paraesporal (composto por proteínas Cry) que confere a atividade entomopatogênica. Uma das formas de dispersão desses plasmídeos é pelo processo de conjugação. Essa troca de material genético entre as espécies de bactérias dificulta a classificação dessas espécies. Com o objetivo de avaliar a influência do plasmídeo pHT73 e do gene *cryIAC* sobre o comportamento de linhagens de *B. thuringiensis*, larvas de 2º instar de *Anticarsia gemmatalis*, foram alimentadas com dietas contendo culturas esporuladas dessa espécie bacteriana. Em seguida, cada larva foi avaliada quanto à germinação de esporos, multiplicação e sobrevivência das linhagens selvagens, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAC* Tet^R, e linhagens exconjugantes *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cryIAC* Tet^R, sendo que cada experimento foi realizado com 10 repetições. As avaliações foram realizadas em diversos tempos, incluindo um tempo antes da morte, t₀, t₂₄ e t₄₈ horas após a morte das larvas. As análises estatísticas evidenciaram que linhagens contendo o plasmídeo pHT73-Em^R se multiplicam em uma taxa maior que linhagens contendo o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R, demonstrando que o gene *cry* confere uma vantagem nas linhagens que o abrigam. As linhagens que possuem o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R se multiplicam a uma taxa maior que linhagens que não apresentam nenhum dos dois plasmídeos estudados. Portanto, as linhagens que possuem o plasmídeo pHT73-Em^R são mais adaptadas ao ambiente larval quando comparadas às linhagens que carregam o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R ou as que não possuem nenhum dos dois plasmídeos. As linhagens que possuem o plasmídeo pHT73Δ*cryIAC* Tet^R possuem uma vantagem em relação as linhagens que não possuem nenhum dos dois plasmídeos, com isso pode-se inferir que existem outros genes plasmidiais que influenciam no comportamento de linhagens desse grupo bacteriano. Estudos posteriores poderão evidenciar se essa influência do plasmídeo pHT73 e do gene *cryIAC* sobre o comportamento de linhagens de *B. thuringiensis* é espécie específico ou se essa influência ocorre também em linhagens de *B. cereus*, além de apontar o papel desses genes e sua importância no comportamento bacteriano.

Palavras-chave: *Bacillus cereus sensu lato*. Conjugação. Plasmídeo.

3.2 INTRODUÇÃO

O grupo do *Bacillus cereus sensu lato* inclui seis espécies bacterianas destacando-se, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*. *B. thuringiensis* é uma bactéria de importância no controle biológico de insetos praga de lavoura e vetores de doenças. Sua atividade entomopatogênica é devida à ação das proteínas Cry (SCHNEPF et al., 1998), cujos genes estão, geralmente, presentes em grandes plasmídeos conjugativos. Alguns autores acreditam que a presença destes plasmídeos e, conseqüentemente, a atividade entomopatogênica, permite que linhagens de *B. thuringiensis* possam colonizar os cadáveres de diferentes espécies de insetos, sendo este, o provável nicho da bactéria no ambiente (ALY; MULLA; FEDERICI, 1985; JARRETT; STEPHENSON, 1990; TAKATSUKA; KUNIMI, 2000; THOMAS et al., 2000, 2001, 2002; SUZUKI et al., 2004; RAYMOND et al., 2010a, b).

B. cereus, assim como *B. thuringiensis*, é uma bactéria frequentemente isolada a partir de amostras ambientais, incluindo solo, água e materiais de origem vegetal e animal. No entanto, algumas linhagens de *B. cereus* causam contaminação de alimentos sendo responsáveis por eventos de intoxicação gastrointestinal, produzindo diarreias e vômitos. Além disso, linhagens de *B. cereus* tem sido apontadas como responsáveis em casos de infecções locais ou sistêmicas (CALLEGAN; GILMORE; GREGORY, 2007), o que aponta a espécie como patógeno oportunista.

B. thuringiensis e *B. cereus* compartilham um grande nível de similaridade genética e são fenotipicamente idênticas, excetuando a produção de cristais proteicos em *B. thuringiensis*. No entanto, o fato dos genes codificantes para a formação desses cristais estarem frequentemente localizados em grandes plasmídeos conjugativos, tem gerado discussões acerca da classificação como duas espécies separadas ou como uma única espécie (HELGASON et al., 2000; VILAS-BÔAS et al., 2002; CHERIF et al., 2003; VILAS-BÔAS et al., 2007), uma vez que a transferência de material genético por conjugação entre linhagens de *B. thuringiensis* e entre linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, transferindo plasmídeos carregando genes *cry*, tem sido descrita frequentemente (GONZÁLES; BROWN; CARLTON, 1982; JARRET; STEPHENSON 1990; ANDRUP; DAMGAARD; WASSERMANN, 1993; JENSEN et al., 1995; VILAS-BÔAS et al., 1998, 2000; WILCKES et al., 1998; THOMAS et al., 2000, 2001, 2002; KLIER et al., 1983; LERECLUS et al., 1983; BATTISTI; GREEN; THORNE, 1985; REDDY et al., 1987; HU et al., 2004, 2005; VAN DER AUWERA et al., 2007; YUAN et al., 2007).

Assim, uma linha de pesquisa importante, visa investigar as diferenças de comportamento entre estas espécies em diferentes tipos de ambientes como solo, cadáveres de insetos e alimentos (VILAS-BÔAS, 2000; SUZUKI, LERECLUS; ARANTES, 2004; SANTOS, 2010; RAYMOND, 2012). Em condições favoráveis os esporos de *B. thuringiensis* e *B. cereus* presentes no ambiente podem germinar, seguindo-se a formação e multiplicação das células vegetativas, troca de material genético por conjugação e posterior esporulação. No entanto, estudos têm mostrado que os esporos de *B. thuringiensis* não podem germinar em amostras de solo esterilizado (VILAS-BÔAS et al., 2000) e em ambientes aquáticos (FURLANETO et al., 2000) devido a escassez de nutrientes e oxigênio. Diversos estudos foram realizados em cadáveres de insetos para avaliar a germinação de esporos, multiplicação de células vegetativas, produção de fatores de virulência e conjugação dos plasmídeos contendo genes *cry* (JARRETT e STEPHENSON, 1990; VILAS-BÔAS et al., 1998; WILCKS et al., 2008; YUAN et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

Estudos demonstram a grande habilidade de disseminação de plasmídeos entre diferentes espécies do grupo do *B. cereus sensu lato* (JARRETT; STEPHENSON, 1990; VILAS-BOAS et al., 1998; SANTOS et al., 2010). Devido ao mecanismo de conjugação os plasmídeos podem ser considerados como uma entidade biológica autônoma, capaz de se transferir de uma célula bacteriana pra outra, assim um plasmídeo como o pHT73 de *B. thuringiensis* não poderia ser considerado específico para essa espécie bacteriana. Quando condições ambientais são desfavoráveis, a célula bacteriana pode eliminar elementos extracromossômicos e com isso obter vantagem seletiva. Dessa maneira são as trocas genéticas que fazem com que os plasmídeos sejam mantidos nas populações bacterianas.

