



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA SCARAMAL RICIETTO

**ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS Cry E Vip DE
*Bacillus thuringiensis***

Londrina
2017

ANA PAULA SCARAMAL RICCIETTO

ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS Cry E Vip DE
Bacillus thuringiensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Gislayne Trindade Vilas-Bôas

Londrina
2017

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

Ricetto, Ana Paula Scaramal.

Análise funcional de proteínas Cry e Vip de *Bacillus thuringiensis* / Ana Paula Scaramal Ricetto. - Londrina, 2017.
92 f. : il.

Orientador: Gislayne Trindade Vilas-Bôas.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas inseticidas - Tese. 2. Interações sinérgicas e antagonicas - Tese. 3. Clonagem e expressão - Tese. 4. Análise de genoma - Tese. I. Vilas-Bôas, Gislayne Trindade. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

ANA PAULA SCARAMAL RICCIETTO

ANÁLISE FUNCIONAL DE PROTEÍNAS Cry E Vip DE *Bacillus thuringiensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Rose Monnerat
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
Embrapa Cenargem

Dr. Everton Ricardi Lozano Silva
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr. Pedro Oliveira Janeiro Neves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2017

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus... Muito, nos aproxima!”

Louis Pasteur

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar”.

Bertrand Russell

Aos meus pais, ***Luiz*** e ***Luzia***, por serem tão ímpares. Por se fazerem tão presentes nessa grande jornada que é a vida. A medida de amar é amar sem medidas!

Dedico e ofereço

Agradecimentos

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”.

Cora Coralina

À minha grande família (*Scaramal Ricietto*) pelo carinho e incentivo durante a execução desta tese. Especialmente à minha irmã *Mariani* que compartilhou comigo os momentos de insegurança e felicidade, de incertezas e decisões e tudo com muito amor.

Às minhas avós *Laurinda e Miguelina*, (*in memoriam*), que sempre me surpreendiam com seus exemplos e histórias, o que sempre nos mostra que os avós são fonte de sabedoria e serenidade.

Aos meus avôs *Antônio* (*in memoriam*) que sempre dizia: “um dia, elas crescem!” e *Isaías* (*in memoriam*), que eu não conheci, mas me presenteou com a mulher da minha vida.

À minha orientadora querida, *Dr^a. Gislayne Trindade Vilas-Bôas*, são tantos os agradecimentos que tenho. Mas aqui, em especial, agradeço por compartilhar seus conhecimentos, orientação, conselhos e incentivos durante todos estes anos; todas essas valiosas contribuições proporcionaram o meu crescimento científico. Obrigada por compartilhar seu caráter, seus ideais e por participar da sua família, estas também ajudaram a lapidar minha pessoa. Por tudo isso, serei eternamente grata!

Ao *Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas*, mais uma vez agradeço pelos “bons dedos de prosa” que mudaram os rumos da minha vida. Sigo-o admirando pela

simplicidade e leveza que tornam a vida mais bela. Obrigada pelos ensinamentos. Obrigada pela amizade!

Ao *Dr. Juan Ferré* pela oportunidade de desenvolver parte desta tese em seu laboratório. Grata pela disponibilidade e orientação não somente na realização deste trabalho, mas durante a minha estada em Valencia tornando-a mais tranquila e feliz.

Aos membros da banca: *Dr^a. Rose Monnerat, Dr. Everton Ricardi Lozano Silva, Dr^a. Daniele Sartori e Dr. Pedro Oliveira Janeiro Neves* pelas contribuições e correções deste trabalho.

À minha grande amiga e parceira em toda essa trajetória e aventura que foi a pós-graduação, *Fernanda Fazion*. Sempre “concorremos” em tudo, desde seleção do mestrado até doutorado, mas isso nunca foi obstáculo para a grande amizade que nasceu. Dividimos inseguranças, cansaços, alegrias, fotos e um belo e que belo tempo pela Europa. Obrigada “Ferzoca” pela convivência, cumplicidade e amizade!

Aos amigos do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias e agregados, *Carla, Priscilla, Fernanda Henrique, Felipe, João Antônio, Renan, Kátia, Same, Roberta, Yan, Nathalia e Maria Paula* muito grata pela convivência, pelos risos e sorrisos!

Aos ex-integrantes e grandes amigos deste laboratório *Josi, Deco, Gabe, Amandinha* e *Janaína* muito obrigada pelos momentos vividos, pelas risadas e parceria. Levo-os todos em meu coração!

Aos integrantes do Laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade de Valencia: *Maissa Chakroun, Leila Gasmi, Rosa Gonzalez, Patricia Hernández-Martínez, Yolanda Bel, Joaquín Gomis-Cebolla, Àngel Llopis, Hanane Djenane,*

Daniel Pinos, Sara Hernández-Rodríguez, Joel Gonzalez Cabrera, Baltasar Escriche e Salvador Herrero pelos ensinamentos, apoio e amizade. ¡Os echo de menos!

À coordenação, professores e demais colegas da pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pelo convívio e aprendizado.

Aos amigos de *sempre*, às vezes a distância e situações me mantiveram ausente, mas vocês sempre estiveram e continuam *do lado de dentro...*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal (CAPES), aos programas de Cooperação Internacional CAPES/MINCYT/2011 e Doutorado Sanduíche no Exterior/2015 pela concessão da bolsa de estudos e apoio durante os estudos na Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas (Argentina) e Universidad de Valencia (Espanha).

E por fim, agradeço a *Deus* que sempre, de uma forma ou outra, testou a minha fé e em todas confirmou a máxima que *Ele* escreve certo por linhas tortas!

That's all folks!!

RICIETTO, Ana Paula Scaramal. **Análise funcional de proteínas Cry e Vip de *Bacillus thuringiensis***. 2017. 92 f. Tese do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica, gram-positiva e formadora de esporos, pertencente ao grupo do *Bacillus cereus* que possui atividade inseticida principalmente ligada às proteínas inseticidas Cry, além da produção de outros fatores de virulência como fosfolipases, enterotoxinas, metaloproteases, hemolisinas e citotoxinas. Proteínas Cry são produzidas durante a fase de esporulação, enquanto as proteínas Vip são sintetizadas durante o crescimento vegetativo. Estas proteínas apresentam modo de ação e interação com receptores de membrana distintos, permitindo o uso de ambas às proteínas para o controle de insetos. A revisão desta tese aborda a descrição e o emprego de *B. thuringiensis* no controle biológico de insetos, as principais proteínas entomopatogênicas, interações e modos de ação destas. O primeiro artigo relata o uso das toxinas de *B. thuringiensis* no controle de *Grapholita molesta* e os efeitos antagônicos observados entre Cry e Vip para este inseto. No segundo trabalho, a clonagem e expressão de proteínas Vip1Bb3 e Vip2Bb4 são descritos. Estas proteínas são toxinas binárias com atividade frente a coleópteros. E ao final, uma terceira publicação que analisa o genoma da linhagem de *B. thuringiensis* BR145. A toxicidade desta linhagem foi avaliada para *Helicoverpa armigera* (LC50 0,294 µg.cm⁻²) e *Chrysodeixis includes* (LC50 0,277 µg.cm⁻²), importantes pragas agrícolas. Os estudos desenvolvidos nesta tese contribuem para melhor compreensão destas proteínas e contribuirão para a contínua utilização destas proteínas nas tecnologias Bt visando um controle mais efetivo de insetos-pragas.

