



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KELLY CHRISTIANE CONSTANSKI SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES *CRY* E *VIP* DO ISOLADO
BACILLUS THURINGIENSIS BR37 POR
SEQUENCIAMENTO GENÔMICO**

Londrina
2015

KELLY CHRISTIANE CONSTANSKI SILVA

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES *CRY* E *VIP* DO ISOLADO
BACILLUS THURINGIENSIS BR37 POR SEQUENCIAMENTO
GENÔMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Pedro M.O. Janeiro Neves.

Co-Orientadora: Prof. Dra. Gislayne T. Vilas-Bôas.

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586i Silva, Kelly Christiane Constanski.
Identificação de genes *cry* e *vip* do isolado *Bacillus thuringiensis* BR37 por
sequenciamento genômico / Kelly Christiane Constanski Silva. – Londrina, 2015.
57 f. : il.

Orientador: Pedro Manuel Oliveira Janeiro Neves.

Coorientador: Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Boas.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Inseticidas biológicos – Teses. 2. *Bacillus thuringiensis* – Teses. 3. Bactérias
– Genética – Teses. 4. Proteínas microbianas – Teses. 5. Inseto – Controle biológico
– Teses. I. Neves, Pedro Manuel Oliveira Janeiro. II. Vilas-Boas, Gislayne Fernandes
Lemes Trindade. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 632.937

KELLY CHRISTIANE CONSTANSKI SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE GENES *CRY* E *VIP* DO ISOLADO *BACILLUS THURINGIENSIS* BR37 POR SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Pedro M. Oliveira Janeiro
Neves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Dra. Patricia Helena Santoro
Instituto Agrônômico do Paraná - IAPAR

Profa. Dra. Viviane Sandra Alves
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Prof. Dr. Mauricio Ursi ventura
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Michele Potrich
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Dr. André Luiz de L. Passianotto
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Prof. Dr. Amarildo Pasini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de julho de 2015.

*A minha grande e eterna amiga
Juliana da Silva Mayer (In memorian)*

*“How I wish, how I wish you were here
We're just two lost souls
Swimming in a fish bowl,
Year after year,
Running over the same old ground.
What have we found?
The same old fears
Wish you were here”
(Pink Floyd)*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por conseguir cumprir mais esta etapa da minha vida, além de me dar forças para seguir em frente;

Aos meus pais João Carlos e Maristela pelo amor incondicional e aos meus irmãos Rodrigo e Kamila por representarem em minha vida a verdadeira essência do amor;

Ao meu querido, Mateus Jonsson de Almeida, por estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por dividir comigo todas as dificuldades e incertezas durante esse período. Sua alegria, amor e compreensão foram imprescindíveis. Amo você.

As minhas lindezas Amora e Valentina por todo carinho e amor que recebo e por deixar meus dias mais felizes. Animais são anjos disfarçados, e vivem na terra para ensinar ao homem, o verdadeiro sentido de amor e fidelidade.

A minha família Vó Cila, Vó Estela, meus tios e primos os quais tornam minha vida mais especial e completa;

Ao meu orientador Professor Dr. Pedro M. O. J. Neves gostaria de agradecer por esses sete anos de convivência e trabalho. Esta é a oportunidade para manifestar minha imensa admiração e expressar os meus mais sinceros agradecimentos;

A minha co-orientadora Professora Dra. Gislayne Trindade Vilas-Bôas e ao Professor Dr. Laurival Vilas-Bôas, sempre disponíveis, agradeço pelas sugestões sempre enriquecedoras e por toda ajuda na realização desse trabalho e acima de tudo pela amizade oferecida ao longo desses anos;

A banca examinadora Dra. Patricia Helena Santoro, Dr. Mauricio Ventura, Dra. Viviane Alves, Dra. Michele Potrich, Dr. Amarildo Pasini e Dr. André Passianotto, por fazerem parte da Banca e conseqüentemente enriquecer este trabalho;

As minhas grandes amigas, Janaína Zorzetti e Ana Paula Scaramal Ricietto por toda a ajuda na realização deste trabalho, por todas as brincadeiras, risadas e, acima de tudo pela amizade construída ao longo desses anos de convivência. Agradeço a Deus por colocar vocês em minha vida.

As minhas amigas-irmãs Marieni Bramé, Livia Nogueira, Rafaela Vaz e Aline Pomari por estarem presentes quando eu mais precisei. Por terem sempre uma palavra amiga, um puxão de orelhas, ou até mesmo por aquele simples olhar. Na vida uma das coisas que mais importa é poder ter alguém para chamar de amigo.

Aos amigos que encontrei no laboratório de Genética, André Barbosa, Fernanda Fazon, Josiane Scarpasa, Priscila Cardoso, Amanda Lunardeli e Fernanda Henrique, obrigada pelos momentos de descontração, pelos desabafos, e por toda a ajuda, é muito bom e importante ter pessoas como vocês;

Aos amigos e companheiros de jornada do Laboratório de Entomologia, Talita Alexandre, Junio Tavares, Adriane Mikami, Camila Marques, Davi Tramontina, Mateus Gimenez, Adriano Hoshino e Viviane Dutra. Obrigada pela amizade e conforto nas horas difíceis.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina por todo conhecido transmitido;

A secretária Weda Westin pela amizade e por toda ajuda ao longo desses oito anos de convivência;

A Universidade Estadual de Londrina por todo o apoio no desenvolvimento deste trabalho;

A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado;

Meu muito obrigada a todos que sempre fizeram com que os momentos de incerteza e dificuldade se tornassem menos significantes e os momentos felizes, mais intensos.

Silva, Kelly Christiane Constanski. **Identificação de genes *cry* e *vip* do isolado *Bacillus thuringiensis* BR37 por sequenciamento genômico.** 2015. 62f. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

RESUMO

Uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos é o uso de produtos biológicos como a bactéria *B. thuringiensis* caracterizada pela produção de proteínas tóxicas a diversas ordens de insetos, as quais são codificadas por genes *cry*, *vip* e *cyt*. Este trabalho teve o objetivo de caracterizar molecularmente e sequenciar o isolado BR37, que, em testes anteriores apresentou atividade tóxica frente às espécies da ordem Lepidoptera. Amostras de DNA desse isolado foram usadas para reações de amplificação por PCR, visando à identificação dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1*, utilizando iniciadores específicos. Foi possível através dessa técnica identificar a presença dos genes *cry1* e *cry2*. O perfil proteico dos cristais desse isolado foi determinado por SDS-PAGE, onde verificado massas moleculares correspondentes a proteínas de 65 e 130 kDa correspondentes aos genes *cry1* e *cry2* respectivamente. Em microscopia eletrônica de varredura foi possível verificar cristais esféricos e bipiramidais, os quais podem estar relacionados à toxicidade a insetos da Ordem Lepidoptera e Coleoptera. O sequenciamento do DNA genômico foi realizado pela plataforma *Ion Torrent*, e as sequências obtidas foram analisadas, filtrando as leituras de baixa qualidade, visando a identificação de sequências correspondentes aos genes *cry*, *vip* e *cyt* de referência depositados no banco de dados GeneBank. Através do sequenciamento foi possível obter as subclasses para os genes identificados em PCR: *cry1Aa16*, *cry1Ab15*, *cry1Ad1*, *cry1Ca9*, *cry1Da3*, *cry1Eb1*, *cry1Fa1*, *cry2Aa13* e também um gene ainda não identificado o *vip3Ca2*. O isolado BR37 apresenta potencial para ser utilizado como fonte de genes *cry* e *vip* no desenvolvimento de bioinseticidas e plantas geneticamente modificadas.

Palavras-chave: *Ion torrent*, genes *vipCa2*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*.

Silva, Kelly Christiane Constanski. Identification of genes *cry* and *vip* isolated *Bacillus thuringiensis* BR 37 genomic sequencing. 2015. 62f. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2015.

ABSTRACT

As an alternative insecticides of use synthetics and the use of biological products as the bacteria *Bacillus thuringiensis* characterized by the production of toxic proteins one insects several orders, as what are encoded by genes *cry*, *vip* and *cyt*. This study aimed to characterize molecular and sequence the BR37 isolated, which, in previous testes showed toxic front activity at species of lepidoptera order. DNA samples that were used isolated by PCR amplification reactions, in order to identify the genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4a*, *cry4b* *cry10*, *cry11* and *cyt1* using specific primers. It was through this technique can identify a presence of *cry1* and *cry2*. The protein profile of this isolated crystals was determined by sds-page, where checked molecular masses corresponding to 65 protein 130 kDa corresponding to genes *cry1* and *cry2* respectivamente. Scanning electron microscopy was possible confirm spherical crystals and bipiramidal, which may be related to the toxicity of one insects order Lepidoptera and Coleoptera. The sequencing of genomic dna was carried out by ion torrent platform, and as sequences obtained were analyzed by filtering as low readings quality, aiming to corresponding sequences identify genes aos *cry*, *vip* and *cit* of reference deposited in genbank database. Get through do sequencing was possible as genes os subclasses identified for PCR: *cry1Aa16*, *cry1Ab15*, *cry1Ad1*, *cry1Ca9*, *cry1Da3*, *cry1Eb1*, *cry1Fa1*, *cry2Aa13* and also not a gene identified *vip3Ca2*. The BR37 isolated has potential for use as a source of genes *cry* and not *vip*.

Key words: *Ion torrent*, *Vip3Ca2*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura tridimensional da proteína Cry1Aa com os três domínios	15
Figura 2 -	Ion 314™ Chip	28
Figura 3 -	Sequenciamento no Ion Chip	30
Figura 4 -	Amplificação do fragmento inicial do gene cry1 e cry2	38
Figura 5 -	Gel de SDS-PAGE	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes, iniciadores gerais e específicos de <i>B. thuringiensis</i> , tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR, sequência de nucleotídeos, condições de amplificação e fontes	34
Tabela 2 -	Genes cry e vip. Sequências consensos comparadas com o banco de dados do NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/486	46

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
G	Unidade de força centrífuga
kDa	Quilo Dalton
Mg	Miligrama
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ng	Nanograma
Rpm	Rotações por minuto
S	Segundos
µg	Micrograma

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	11
2.1.2. ASPECTOS GERAIS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	12
2.1.3 GENES <i>CRY</i>	13
2.1.4 PROTEÍNAS <i>CRY</i>	14
2.1.5 MODO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS <i>CRY</i>	16
2.1.6 PROTEÍNAS <i>VIP</i>	18
2.2 ISOLADO BR37 DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	20
2.3 UTILIZAÇÃO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> NA AGRICULTURA.	21
2.3.1 BIOINSETICIDAS E PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS.....	21
2.4 SEQUENCIAMENTO GENOMICO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	24
2.5 SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO	26
2.6 PLATAFORMA ION TORRENTE (PGM).....	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	31
3.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 BACTÉRIA.....	32
4.1.2 EXTRAÇÃO DE DNA DO ISOLADO BR37 E CONDIÇÕES DE PCR.....	32
4.1.3 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS <i>CRY</i> ATRAVES DE SDS PAGE.....	35
4.1.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO ISOLADO BR37 DE <i>B. THURINGIENSIS</i>	35
4.1.5 SEQUENCIAMENTO DO ISOLADO BR37 DE <i>B. THURINGIENSIS</i>	36
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	38
CONCLUSÕES	47
LITERATURA CITADA	48

1 INTRODUÇÃO

Alternativas ao controle químico, como o controle biológico por meio de uso de micro-organismo vêm assumindo uma posição de destaque ao longo dos anos no controle de insetos. A disponibilidade de organismos com atividade entomopatogênica é muito ampla fornecendo uma grande variedade de matéria prima para o desenvolvimento de novos produtos com maior toxicidade e espectro de ação (Perlack, 1990, Moscardi, 2008).