Santos e colaboradores (2010) demonstraram que a conjugação entre linhagens de *B. thuringiensis* e *B. cereus* ocorre de maneira randômica, assim não ocorre preferência na transferência de material genético entre essas duas espécies bacterianas. No mesmo trabalho os autores evidenciaram que linhagens de *B. thuringiensis* apresentaram maior germinação de esporos e multiplicação de células vegetativas que linhagens de *B. cereus* contendo o plasmídeo com o gene *cry*. No entanto, a comparação das habilidades de germinação de esporos e multiplicação de células vegetativas de linhagens bacterianas contendo o plasmídeo com o gene *cry* com as habilidades de linhagens sem o plasmídeo, demonstrou maior eficiência no desenvolvimento nas linhagens contendo o plasmídeo. Portanto, esse estudo visa verificar se as alterações verificadas no comportamento destas linhagens são decorrentes à expressão do gene *cry* que está contido no plasmídeo ou a expressão de outro genes plasmidiais ou da interação desses genes com o cromossomo.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Linhagens utilizadas

As características fenotípicas das linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 1. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R apresenta um plasmídeo natural (pHT73-Em^R) de 75 kb, contendo o gene *cryIAc*, no qual foi inserido um gene de resistência à eritromicina (*ermC*) (VILAS-BÔAS et al., 1998). *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R contém o mesmo plasmídeo, no entanto, o gene *cryIAc* foi substituído por um gene de resistência à tetraciclina (*tetR*).

3.3.2 Características dos experimentos de conjugação

As linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R foram usadas como doadoras (Tabela 1). A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 foi empregada como receptora nos processos de conjugação. Os experimentos foram realizados com repetições variadas, sendo que valores muito discrepantes, devido a erros experimentais, foram eliminados. A presença dos plasmídeos pHT73-Em^R e pHT73Δ*cryIAc*-Tet^R nos exconjugantes foi confirmada através da produção de proteína cristal e teste de resistência.

3.3.3 Conjugação em suporte sólido

Os experimentos de conjugação em suporte sólido foram conduzidos pelo método descrito por Santos et al., (2010). As linhagens doadora e receptora foram inoculadas individualmente em 5,0 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido, com os antibióticos apropriados, e incubadas a 30 °C por 15 h. Em seguida, 0,1 mL, de cada linhagem, separadamente, foi transferido para 10 mL de meio LB pré-aquecido com antibiótico e cultivado até D.O._{600nm} ~ 1,0. Igual concentração de linhagem doadora e receptora (0,5 mL de cada linhagem) foi colocada sobre um filtro de nitrocelulose (Millipore HVLP 0,45 μM), e este colocado sobre um disco de papel de filtro depositado dentro de uma placa de Petri sem meio de cultura. Após a absorção do meio de cultivo pelo papel de filtro, a membrana de

nitrocelulose foi transferida para uma placa de Petri contendo meio LB sem antibiótico, seguindo uma incubação a 30 °C por 24 h.

As células que se multiplicaram sobre o filtro de nitrocelulose foram ressuspensas em 1,0 mL de solução salina e inoculadas em placas contendo meio LB suplementado com os antibióticos adequados. Após 24 horas foi verificado o aparecimento de colônias exconjugantes, as quais foram estocadas em banco seco e glicerol 25%, após foram armazenadas adequadamente e utilizadas nos estudos *in vivo* em larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1918, (Erebidae: Lepidoptera).

3.3.4 Produção da suspensão de esporos-cristais

Linhagens de *B. thuringiensis* estocadas em papel de filtro contendo esporos e/ou cristais foram recuperadas após imersão dos papéis em 1 ml de água destilada esterilizada seguida de breve agitação. Placas de Petri contendo meio Bacto-Peptona (BP) (LECADET et al., 1980) foram inoculadas com 0,2 ml da suspensão bacteriana, sobre o meio de cultura com alça de Drygalski.

As placas foram incubadas em estufa a 30 °C até completa esporulação, a qual foi monitorada em microscópio óptico, sendo que as lâminas contendo uma suspensão da cultura são coradas por 70 segundos com Amido Black, posteriormente são enxaguadas e coradas por 20 segundos com Fucsina (Figura 1). Após quatro dias de incubação, as placas foram ressuspensas em 1,5 mL de água destilada esterilizada.

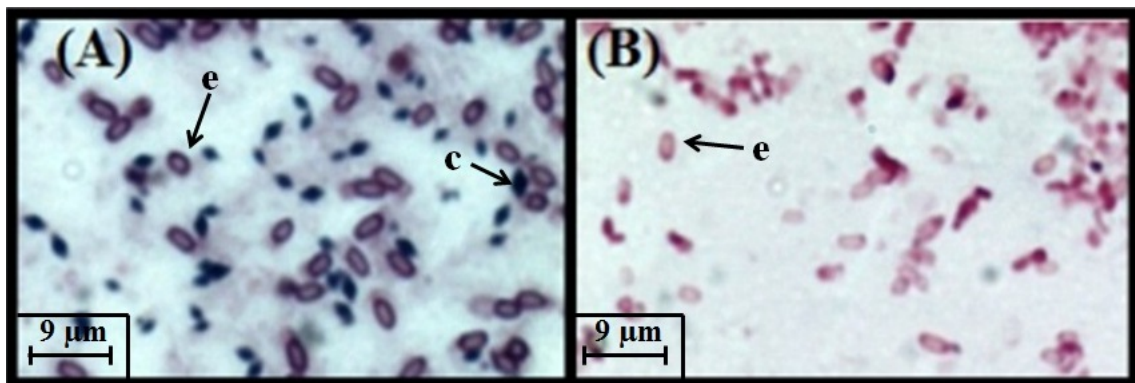


Figura 1 - Fotomicroscopia das linhagens (A) *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R evidenciando os cristais bipiramidais (c) e esporos (e) e (B) linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R, contendo apenas esporos (e). Aumento de 1000 vezes e coloração: Amido-Black e Fucsina.

3.3.5 Comportamento de linhagens de *Bacillus thuringiensis* em larvas de *A. gemmatalis*

Estudou-se o comportamento das linhagens contidas na Tabela 1 em lagartas de 3º instar de *A. gemmatalis*, criadas em dieta com tetraciclina. Os testes foram conduzidos usando seleção randômica das larvas com aproximadamente o mesmo tamanho (sexo indefinido). As lagartas foram cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-SOJA), situada na cidade de Londrina/PR, Brasil. Nos experimentos foram utilizadas culturas esporuladas de todas as linhagens. As culturas bacterianas foram tratadas com calor (80 °C, 20 minutos), visando a eliminação de células vegetativas e a persistência de esporos.

Os experimentos foram realizados em folhas de *Glycine max* (Linnaeus). As folhas foram coletadas, lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 5%, enxaguadas em água destilada e secas em papel filtro. Posteriormente, foram cortados discos foliares com um centímetro de diâmetro, os quais foram mergulhados em solução de TWEEN 0,001% e receberam uma suspensão com 10^{11} esporos das linhagens Cry⁻ de *B. thuringiensis* (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R) ou suspensão de esporos e cristais das linhagens Cry⁺ de *B. thuringiensis* (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R).