Palavras-chave: *B. thuringiensis*. Cry e Vip. Interações. clonagem e expressão. genoma.

RICIETTO, Ana Paula Scaramal. **Functional Analysis of Cry and Vip proteins of *Bacillus thuringiensis***. 2017. 92 p. Thesis (Doctorate in Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina., Londrina, 2017.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic spore-forming bacterium belonging to the *Bacillus cereus* group, which has its insecticidal activity mainly linked to Cry and Vip proteins, despite the production of other virulence factors as phospholipase, enterotoxin, metalloprotease, hemolysin and cytotoxin. Cry proteins are produced during the sporulation phase and released with spores while Vip proteins are synthesized during the vegetative growth. These proteins show different mode of action and interaction with distinct membrane receptors, allowing the use of both toxins for the control of insects. The thesis review approach the description and the use of *B. thuringiensis* in the biological control of insects, the main entomopathogenic proteins, interactions and modes of action. The first paper reports the use of toxins of *B. thuringiensis* to *Grapholita molesta* control and antagonics effects between Cry and Vip proteins for this insect. In the second publication, cloning and expression of Vip1Bb3 and Vip2Bb4 proteins is described. These proteins are binary toxins with insecticidal activity against Coleopteran insects. Finally, the last paper analyses the genome of *B. thuringiensis* BR145. The toxicity of this strain was evaluate against *Helicoverpa armigera* (LC50 0,294 µg.cm⁻²) and *Chrysodeixis includes* (LC50 0,277 µg.cm⁻²), important agricultural pests. The studies developed in this thesis contribute to a better understanding of these proteins and will contribute to the continuous use of these proteins in Bt technologies aiming at a more effective control of insect pests.

Key words: *B. thuringiensis*. Cry and Vip. Interaction. cloning and expression. genome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Visão esquemática da nomenclatura para δ -endotoxinas e toxinas secretáveis.....	29
Figura 2 –	Representação parcial da diversidade das toxinas Cry	30
Figura 3 –	Estrutura tridimensional Cry1Aa e seus domínios	31
Figura 4 –	Modo de ação das proteínas Cry: formação de poros e transdução de sinal	34
Figura 5 –	Modo de ação das proteínas Cry: duplo modo	35
Figura 6 –	Receptores moleculares da proteína Cry1Aa	37
Figura 7 –	Modelo proposto de ação para as toxinas binárias Vip1/Vip2	41
Figura 8 –	Modelo proposto de ação para as proteínas Vip3	44
	Publicação II	
Figura 1 –	SDS-PAGE de lisado de <i>B. thuringiensis</i> 407 Cry-	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D-Cry	Proteínas Cry de três domínios
Aa	Aminoácidos
Amp	Ampicilina
AMP	Adenosina monofosfato
APN	N-aminopeptidase
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bin-like	Semelhante às proteínas binárias
CADR	Glicoproteína caderina
C-terminal	Região carboxi terminal de uma proteína
<i>cry</i>	Gene <i>cry</i>
Cry	Proteína cristal
Cyt	Proteína citolítica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Deoxi-ribonucleotídeos trifosfato
D.O600	Densidade óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EXT_MTX	Toxinas Epsilon e/ou Mosquitocida
g	Gramma
<i>g</i>	Unidade de força centrífuga
Gal-Nac	N-acetil galactosamina
GCR	Proteína glicoconjugada
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Horas

Kb	Quilobase – 10^3 pares de bases
kDa	Quilo Dalton
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LB ágar	Meio de cultura Luria-Bertani sólido
LB amp	Meio de cultura Luria-Bertani com ampicilina
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
N-terminal	Região amino-terminal de uma proteína
ORF	Fase de leitura aberta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFT	Toxinas formadoras de poros
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomoles
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
Sip	Proteína inseticida secretada
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
TEB	Tris-borato EDTA

<i>vip</i>	Gene <i>vip</i>
Vip	Proteína inseticida vegetativa
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius
σ	Fatores Sigma

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUÇÃO	17
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 <i>Grapholita molesta, Helicoverpa armigera e Chrysodeixis includens</i>	20
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
2.2.1 Genoma de <i>B. thuringiensis</i>	26
2.2.2 Proteínas Cry	27
2.2.2.1 Mecanismo de ação das proteínas Cry	32
2.2.3 Receptores de proteínas inseticidas	36
2.2.4 Proteínas Vip	38
2.2.4.1 Vip1/Vip2	39
2.2.4.1.1 Modo de ação das proteínas Vip1/Vip2	40
2.2.4.2 Vip3	42
2.2.4.2.1 Modo de ação das proteínas Vip3	43
2.2.5 Interações entre proteínas Cry e Vip	44
2.2.6 Plantas Bt	46
III. OBJETIVO GERAL	48
3.1 Objetivos Específicos	48
PUBLICAÇÕES	
PUBLICAÇÃO I	51
PUBLICAÇÃO II	57

	PUBLICAÇÃO III	73
VII.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
VIII.	REFERÊNCIAS	81

I. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva caracterizada pela produção de proteínas que apresentam atividade entomopatogênica, como as proteínas Cry produzidas durante a fase de esporulação, e as proteínas Vip sintetizadas durante a fase de crescimento vegetativo desta bactéria. Esta espécie apresenta uma ampla e específica atividade inseticida frente a diferentes insetos de diversas ordens, sendo as ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera as mais estudadas, visto que, os insetos pertencentes a essas ordens, são considerados grandes causadores de perdas agrícolas e responsáveis pela disseminação de diversas doenças (VILAS-BÔAS et al., 2007).

Esta bactéria tem sido empregada no controle biológico em todo o mundo e a tendência em utilizar esse agente biológico nas estratégias de controle é conferida pelas vantagens que este micro-organismo apresenta como especificidade, inocuidade a organismos não alvos e menor risco ambiental. Com estas características, *B. thuringiensis* integra o mercado de bioinseticidas que corresponde a 2% em todo o mundo representando 80% do comércio (BRAR et al., 2006; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; CRAVA et al., 2014) e, mais recentemente, vem sendo utilizado como fonte de genes para construção de plantas transgênicas com a finalidade de diminuir a seleção de insetos resistentes (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013; CARRIÈRE; CRICKMORE; TABASHNIK, 2015).

Entretanto, algumas populações de insetos foram selecionadas quanto à resistência às proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*. O primeiro caso relatado em

campo foi *Plutella xylostella* que foram selecionados pela resistência às proteínas Cry presentes nos produtos Bt após as pulverizações. Adicionalmente, considerando as plantas Bt, foram comunicados casos de seleção de *Spodoptera frugiperda*, *Busseola fusca* e *Helicoverpa armigera* e *H. zea* resistentes às proteínas Cry (TABASHNIK; WU; WU, 2012; WELCH et al., 2015). Com isso, a busca por novos genes, novas táticas e estratégias tem sido desenvolvidas com a finalidade de retardar a seleção de resistência pelos insetos.