Dentre os bioinseticidas mais utilizados, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*, como um agente favorável e seguro para o controle de insetos, por ser específico e não apresentar atividade tóxica a mamíferos bem como não causar problemas de contaminação ambiental e dos alimentos (SCHNEPF et al., 1998). Essa atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* é devida principalmente à presença de inclusões protéicas denominadas proteínas Cry. Estas inclusões cristalinas podem apresentar atividade tóxica para diversas ordens de insetos como Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, para alguns nematoides, ácaros e protozoários (SCHNEPF et al., 1998).

No final dos anos 1980, foi possível também a inserção de genes codificadores para diferentes proteínas Cry, formando as chamadas plantas Bt. Essas plantas, que expressam proteínas Cry em folhas e estruturas de frutificação, por exemplo, apresentam atividade de controle para insetos desfolhadores e destruidores de órgãos frutíferos, tornando possível o controle de insetos sensíveis às toxinas Cry sem a aplicação de inseticidas químicos (CAPALBO et al., 2008).

Atualmente já foram clonados e sequenciados 743 genes *cry*, classificados em

73 grupos de proteínas Cry com diferentes subdivisões (Cry1 a Cry73). A classificação de novas proteínas ocorre em função do grau de identidade dos aminoácidos. Devido à constante descoberta de proteínas, o número de genes *cry* aumenta a cada ano, e periodicamente, a classificação e a nomenclatura das proteínas Cry são atualizadas em um banco de dados http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

Uma mudança na metodologia para encontrar novos genes surgiu na detecção “não óptica” das sequências de DNA com a plataforma *Ion Torrent* PGM (ROTHBERG et al., 2011). A simplicidade, escalabilidade e redução de custos e tempo para geração de uma sequência tem permitido o sequenciamento massivo de materiais genéticos extraídos de vários ecossistemas.

Esse fato estimula a busca por novos genes que expressem proteínas tóxicas que possam vir a controlar de forma eficiente vários insetos, expandindo a utilização desta bactéria para pragas de importância agrícola, diminuindo assim os prejuízos causados ao meio ambiente com a utilização de inseticidas sintéticos.

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo caracterizar e sequenciar o isolado BR37 de *B. thuringiensis* que apresenta elevada atividade tóxica contra insetos de grande importância para o país, e disponibilizar as informações para posteriores aplicações biotecnológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis foi descrito pela primeira vez em 1911 por Ernst Berliner na Alemanha. A bactéria foi isolada a partir de larvas da traça da farinha, *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000; ROH et al., 2007). Berliner chamou-a de *Bacillus thuringiensis* e reportou a existência de cristais, mas a atividade destes ainda era desconhecida. Porém, esse não foi o primeiro relato de doenças causadas em insetos por *B. thuringiensis*, o registro data 1901, quando Ishiwata isolou essa bactéria em *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae).

Em 1938, uma formulação à base dessa bactéria foi comercializada na França sob o nome de Sporeine (GLARE & O'CALLAGHAN, 2000; ROH et al., 2007). Na década de 60, foi isolada uma linhagem de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (DULMAGE, 1970) com toxicidade até 200 vezes superior às linhagens já conhecidas para produtos comerciais (GOLDBERG & MARGALIT, 1977). Essa descoberta aumentou o interesse na busca por novas toxinas ativas contra outras ordens de insetos.

Esse micro-organismo é o principal agente de controle biológico de insetos, e esse impulso se deve a descobertas de novos isolados de Bt que apresentam um variado espectro de ação, controlando insetos de várias ordens como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera (MELO & AZEVEDO, 1998). E, também, subespécies de Bt que apresentam cristais tóxicos contra insetos das Ordens Himenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Phthiraphera e também para alguns nematoides, protozoários e ácaros (SCHNEPF et al., 1998; GLARE & O'CALLAGHAN 2000; BRAR et al., 2006).

Com o avanço da biologia molecular e novas tecnologias aplicadas à

transformação genética de plantas, os estudos se voltaram para a busca de genes que codificam as proteínas entomopatogênicas de *B. thuringiensis* visando à construção de plantas resistentes a pragas. O primeiro registro de plantas transgênicas que expressavam toxinas Bt foi em 1987 com plantas de tabaco e tomate, e, em 1995, nos Estados Unidos foi realizada a primeira plantação comercial de milho geneticamente modificado (USEPA, 1999).

A utilização de *B. thuringiensis* no controle biológico de pragas, tanto como bioinseticida ou em plantas geneticamente modificadas, é vista com grandes perspectivas em relação aos inúmeros benefícios proporcionados pela utilização dessa bactéria.

2.1.2 Aspectos gerais de *Bacillus thuringiensis*

Trata-se de uma bactéria que ocorre naturalmente em diversos ambientes, como solos, água, superfície de plantas, insetos mortos e seus habitats, teias de aranha e em grãos armazenados (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004). Gram positiva, aeróbia facultativa, da família Bacillaceae que produz no momento de sua esporulação inclusões protéicas cristalinas. Essas inclusões proteicas são compostas por proteínas, conhecidas como δ -endotoxinas ou proteínas Cry (ARANDA et al., 1996; MONNERAT & BRAVO, 2000).

Entretanto, a patogenicidade do Bt também é atribuída a outros fatores de virulência como hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases, α -exotoxina, β -exotoxina e o próprio esporo (BRAVO et al., 1998; VILAS-BÔAS et al., 2007; VIDAL-QUIST et al., 2009), proteínas VIP, que são secretadas na fase vegetativa e tem atividade contra insetos da ordem lepidoptera e coleoptera (ESTRUCH et al., 1996) e proteínas Cyt (SCHNEPF et al., 1998). Além disso, a ação sinérgica dos esporos

produzidos pelas proteínas pode contribuir para a toxicidade apresentada pelos cristais (BRAVO et al., 1998; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

O cristal inseticida dessa bactéria pode conter um tipo ou vários tipos de proteínas Cry. Isso ocorre pelo fato de existir uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou cópias de diferentes genes, que formarão um mesmo cristal misto (LERECLUS et al., 1993), onde podem ser encontrados até sete genes *cry* em um mesmo isolado de *B. thuringiensis* (MARTINEZ & CABALERRO, 2002). Muitos desses genes ainda são desconhecidos, sendo necessário identificar o seu conteúdo e seu potencial a fim de utilizá-los como alternativa no controle de insetos (SUN et al., 2008).

A identificação de novos tipos e subtipos de genes contidos numa nova linhagem é realizada, inicialmente, por bioensaios e pela técnica de PCR. Essa técnica conta com mais de 80 iniciadores desenvolvidos para identificar grupos e genes *cry* individuais (SONG et al., 2003). Assim, a identificação dos genes *cry* de isolados de *B. thuringiensis* é vista como um dos passos iniciais e mais importantes para a escolha de um isolado para que possa ser empregado em programas de controle de insetos.

2.1.3 Genes *cry*

Os genes *cry* geralmente estão localizados em plasmídios conjugativos de alto peso molecular ocorrendo, eventualmente no cromossomo ou em ambos, entretanto ainda não foi esclarecido se os genes presentes nos cromossomos contribuem para a formação da inclusão proteica (SCHNEPF et al., 1998). Estes genes apresentam mobilidade devido a associação com sequências de inserção (IS) e transposons (MAHILLON et al., 1994) e somado ao fato desses genes estarem presentes,

preferencialmente, em plasmídios conjugativos pode explicar a diversidade destes genes e as diferentes combinações deles, o que resulta em cristais proteicos com diferentes tipos de proteínas Cry e com perfis de toxicidade distintos (ARANTES et al., 2002; PÉREZ, 2004; PIGOTT & ELLAR, 2007).

A descoberta de novos genes *cry* com amplo espectro de ação é de extrema importância para o desenvolvimento de novos bioinseticidas e plantas geneticamente modificadas reduzindo a probabilidade dos insetos alvo desenvolverem resistência (BETZ et al., 2000; BOBROWSKI et al., 2001).

2.1.4 Proteínas Cry

O cristal proteico existente no protoplasma celular de *B. thuringiensis* foi descoberto em 1953 por Hannay (BRAVO et al., 2007). Estes cristais são responsáveis pela caracterização do Bt e tem como principais constituintes as proteínas Cry e Cyt, codificadas por genes que podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (GONZÁLES et al., 1982; SANCHIS et al., 1998). O acúmulo dessas proteínas forma um corpo de inclusão cristalina, por isso são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000). De acordo com a definição mais aceita, uma proteína é considerada Cry, quando forma uma inclusão parasporal (cristal), exibe algum grau de toxicidade a insetos alvos, ou apresente sequência de aminoácidos similar a uma proteína Cry já descrita (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007; SCHNEPF et al., 1998).

A maior parte das proteínas que compõem as inclusões proteicas é sintetizada durante a fase de esporulação, sendo a transcrição da maioria dos genes *cry* dependente de fator sigma específico desta fase. Uma pequena parte, no entanto, é expressa também durante o crescimento vegetativo. Independente da expressão de genes *cry* ocorrer na

esporulação ou na fase vegetativa a proteína Cry é fruto do metabolismo secundário (ARANTES et al., 2002), sendo liberadas somente no momento em que as células são lisadas (MONNERAT & BRAVO, 2000).

O cristal proteico pode apresentar vários formatos, como, bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico ou ainda, sem forma definida (HABIB & ANDRADE, 1998). E o peso molecular das proteínas Cry pode variar entre 30 e 140 kDa, cujas estruturas tem duas porções compostas por protoxinas: uma região amino-terminal variável que está associada a toxicidade da proteína e uma região carboxi-terminal conservada que se associa à formação das inclusões proteicas (BRAVO et al., 2007).

A estrutura tridimensional da proteína Cry (Figura 1) é formada por três domínios I, II e III. A porção amino-terminal domínio I, é formada por cadeias polipeptídicas compostas por sete α -hélice antiparalelas, sendo uma central e hidrofóbica ($\alpha 5$) e outras seis cadeias anfipáticas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$). Este domínio é responsável pela inserção na membrana e formação do poro. O domínio II da porção amino-terminal é composto por três folhas β -pregueadas e duas α -hélices curtas, enquanto o domínio III da porção carboxi-terminal apresenta estrutura tipo β -sanduíche que confere a especificidade de ligação aos receptores celulares bem como o domínio II e a estabilidade estrutural da proteína, protegendo-a de degradação durante a proteólise (DE MAAGD et al., 2001; ARANTES et al., 2002; BRAVO et al., 2007; ROH et al., 2007)

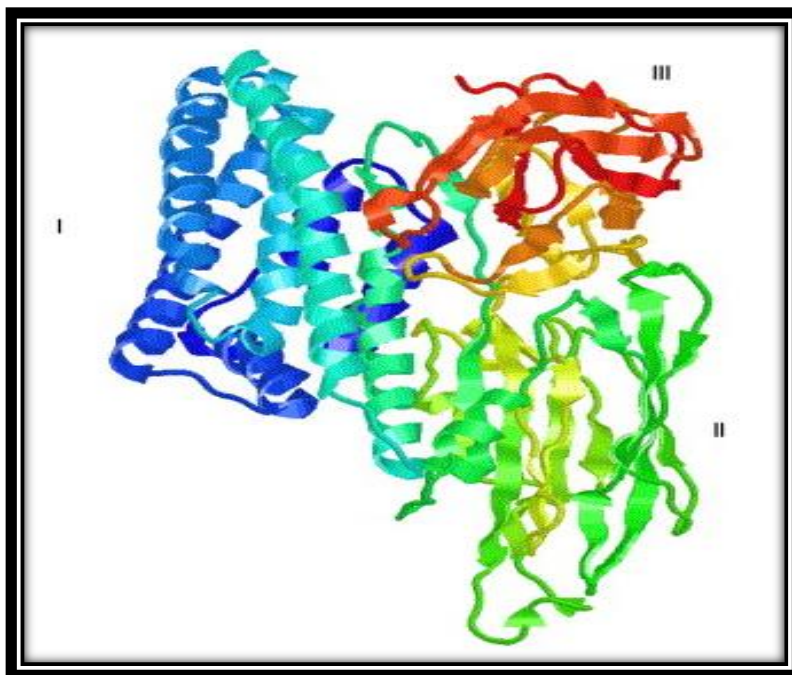


Figura 1 – Estrutura tridimensional da proteína Cry1Aa com os três domínios (De MAAGD et al., 2003).