Para cada linhagem de *B. thuringiensis* citada anteriormente foram utilizadas 40 lagartas de 2º instar de *A. gemmatalis*. Os experimentos foram realizados em bandejas plásticas retangulares (42 x 19,5 cm) contendo 128 poços (Bio-Assay Tray- BIO-BA-128[®]-Pitman, NJ, USA) (Figura 2). As lagartas foram colocadas individualmente em cada poço contendo um disco de folha de soja com a suspensão de esporos ou esporos e cristais das linhagens utilizadas. As bandejas plásticas foram colocadas em estufa com temperatura controlada (25-27 °C), fotoperíodo (16/8 h claro/escuro) e com 80% de umidade relativa.

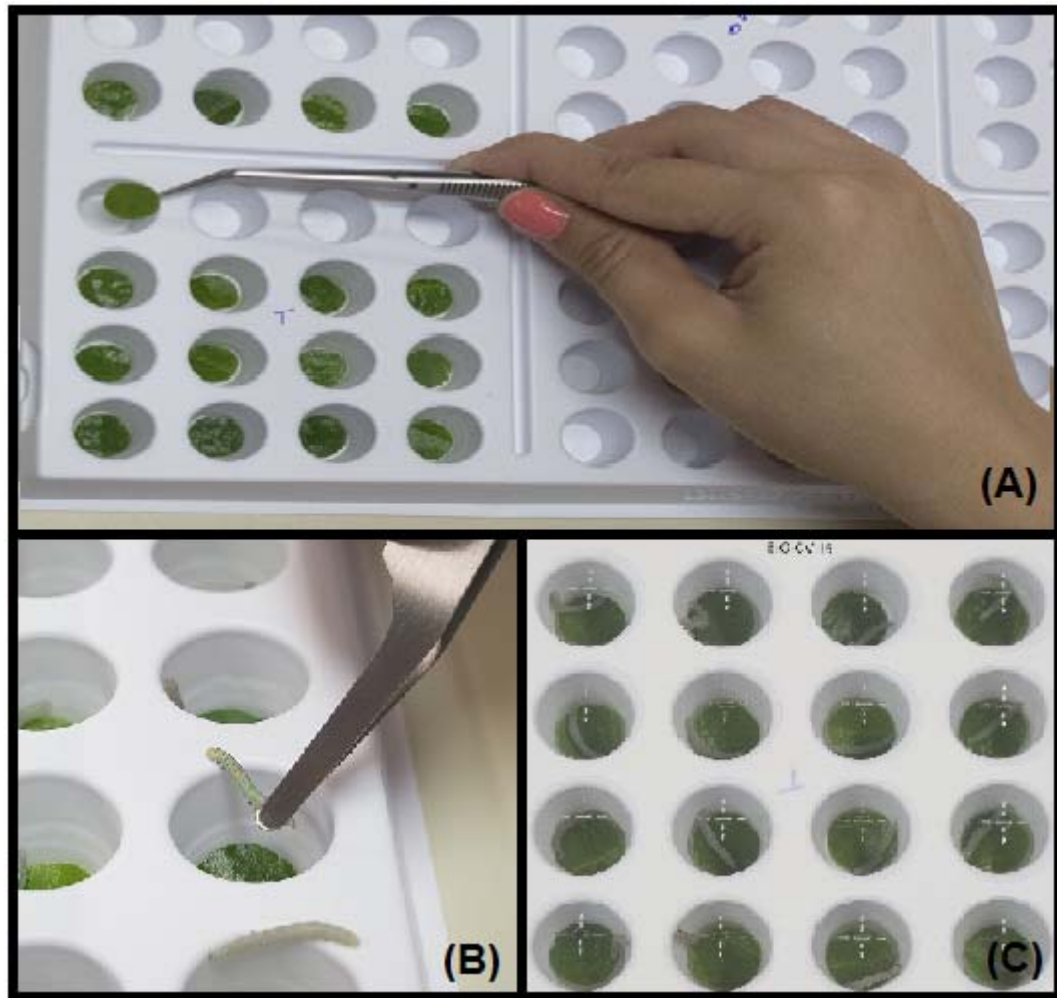


Figura 2 - Etapas de montagem do experimento. (A) Visão geral da bandeja plástica com os discos foliares; (B) Lagarta de *A. gemmatalis* sendo inserida individualmente no poço; (C) Final da montagem do experimento com a vedação da bandeja plástica com um selo adesivo a camada plástica.

Após 24 horas de incubação, um novo disco de folha de soja, sem suspensão bacteriana, foi inserido em cada poço, para permitir a oferta de alimento às lagartas por todo o experimento. Nesse momento, além de ser ofertado novo disco de folha de soja, um total de 10 lagartas foram processadas imediatamente, para cada linhagem bacteriana, visando a quantificação de células vegetativas e esporos em lagartas vivas. Esse tempo foi denominado Tempo 1, ou tempo anterior a morte das lagartas, sendo este 24 horas após o início do experimento.

Lagartas que foram alimentadas inicialmente com folhas contendo linhagens produtoras de cristais foram incubadas até a morte, ocorrida pela ação entomopatogênica da bactéria. Lagartas alimentadas inicialmente com folhas contendo linhagens sem atividade entomopatogênica (Cry^-) foram mortas mecanicamente, simultaneamente à morte das lagartas pela atividade entomopatogênica. Nesse tempo, denominado Tempo 2, ou tempo de morte das

lagartas, para cada linhagem, um lote de 10 lagartas foi processado imediatamente, e outros dois lotes de 10 lagartas foram armazenados em tubos de microcentrifuga, os quais foram incubados a 30 °C por 24 horas (Tempo 3) ou 48 horas (Tempo 4) e, então, processados.

Dessa forma, para cada linhagem, o processamento das lagartas para quantificação de células vegetativas e esporos bacterianos foi realizado em quatro lotes (Tempo 1, anterior a morte das lagartas, Tempo 2, tempo de morte das lagartas (aproximadamente 48 horas após o início do experimento), Tempo 3, 24 horas após a morte das lagartas e Tempo 4, 48 horas após a morte das lagartas), com 10 lagartas por lote, totalizando 40 lagartas.

Cada experimento foi realizado com um conjunto de linhagens. Assim, as duas linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 foram avaliadas sempre na mesma bateria experimental. Da mesma forma, os experimentos com as três linhagens *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 sempre foram realizados na mesma bateria experimental. Durante cada experimento foi realizado um controle negativo contendo 10 lagartas. Dessa forma, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73 Δ *cryIAc* Tet^R e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R, possuem 40 lagartas cada e 10 lagartas como controle negativo e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73 Δ *cryIAc* Tet^R, possuem 40 lagartas cada e 10 lagartas como controle negativo.

Para a quantificação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) e esporos bacterianos, em cada tempo, as lagartas foram maceradas em 1 mL de solução salina 0,85% em tubos de microcentrifuga de 2,0 mL, seguindo-se diluição em série em solução salina. Cada diluição foi inoculada em placas contendo meio LB suplementado com os antibióticos apropriados para cada linhagem (100 μ g mL⁻¹ de eritromicina; 200 μ g mL⁻¹ de estreptomicina e 10 μ g mL⁻¹ de tetraciclina), antes e após tratamento de calor (80 °C por 20 min). As placas foram incubadas a 30 °C por cerca de 16 horas até a formação de colônias.