Uma dessas estratégias é o emprego de plantas transgênicas piramidadas, as quais combinam vários genes inseticidas. O fato das proteínas Cry e Vip não compartilharem os mesmos receptores de membrana favorece o desenvolvimento de plantas transgênicas que combinam diferentes proteínas com atividade inseticida e modos de ação diferentes e/ou similares, o que pode, potencialmente, retardar o aparecimento de insetos resistentes.

Desta forma, levando-se em consideração o grande acúmulo de informações sobre a biologia de *B. thuringiensis*, sua atividade entomopatogênica e utilização no controle biológico, decidimos compor essa tese com três publicações que abrangem, parcialmente, a aplicabilidade desta bactéria.

No primeiro artigo, nós estudamos a interação sinérgica e/ou antagônica entre as proteínas Cry e Vip através da avaliação em conjunto destas toxinas frente ao lepidóptero *Grapholita molesta* Busck, 1916 (Lepidoptera: Tortricidae), uma importante praga que ocasiona danos em plantas frutíferas.

Na segunda publicação, nós optamos por clonar e expressar dois novos genes *vip* (*vip1Bb3* e *vip2Bb4*). As proteínas binárias Vip1/Vip2 tem seu modo de ação diferente das proteínas inseticidas Cry e Vip3 e assemelham-se às proteínas

de um grupo diferente de bactérias (*Clostridium sp.*). No entanto, essas proteínas também são formadoras de poros e possuem atividade inseticida frente a coleópteros.

E, por fim, a terceira publicação, a qual contém a descrição do genoma de *B. thuringiensis* BR145. Esse isolado apresenta atividade entomopatogênica contra *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidade) e *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae). A análise do genoma possibilitará a identificação de novos genes inseticidas para futuras aplicações.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Grapholita molesta*, *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens*

Grapholita molesta Busck, 1916 (Lepidoptera: Tortricidae) ou mariposa oriental é um inseto-praga polífago, economicamente importante em todo o mundo, que ocasiona danos em espécies frutíferas da família Rosaceae, como ameixas, cerejas, damascos, caqui, marmelo, nectarinas, sendo considerada praga primária em pêssegos e secundária em peras e maçãs (KIRK; DORN; MAZZI, 2013; SILVA-BRANDÃO et al., 2015; LI et al., 2016).

Os danos provocados pela mariposa oriental atingem tanto brotações quanto frutos. Contudo, os prejuízos de maior importância econômica ocorrem nos frutos, uma vez que esta lagarta forma galerias internas na polpa e libera seus excrementos na superfície do fruto depreciando seu valor de mercado. Adicionalmente, as infestações por *G. molesta* também são responsáveis por danos indiretos atuando como porta de entrada para infecções secundárias aos seus hospedeiros (MYERS; HULL, 2007; BATISTA NETO, 2013).

Nativa da China, esta espécie está amplamente distribuída encontrando-se em todas as regiões temperadas da Ásia, Europa, Américas, África e Austrália. No Brasil, está presente em alguns estados das regiões Sul-Sudeste, como Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BATISTA NETO, 2013; KIRK; DORN; MAZZI, 2013; SILVA-BRANDÃO et al., 2015).

O controle da *G. molesta* é realizado principalmente por inseticidas sintéticos. Compostos como organofosforados, têm sido amplamente utilizados no manejo desta praga, sendo atualmente pouco efetivos pelo aparecimento de populações resistentes. Um fator que contribui para a baixa efetividade deste controle é o comportamento alimentar que mantém o inseto protegido nas plantas ou no interior dos frutos (KIM et al., 2011; CHAVES et al., 2014).

Como forma de driblar o mecanismo de resistência deste inseto a estes compostos, tem se planejado e empregado à substituição destes compostos por diferentes maneiras de controle, incluindo a utilização de novos grupos inseticidas, como exemplo neonicotinoides, espinosina, bem como o emprego das técnicas de interrupção do acasalamento com feromônios sexuais e a utilização de agentes biológicos como extratos florais e o parasitoide *Trichogramma* sp. (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (VARELA et al., 2011; CHAVES et al., 2014; JONES; KOPTUR; VON WETTBERG, 2016; MCGHEE et al., 2016).

Em relação ao emprego de *B. thuringiensis*, os produtos comerciais demonstram atividade inseticida no controle da mariposa oriental (MONTEIRO; SOUZA, 2010), contudo o controle não é efetivo devido ao comportamento alimentar desta praga que fica protegida no interior de plantas ou dos frutos (KIM et al., 2011; CHAVES et al., 2014).

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma das pragas mais danosas para a agricultura porque é uma lagarta de comportamento polífago que acarreta danos em culturas de interesse econômico como milho, soja, feijão, algodão, tomate, frutíferas e plantas ornamentais (CZEPAK; ALBERNAZ, 2013; SPECHT et al., 2013).

Os danos provocados pelo hábito alimentar desta espécie afetam folhas, caules, brotos, inflorescências, frutos e vagens, acarretando em perdas para a planta tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva (CZEPAK; ALBERNAZ, 2013).

Esta espécie é amplamente distribuída com registros na Europa, Ásia, África e Oceania. Posteriormente, surgiram também relatos da presença desta espécie nas Américas (CZEPAK; ALBERNAZ, 2013; TAY et al., 2013; ANDERSON et al., 2016; DOURADO et al., 2016). No Brasil, sua ocorrência foi relatada em 2013 nos estados de Goiás, Mato Grosso e Bahia, porém, em 2008, um espécimen de *H. armigera* foi coletado no Paraná (CZEPAK; ALBERNAZ, 2013; SPECHT et al., 2013; SOSA-GÓMEZ et al., 2016).

O controle desta espécie geralmente é realizado por inseticidas sintéticos, entretanto, métodos alternativos tem sido implementados como o algodão Bt (PARAMASIVA et al., 2014; LUONG et al., 2017). O primeiro país a empregar essa tecnologia em combate a *H. armigera* foi a Austrália, na década de 90, na tentativa de diminuir os níveis de resistência a inseticidas sintéticos empregados no controle desta praga (TAY et al., 2013; ANDERSON et al., 2016).

Atualmente no Brasil, esta praga é considerada uma das mais importantes e seu controle têm sido realizados com o emprego de inseticidas sintéticos e agentes biológicos como *B. thuringiensis* e vírus (PERINI et al., 2016). As grandes perdas ocasionados pela infestação de *H. armigera* também tem levado a considerar a implementação de culturas Bt para essa espécie (LEITE et al., 2014).

Chrysodeixis includens (= *Pseudoplusia*) Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta falsa-medideira, está distribuída

pelos Estados Unidos, América do Sul e Austrália utilizando as ilhas do Caribe durante o período de diapausa (PALMA et al., 2015). No Brasil, esta espécie foi considerada por muitos anos uma praga secundária com distribuições limitadas, porém, como uma lagarta polífaga, adaptou-se e tornou-se uma praga de importância econômica ocasionando prejuízos em importantes culturas de verão como soja, algodão, feijão e tomate, além de ser encontrada também em algumas espécies da família Brassicaceae (PALMA et al., 2015).