As deltas-endoxinas são classificadas em vários grupos de proteínas Cry. Essa classificação é baseada na identidade dos aminoácidos (CRICKMORE et al., 1998). Atualmente são descritas mais de 743 proteínas Cry classificadas em 72 classes com subdivisões (Cry1 a Cry72). As atualizações podem ser acompanhadas pelo site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt.

A classificação apresenta quatro estágios hierárquicos em decorrência do local que as sequências ocupam em uma árvore filogenética (CRICKMORE et al., 1998; DE MAAGD et al., 2001). Na primeira etapa da classificação as sequências recebem um número e quando a similaridade genética é inferior a 45%, esse número se difere (Cry1, Cry2... Cry73). Na etapa seguinte, quando a similaridade é de até 78%, as sequências recebem uma letra maiúscula (Cry1A, Cry1B, Cry1C...Cry1N) que representa a classe a qual pertencem. Na terceira etapa, quando a similaridade é superior a 95%, as sequências recebem uma letra minúscula (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac...Cry1Ai) referente a sua subclasse. Na última etapa são atribuídos números de identificação (Cry1Aa1,

Cry1Aa2... Cry1Aa24) de acordo com a ordem em que essas sequências são depositadas no banco de dados.

2.1.5 Modo de ação das proteínas Cry

Frequentemente, o gene *cry* presente em um isolado correlaciona a especificidade da proteína Cry produzida. Mas a patogenicidade e a especificidade de uma linhagem é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que elas possuem.

As análises dos modos de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* visam elucidar os mecanismos pelos quais estas exercem seu efeito entomopatogênico além de mostrar a especificidade das diferentes toxinas (SCHNEPF ET al., 1998; FIUZA, 2004).

São descritos dois modelos, baseados em dados experimentais, que explicam o modo de ação das toxinas, sendo as primeiras etapas desses dois modelos idênticas: O início do processo se dá pela solubilização dos cristais em pH alcalino no intestino médio dos insetos, liberando as protoxinas, essa etapa é determinante para a especificidade do isolado à espécie alvo, tanto pela alcalinidade do sistema digestivo quanto pela composição dos cristais de *B. thuringiensis*. As protoxinas são ativadas pelas enzimas digestivas, formando fragmentos tóxicos. As toxinas reconhecem os receptores específicos nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio dos insetos suscetíveis às quais elas se ligam (FIUZA et al., 1996).

O modelo de ação denominado “formação de poros” é o mais antigo e parece ser o mais comum entre as diferentes ordens de insetos (Díptera, Lepidoptera e Coleoptera). Segundo esse modelo, a ligação da toxina com receptores específicos levaria a formação de oligômeros de toxinas, os quais se ligariam a receptores secundários da membrana da célula intestinal. Como resultado dessa ligação, ocorreria a inserção da toxina oligomérica na membrana da célula epitelial intestinal, resultando em poros nesse

epitélio (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007; BRAVO & SOBERÓN, 2008).

Outro modelo, denominado “transdução de sinal” foi estudado em apenas poucos insetos-alvos. De acordo com esse modelo, a ligação da proteína Cry com receptores específicos, induziria uma série de reações intracelulares, que envolvem a proteína G e a adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular e ativação da proteína quinase A. Todas essas consequências provocariam um desequilíbrio da pressão interna celular, danificando-a (BRAVO & SOBERÓN, 2008).

Assim, as proteínas Cry causam a morte das células epiteliais por inativação do sistema de controle de gradiente de pH e citólise osmótica. Estas proteínas provocam alterações na permeabilidade das microvilosidades levando a lise celular e a proliferação de bactérias na hemolinfa, ocasionando a morte por septicemia (BRAVO et al., 2007).

Independente do modo de ação ocorrerá morte das células do intestino médio do inseto e, conseqüente, paralisia do aparelho digestivo do mesmo. Em alguns casos a larva morre por inanição, provocada pela paralisia geral dos músculos, prejudicando a respiração do inseto ou pela germinação dos esporos na luz do aparelho digestivo e multiplicação das células vegetativas levando o inseto à morte por septicemia (BRAVO et al., 2007; BRAVO & SOBERÓN, 2008).

2.1.6 Proteínas Vip

As proteínas Vip (proteínas inseticidas vegetativas) foram descritas por Estruch et al., (1996) e assim foram chamadas por serem produzidas na fase vegetativa de desenvolvimento de *B. thuringiensis*, compondo assim outra família de proteínas com

ação inseticida produzidas por algumas isolados de Bt. Essas proteínas não apresentam nenhuma semelhança com as proteínas Cry (ESTRUCH et al., 1996), pois são secretadas como proteínas solúveis durante a fase vegetativa de crescimento da bactéria, fator este que dificulta sua aplicação no campo (ARORA et al., 2003), além de não formarem cristais (ESTRUCH et al., 1996).

O espectro inseticida das proteínas Vip inclui insetos da ordem coleoptera (Vip1 e Vip2) e lepidoptera (Vip3), inclusive algumas espécies de insetos praga que são insensíveis à ação das proteínas Cry (ESTRUCH et al., 1996).

As proteínas codificadas pelos genes vip1A(a) e vip2A(a) contêm na região N-terminal um peptídeo, sinal típico de proteínas de secreção. Ambas possuem similaridade de sequência com outras toxinas produzidas por outras espécies bacterianas (DE MAAGD et al., 2003) e, provavelmente, um modo de ação semelhante, baseado na ligação a receptores específicos na membrana celular do intestino médio dos insetos (YU et al., 1997; LOGUERCIO et al., 2001).

O gene vip3Aa codifica uma proteína ativa contra larvas de diversas espécies de lepidópteras. Esta proteína não apresenta similaridade de sequência com qualquer proteína conhecida (ESTRUCH et al., 1996). Não contém uma sequência sinal típica no N-terminal, e não é processado durante a secreção (DE MAAGD et al., 2003). Observações histopatológicas indicam que as células do epitélio do intestino médio dos insetos suscetíveis são o principal alvo para a proteína inseticida Vip3A, causando paralisia intestinal, lise completa das células e consequente morte das larvas. Assim, a ruptura das células do intestino parece ser o principal mecanismo de letalidade das proteínas Vip (YU et al., 1997).

2.1.7 Proteínas Cyt

As proteínas Cyt são citotoxinas isoladas do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, assim como as Cry, são sintetizadas durante a fase de esporulação. Porém diferentemente das Cry, essas toxinas são capazes de provocar a lise de uma ampla gama de tipos de células in vitro (HOFTE & WHITELEY, 1989). As proteínas Cyt podem ser encontradas também em menor quantidade em outras subespécies de *B. thuringiensis*, tais como *kyushuensis*, *jegathesan*, *medeliin*, *morrisoni*, *neoleoensis*, dentre outras (DELÉCLUSE et al., 1995).

Essas proteínas são formadas por apenas um domínio, composto por duas cadeias externas em forma de α -hélice, e uma cadeia interna em forma de β -folha pregueada. No interior do inseto, as proteínas Cyt sofrem quebras, onde suas porções C-terminal e N-terminal são clivadas, liberando a toxina ativa. Ao contrário das proteínas Cry, Cyt não se liga a receptores específicos da membrana celular, e sim, diretamente aos lipídios da membrana. Após sua ligação, as proteínas Cyt induzem a formação de poros ou agem desestruturando a bicamada lipídica das membranas (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007). São conhecidas 38 proteínas Cyt classificadas Cyt1A, Cyt1B, Cyt1C, Cyt1D, Cyt2A, Cyt2B, Cyt2C e Cyt3 (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; CRICKMORE et al., 2015).

Delecluse et al., (1991) ao silenciarem o gene *cyt1A* verificaram que a proteína expressa por esse gene parece não ser essencial para a atividade entomopatogênica de linhagens de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, uma vez que a interrupção do gene, resultou em uma linhagem com atividade entomopatogênica similar à linhagem selvagem.

Outro estudo aponta que as proteínas Cyt agem de forma sinérgica com as proteínas Cry, atuando como receptores adicionais destas, potencializando sua ação (OESTERGAARD et al., 2007). O mecanismo proposto é que as proteínas Cyt se ligam à membrana do inseto deixando expostas regiões que são reconhecidas pelas proteínas Cry, facilitando a oligomerização destas, e conseqüentemente a formação de poros (PÉREZ et al., 2005).

2.2 Isolado BR 37 de *Bacillus thuringiensis*

O isolado BR37 vem sendo estudado e tem apresentado potencial para o controle de diversas pragas. Thuler et al., (2007) estudaram a toxicidade do isolado BR37 a *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), nesse trabalho utilizou-se uma suspensão de 3×10^8 esporos/ml pulverizados sobre folhas de couve manteiga (0,1 ml) e dessa forma obtiveram 100% de mortalidade das lagartas de 2º instar. Esses mesmos autores também confirmaram através de PCR a presença dos genes *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1F* nesse isolado.

Em bioensaios realizados com o isolado BR37 liofilizado diluídos em água (peso/volume) onde folhas de milho foram mergulhadas na suspensão também foi verificada a mortalidade de 100% de lagartas de *S. frugiperda* e *S. eridania* (SILVA, 2009). Esse potencial de toxicidade também foi verificado para *Chrysodeixis includens* (WALKER, 1857) e *Chlosyne lacinia* (Saundersii Doubleday & Hewitson, 1849) provocando 97,5 e 93% de mortalidade, respectivamente (Dados não publicados)¹.

Em outro trabalho realizado com lagartas de 2º instar de lagartas do gênero *Spodoptera* constatou-se que o isolado BR37 foi eficiente, causando 100% de

¹ Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de pragas - Edital universal mct/cnpq 14/2008 (processo no 481460/2008-0).

mortalidade em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). Nesse teste foi utilizado 150 µL da mistura de esporos que foi aplicado sobre dieta artificial. Quanto à caracterização gênica, foi confirmado à presença de oitos genes *cry*, sendo eles, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ad*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1F* e *cry2* (SANTOS et al., 2009).

2.3 A Utilização de *B. thuringiensis* na Agricultura

2.3.1 Bioinseticidas e Plantas Geneticamente modificadas

A comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis* foi iniciada em 1938 na França, com o nome de “Sporeine” (CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004). Já na década de 60 foi isolada uma linhagem de Bt subsp. *kurstaki*, denominada HD-1 (DULMAGE, 1970) que é cerca de 2 a 200 vezes mais tóxica do que as linhagens, normalmente utilizadas nos produtos comerciais. Com essa descoberta, a busca por linhagens mais tóxicas foi estimulada, resultando na identificação da primeira linhagem eficaz contra dípteros, em 1977 (GOLDBERG & MARGALIT, 1977), e outra com ação frente a coleópteros em 1983 (KRIEG et al., 1983).

Os bioinseticidas formulados com *B. thuringiensis* são utilizados em todo o mundo, com resultados promissores. Estima-se que os produtos à base dessa bactéria correspondam a cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007), com a maior produção (50%) concentrada nos Estados Unidos e Canadá (TAMEZ-GUERRA et al., 2001). Na América Latina, países como Cuba e México lideram a utilização, especialmente, para o controle de pragas nas culturas do algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho e pastagens. No

Brasil, esses produtos são utilizados para combater cerca de 30 pragas de importância agrícola, entretanto, são menos difundidos quando comparado a países como Cuba (POLANCZYK; ALVES, 2003).

O bioinseticida à base de *B. thuringiensis* com maior aplicação no mundo é o Dipel®, à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Essa estirpe foi selecionada para a produção do bioinseticida porque apresentou toxicidade até 200 vezes superior às cepas utilizadas em outros produtos. O Dipel® é eficiente para mais de 170 espécies de lepidópteros-praga, sendo pouco tóxico para insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, e algumas espécies de ácaros (DULMAGE, 1970; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Apesar de todos os benefícios conhecidos, os bioinseticidas não são comercializados em volumes expressivos como os agroquímicos. Isso se deve a diversos fatores como instabilidade de suas formulações, fatores abióticos como a luz ultravioleta e temperatura elevada, ausência de translocação nas plantas, dificuldade e longos prazos para o registro dos produtos (NAVON, 2000; BETTIOL, 2011).