3.3.6 Análise dos resultados

A análise de variância (teste de Tukey) em $p < 0,05$, realizada pelo programa Instat, foi utilizada para estabelecer se existe diferença significativa na germinação de esporos, multiplicação das células vegetativas e esporulação das linhagens de *B. thuringiensis* em larvas de *A. gemmatilis*. Para a comparação entre o comportamento das diferentes linhagens foi utilizado um modelo binomial negativo.

3.4 RESULTADOS

Foram obtidos exconjugantes da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 com duas linhagens doadoras, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT 73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73 Δ cry1Ac Tet^R, através da incubação conjunta em suporte sólido de células vegetativas de ambas linhagens. Assim, um total de 5 linhagens foi utilizado nos experimentos de estudo do comportamento das linhagens de *B. thuringiensis* em larvas de *A. gemmatalis*.

As linhagens com atividade entomopatogênica levaram o inseto à morte aproximadamente 48 horas após o início do experimento, o que foi considerado como t_0 nesse estudo. As demais avaliações foram realizadas, 24 horas após o início do experimento (tempo antes da morte) e com 24 e 48 horas após a morte do inseto (Figura 3).

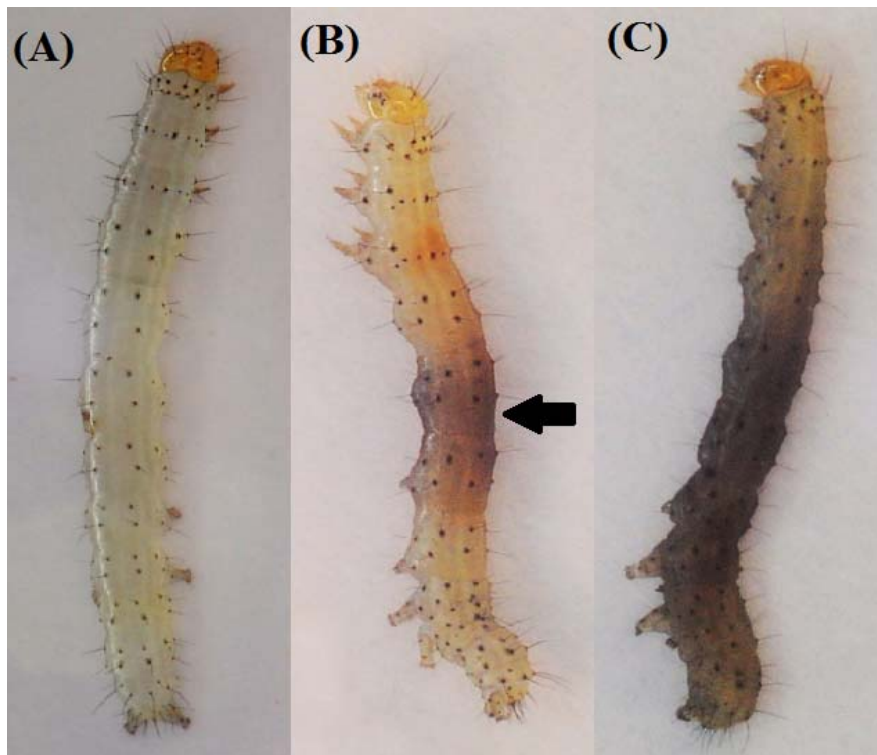
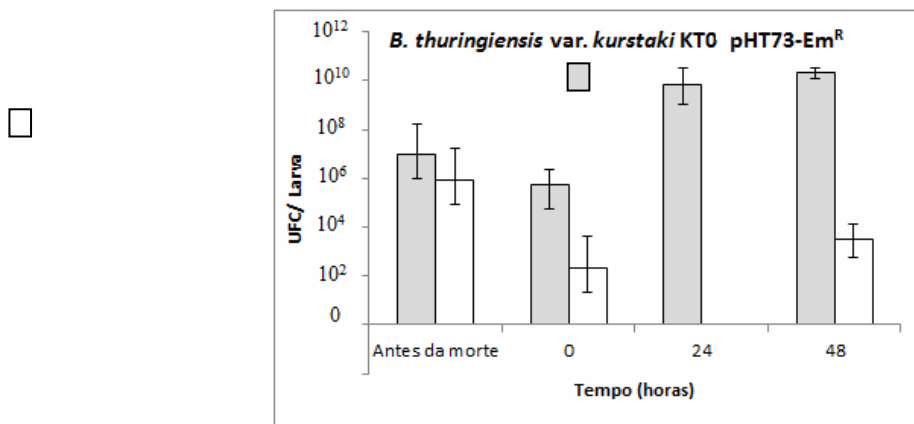


Figura 3 - Etapas de infecção pela linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e exconjugantes com o plasmídeo pHT73-Em^R em *A. gemmatalis*. (A) antes do tratamento; (B) logo após morte (t_0); (C) 12 horas após a morte (t_{12}). Seta: início da infecção de *B. thuringiensis* no intestino médio de *A. gemmatalis*.

As diversas linhagens bacterianas apresentaram diferentes comportamentos em larvas de *A. gemmatalis* (Figura 4). A linhagem selvagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R (Figura 4A) no tempo antes da morte apresentou 10^6 esporos no interior da lagarta, não ocorrendo germinação nesse tempo; a germinação ocorreu entre o t_0 e t_{24}

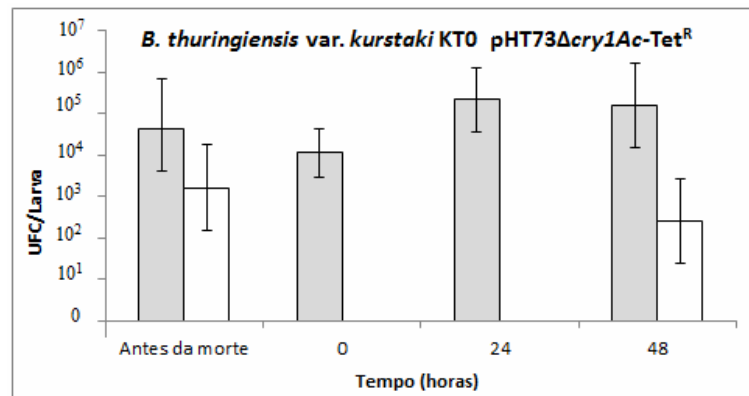
($p > 0,05$), sendo esta foi completa no t_{24} . A multiplicação das células vegetativas ocorreu entre os tempos t_0 e t_{24} ($p > 0,05$), seguindo para um início de esporulação entre os tempos t_{24} e t_{48} ($p > 0,05$).

Figura 4 - Desenvolvimento de linhagens de *B. thuringiensis* em cadáveres de *A. gemmatalis*. Somente as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R são tóxicas para as larvas. Larvas alimentadas com a suspensão contendo outras linhagens foram mortas mecanicamente. Tempos 0, 24 e 48 h representam o tempo após a morte larval. Os resultados apresentados são médias de três experimentos independentes. Barra de desvio-padrão são mostradas ($p < 0,05$). Amostras sem tratamento de calor; Amostras com tratamento de calor (80 °C por 20 min).