A lagarta falsa-medideira é controlada atualmente com inseticidas sintéticos e estes tem propiciado a seleção de resistência pelos insetos (SORGATTO; BERNARDI; OMOTO, 2015). Com isso, para espécies como esta, que apresenta comportamento polífago e dificuldade no controle por inseticidas sintéticos, há também o emprego de plantas Bt. No Brasil, o primeiro algodão Bt também expressando Cry1Ac foi liberado em 2005 (FUNICHELLO et al., 2013) e a primeira soja Bt expressando Cry1Ac foi registrada para uso comercial em 2011 e liberada para o cultivo em 2013 (YU et al., 2014). Considerando a resistência a Cry1Ac, gene único presente em Bollgard I® e o qual *C. includens* apresenta resistência, foi desenvolvida uma nova planta transgênica Bollgard II® que expressa não somente Cry1Ac como Cry2Ab (KNIGHT; HEAD; ROGERS, 2016). Nas culturas de feijão, o controle é feito com inseticidas sintéticos (QUINTELA, 2001) o que é válido para as culturas de tomate que também emprega a utilização de agentes biológicos como diversos parasitoides e pulverizações com *B. thuringiensis* (MOURA et al., 2014).

2.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram positiva, formadora de esporos, com atividade entomopatogênica associada aos seus fatores de virulência e a produção de proteínas inseticidas que apresentam atividades entomopatógenas contra larvas de diferentes ordens de insetos bem como, em alguns casos frente a espécies de outros Filos (VILAS-BÔAS et al., 2012; PALMA et al., 2014; DENG et al., 2015). Esta bactéria, em conjunto com outras 11 espécies (*Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus cytotoxicus* e *Bacillus toyonensis*, *Bacillus gaemokensis*; *Bacillus manliponensis* e *Bacillus bingmayongensis*) são consideradas como membros do grupo taxonômico do *Bacillus cereus sensu lato* (SANTOS et al., 2010; LIU et al., 2015; HENDRIKSEN, 2016; PATIÑO-NAVARRETE; SANCHIS, 2016).

Dentre as espécies deste grupo, *B. thuringiensis* compartilha características genômicas similares a *B. anthracis*, o agente patogênico do anthrax e *B. cereus* um patógeno oportunista de humanos causador de gastroenterites. Além de apresentarem genomas com similaridades elevadas, essas espécies possuem fenótipos relativamente idênticos, sendo possível distingui-las pelas características patogênicas codificadas por genes localizados principalmente em plasmídeos, como exemplo a síntese de cristais pelo *B. thuringiensis* (RASKO et al., 2005; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; SANTOS et al., 2010).

Esta bactéria apresenta em seu ciclo de vida duas fases: uma relacionada ao crescimento vegetativo e outra que é a fase de esporulação. No início da fase de crescimento vegetativo e ainda durante a fase estacionária de crescimento são

sintetizadas duas principais proteínas Cry e Cyt (denominadas δ -endotoxinas) (PERALTA; PALMA, 2017) que apresentam atividade entomopatogênica e citolítica. Estas proteínas são produzidas em quantidades elevadas e ao fim acumulam-se constituindo o cristal proteico e são liberadas juntamente com os esporos. Estas inclusões proteicas são codificadas por genes que se localizam com maior frequência nos plasmídeos e menor frequência no cromossomo bacteriano (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; PALMA et al., 2014).

As δ -endotoxinas são reconhecidas como fatores de virulência primários, contudo, outros fatores contribuem para a patogenicidade do *B. thuringiensis* como hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases, α -exotoxina, β -exotoxina e o próprio esporo (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; VIDAL-QUIST; CASTAÑERA; GONZÁLEZ-CABRERA, 2009; RAYMOND et al., 2010).

Além das proteínas Cry e Cyt sintetizadas em grande parte durante a esporulação, células de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa, produzem outras proteínas, que possuem atividades inseticidas conhecidas como Vip (proteínas vegetativas) e Sip (proteínas secretadas) que são secretadas no meio de cultivo e contribuem para a patogenicidade desta bactéria frente a insetos (CHAKROUN et al., 2012; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; PALMA et al., 2014; PALMA; BERRY, 2016).

B. thuringiensis foi isolado em 1901, por Shigetane Ishiwata, a partir de lagartas do bicho-da-seda *Bombyx mori* Lineu, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae) no Japão e descrito e classificado por Ernst Berliner em 1911 e 1915 na Alemanha, respectivamente, a partir de um isolamento em lagartas-da-traça de farinha *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) (SANCHIS, 2011).

Com características como alta especificidade e toxicidade para uma ampla variedade de insetos, esta bactéria é empregada no controle biológico de insetos considerados pragas agrícolas e também vetores de doenças. Os primeiros ensaios do uso de *B. thuringiensis* como agente biológico aconteceram durante a década de 20 frente à *Lymantria dispar* Lineu, 1758 (Lepidoptera: Lymantriidae) nos Estados Unidos e *Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796 (Lepidoptera: Pyralidae) na Europa. Com resultados positivos, em 1938, foi comercializado o primeiro produto à base de *B. thuringiensis* conhecido como Sporène produzido na França (SANCHIS, 2011; ZHANG; HUA; ADANG, 2016).

Atualmente, os inseticidas derivados deste agente representam 80% do mercado de bioinseticidas em todo o mundo e tendem a aumentar, uma vez que os genes que codificam as proteínas inseticidas estão sendo empregados com sucesso em novos formulados e no desenvolvimento de plantas transgênicas (CRAVA et al., 2014).

2.2.1 Genoma de *B. thuringiensis*

A sequência genômica de qualquer organismo é um recurso enriquecido de informações para os pesquisadores. As estruturas dinâmicas e funcionais dos genomas juntamente com as características peculiares de cada genoma estão sendo revelados com o progresso de novas análises genômicas.

Atualmente, 89 genomas de *B. thuringiensis* estão depositados no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), entre os quais 37

apresentam genomas completo e 52 são drafts de genomas (genomas com montagens parciais). Em geral, os genomas de *B. thuringiensis* variam de 4,93 Mb – 7,09 Mb e conteúdo G+C entre 34,5 e 35,5%.

Comumente, *B. thuringiensis* comportam entre 2 a 12 plasmídeos, dependendo da linhagem, com tamanhos variando entre 2 kb a 600 kb representando cerca de 10 – 20% do conteúdo genético total desta bactéria (Zhong et al., 2011). Em dados do NCBI, encontramos linhagens que portam 14 plasmídeos como *B. thuringiensis serovar thuringiensis str. IS5056* e a amplamente conhecida *B. thuringiensis serovar kurstaki – HD1*.

Entre as análises genômicas pode-se observar que genomas menores apresentam números menores de genes enquanto o inverso ocorre com genomas maiores. Com isso, os genes caracterizados a partir de genomas de *B. thuringiensis* auxiliam como uma ferramenta para a prospecção de novos genes que possam ser utilizados no controle biológico aumentando a eficácia e propiciando o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas (SWAMY; ASOKAN, 2013).