É preciso que haja um incremento na utilização dos bioinseticidas no Brasil, para isso algumas atitudes deveriam ser tomadas, tais como: a divulgação desse material e principalmente a mudança cultural na agricultura praticada, além da implementação de produções regionais que pudessem reduzir o custo de produção e o estabelecimento de incentivos para implantação de programas de manejo integrado de insetos (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Além disso, tem-se a opção do uso de plantas geneticamente modificadas que expressam as proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, trata-se das culturas transgênicas, consideradas uma das mais bem sucedidas conquistas da biotecnologia (FERRÉ; VAN

RIE; MACINTOSH, 2008; SENA; HERNANDEZ-RODRIGUEZ; FERRE, 2009), devido aos resultados obtidos.

A transformação genética de plantas consiste na inserção de uma ou mais sequências no genoma do cultivar desejado, geralmente isolado de mais de uma espécie, de forma a garantir a expressão gênica de um ou mais genes de interesse (NODARI & GUERRA, 2001).

As perspectivas em relação às plantas Bt surgiram em 1981 com a caracterização de um gene de *B. thuringiensis* codificador de uma proteína responsável pela atividade tóxica a insetos, o qual foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (SCHNEPF & WHITELEY, 1981). Assim, foi possível introduzir os genes codificadores de proteínas Cry nos genomas dos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo apenas os insetos-praga que se alimentavam dos tecidos (DE MAAGD; BOSCH; STIEKEMA, 1999).

Na década de 90 tornou-se possível a utilização comercial de plantas geneticamente modificadas (PGM) resistentes a insetos as quais eram eficientes no controle de pragas, e desde a sua primeira aplicação a transformação genética se tornou uma ferramenta indispensável na biologia molecular vegetal e na pesquisa de genômica funcional (USEPA, 1999). Já em 2006, 19% da área global de transgênicos (102 milhões de hectares) era ocupada por culturas Bt (JAMES, 2006).

As PGMs resistentes a insetos podem proporcionar inúmeras vantagens aos agricultores e ao meio ambiente. Um exemplo disso é a China, que desde 1997 cultiva o algodão Bt. Nesse País foi verificada uma redução de 78 mil toneladas de inseticidas utilizados em 2001, com o número de aplicações passando de 20 para sete durante todo o ciclo de cultivo (WU et al., 2005). Os benefícios associados a esse fato foram à diminuição em até 75% nos casos de produtores rurais intoxicados por inseticidas e a

reversão no quadro de resistência de insetos a lambda-cialotrina (piretróide) e endosulfan (ciclodieno), o qual já se encontrava previamente instalado e documentado naquela região (HOSSAIN et al., 2004; WU et al., 2005). Porém uma das principais ameaças da ampla adoção destas culturas é a evolução da resistência dos insetos, como uma resposta à forte pressão de seleção que é imposta às populações de insetos (FERRÉ & VAN RIE, 2002). É importante ressaltar que o tempo em que os transgênicos Bt permanecem resistentes aos insetos é um importante aspecto avaliado e testado no mercado (ALI et al., 2010).

Também, a manipulação de genes *cry*, *vip* e *cyt* oferece uma alternativa para melhorar a eficácia e a persistência das proteínas no meio ambiente, eliminando certas características indesejáveis dos cristais tais como rápida degradação quando expostos a radiação ultravioleta, instabilidade na água e a baixa eficiência no controle de insetos que se alimentam dos tecidos internos da planta (NAVON, 2000).

2.4 Sequenciamento genômico de *Bacillus thuringiensis*

O sequenciamento de genomas microbianos, apoiado pelo enorme progresso e investimentos em métodos moleculares, está avançando em um ritmo acelerado, e é visto como uma nova abordagem de estudo que possibilita, de maneira ágil e com menor custo, a obtenção de informações importantes contidas no DNA de um organismo (GALPERIN & KOONIN, 2010). Em decorrência desses avanços em técnicas de sequenciamento mais eficientes, os genomas de milhares de espécies se encontram em bancos de dados e ferramentas como o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permitem buscar e comparar sequências com as já existentes nesses bancos de dados (ALTSCHUL et al., 1990).

Um dos objetivos do sequenciamento é a identificação dos genes presentes no

genoma. Uma vez identificados os nucleotídeos desses genes, eles podem ser usados para inferir as sequências de aminoácidos das proteínas. Desse modo, a proteína pode ser sintetizada ou isolada e suas propriedades estudadas para determinar sua função (PIERCE, 2004).

Porém, ainda são poucos os estudos de sequenciamento genômico completo de *B. thuringiensis* citados na literatura, o primeiro dado de sequenciamento completo do genoma dessa bactéria data de 2004, com a linhagem *Bacillus thuringiensis* serovar *konkukian* str. 97-27. Até o momento tem-se referência de 15 linhagens de *B. thuringiensis* que foram completamente sequenciadas, 15 estão em nível de cromossomo, duas em Scaffold e nove em Contig (NCBI, 2015).

Pesquisadores encontraram, em 2013, um plasmídeo de *B. thuringiensis* inteiramente novo, sendo também o maior relatado até o momento o BTB_502p. Esse estudo foi realizado com a linhagem 407 – Cry onde foram observados, um cromossomo de 5,5 Mb e nove plasmídeos, nomeados BTB_2p , BTB_5p, BTB_6p, BTB_7p , BTB_8p , BTB_9p, BTB_15p, BTB_78p, e BTB_502p; os plasmídios dessa linhagem variaram em tamanho, que foi de 2.062 a 501.911 bp. Esse trabalho irá auxiliar outros estudos, pois essa linhagem poderá ser usada como modelo genético, bem como contribuir para estudos de estrutura genômica e função do *B. thuringiensis* (SHEPPARD et al., 2013).

Peng et al., (2012) analisando a linhagem MC28 que produz cristais parasporais esféricos durante a fase estacionária do seu ciclo de crescimento e é altamente tóxica para insetos da ordem lepidópteros e dípteros (TAN, 2010 e TAN, 2009), encontraram três plasmídeos contendo genes de cristais com ação inseticida. No plasmídeo pMC189 foram encontrados sete genes de cristais inseticidas: cry30Fa1 (MC28_E074), cry53Ab1 (MC28_E095), cry54Aa1 (MC28_E038), cry54Ab1 (MC28_E085),

cry68Aa1 (MC28_E064), *cyt1Da1* (MC28_E051) e *cyt2Aa3* (MC28_E053). No plasmídeo pMC95 foram três genes *cry* : *cry4Cc1* (MC28_C067), *cry69Aa1* (MC28_C001) e *cry70Ba1* (MC28_C076). E no plasmídeo pMC183 apenas um gene *cry*, *cry69Aa2* (MC28_D165). Em breve, o genoma MC28 não enriquecerá somente o banco de dados do genoma de *Bacillus thuringiensis*, mas também facilitará a compreensão da regulação dos genes tóxicos e relações evolutivas entre os organismos do grupo *B. cereus* (PENG et al., 2012).

Challacombe et al., (2012) concluíram através do sequenciamento completo do genoma de *Bacillus thuringiensis* Al Hakam que este genoma não contém homólogos de genes *cry*, *cyt* e *vip* conhecidos. Porém, o genoma do *B. thuringiensis* Al Hakam fornece novos dados de sequência que podem também ser usados para estudar as relações evolutivas entre os organismos do grupo *B. cereus*.

2.5 Sequenciadores de Nova Geração

O sequenciamento de DNA e, mais recentemente, o surgimento do sequenciamento de nova geração, tem aumentado significativamente o conhecimento sobre a diversidade microbiana e sua função em ecossistemas microbianos complexos (KUCZYNSKI et al., 2011). Com a redução de tempo para gerar uma sequência de DNA, várias aplicações foram aprimoradas ou originalmente desenvolvidas, tais como o sequenciamento de novos genomas, estudos metagenômicos, identificação de regiões de interação entre DNA-proteína (ChIP-seq), caracterização do transcriptoma de genomas inteiros (RNA-seq), descoberta de RNAs não codificantes (nc-RNAs) e ainda o estudo de amostras de DNA fóssil (paleogenômica) (WHITELEY et al., 2012).

Novos equipamentos, denominados sequenciadores de nova geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) ou ainda sequenciadores maciçamente paralelos, estão

revolucionando o campo do sequenciamento genômico, pois permitem explorar e responder questões biológicas com uma velocidade e precisão nunca antes atingida. Cada uma das novas plataformas de sequenciamento apresenta sua própria metodologia de sequenciamento, no entanto, uma característica em comum entre todas as máquinas, é a capacidade de gerar uma grande quantidade de dados em um período muito curto (POP & SALZBERG, 2008).

Em 2004, a plataforma de sequenciamento 454 (Roche, Connecticut, Estados Unidos da América) foi o primeiro sequenciador de nova geração introduzido no mercado. O princípio do pirosequenciamento é aplicado, onde uma cascata de reações enzimáticas iniciadas pela liberação de um pirofosfato durante reação de incorporação de um nucleotídeo na cadeia nascente pela DNA polimerase gera ao final do processo um sinal de luz que é capturado por uma câmera que faz parte do sequenciador. Dois anos após (2006), a plataforma de sequenciamento *Illumina* (Illumina, San Diego, Estados Unidos da América) foi lançada no mercado com a capacidade de gerar simultaneamente milhões de leituras curtas de DNA, o que permite o sequenciamento de um bilhão de bases nucleotídicas em uma única corrida (POP & SALZBERG, 2008).

Recentemente, foi lançada a primeira plataforma de sequenciamento que realiza a detecção de bases sem se apoiar em emissões de luz geradas durante o processo de identificação de bases. A detecção “não óptica” das sequências de DNA é realizada pela plataforma *Ion Torrent* PGM (Personal Genome Machine) (Life Technologies, São Francisco, Estados Unidos da América) (ROTHBERG et al., 2011).

2.6 Plataforma Ion Torrent PGM (Personal Genome Machine)

O sequenciamento nesta nova plataforma ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH da solução onde ocorre a reação de sequenciamento. Para

isso, Rothberg et al. (2011) criaram o primeiro dispositivo comercialmente disponível - um chip de sílica semiconductor - capaz de traduzir sinais químicos em informação digital. Como resultado, é possível realizar um sequenciamento de produtos de PCR (*amplicons*) sem a utilização de luz e, conseqüentemente, mais rápido, mais escalável e de menor custo.

O sequenciador é o próprio chip que possui milhares de poços nanoscópicos e pode gerar 10 Mb (Ion 314™ Chip), 100 Mb (Ion 316™ Chip) ou 1Gb (Ion 318™ Chip) de sequências (Figura 2). Além disso, o dispositivo é composto principalmente por leitores e sensores eletrônicos, um microprocessador para processamento do sinal e um sistema de fluidos para controlar o fluxo de reagentes sobre o chip (ROTHBERG et al., 2011).

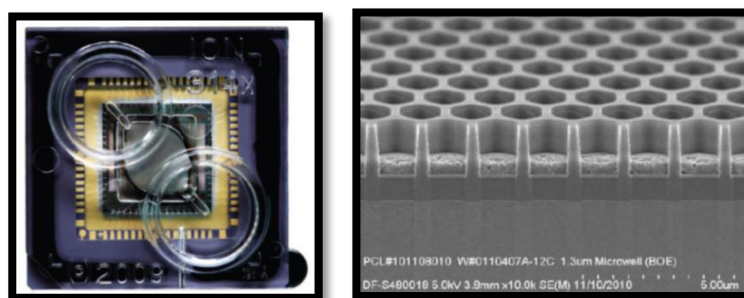


Figura 2. Ion 314™ Chip. A forma elíptica cinzenta no centro contém 1.4 milhões de micropoços nanoscópicos (à direita) que registram a reação de sequenciamento.