4 (A)

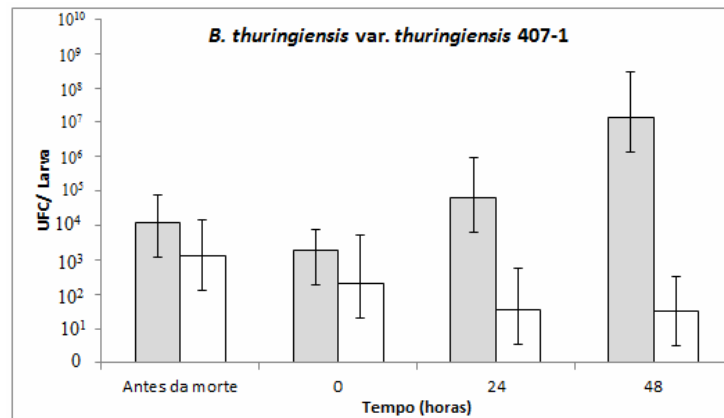
A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73 Δ *cry1Ac* Tet^R (Figura 4B) no tempo antes da morte possuía 10⁵ esporos no interior da lagarta, sem ocorrer germinação dos esporos nesse tempo. Entre os tempos antes da morte e t_0 ocorreu a germinação dos esporos ($p > 0,05$), sendo que esta foi completa no t_0 (neste tempo não encontrou-se esporos). Não ocorreu multiplicação das células vegetativas significativa em nenhum dos tempos analisados.



4 (B)

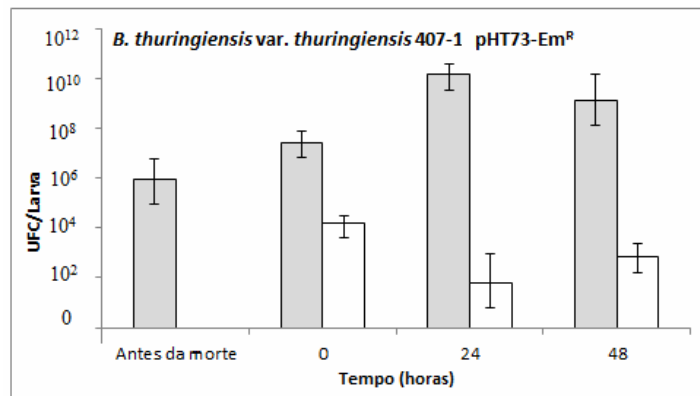
A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 (Figura 4C), não apresentou completa germinação dos esporos, a germinação parcial ocorreu entre t_0 e t_{24}

($p > 0,05$). Ocorreu multiplicação das células vegetativas entre t_{24} e t_{48} ($p > 0,05$), porém aproximadamente 10^2 das formas presentes permaneceram na forma de esporos no decorrer do experimento.

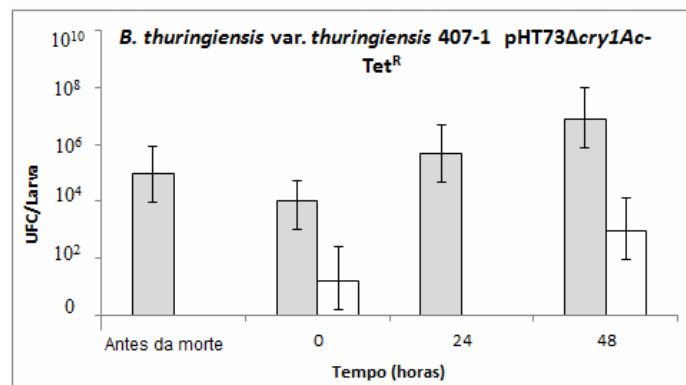


4 (C)

B. thuringiensis var. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R (Figura 4D) apresentou germinação dos esporos no tempo antes da morte, porém em t_0 ocorreu esporulação em aproximadamente 10^5 , a multiplicação da células vegetativas ocorreu entre t_0 e t_{24} ($p > 0,05$). *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73 Δ cry1Ac-Tet^R (Figura 4E) apresentou completa germinação dos esporos no tempo antes da morte, ocorreu multiplicação das células vegetativas entre t_0 e t_{48} ($p > 0,05$) e entre t_{24} e t_{48} ($p > 0,05$) ocorreu início de esporulação.



4 (D)



4 (E)

3.5 DISCUSSÃO

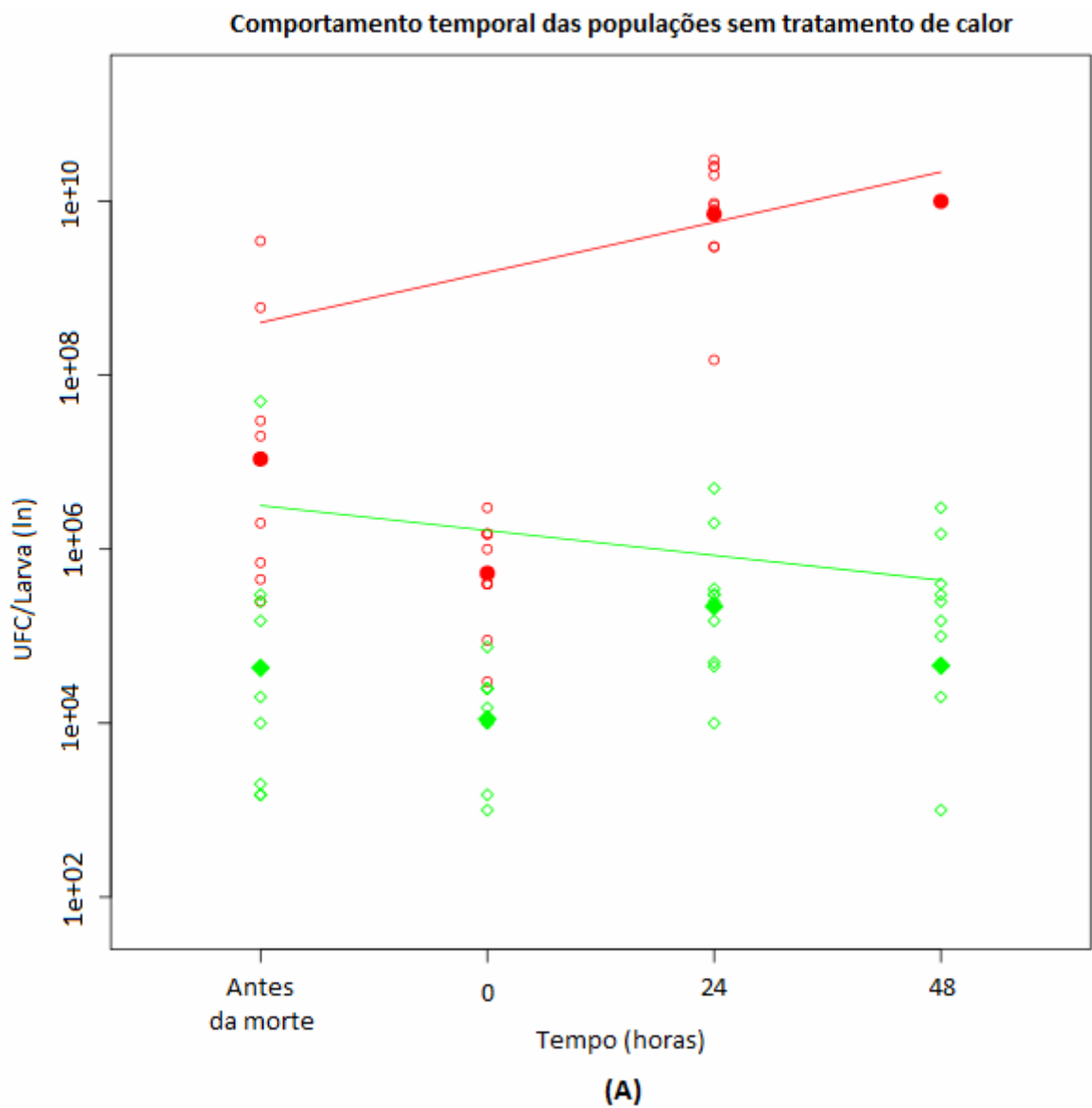
O desenvolvimento de espécies do grupo do *B. cereus sensu lato* em insetos hospedeiros tem sido estudado por muitos pesquisadores, tentando compreender o dinâmico comportamento desse grupo bacteriano (SALAMITOU et al., 2000; TAKATSUKA; KUNIMI, 2000; THOMAS et al., 2000, 2001, 2002; YUAN et al., 2007; SANTOS et al., 2010; RAYMOND et al., 2012).