2.2.2 Proteínas Cry

Proteínas Cry podem ser definidas como uma inclusão proteica parasporal de *B. thuringiensis* que exibem atividade inseticida ou um efeito tóxico para organismos alvos e apresentam similaridade entre sequências de aminoácidos com outras proteínas Cry existentes (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; CRICKMORE, 2016). Estas são codificadas pelos genes *cry* que determinam os

distintos perfis de toxicidade destas proteínas. Isto é possível porque uma mesma linhagem de *B. thuringiensis* pode conter uma única cópia ou várias cópias de um mesmo gene *cry* e/ou vários genes *cry* diferentes, codificando a formação de diferentes proteínas Cry resultando em cristais proteicos com diferentes tipos de proteínas Cry (ARANTES; VILAS-BOAS; VILAS-BÔAS, 2002; PIGOTT; ELLAR, 2007; ROH et al., 2007).

As toxinas Cry e as demais proteínas com atividade tóxica como Vip, Cyt e Sip são classificadas unicamente de acordo com a identidade de seus aminoácidos, não considerando sua toxicidade, e a classificação considera quatro níveis de identidade. Aminoácidos que apresentam 45% de homologia em sua sequência são agrupados no primeiro ranque (Cry1, Cry2 etc.). Se essa proteína compartilha menos que 78% de identidade, será então atribuída ao segundo nível (Cry1A, Cry1C etc.); compartilhando até 95%, será classificada no terceiro ranque (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac etc.) e para o quarto ranque, a identidade deverá ser maior que 95% (Figura 1) (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; BRAVO et al., 2013; PALMA et al., 2014). Atualmente, são descritas mais de 750 proteínas Cry classificadas em 74 classes (CRICKMORE et al., 2017).

As análises filogenéticas das sequências de proteínas Cry mostraram que a família destas toxinas agrupam nesta classificação, além das toxinas 3D-Cry, outras proteínas não relacionadas filogeneticamente como as toxinas Etx/Mtx, algumas proteínas Bin-like com características binárias e as proteínas Cyt. A classificação destas proteínas como pertencentes à família Cry decorrem do fato que elas compartilham similaridades com as sequências de proteínas Cry, porém não apresentam a conservação característica dos blocos que compõem as proteínas 3D-

Cry (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

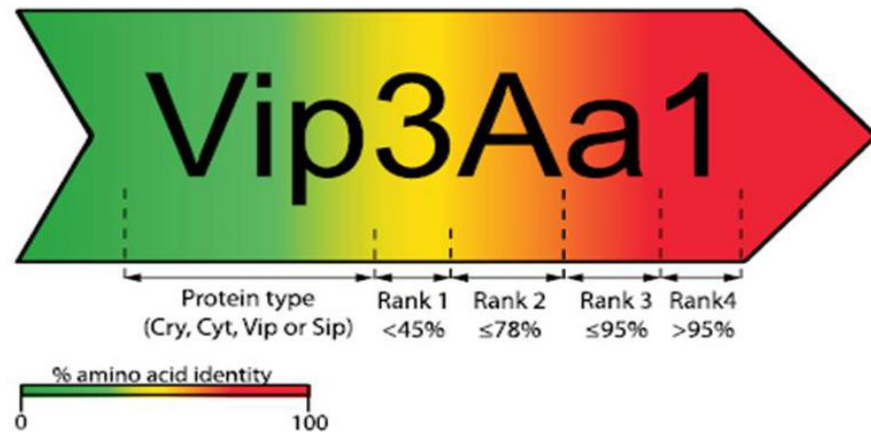


Figura 1. Visão esquemática da nomenclatura para δ-endotoxinas (Cry e Cyt) e toxinas secretáveis (Vip e Sip) (Palma et al., 2014).

Cinco blocos de aminoácidos conservados são encontrados na maioria das sequências. Essas regiões conservadas são frequentemente observadas em porções internas das proteínas e nas regiões de contato entre domínios, porém não obrigatórias, uma vez que algumas proteínas Cry não apresentam um ou mais blocos, como é o caso da Cry11, a qual não apresenta os blocos 3 e 5 (Figura 2), sugerindo que esses blocos possam estar relacionados com a estabilidade e a função destas proteínas (SCHNEPF et al., 1998; PIGOTT; ELLAR, 2007; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

Embora as proteínas 3D-Cry apresentem uma ampla variabilidade na especificidade para diferentes insetos e sequência de aminoácidos distintos, estas compartilham uma estrutura semelhante constituída por três domínios principais e

ativos que sugerem um modo de ação similar entre elas (Figura 3) (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; ZHANG; HUA; ADANG, 2016).

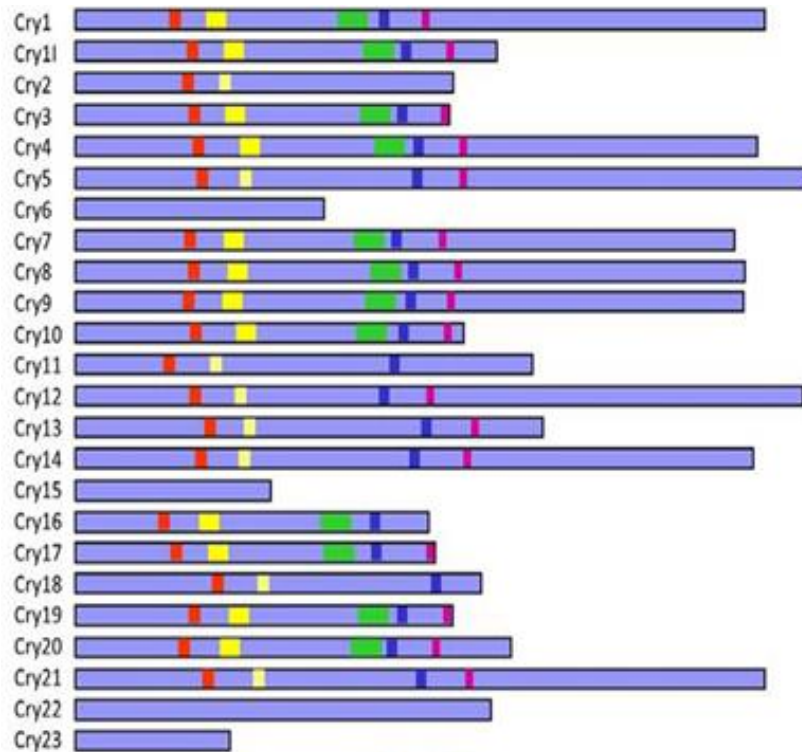


Figura 2. Representação parcial da diversidade das toxinas Cry. Blocos conservados descritos por Schnepf et al. (1998) são mostrados coloridos (Adaptado de Adang et al., 2014).

O domínio I, correspondente à porção amino-terminal destas proteínas, é formado por cadeias polipeptídicas constituídas de sete α -hélices, uma central e hidrofóbica ($\alpha 5$), envolto por outras seis cadeias anfipáticas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ e $\alpha 7$). Este domínio é responsável pela inserção desta na membrana e a formação do poro (BRAVO et al., 2013; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; ZHANG; HUA; ADANG, 2016).