Fonte: Rothberg et al., 2011

O primeiro passo do fluxo de trabalho é a criação de uma biblioteca genômica a partir da fragmentação dos *amplicons* (via sonicação) e ligação de adaptadores *Ion Torrent* em suas pontas. Em seguida, esse *pool* de fragmentos de cada amostra da biblioteca é clonalmente amplificado em *Ion Spheres* (esferas de material sintético ou *beads*). As *beads* que contém as amostras de DNA molde acopladas são então

enriquecidas e oligonucleotídeos iniciadores e a DNA polimerase são ligados a elas. Após a etapa de PCR em emulsão, é realizada a adição dos reagentes para a reação de sequenciamento paralelo massivo e as *beads* com seu fragmento amplificado são depositadas no chip por uma etapa de centrifugação. Cada micropoço possui a dimensão suficiente para que apenas uma *bead* possa ser nele depositado (ROTHBERG et al., 2011).

A química do sequenciamento em si é notavelmente simples. Naturalmente, um próton é liberado (proveniente da hidrólise do trifosfato) quando um nucleotídeo é incorporado pela DNA polimerase na cadeia nascente de DNA, resultando em uma alteração do pH da solução (Figura 3).

No sequenciamento de íon os quatro nucleotídeos preenchem o chip sucessivamente, um após o outro. Quando um nucleotídeo do fluxo é complementar à sequência da fita de DNA em um micropoço particular, este é incorporado na cadeia nascente pela polimerase que foi previamente ligada. Tal incorporação resulta na hidrólise do trifosfato desse nucleotídeo, provocando a liberação de um único próton para cada nucleotídeo ligado durante o fluxo. Esta liberação produz uma mudança no pH da solução proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (0.02 unidades de pH por cada incorporação de base). A alteração é detectada pelo sensor de íon localizado abaixo de cada micropoço e convertida em uma voltagem. Se existem duas bases idênticas complementares à fita de DNA, a voltagem é dobrada e o chip reconhece as duas bases idênticas. Se o próximo nucleotídeo preenchido ao chip não for compatível, não haverá mudança na voltagem e nenhuma base será reconhecida. Devido a esta característica de detecção direta e conexão da informação química para a digital, sem necessidade de câmeras ou luz, cada incorporação de nucleotídeo é medida em segundos, o que permite corridas com um período muito mais curto (aproximadamente

2 horas) (ROTHBERG et al., 2011).

Uma vez gerados os dados no sequenciador, estes são automaticamente transferidos para o Servidor *Torrent* onde programas específicos são capazes de transformar os sinais químicos em seqüências de bases com geração das seqüências individuais (*reads*).

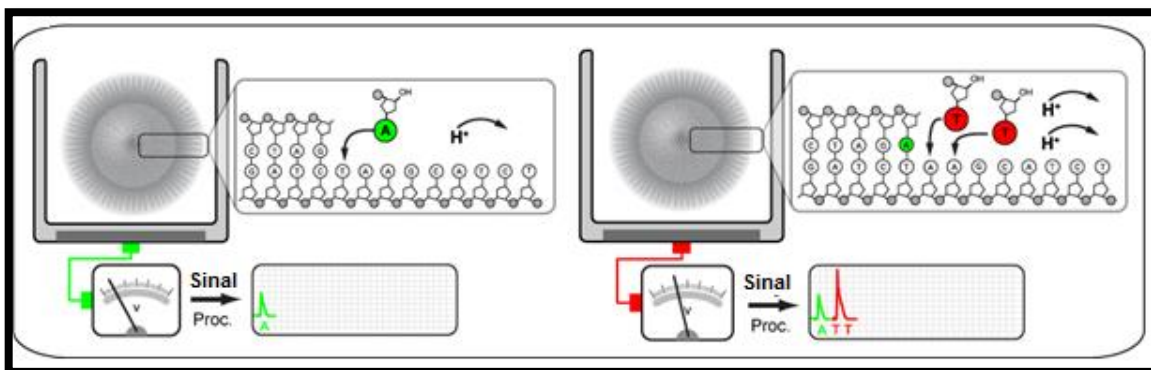


Figura 3. Sequenciamento no Ion Chip: oligonucleotídeos iniciadores e a DNA polimerase são ligados às microesferas e estas são depositadas no chip (uma em cada micropoço); todos os quatro nucleotídeos preenchem o chip ciclicamente. No processamento de sinais, o software converte os dados em medidas de incorporação em cada micropoço para cada nucleotídeo sucessivo do fluxo. Após as bases determinadas, cada leitura é passada através de um filtro para exclusão das leituras com baixa precisão. Fonte: adaptado de Rothberg et al., 2011.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Identificar e sequenciar genes *cry*, *cyt* e *vip* de *B. thuringiensis* BR37;

3.1.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de alguns grupos de genes *cry* e *cyt* por meio de PCR;
- Sequenciar o genoma do isolado BR37 da bactéria *B. thuringiensis*;
- Realizar a leitura do genoma a partir das sequências obtidas;
- Identificar e caracterizar genes *cry*, *vip* e *cyt* presentes neste isolado;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactéria

O isolado BR37 de *B. thuringiensis*, utilizado neste estudo, foi obtido de amostras de solo de Londrina – Paraná (23°18' S latitude) e encontra-se armazenado no Banco de Bactérias do Laboratório de Genética e Taxonomia de Micro-organismos da Universidade Estadual de Londrina. Esse isolado demonstrou, em estudos anteriores, toxicidade a diversos insetos, incluindo *S. frugiperda* e *S. eridania*, *A. gemmatilis*, *C. includens* e *C. lasinia* provocando mortalidade de (96, 96, 100, 97,5 e 93% respectivamente) (Dados não publicados).

4.1.2 Extração de DNA do isolado BR37 e condições de PCR

Amostras de DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* foram extraídas pelo método de Hansen & Hendriksen (2001). Os isolados foram cultivados por 15 h/30°C em placas contendo meio Luria-Bertani (LB: triptona 1,0%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1,0%). Com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, uma colônia de aproximadamente 2 mm de diâmetro foi transferida para microtubos contendo 200 µL de TE (10 mM de Tris; 1 mM de EDTA; pH 8,0). A suspensão foi homogeneizada e incubada em Banho-Maria sob fervura por 10 min. Em seguida a suspensão foi centrifugada a 12.000 x g por 3 minutos e o sobrenadante transferido para novos tubos esterilizados e utilizado como amostra de DNA para as reações de amplificação por PCR .

A presença dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4A* e *cry4B*, *cry10*, *cry11* e *cyt1* foi analisada por PCR utilizando iniciadores específicos descritos (Tabela 1). As reações de amplificação foram conduzidas com um volume total de reação de 25 μ L, contendo 1 U de *Taq* Dna polimerase (Invitrogen), 2,5 μ L de tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM de KCl), 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de dNTP, 0,5 μ M de cada iniciador, 2,0 μ L do DNA extraído e água Milli-Q. A amplificação ocorreu segundo método descrito pelos autores de cada par de primers.

Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (89 mM Tris Borato, 2 mM EDTA, pH 8,0) corados com Syber Safe (Invitrogen, Inglaterra) usando marcador de 1Kb plus DNA *ladder* (Invitrogen, Inglaterra). Os produtos resultantes da amplificação com os iniciadores da Tabela 1 foram purificados utilizando-se Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek) e quantificados por ScanDrop (Analytik Jena).

Tabela 1: Genes, iniciadores gerais e específicos de *B. thuringiensis*, tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR, sequência de nucleotídeos, condições de amplificação e fontes.

Genes	Iniciadores	Produto (pb)	Sequência	Ciclos	Desnaturação	Pareamento	Extensão	Fonte
<i>cry1</i>	cry1gralD cry1gralR	558	5' CTGGATTTACAGGTGGGGATAT 5' TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT	30	60 s, 94°C	60 s, 52°C	60s, 72°C	[1]
<i>cry2</i>	cry2gralD cry2gralR	526	5' GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT 5' GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[2]
<i>cry3</i>	cjIII20-21D cjIII20-21R	652-733	5' TTAACCGTTTTTCGCAGAGA 5' TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[3]
<i>cry4A</i>	cry4Aspe*	459	5' TCAAAGATCATTTTCAAATTACA 5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	30	45 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[4]
<i>cry4B</i>	cry4BspeD cry4BspeR	321	5' CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC 5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT	30	60 s, 94°C	60 s, 50°C	60 s, 72°C	[4]
<i>cry10</i>	cry10speD cry10speR	348	5' TCAATGCTCCATCCAATG 5' CTTGTATAGGCCTTCCTCCG	30	60 s, 94°C	60 s, 51°C	60 s, 72°C	[4]
<i>cry11</i>	cry11gralD cry11gralR	342-352	5' CGCTTACAGGATGGATAGG 5' GCTGAAACGGCACGAATATAAATA	30	45 s, 94°C	45 s, 50°C	60 s, 72°C	[4]
<i>cyt1</i>	cyt1gralD cyt1gralR	480	5'CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT 5'TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT	30	45 s, 94°C	60 s, 52°C	60s, 72°C	[4]

Todas as reações tiveram um passo inicial de desnaturação à 94 °C por 2 min e um passo final de extensão de 5 min à 72 °C. [1] Bravo et al., 1998. [2] Vidal-Quist et al., 2009. [3] Céron et al., 1995. [4] Ibarra et al., 2003.

4.1.3 Caracterização de Proteínas Cry Através de SDS-PAGE

As proteínas presentes nos cristais do isolado foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) a fim de se caracterizar o perfil das proteínas produzidas. Cada isolado foi cultivado, em meio NB a 30 °C por 72 horas a 200 rpm, até completa esporulação. As proteínas Cry foram solubilizadas e os cristais foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por Lecadet et al., (1992). Foram transferidos 1,5 mL das culturas bacterianas para tubos de microcentrifuga de 2 mL previamente autoclavados. Estes foram centrifugados a $12.000 \times g$ por 20 min. Os sobrenadantes, resultantes da centrifugação, foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCl 0,5 M por 20 minutos. Após o descarte do NaCl 0,5M, as paredes do tubo de microcentrifuga foram secas com papel de filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF (fluoreto de fenilmetil sufonil) a 1mM e centrifugados a $12.000 \times g$ por 20 min. Descartou-se o PMSF 1mM e os sedimentos foram ressuspensos em 500 μ L de PMSF 1 mM e armazenados a -20 °C.

As preparações de esporos-cristais das linhagens foram analisadas por SDS-PAGE, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados 15 μ L das preparações de esporos-cristais solubilizados para a realização da eletroforese em tampão Tris-glicina, sob voltagem constante de 30 mA, por 3 horas. A linhagem *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82, a qual já tem o perfil proteico conhecido foi utilizada como referência. Um marcador de proteína, Precision Plus Kaleidoscope, 10-250kD (Bio-Rad) foi utilizado para a posterior análise dos resultados. As distâncias percorridas pelo marcador foram medidas e através dos respectivos pesos moleculares foi realizada a regressão linear através de gráfico montado usando o programa Excel versão 2007 (Microsoft Office Package). Assim, foram calculados os pesos moleculares

das proteínas produzidas pelas diversas linhagens do estudo.

4.1.4 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica do isolado foi realizada por microscopia eletrônica de varredura. Para isso, o material liofilizado do isolado utilizado foi depositado diretamente sobre suportes metálicos *stubs*, cobertos com ouro por 180 segundos, com corrente de 40 mA, sob vácuo (10⁻¹ mbar), em um metalizador BAL-TEC modelo SCD – 050 Sputter Coater e analisado em microscópio eletrônico de varredura Philips QUANTA 200 (FEI) em alto vácuo sob tensão de 20 kV, com distância de trabalho de 10.2 mm.