A linhagem selvagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R mostrou completa germinação dos esporos no t₂₄, como descrito por Santos e colaboradores (2010) onde essa mesma linhagem provocou a morte do inseto hospedeiro e foi capaz de colonizar larvas de *B. mori*, apresentando alta multiplicação de células vegetativas. A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 contendo o mesmo plasmídeo com o gene *cry* deletado (pHT73Δ*cryI*Ac Tet^R) não conseguiu se desenvolver no interior da lagarta, apresentando somente a germinação dos esporos, não ocorrendo multiplicação das células vegetativas e posterior esporulação como a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R.

Através dos tempos citados pode-se observar a dinâmica do comportamento de linhagens de *B. thuringiensis* em larvas de insetos. Os cristais proteicos ao serem ingeridos, causaram danos na membrana epitelial do intestino larval, com isso os esporos puderam invadir a hemolinfa e então germinar; conseqüentemente pôde ocorrer multiplicação das células vegetativas. Com base nesses conceitos foram realizadas análises de contagem no tempo antes da morte das largatas, para avaliar se existe correlação entre o comportamento das linhagens e a morte do inseto, ou seja, se a germinação e/ou multiplicação das linhagens é influenciada pela morte do inseto. Através dessa análise pôde-se avaliar se a germinação ocorre em larvas de insetos antes da morte. Escolheu-se o modelo binomial negativo utilizado para comparar o comportamento das diferentes linhagens no interior do inseto hospedeiro, pois, este permite incorporar o excesso de variância nos dados experimentais.

O modelo binomial negativo permitiu a comparação entre essas duas linhagens, analisando dados anteriores ao tratamento de calor, ou seja, considerando o número total da população bacteriana. Esse modelo permitiu concluir que o ambiente larval foi mais favorável a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R no decorrer do tempo quando comparada a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryI*Ac Tet^R (Figura 5A). Verificou-se que a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R apresentou crescimento exponencial com taxa 1,3285 e a linhagem e KT0 pHT73Δ*cryI*Ac

Tet^R apresentou um crescimento menor, com taxa de 0,6598, mostrando que o crescimento da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R foi significativamente maior que o da linhagem KT0 pHT73 Δ cry1Ac Tet^R (Figura 5A).