O domínio II tem como função o reconhecimento dos receptores presentes no intestino médio do inseto, a ligação irreversível a estes receptores e a toxicidade desta toxina, uma vez que este domínio apresenta diversidade (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2016). Este domínio consiste de três folhas β -pregueadas antiparalelas e duas curtas hélices com um core hidrofóbico, dispostas numa forma triangular beta-prisma, com três projeções em forma de alças (1, 2 e 3) presentes no ápice da conformação (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; XU et al., 2014).

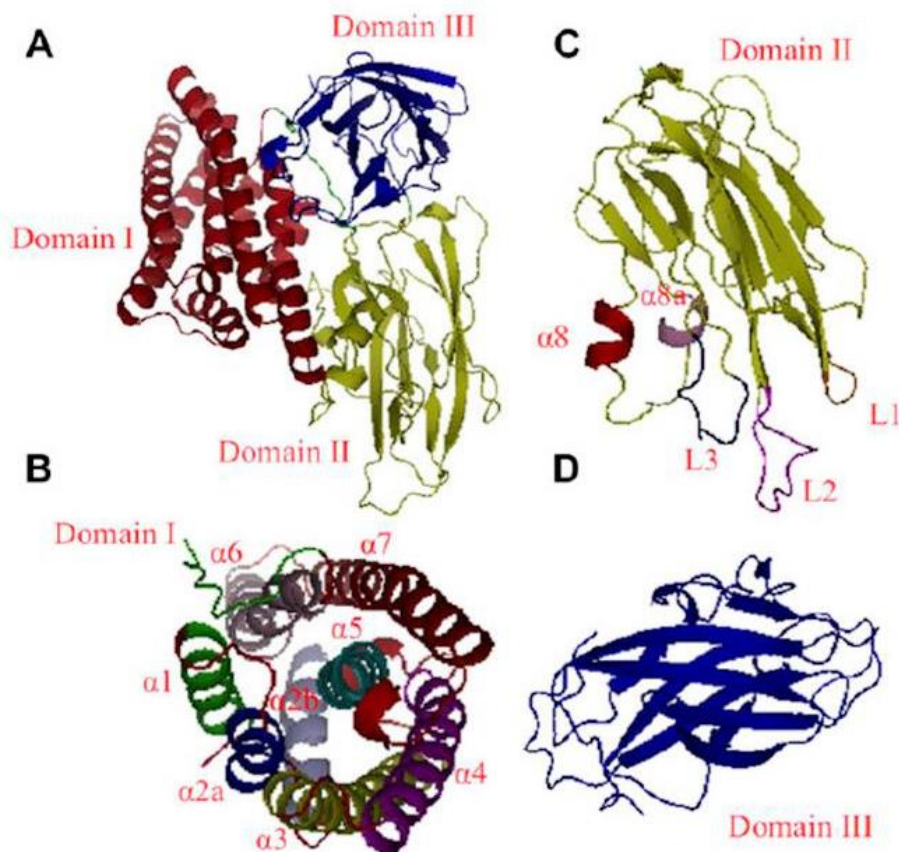


Figura 3. Estrutura 3-D Cry1Aa. A: visão geral dos três domínios de Cry1Aa na qual o domínio I está em vermelho, domínio II em azul e domínio III em verde. B: Domínio I com α -hélices em diferentes cores. C: Domínio II com α -hélices e alças; domínio III com duas folhas β -antiparalelas (Adaptado de Zhang et al., 2016).

O domínio III, referente à porção carboxi-terminal, possui conformação do tipo β -sanduíche, formado por duas folhas β -antiparalelas com alças que conferem a especificidade de ligação aos receptores celulares, da mesma forma que o domínio II, e a estabilidade estrutural da proteína, protegendo-a de degradação durante a proteólise (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2016; ZHANG; HUA; ADANG, 2016). Recentemente, a estrutura da proteína Cry1Ac foi melhor elucidada demonstrando que quatro novos domínios (IV, V, VI e VII) estão presentes na região C-terminal desta proteína. Os domínios IV e VI são formados por α -hélices enquanto os domínios V e VII são compostos fitas β e são responsáveis pelo dobramento das proteínas (EVDOKIMOV et al., 2014; TABASHNIK et al., 2015; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016).

2.2.2.1 Mecanismo de ação das proteínas Cry

Diferentes modelos de ação para as proteínas Cry têm sido propostos para descrever como os poros são formados nas membranas intestinais do inseto causando lise e conseqüentemente morte celular (GÓMEZ et al., 2014).

O modelo de ação designado “formação de poros” (Figura 4) consiste em etapas sequenciais que se iniciam com a solubilização da protoxina no intestino do inseto que apresenta, entre outras características, pH alcalino. Durante o processo de ativação, as proteases presente nessa região clivam essa proteína nas porções N e C-terminais removendo 43 e 500 aminoácidos respectivamente, gerando uma toxina de aproximadamente 60 kDa. Com isso forma-se um monômero, mantendo os três domínios, tornando essa toxina ativa. Em etapa posterior, essa toxina ativada

liga-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades do intestino médio do inseto (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; XU et al., 2014; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016).

De modo geral, a etapa de ligação da toxina acontece primeiramente aos receptores APN e ALP, os quais ela apresenta baixa afinidade nesse momento, porém estão presentes abundantemente na membrana, elevando a concentração das toxinas para o segundo passo de ligação – a interação com o receptor Caderina (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; GÓMEZ et al., 2014; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016).

A interação com a caderina é de alta afinidade e envolve epítipo diferentes da proteína e do receptor. Essa interação facilita o processamento proteolítico da α -hélice 1, presente na porção N-terminal, induzindo a formação de oligômeros. Estes, em etapa posterior, interagem novamente com receptores APN ou ALP, levando este oligômero a inserção na membrana. Com isso, poros não seletivos e permeáveis são formados acarretando na lise celular (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; GÓMEZ et al., 2014; BRETSCHNEIDER; HECKEL; PAUCHET, 2016).

Um modelo alternativo, conhecido como “transdução de sinal”, sugere que as proteínas que compartilham os três domínios não são formadoras de poros, mas ativam uma cascata sinalizadora através da interação das proteínas Cry com a caderina que atua como um receptor específico (ZHANG; HUA; ADANG, 2016). Neste modelo, propõe-se que a interação da proteína Cry diretamente com a caderina dispara uma via de sinalização intracelular que resulta na ativação da proteína G e adenilato ciclase, resultando no aumento da concentração de

adenosina monofosfato (AMP) cíclico intracelular e ativação da proteína quinase A, consequentemente ocasionando a desestabilização do citoesqueleto e a formação de canais iônicos na membrana (Figura 4) (ZHANG et al., 2006; BRAVO; SOBERÓN, 2008; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; XU et al., 2014).