4.1.5 Sequenciamento do isolado BR37 de *Bacillus thuringiensis*

A extração do DNA genômico total utilizado para o sequenciamento foi realizado no Laboratório de Genética e Taxonomia de Micro-organismos da Universidade Estadual de Londrina utilizando-se o kit pelo Dneasy Blood & Tissue Kit segundo instruções do fabricante e a quantificação da amostra de DNA foi realizada em NANODROP 2000.

O sequenciamento do genoma do isolado BR37 foi realizado no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo através da plataforma *Ion Torrent* (Life Technologies) com um Ion Chip 316 (Life Technologies).

As sequências obtidas em formato FAST-Q foram analisadas no Laboratório de Bioinformática da Universidade Estadual de Londrina – CCB. Inicialmente foi realizado o processamento de qualidade do arquivo bruto, filtrando as leituras de baixa qualidade baseando-se no comprimento e número de bases ambíguas. Esse processamento de qualidade foi realizado por meio do programa PRINSEQ (Schmieder; Edwards, 2011).

Posteriormente, através da utilização de sequências dos genes *cry* e *vip* de referência depositadas no banco de dados GeneBank, NCBI (Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos EUA - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> realizou-se o mapeamento a partir dos reads obtidos no sequenciamento dos possíveis genes *cry* e *vip* presentes nesse isolado com a utilização dos softwares BOWTIE 2 (LANGMEAD & SALZBERG, 2012) e SAMTOOLS (LI et al., 2009). As sequências de genes *cry* utilizadas como referência foram selecionadas com base nos ranques de classificação (CRICKMORE et al., 2015) e alinhamento local destas sequências.

A visualização da cobertura do gene de referência com os *reads* mapeados a partir dos dados genômicos do isolado BR37 foi realizada pelo o software ARTEMIS (RUTHERFORD et al., 2000). As sequências consenso foram obtidas para os genes *cry* que apresentaram cobertura completa, ou seja, com toda a extensão do gene de referência coberta pelos *reads*.

As sequências consensos foram comparadas às demais sequências através da ferramenta BLAST (BLASTn e BLASTp) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Esse alinhamento global permitiu indicar e confirmá-las em relação aos genes *cry*.

Posteriormente, as sequências consenso e as sequências com cobertura e identidade superiores a 80 e 95%, respectivamente, verificadas pelo BLAST foram alinhadas por meio do software MEGA v. 5.10 (TAMURA, 2011) a fim de obter os ranques para a classificação precisa dos genes *cry* presentes no isolado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolado BR37, foi utilizado o DNA total como molde e a quantificação da concentração de DNA em nanogramas foi determinada por ScanDrop. Os genes *cry1* e *cry2* foram confirmados por PCR através da obtenção de amplicons com tamanhos esperados para esses genes (Figura 4). É importante ressaltar que esses genes codificam para proteínas Cry com atividade tóxica a insetos da ordem Lepidoptera (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004, RICIETO et al., 2013).

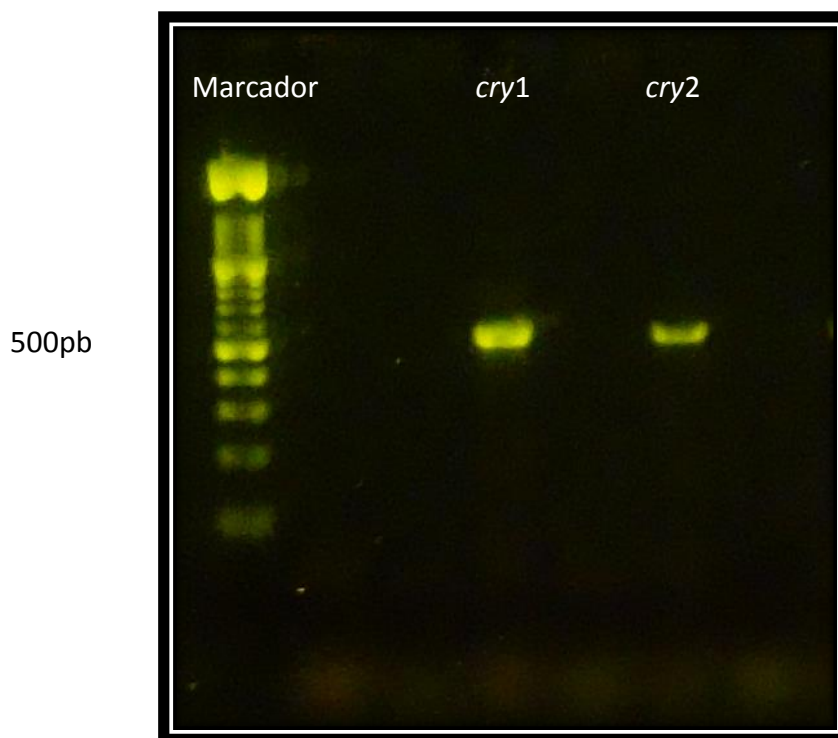


Figura 4. Amplificação do fragmento inicial dos genes *cry1* e *cry2*. Reações de amplificação por PCR com tamanhos esperados de 500 pb. Gel de agarose 1,2. Marcador de peso molecular 100 pb Ladder (Invitrogen). Fonte: O próprio autor.

A identificação dos genes contidos em um isolado de *B. thuringiensis*, por meio da técnica de PCR, utilizada em diversos estudos (SANTOS et al., 2009; MONNERAT et al., 2009), pode ser empregada para prever seu potencial de biocontrole, bem como

sua especificidade (WANG et al., 2003). Porém, é necessário incentivar a busca por novos genes, cujas diferenças não tenham sido detectadas somente através do tamanho de fragmento da amplificação, mas que possam ser detectadas pelo sequenciamento. Pois dessa maneira, a identificação se tornará mais rápida e eficiente, o que poderá acelerar a descoberta de novos genes e, conseqüentemente, um aumento nos programas de controle biológico à base de *B. thuringiensis*, pois a sequência do genoma também fornece uma base mais sólida para o melhoramento genético e estudos de regulação dos genes tóxicos.

O perfil proteico das soluções de esporos e cristais utilizados nos bioensaios foi determinado por SDS-PAGE e o isolado apresentou massas moleculares correspondentes aos perfis esperados sendo elas de 130 e 65 kDa valores que são característicos das proteínas Cry1 e Cry2, respectivamente (Figura 5.)

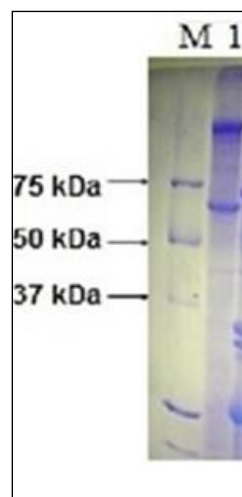


Figura 5. Gel de SDS-PAGE 10% de suspensão de esporos e cristais da linhagem de *B. thuringiensis*. M: marcador; 1 – BR37. Fonte: o próprio autor.

Já com a utilização do microscópio eletrônico de varredura foi possível confirmar a presença de cristais bipiramidais e esféricos (figura 6).

A análise da morfologia dos cristais é importante porque pode fornecer informações sobre atividade inseticida do isolado (SAADOUN et al., 2001). Sendo que os cristais bipiramidais podem estar relacionados à presença de proteínas do tipo Cry1, eficazes contra insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, enquanto que, os cristais cubóides são associados às proteínas Cry2, efetivos contra lepidópteros e dípteros (SILVA et al., 2004). E os cristais esféricos, que normalmente identificam isolados tóxicos a dípteros (MELATTI, 2008; ROH et al., 2007).

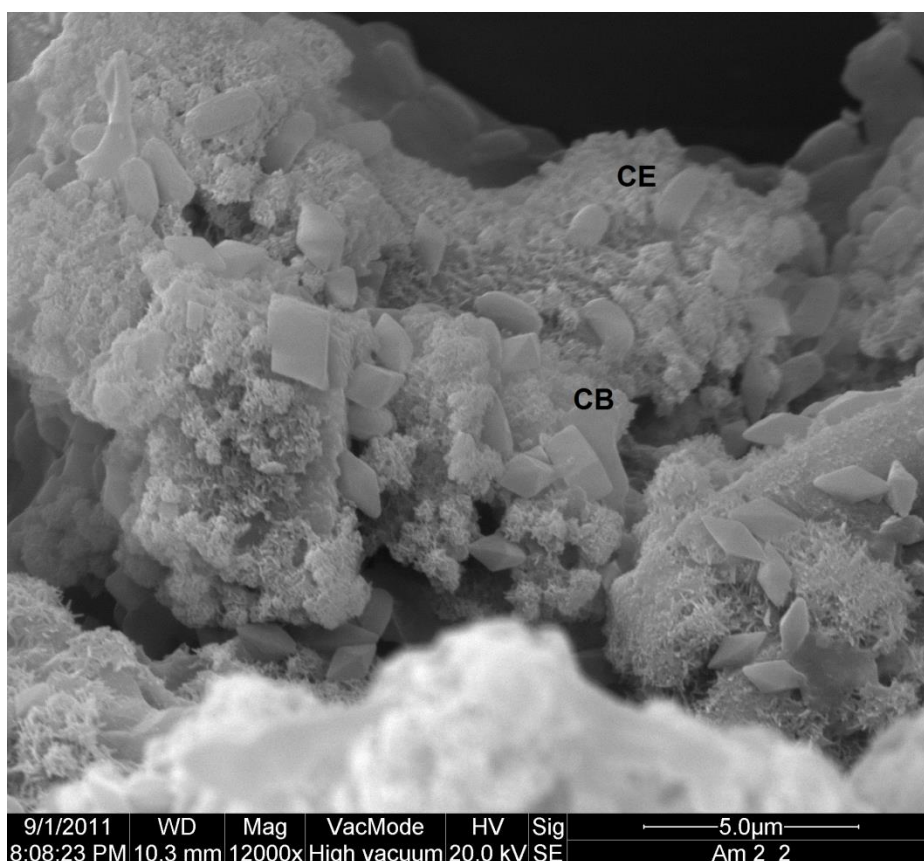


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de *B. thuringiensis* BR37 CB-cristal bipiramidal e CE-Cristal esférico. Fonte: o próprio autor.

A análise do DNA total do isolado BR37, foi realizada na plataforma *Ion Torrent* e gerou um arquivo bruto com 2.033.147 *reads* com tamanho médio de 310 pb por *read*. Após o processamento, com a retirada de sequências curtas e de baixa qualidade, foi obtido 2.007.864 *reads* com tamanho superior a 40 nucleotídeos e qualidade superior a 20 em cada base. Com os *reads* gerados, foi possível cobrir em torno de 35 vezes o genoma total desta bactéria, oferecendo segurança nas análises. Outros autores encontraram resultados semelhantes ao sequenciar isolados de *B. thuringiensis*. Doggett et al., (2013), ao estudar o isolado de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-789, obteve 49.827.921 que forneceu a cobertura em 26,9 vezes o genoma total da linhagem e He et al., (2010), obteve 448.963 *reads* provendo 32 vezes a cobertura do genoma do isolado BMB-171.

Essa técnica de sequenciamento permite identificar todo o conteúdo de genes *cry* responsáveis pela toxicidade a diversas pragas, inclusive genes *cry* que até então não foram descritos, tanto em cromossomos como em plasmídios, o que não seria possível por meio de outras técnicas, como PCR. O conteúdo genômico dessa bactéria vem sendo estudado desde a década de 70 por diversos grupos de pesquisa visando principalmente à busca por novos genes *cry*. Várias proteínas Cry com funções distintas já foram descritas e os seus respectivos genes clonados (CRICKMORE, 2015).

O sequenciamento completo do BR37 permitiu o conhecimento de todos os genes *cry* pertencentes a esse isolado, confirmando a presença dos genes já identificados por PCR e permitindo acrescentar um gene *vip3C*. Além disso, para todos os genes localizados por PCR, foi possível obter a precisa classificação comparando a sequência consenso com as sequências dos genes *cry* depositadas no banco de dados do NCBI analisando os resultados no software MEGA 5.1. foi possível a identificação dos seguintes genes: *cry1Aa16*, *cry1Ab15*, *cry1Ad1*, *cry1Ca9*, *cry1Da3* *cry1Eb1* e *cry1Fa1*,

cry2Aa13 e *vip3Ca2* (Tabela 2) que exibiram alta cobertura e identidade com as sequências de genes *cry* depositadas no banco de dados do NCBI. Nenhum gene *cyt* foi detectado no BR37.