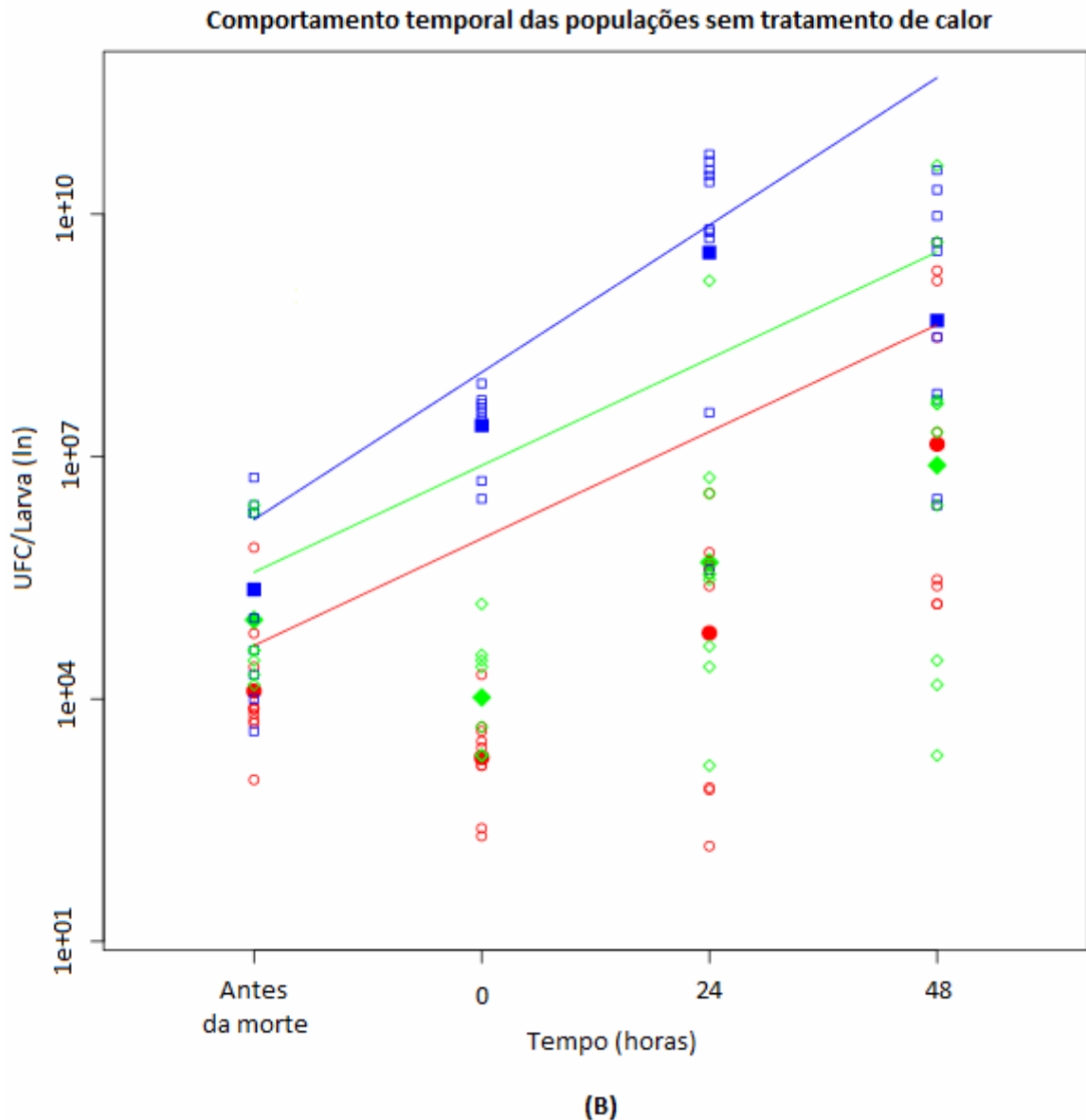


Figura 5 - Modelo de comportamento temporal de linhagens de *B. thuringiensis* em cadáveres de *A. gemmatalis*. Somente as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R são tóxicas para as larvas. Valores plotados correspondem aos anteriores ao tratamento de calor. Tempos 0, 24 e 48 representam o tempo após a morte larval. A) Valores observados; Valores médios; Linha de tendência da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73-Em^R (inclinação da reta: 1,3285); Valores observados; Valores médios; Linha de tendência da linhagem da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* KT0 pHT73Δ*cryIAC* Tet^R (inclinação da reta: -0,6598); B) Valores observados; Valores médios; Linha de tendência da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 (inclinação da reta: 3,047); Valores observados; Valores médios; Linha de tendência da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R (inclinação da reta: 4,198); Valores observados; Valores médios; Linha de tendência das médias da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cryIAC* Tet^R; (inclinação da reta: 3,043);

Para as mesmas duas linhagens testou-se o efeito do calor no t_0 , onde dados obtidos antes do tratamento de calor foram contrastados com dados obtidos posteriores ao tratamento de calor. As diferenças para ambas as linhagens foram significativas, ou seja, o calor tem efeito estatisticamente igual nas duas espécies, sendo eficaz na eliminação de células vegetativas. Verificou-se o efeito do calor no tempo antes da morte, evidenciando para ambas as espécies que não houve diferenças estatísticas, com isso pode-se concluir que a população bacteriana total encontrava-se na forma de esporos no tempo antes da morte, não ocorrendo germinação dos esporos nesse tempo.

As análises das linhagens *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73 Δ cryIAc Tet^R utilizando dados antes do calor permitiram a comparação do comportamento dessas linhagens no decorrer do tempo. As bactérias *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73 Δ cryIAc Tet^R apresentam um crescimento exponencial com taxas estatisticamente iguais (3,047 e 3,043, respectivamente) sendo que a bactéria *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R apresentou crescimento significativamente maior (4,198) (Figura 5B).

Para as mesmas três linhagens testou-se o efeito do calor no t_0 , onde dados antes do tratamento de calor foram contrastados com dados posteriores ao tratamento de calor. Com os resultados pode-se observar que o calor tem efeito mais pronunciado nas bactérias *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73 Δ cryIAc Tet^R, portanto essas linhagens possuíam um maior número de células vegetativas que a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1. Análises estatísticas testando o efeito do calor, no tempo antes da morte, verificaram que a população de esporos foi maior nas bactérias *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73 Δ cryIAc Tet^R, com isso evidencia-se que linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R possui uma quantidade maior de células vegetativas no tempo antes da morte. As diferenças para ambas as linhagens foram significativas, ou seja, o calor tem efeito estatisticamente igual nas duas espécies.

Através do experimento constatou-se que as bactérias que continham o plasmídeo pHT73-Em^R, se multiplicaram em uma taxa maior que as bactérias com o plasmídeo pHT73 Δ cryIAc Tet^R, ou aquelas que não possuíam o plasmídeo (selvagem). Portanto o plasmídeo pHT73-Em^R conferiu vantagem as bactérias que o possuíam no ambiente larval, pois este foi mais favorável a essas bactérias. A análise das bactérias *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1; *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-

Em^R e *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R, permitiu concluir que o gene *cry*, contido no plasmídeo pHT73-Em^R, também proporciona vantagem para as bactérias que o abrigam, pois a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73-Em^R multiplicou-se de maneira mais eficiente no interior do inseto do que a linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 pHT73Δ*cryIAc* Tet^R que possui o gene *cry* deletado, constatando assim a vantagem do gene *cry*. Santos e colaboradores (2010) avaliaram o comportamento da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* 407-1 selvagem, em larvas de 2º instar de *B. mori* e obtiveram multiplicação das células vegetativas em altas taxas, a linhagem exconjugante com o plasmídeo pHT73-Em^R não foi avaliada.

No entanto, estudos realizados por outros autores, como Raymond e colaboradores (2012) e Takatsuka e Kunimi, (2000), relatam que linhagens sem plasmídeos se multiplicam mais rapidamente que as linhagens com grandes plasmídeos como o pHT73-Em^R, assim as linhagens pertencentes a microbiota intestinal podem se multiplicar mais rápido e gerar uma interação antagonística, impossibilitando o desenvolvimento das linhagens com grandes plasmídeos.

Além disso, Suzuki e colaboradores (2004) concluíram que a habilidade de linhagens de *B. thuringiensis* crescerem e esporularem em cadáveres de insetos é variável. Esses autores observaram que linhagens de *B. thuringiensis* são capazes de matar o inseto, mas nem sempre se multiplicam nos cadáveres. Algumas linhagens sem especificidade para matar um hospedeiro foram capazes de se multiplicar quando estes foram mortos mecanicamente. Linhagens acristalíferas de *B. thuringiensis* var. *israelenses* mantém a habilidade para multiplicar em larvas de Diptera (SUZUKI et al., 2004). Thomas et al. (2000) descreveram o mesmo fenômeno no coleóptera *Phaedon cochleriae* com a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

Estudos posteriores poderão evidenciar se a influência do plasmídeo pHT73 e do gene *cryIAc* sobre o comportamento de linhagens de *B. thuringiensis* é espécie específico ou se a influência ocorre também em linhagens de *B. cereus*. O trabalho terá continuidade com análises de outras bactérias do Grupo do *B. cereus*, incluindo linhagens selvagens de *B. cereus sensu stricto*, contendo o plasmídeo pHT73-Em^R ou o plasmídeo pHT73Δ*cryIAc* Tet^R, para a confirmação dos resultados obtidos em linhagens de *B. thuringiensis* e uma maior amplitude do papel desses plasmídeos ou do gene *cry* nesse grupo bacteriano. Em acréscimo, os resultados obtidos também devem levar a caracterização de genes plasmídicos envolvidos no desenvolvimento de bactérias em insetos. Os resultados obtidos permitirão um aprimoramento nos conhecimentos acerca de evolução das bactérias

do grupo do *B. cereus*. No conjunto, os resultados poderão fornecer dados essenciais sobre a evolução de bactérias do grupo *B. cereus*, como a compreensão do papel de plasmídeos conjuntivos e de seus genes no comportamento de linhagens do grupo do *B. cereus* em ecossistemas naturais, como o cadáver de invertebrados.