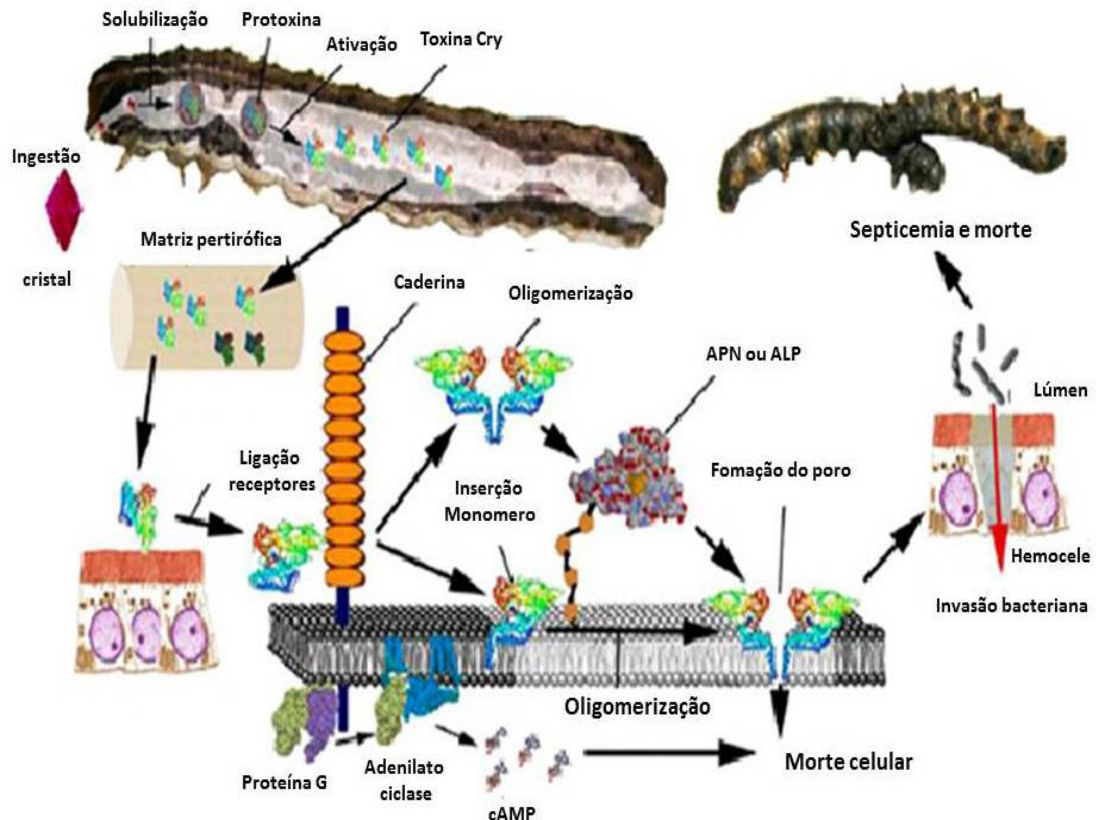


Figura 4. Representação dos modelos de “formação de poros” e “transdução de sinal”. Depois da ingestão dos cristais, a protoxina é solubilizada no intestino do inseto tornando-se toxina Cry ativa. A toxina atravessa a matriz peritrófica, ligando-se aos receptores presentes nas microvilosidades resultando na ativação do modelo de transdução de sinal e/ ou no modelo sequencial de formação de poros. Ambos ocasionam a morte do inseto (Adaptado e modificado de Adang et al., 2014).

Recentemente, outra hipótese tem sido discutida. O modelo de ação “modo duplo” (Figura 5) foi proposto por Gómez et al. (2014), no qual as diferentes proteases do intestino do inseto podem influenciar a ativação da proteína e com

isso, tanto a protoxina, quanto a toxina ativa pode matar insetos utilizando diferentes vias (GÓMEZ et al., 2014; TABASHNIK et al., 2015). Simplificadamente, nesse modelo, as toxinas e protoxinas ligam-se a caderina com afinidades similares e dois diferentes oligômeros são formados, distinguindo-se em tamanho, sensibilidade à temperatura, habilidade de inserção na membrana e características do poro (GÓMEZ et al., 2014; SOBERÓN; MONNERAT; BRAVO, 2016).

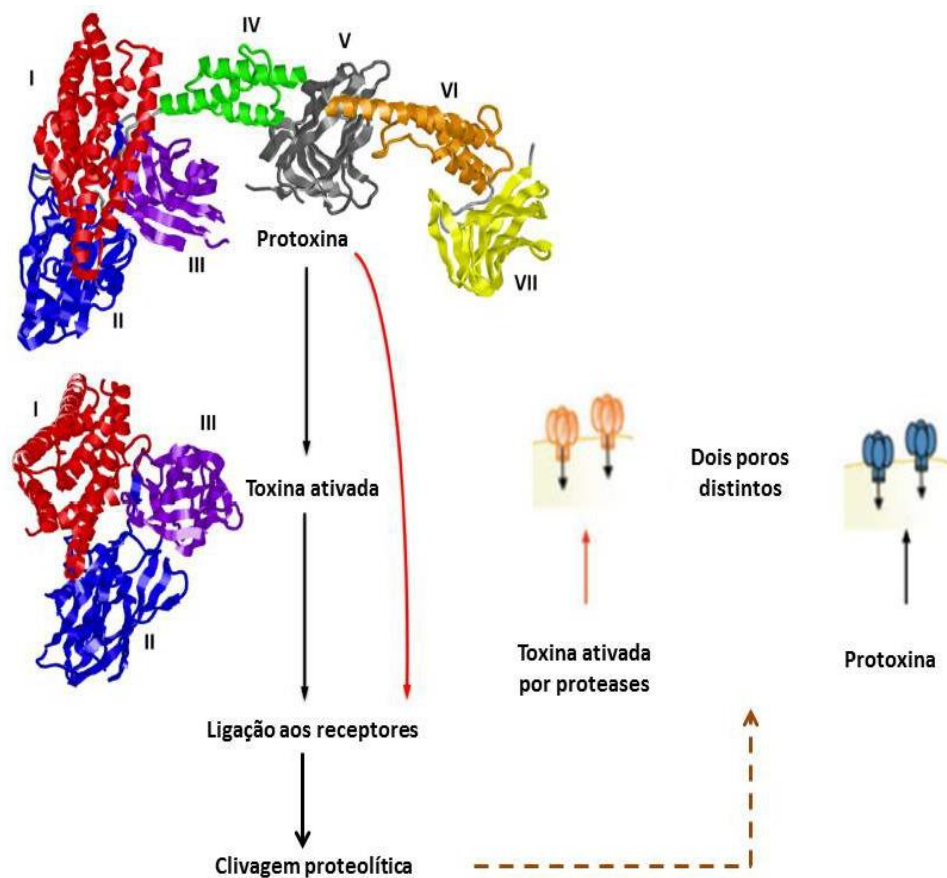


Figura 5. Modo de ação “duplo modo”. Protoxinas poderiam ser ativadas por proteases resultando em toxinas ativas e ambas as moléculas, protoxina e toxina, são capazes de ligar-se a caderina presente no intestino do inseto e após, sofrerem uma etapa extra de clivagem. Os oligômeros formados inserem-se na membrana promovendo a formação de poros. Os domínios estão representados por I, II e III (responsáveis pela ligação aos receptores e toxicidade) e IV, V, VI e VII (envolvidos no empacotamento das proteínas Cry) (Adaptado e modificado de Soberón et al., 2016 e Tabashnik et al., 2015).