O gene *cry1Aa16* apresentou 100% de similaridade e 99% de cobertura com a sequência depositada no NCBI. Alguns sítios de mutação foram observados, sendo eles nas posições 596, 776 e 1415 (Citosina (C) para Timina (T), Guanina (G) para Adenina (A) e Adenina para Guanina, respectivamente).

O gene *cry1Ab15* obteve 99% de similaridade e cobertura com a sequência depositada por Li et al., (2001). Foram verificados dois pontos de mutação, sendo eles nos sítios 3453 e 3255 (T-C e A-G).

Já no gene *cry1Ad1* foi possível observar quatro pontos de mutação nas posições 3341, 3353, 3361 e 3408 (T-C, C-T, C-A e A-G, respectivamente).

A sequência do gene *cry1Ca9* obteve 99% de similaridade e cobertura com a sequência de Kao et al., (2003) depositados no NCBI. Mas também foram observados pontos de mutação nas posições 3006 (T-G), na posição 3024 (G-A) e na posição 2789 (T-C).

No gene *cry1Eb1* foi verificado apenas um ponto de mutação na posição 459 (C-A). As mutações encontradas podem sugerir que esses sejam novos genes *cry*. Porém isto será posteriormente investigado para que essa informação possa ser concluída. Já para os genes *cry1Da3* e *cry1Fa1* as sequências foram 100% similares.

Além da alta porcentagem de cobertura e similaridade, acima de 99%, é importante ressaltar que todos os alinhamentos obtiveram *e-value* igual à zero, o que indica qualidade estatística no alinhamento. Não sendo este obtido ao acaso (AMARAL; REIS; SILVA, 2007).

Foi observado que o gene *cry1* apresentou maior abundância em relação aos

outros genes identificados. Em um trabalho feito na Coréia com 58 isolados de Bt mostrou que a frequência do gene *cry1C* foi predominante cerca de 60%, seguido pelo gene *cry1Ab* (45%) e o gene *cry2A* (34%) (KIM et al., 1998). Da mesma forma CHAK et al., (1994) analisaram 225 isolados provenientes de ecossistemas de Taiwan, e desses, cerca de 98,2% continham os genes *cry1*.

Outros trabalhos mostram ainda a importancia do sinergismo entre as proteínas. VISSER et al., (1990), observaram que a interação entre *cry1C* e *cry1E* proporciona alta toxicidade a *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Já Aranda et al., (1996) e Bravo et al., (1998) enfatizam a eficiência de *cry1C* e *cry1D* no controle de *S. frugiperda* relataram que o gene *cry1F* possui uma atividade inseticida significativa contra *Heliothis virescens* (Fabrícus, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), *S. exigua* e *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Crambidae). Esses dados reforçam a ideia de que isolados com mais genes *cry* possam obter melhores resultados no controle de diversas pragas.

A análise do conjunto total de sequência do genoma do isolado BR37 permitiu classificar também o gene *cry2Aa13* que obteve 100% de similaridade e cobertura com a sequência de Arango et al., (2008) depositada no NCBI. Nenhum ponto de mutação foi observado nesse gene.

O gene *cry2A* é formado por cinco subgrupos: *cry2Aa*, *cry2Ab*, *cry2Ac*, *cry2Ad* e *cry2Ae* (BAUM et al., 2003, DONOVAN et al., 1989; WIDNER & WHITELEY, 1989; WU et al., 1991; CHOI et al., 1999). As proteínas expressas por esses genes possuem atividade tóxica para insetos da ordem Lepidoptera e Diptera (SASAKI et al., 1997).

Outro gene observado no isolado foi o *vip3Ca13* que apresentou 99% de similaridade e cobertura com a sequência depositada no banco de dados NCBI. Porém

foram observados três pontos de mutação nas posições 2, 3 e 4 (A-T, A-G e C-A respectivamente).

As alterações de nucleotídeos evidenciam a presença de novos alelos da classe Vip3 (CRICKMORE et al., 1998). Essas alterações podem causar efeito significativo sobre a atividade inseticida das toxinas, como foi observado por Shen et al., (2009). Estes autores relataram que as poucas substituições de aminoácidos nas proteínas Vip3Aa26 e Vip3Aa27 acarretaram diferentes atividades inseticidas. A proteína Vip3Aa27 apresentou potencial inseticida contra as espécies *Trichoplusia ni* (Hubner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidea), *S. exíqua* e *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidea); a Vip3Aa26 somente apresentou atividade contra as lagartas da espécie *T. ni*, o que indica que proteínas de mesma subclasse podem mostrar diferenças nos mecanismos de ação.

Já em relação à ação das proteínas Vip3 essas têm sido pesquisadas e demonstram iniciar sua atividade no epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry, no entanto, devido a sua forma solúvel, as proteínas Vips se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível e começa uma progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997; SAUKA et al., 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; COSTA et al., 2010).

Além disso, a resistência a algumas toxinas Cry de Bt tem sido observada em certas populações de insetos. Esses tem habilidade de desenvolver resistência às proteínas expressas em plantas cultivadas, graças à adaptação as condições adversas. A implantação extensiva e continuada de lavouras que expressam genes *cry*, proporciona o aumento desse risco, pois, como a proteína é produzida ao longo do ciclo vegetativo da planta, os insetos são expostos a elas por mais de uma geração. Essa pressão de seleção

favorece o aumento da frequência de alelos de resistência, podendo conduzir a níveis altos de tolerância em um curto espaço de tempo (GOULD, 1998). Esses fatores tornam importante a busca de novas classes de proteínas inseticidas para programas de manejo da resistência (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Esses dados enfatizam ainda a importância para a busca de proteínas Vip para o controle de insetos pragas. Na literatura, as proteínas Vips são citadas causando mortalidade em diversas pragas da ordem lepidoptera: *Chalcites Chrysodeixis* (Esper, 1789) (Lepidoptera: Noctuidea), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), *Mamestra brassicae* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Noctuidea) *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidea) e *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidea) (PALMA et al., 2012).

Outros trabalhos também elucidam a maior toxicidade das proteínas Vip para algumas pragas quando comparadas com as proteínas Cry. Um estudo realizado com *S. frugiperda* analisou a toxicidade e interação de ligação das proteínas Cry1Ab e Cry1Fa e Vip3Aa, Vip3Af nas vesículas de membrana do epitélio intestinal (BBMVs). Nos ensaios de toxicidade, os autores constataram que as proteínas Vip3 foram mais efetivas no controle das lagartas do que as proteínas Cry1 (SENA et al., 2009). Resultados estes que corroboram com os encontrados por Figueiredo et al., (2013) onde a pró-toxina Vip3Aa50 apresentou alta toxicidade para as lagartas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*. A avaliação dos valores de CL₅₀ e CL₉₀ verificou que as lagartas de *A. gemmatalis* foram mais suscetíveis que as de *S. frugiperda*. A atividade inseticida da proteína Vip3Aa50, dada pela CL₅₀, foi cerca de quatro vezes maior contra *A. gemmatalis*. Para CL₉₀, a diferença foi ainda mais pronunciada, com eficácia nove vezes maior para o controle de *A. gemmatalis*.

Há uma grande quantidade de proteínas Cry e Vip já descritas na literatura, porém os resultados apresentados também incitam a busca por novas toxinas através da Metagenômica aliada à Bioinformática. Esta busca por novas toxinas pode possibilitar uma maior eficácia para o controle de insetos, visando também novas alternativas para reduzir os problemas relacionados à resistência (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004).

A elevada atividade inseticida que o isolado BR37 obteve em estudos anteriores (SANTOS et al., 2008; SILVA, 2009; Dados não publicados), torna este isolado um excelente candidato a fonte de genes *cry1* e *cry2* e *vip3C*, para emprego em plantas transgênicas piramidizadas e também formulações de bioinseticidas. Estudos referentes à composição, à função e ao efeito tóxico das proteínas Vip3 podem contribuir para aumentar a eficácia do controle de pragas e retardar a seleção de resistência a toxinas de *B.thuringiensis* (FIGUEIREDO et al., 2013).

Tabela 2. Genes *cry* e *vip*. Sequências consensos comparadas com o banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/486>).

Sequência pesquisada	Posição dos nucleotídeos	Número de acesso NCBI	Autores e ano	Gene encontrado
AAGCTAAGCTATTTG	2018 – 2033	JF9164621	Hernandez et al, 2012	<i>vip3Ca2</i>
CGTGTAGGGATGGA	2438 – 2451	HQ439776	Liu et al, 2010	<i>cry1Aa16</i>
TCCTTGTCGCTAACGC	111 – 128	AF358861	Liu et al, 2001	<i>cry1Ab15</i>
AGACGAACTGAAATT	1157 – 1171	M73250	Feitelson et al, 1993	<i>cry1Ad1</i>
CAGTTGGTCAACTAA	770 – 784	AAL79362	Kao et al, 2003	<i>cry1Ca9</i>
TACTCTTGCGTCTGGT	1407 – 1418	CP010090	Zhu et al, 2014	<i>cry1Da3</i>
GGACTTCTTAAATAAT	890 – 905	M73253	Feitelson et al, 1993	<i>cry1Eb1</i>
TTTATAACAAGTTCAGT	791 – 805	M63897	Chambers et al, 1991	<i>cry1Fa1</i>
AAAGTGCGTTTAAAGG	681 – 697	ABL01536	Arango et al, 2008	<i>cry2Aa13</i>

CONCLUSÕES

O sequenciamento do isolado BR37 se mostrou eficiente já que permitiu a completa identificação de oito genes *cry* além de um gene *vip3Ca2*.

Foi possível a obtenção da sequência completa dos genes, permitindo a verificação de polimorfismos não observável pela técnica de PCR.

O isolado BR37 apresenta potencial para ser utilizado como fonte de genes no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas com expressão de proteínas tóxicas para o controle de pragas da ordem Lepidoptera.

LITERATURA CITADA

ALI, S.; ZAFAR, Y.; ALI, G. M.; NAZIR, F. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**. 9: 2022-2031. 2010.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. AND LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. 215: 403-10. 1990.

AMARAL, A.M.; REIS, M.S.; SILVA, F.R. O programa *BLAST*: Guia prático de utilização. 24p. Documentos, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 1676-1340, n. 224, 2007.

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.

ARORA, N. et al. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Biophysical Research Communications**. 310: 158-162. 2003.

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

ARANDA, E. et al. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996.

BETZ, F.S., B.G. Hammond and R.L. Fuchs Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 32:156-173. 2000.

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**. 41: 323 – 342, 2006.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strains collection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 4965-4972. 1998.

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

BETTIOL W. Biopesticides use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management**, Hemel Hempstead. 22: 280-283. 2011.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.

H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34. p.843-850, 2001.

CAPALBO D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BOREM A.; del Giudice, M. (Eds). **Biotecnologia e meio ambiente**. p. 425. 2008.

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECAL, L.; BRAVO, A. Specific PCR Primers Directed to Identify *cryI* and *cryIII* Genes within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied Environmental Microbiology**. 61: 3826 – 3831. 1995.

CHAK, K.F., CHAO, D.C., TSENG, M.Y., KAO, S.S., TUAN, S.J. AND FENG, T.Y. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolated from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**. 60, 2415-2420.1994.

CHALLACOMBE, J. F.; ALTHERR, M. R.; XIE, G.; 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.; HAN, C. S.; HILL, K. K.; HITCHCOCK, P.; JACKSON, P. J.; KEIM, P.; KEWALRAMANI, A. R.; LONGMIRE, J. L. S.; MALFATTI, S.; MARTINEZ, D.; 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.; SAUNDERS, E.; TAPIA, R.; TESMER, J. G.; THAYER, N.; THOMPSON, L. S.; TICE, H.; TICKNOR, L. O.; WILLS, P. L.; GILNA, P. Brettin TS. The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. **Journal Bacteriology**. 189:3680–3681. 2012.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHENPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: janeiro, 2015.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62, 807-813. 1998.