REFERÊNCIAS

- ALY, C.; MULLA, M. S.; FEDERICI, B. A. Sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cadavers of mosquito larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 46, n. 3, p. 251–258, 1985.
- ANDRUP, L.; DAMGAARD, J.; WASSERMANN, K. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. **Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 20, p. 6530–6536, 1993.
- BATTISTI, L.; GREEN, B.; THORNE, C. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**. v. 162, n. 2, p. 543–550, 1985.
- CALLEGAN, M. C.; GILMORE, M. S.; GREGORY, M. Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interactions. **Progress in Retinal and Eye Research**. v. 26, p. 189–203, 2007.
- CHERIF, A.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; RIZZI, A.; BOUDABOUS, A.; HYAMI-HORANI, H. DAFFONCHIO, D. Genetic relationship in the “*Bacillus cereus* group” by rep-PCR fingerprint and sequencing of *Bacillus anthracis*- specific rep-PCR fragment. **Journal Applied Microbiology**. v. 94, p. 1108-1119, 2003.
- FURLANETO, L. M.; SARIDAKIS, H. O.; ARANTES, O. M. N. Survival and conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* strains in aquatic environment. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, n. 4, p. 233-238, 2000.
- GONZÁLES, J. M. Jr.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *B. thuringiensis* plasmids coding for d-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **Proceedings of the National Academic of Science**. v. 79, n. 10, p. 6951-6955, 1982.
- HELGASON, E.; ØKSTAD, P. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I.; KØLSTO, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* - One species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.
- HU, X.; HANSEN, B.M.; EILENBERG, J.; HENDRIKSEN, N. B.; SMIDT, L.; YUAN, Z.; JENSEN, G.B. Conjugal transfer, stability and expression of a plasmid encoding a *cryIAc* gene in *Bacillus cereus* group strains. **FEMS Microbiology**. v. 231, p. 45–52, 2004.
- JARRETT, P.; STEPHENSON, M. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 1608–1614, 1990.
- JENSEN, G.B.; WILCKES, A.; PETERSEN, S. S.; DAMGAARD, J.; BAUM, J.A.; ANDRUP, L. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. **Journal Bacteriology**. v. 177, p. 2914–2917, 1995.

KLIER, A.; BOURGOUIN, C.; RAPOPORT, G. Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes. **Molecular and General Genetics**, v. 191, p. 257-262, 1983.

LERECLUS, D.; MENOUE, G.; LECADET, M. M. Isolation of a DNA sequence related to several plasmids from *B. thuringiensis* after a mating involving the *Streptococcus faecalis* plasmid pAMb1. **Molecular Genetics e Genomics**. v. 191, p. 307–313, 1983.

RAYMOND, B.; WYRES, K. L.; SHEPPARD, S. K.; ELLIS, R. E.; BONSALL, M. B. Environmental Factors Determining the Epidemiology and Population Genetic Structure of the *Bacillus cereus* Group in the Field. **PLoS Pathogens**. v. 26, n. 6(5), e1000905, 2010a.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**. v. 18, n. 5, p. 183-232, 2010b.

RAYMOND, B.; WEST, S. A.; GRIFFIN, A. S.; BONSALL, M. B. The Dynamics of Cooperative Bacterial Virulence in the Field. **Science**. v. 337, n. 6090, p. 85-88, 2012.

REDDY, A.; BATTIST, L.; THORNE, C.B. Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. **Journal Bacteriology**. v. 169, p. 5263–5270, 1987.

SALAMITOU, S.; RAMISSE, F.; BREHÉLIN, M.; BOURGUET, D.; GILOIS, N.; GOMINET, M.; HERNANDEZ, E.; LERECLUS, D. The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**. v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.

SANTOS, C.; VILAS-BÔAS, G. T.; LERECLUS, D.; SUZUKI, M. T.; ANGELO, E. A.; ARANTES, O. M. N. Conjugal transfer between *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* strains is not directly correlated with growth of recipient strains. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 105, n. 2, p.171–175, 2010.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *B. thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SUZUKI, M. T.; LERECLUS, D. ARANTES, O. M. Fate os *B. thuringiensis* strains in different insect larvae. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 50, n. 11, p. 973-975, 2004.

TAKATSUKA, J.; KUNIMI, Y. Intestinal bacteria affect growth of *Bacillus thuringiensis* in larvae of the oriental tea tortrix, *Homona magnanima* diakonoff (Lepidoptera: tortricidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 73, n.3, p. 222-226, 2000.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 118–124, 2000.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies. *israelensis* strains in laboratory

culture, river water, and dipteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 330–338, 2001.

THOMAS, D. J. I.; MORGAN, J. A. W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Transfer of plasmid pBC16 between *Bacillus thuringiensis* strains in non-susceptible larval. **FEMS Microbiology**. v. 40, p.181–190, 2002.

VAN DER AUWERA, G.A.; TIMMERY, S.; HOTON, F.; MAHILLON, J. Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p. 164–172, 2007.

VILAS-BÔAS, G. F. L. T.; VILAS-BÔAS, L. A.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. **FEMS Microbiology**. v. 25, p. 369–374, 1998.

VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T.; SARIDAKIS, H. O.; LEMOS, M.V.F.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. **FEMS Microbiology Ecology**, v.31, n. 3, p.255-259, 2000.

VILAS-BÔAS, G.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; LEMOS, M.; BOURGUET, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p. 1414–1424, 2002.

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. 6, p. 673-687, 2007.

WILCKS, A.; JAYASWAL, N.; LERECLUS, D.; ANDRUP, L. Characterization of plasmid pAW63, a second self-transmissible plasmid in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73. **Microbiology**. v. 144, p. 1263–1270, 1998.

WILCKS, A.; SMIDT, L.; BAHL, M. I.; HANSEN, B. M.; ANDRUP, L.; HENDRIKSEN, N. B.; LICHT, T. R. Germination and conjugation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the intestine of gnotobiotic rats. **Journal Applied of Microbiology**. v. 104, n. 5, p. 1252–1259, 2008.

YUAN, Y. M.; HU, X. M.; LIU, H. Z.; HANSEN, B. M.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Kinetics of plasmid transfer among *Bacillus cereus* group strains within lepidopteran larvae. **Archives of Microbiology**. v. 187, n. 6, p. 425–431, 2007.

ANEXO

ANEXO A

Tabela 1. Propriedades das linhagens empregadas neste estudo.

Linhagens	Características	Fonte
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KT0 pHT73-Em ^R ¹	Doadora, Cry ⁺ , Em ^R	a
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> KT0 pHT73Δ <i>cryIAc</i> Tet ^R ¹	Doadora, Cry ⁻ , Tet ^R	b
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> 407-1 ²	Receptora, Cry ⁻ , Pig ⁺ , Sm ^R	c
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> 407-1 pHT73-Em ^R ³	Exconjugante, Cry ⁺ , Pig ⁺ , Em ^R	c
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i> 407-1 pHT73Δ <i>cryIAc</i> Tet ^R ³	Exconjugante, Cry ⁻ , Pig ⁺ , Tet ^R	b

Cry⁺: produtora de cristal entomopatogênico; Cry⁻: não produtora de cristal entomopatogênico; Pig⁺: produtora de um pigmento marrom; ¹ Linhagem doadora; ² Linhagem receptora; ³ Linhagem exconjugante; Em^R: resistente a eritromicina; Sm^R: resistente a estreptomicina; Tet^R: resistente a tetraciclina.

a Vilas-Bôas, et al. 1998.

b Esse estudo.

c Santos, et al., 2010.