DELÉCLUSE, A.; CHARLES, J. F.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Deletion by *in vivo* recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp.*israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. **Journal Bacteriol.** 173: 3374-3381. 1991.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCNEPF, E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**. 37: 409-433. 2001.

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**. 4: 9-13. 1999.

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

- ESTRUCH, J. J.; WARREN, G.; MULLINS, M.; NYE, G.; CRAIG, J.; KOZIEL, M. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 93: 5389-5394. 1996.
- FERRÉ, J.; VAN, R.; J, MACINTOSH, S. C. **Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM)**, p 41–85 In ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. editors. (ed), Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer, New York, NY. 2008.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**. 47:501-533. 2002.
- FIGUEIREDO, C. S.; MARUCCI, S. C.; TEZZA, R. I. D.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Caracterização do gene vip3A e toxicidade da proteína Vip3Aa50 à lagarta-do-cartucho e à lagarta-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.48, n.9, p.1220-1227, set. 2013.
- FIUZA, L. M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 84-89, 2004.
- FIUZA, L.M., et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidea): evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1544-1549, 1996.
- GALPERIN, M. Y.; KOONIN, E. V. From complete genome sequence to 'complete' understanding?. **Trends Biotechnol**. 28: 398-406. 2010.
- GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. **Proceeding of the National Academic of Science**. 79: 6951 -6955. 1982.
- GOLDBERG, L. J.; MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. **Mosquito News**. 37:355-358. 1977.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review Entomology**. 43: 701-726. 1998.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety***. Wiley & Sons. 2000.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba : Fealq. p. 383-446. 1998.
- HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied Environmental Microbiology**, 67: 185 – 189. 2001.
- HE, J.; SHAO, X. ZHENG, H. LI.; M, WANG, J.; ZHANG, Q.; LI, L.; LIU.; SUN, M.;

- WANG, S.; YU, Z. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. **Journal Bacteriology**. 192:4074–4075. 2010.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; NAVARRO-CERRILLO, G.; CACCIA, S.; MAAGD, R. A.; MOAR, W. J.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S.; Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS ONE**. v. 5, n. 9. 2010.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242 – 255, jun. 1989.
- HOSSAIN, F.; PRAY, C. E.; LU, Y.; HUANG, J.; FAN, C.; HU, R. Genetically modified cotton and farmer's health in China. **International Journal of Occupational and Environmental Health**.10: 293-303. 2004.
- JAMES, C. **Global review of commercialized transgenic crops: 2006**. ISAAA (Briefs, 36: Preview). Ithaca: ISAAA, p. 20. 2006.
- KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBRUCH, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**: 96: 500-508. 1983.
- KUCZYNSKI, J.; LIU, Z.; LOZUPONE, C.; MCDONALD, D.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Microbial community resemblance methods differ in their ability to detect biologically relevant patterns. **Natural Methods**. 7: 813-819. 2010.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapes-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, n. 9, p. 357-359, 2012.
- LECADET, M. M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n.3, p. 840-849, mar. 1992.
- LERECLUS, D.; ARANTES, O. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Gene**. 108: 115-119. 1993.
- LOGUERCIO, L.L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**. 32: 362-367. 2001.
- MARTINEZ, C.; CABALLERO, P. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**. 92: 745-752. 2002.
- MAHILLON, D. J.; REZSOHHAZY, R.; HALLET, B.; DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica**. 93: 13 – 26. 1994.
- MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA, 264p. 1998.

MELATTI, V.; BATISTA, A. C.; DEMO, C.; PRAÇA, L.; MONNERAT, R.G. Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. v. 88, p. 1-14, 2005.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioensetecidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de ação e resistência. In: ITAMAR MELO. (Org.). Controle Biológico. 1 ed. São Paulo: Embrapa, v. 3, p. 163-192. 2000.

MONNERAT, R. G. ; SOARES, C. M. S. ; GOMES, A. C. M. ; JONES, G. ; MARTINS, E. ; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. *Microbial Biotechnology*, 2: 1560-1562. 2009.

MOSCARDI, F. Problemática das populações dos insetos pragas em desequilíbrio e a retomada do MIP. XXX Reunião de Pesquisa de soja da região central do Brasil, Rio Verde, 2008.

NODARI, R. O.; GUERRA, P. M. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Caderno de Ciência e Tecnologia**. 18: 81 -116. 2001.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). SNPdb. Rockville Pike, Bethesda MD, USA. [2013]. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> > acesso em 25/01/2015.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection reality and prospects. **Crop Protection**. 19: 669-676. 2000.

OESTERGAARD, J. et al. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa Toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 73, n. 11, p. 3623-3629, jun. 2007.

PALMA, L., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S. , MAEZTU, M., MARTÍNEZ, P. H., ESCUDERO, I. R., ESCRICHE, Baltasar., MUÑOZ, D., VAN RIE, J., FERRÉ, J., CABALLERO, P. Vip3C, a Novel Class of Vegetative Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**. 78: 197163-7165. 2012.

PENG, G.; PENG, A.; XIAOJUAN, D.; JING, Z.; LIZHI, X.; JUN, Z.; QIAO, L.; QIMING D.; SHUANGCHENG, L.; SHIQUAN, W.; HUANNIAN, L.; LINGXIA, W.; PING, L.; AIPING, Z. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Serovar Sichuansis Strain MC28. **Journal Bacteriology**. 194: 6975. 2012.

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

PÉREZ, C. et al. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa 31 functions as membrane bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n.

51, p. 18303-18318, jun. 2005

PERLAK, F.J. et al. Insect resistant cotton plants. *Bio/technology London*, v.8, p.939-943, 1990.

PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**.71: 255 – 281, 2007.

PIERCE, A. B. **Genética: Um Enfoque Conceitual**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**. 7: 1-10. 2003.

POP, M.; SALZBERG, S. L. Bioinformatics challenges of new sequencing technology. *Trends in Genetics*. v. 24, n. 3, p. 142-149, 2008.

RICIETO, A. P. S.; Fazion, F. A. P.; CARVALHO FILHO, C. D.; VILAS-BOAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**. 59: 28-33, 2013.

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

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; LEAMON, J. H.; JOHNSON, K.; MILGREW, M. J.; EDWARDS, M.; HOON, J.; SIMONS, J. F.; MARRAN, D.; MYERS, J. W.; DAVIDSON, J. F.; BRANTING, A.; NOBILE, J. R.; PUC, B. P.; LIGHT, D.; CLARK, T. A.; HUBER, M.; BRANCIFORTE, J. T.; STONER, I. B.; CAWLEY, S. E.; LYONS, M.; FU, Y.; HOMER, N.; SEDOVA, M.; MIAO, X.; REED, B.; SABINA, J.; FEIERSTEIN, E.; SCHORN, M.; ALANJARY, M.; DIMALANTA, E.; DRESSMAN, D.; KASINSKAS, R.; SOKOLSKY, T.; FIDANZA, J. A.; NAMSARAEV, E.; MCKERNAN, K. J.; WILLIAMS, A.; ROTH, G. T.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**. v. 475, p. 348-352, 2011.

SAADOUN, I.; AL-MOMANI, F.; OBEIDAT, M.; MEQDAM, M.; ELBETIEHA, A. Assessment of toxic potential of local Jordanian *Bacillus thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera). *Journal of Applied Microbiology* v. 90, p. 866–872, 2001.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENO, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of d entotoxinas genes with diferente insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7. 29. **Molecular Microbiology**. 2: 393-404. 1998.

SANTOS, K.B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A.M.; SANTOS, R.B.; SANTOS, W.J.; VILAS-BÔAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**. 50: 157 – 163. 2009.

- SAUKA, D.H.; COZZI, J.G.; BENINTENDE, G.B. Detection and identification of cryII genes in *Bacillus thuringiensis* using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **Current Microbiology**, v.52, p.60-63, 2006.
- SENA, J. A.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* CryI and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**. 75: 2236-7. 2009.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews**. 62: 775-806. 1998.
- SCHNEPF, E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. 78: 2893-2897. 1981.
- SHEN, J.; HOU, M.; GUO, W. Identification and cloning of vip3A genes from isolates of *Bacillus thuringiensis* and their bioactivity analysis. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, v.49, p.110-116, 2009.
- SILVA, C. C. K. Controle alternativo de *Spodoptera frugiperda* (Smith) e *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae). 2011. 56 f. **Dissertação de Mestrado em Agronomia** – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.
- SILVA, S. B.; SILVAWERNECK, J.O.; FALCAO, R.; OLIVEIRA NETO, O.B.; SÁ, M. F.G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R.G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. *Journal of Applied Entomology*, v. 128, p. 1-6, 2004.
- SONG, F.; ZHANG, J.; GU, A.; WU, Y.; HAN, L. H. E, K.; CHEN, Z.; YAO, J.; HU, Y.; LI, G.; HUANG, D. Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**. 69: 5207 – 5211. 2003.
- SUN, Y.; FU, Z.; DING, X.; XIA, L. Evaluating the insecticidal genes and their expressed products in *Bacillus thuringiensis* strains by combining PCR with Mass Spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. 74: 6811 – 6813. 2008.
- SHEPPARD, A. E.; POEHLEIN, A.; ROSENSTIEL, P.; LIESEGANG, H.; SCHULENBURG, Hinrich. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry. **Genome Announcements**. 2013.
- TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L. J.; MEDRADO-ROLDÁN, H.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; GÓMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R. S. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización em México, **Ciência UANL**.4: 143-152. 2001.
- TAN, F. et al. Rapid cloning, identification, and application of one novel crystal protein gene **cry30Fa1** from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**. 302:46–51. 2010.
- TAN, F. et al. Cloning and characterization of two novel crystal protein gene, **cry54Aa1**

and **cry30Fa1**, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. **Current Microbiology**. 58:654–659. 2009.

THULER, A. M. G.; THULER, E. S.; CICERO, E. S.; BORTOLI, S.A.; LEMOS, M. V.F. Estudo da variabilidade gênica em isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* para emprego no controle biológico de *Plutella xylostella*. *Bol. San. Veg. Plagas*. 33:409-417. 2007

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency and US Department of Agriculture. 1999. **Report of EPA/USDA workshop on Bt Crop Resistance Management in Cotton**. Memphis, Tennessee. August 26, 1999. Esther Day, ed. 80p. American Farmland Trust, Center of Agriculture in the Environment. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>>. Acesso em: jan. 2015.

VIDAL-QUIST, J.C., CASTAÑERA, P., and GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. **Journal Microbiology Biotechnol**. 19: 749 – 759. 2009.

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

VILAS-BÔAS, G.T.; PERUCA, A.P.S. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**. 53: 673 – 68. 2007.

VISSER. B. E.; MUNSTERMAN, STOKER, A.; DIRKSE, W.G. A Novel *Bacillus thuringiensis* Gene Encoding a *Spodoptera exigua* - Specific Crystal Protein. *J. Bacteriol*. 172: 6783-6788. 1990.

WANG, J.; STEGGLES, J. R.; ELLA, D. J. Molecular characterization of virulence defects in *Bacillus thuringiensis* mutants. **FEMS Microbiol Lett**. 127–134. 2008.

WHITELEY, A. S.; JENKINS, S.; WAITE, I.; KRESOJE, N.; PAYNE, H.; MULLAN, B.; ALLCOCK, R.; O'DONNELL, A. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the *Ion Torrent* (PGM) platform. **Journal of Microbiological Methods**. v. 91, p. 80-88, 2012.

WU, K.; Mu, W.; LIANG, G.; GUO, Y. Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. **Pest Management Science**. 61:491–498. 2005.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. **Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pest**. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN – LE ROUX, C. (Ed). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 81–100. 2000.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**. 63: 532-536. 1997