Independentemente do modo de ação, ocorre à lise celular do intestino médio do inseto e consequente paralisia do aparelho digestivo. Assim, a larva morre por inanição ou por septicemia provocada pela germinação dos esporos e multiplicação das células vegetativas (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; BRAVO; SOBERÓN, 2008).

2.2.3 Receptores de proteínas inseticidas

Diferentes proteínas têm sido identificadas como receptoras de proteínas Cry entre elas: N-aminopeptidases (APN), caderinas (CADR), fosfatases alcalinas (ALP), duas proteínas glicoconjugadas (GCR), com 270 e 250 kDa, respectivamente, e proteínas transportadoras do sistema ABC (Figura 6). Em adição, glicolípídeos de insetos também têm sido considerados como receptores em nematódeos (PIGOTT; ELLAR, 2007; ROH et al., 2007; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2010; BRAVO et al., 2011; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

As proteínas APNs, caderinas e ALPs são os receptores melhores descritos, sendo os receptores APN e caderina, as primeiras proteínas reconhecidas como possíveis receptores para proteínas Cry em insetos (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

Os receptores APNs apresentam peso molecular de 100 – 150 kDa, com peptídeo sinal presente na sequência final da região C-terminal e está ancorado à membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) em regiões ricas em lipídeos como colesterol e esfingolípídeos. Essas proteínas estão envolvidas no reconhecimento

dos epítomos da estrutura primária da proteína e em conjunto com endopeptidases e carboxipeptidases, eles degradam as proteínas derivadas da dieta do inseto (PIGOTT; ELLAR, 2007; CRAVA et al., 2013; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

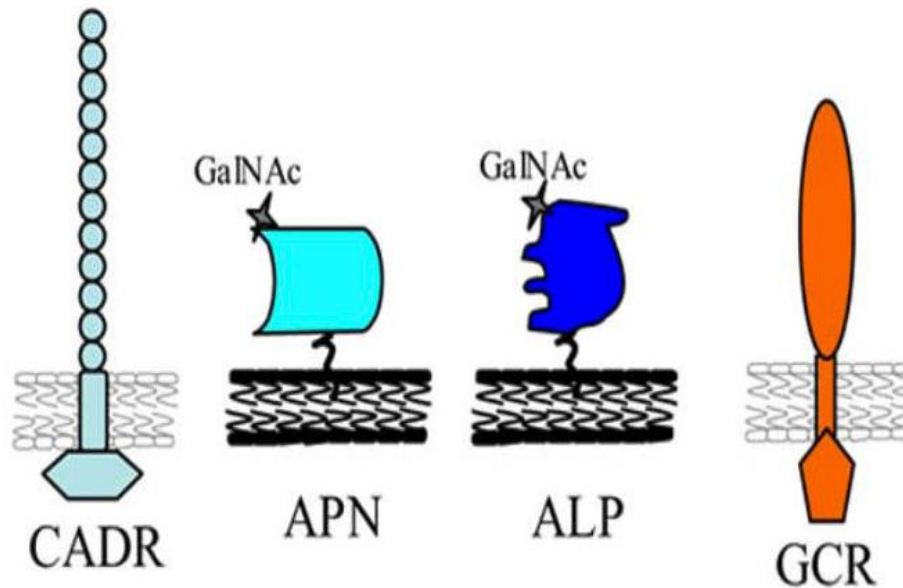


Figura 6. Receptores moleculares da proteína Cry1Aa. CADR (caderina); APN (N-aminopeptidase); ALP (fosfatase alcalina) e GCR (glicoconjugado de 270 kDa) (Bravo et al., 2007).

As caderinas são definidas pela presença de um ou mais domínios repetidos de ligação ao cálcio e geralmente podem estar ancoradas à membrana por um domínio transmembrânico ou por um GPI. Essas proteínas são essenciais em diferentes funções celulares como comunicação, sinalização e estrutura, entre outras (BEL; ESCRICHE, 2006; PIGOTT; ELLAR, 2007). Em *B. thuringiensis*, estas proteínas não somente são associadas com receptores específicos como também facilitam as etapas proteolíticas, oligomerização e formação eficiente dos poros (BEL; ESCRICHE, 2006).

As glicoproteínas ALPs integram o maior grupo de proteínas ligantes de Cry, identificadas em Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, com peso molecular de 65 kDa desempenhando função importante na toxicidade, dado que seus níveis de expressão nos primeiros estádios larvais são maiores que os níveis de APN, além de seu papel de proteína receptora (ARENAS et al., 2010; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

2.2.4 Proteínas Vip

As proteínas Vip foram descobertas na década de 90 e constituem uma nova família de proteínas inseticidas que são expressas durante a fase vegetativa de crescimento de *B. thuringiensis*. Estas proteínas são secretadas no meio de cultura como proteínas solúveis podendo ser detectadas no sobrenadante de culturas 15 h após a inoculação, persistindo até o final da esporulação o que reflete sua alta estabilidade (ESTRUCH et al., 1996; WARREN, 1997; CHAKROUN et al., 2016). Diferentemente das proteínas Cry, as proteínas Vip não formam inclusões proteicas.

As proteínas Vip não apresentam homologia de sequências ou estrutura com as proteínas Cry, porém seguem as normas de nomenclatura das proteínas Cry e são classificadas dentro de quatro diferentes famílias: Vip1, Vip2, Vip3 e recentemente uma nova família classificada como Vip4. Atualmente são descritas 141 proteínas Vip (CRICKMORE et al., 2017). Vip1 e Vip2 são toxinas binárias com alta atividade entomopatogênica contra Coleoptera e Hemiptera; Vip3 são proteínas de cadeia simples com atividade inseticida contra Lepidoptera, contudo para as

toxinas Vip4 insetos-alvos ainda não foram identificados (PALMA et al., 2014; CHAKROUN et al., 2016).

Uma correlação entre a presença de genes *vip* e *cry* numa mesma linhagem de *B. thuringiensis* é observada visto que os genes *vip* frequentemente são encontrados em plasmídeos que abrigam genes *cry* e em geral, são associados com a presença de *cry1* e *cry2* (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

2.2.4.1 Vip1/Vip2

As proteínas Vip1 e Vip2 são toxinas binárias sintetizadas por algumas linhagens de *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *Bacillus sphaericus* e *Brevibacillus laterosporus* (CHAKROUN et al., 2016; SELLAMI; SLIM; JAMOUISSI, 2016). Essas toxinas são denominadas binárias decorrentes da necessidade de atuarem em conjunto para demonstrarem toxicidade. Vip1/Vip2 apresenta atividade inseticida contra espécies da ordem Coleoptera e Hemiptera (SATTAR, 2011; YU et al., 2011; SHINGOTE et al., 2013).

Os genes *vip1* e *vip2* que codificam estas proteínas estão localizados em megaplasmídeos, no mesmo *operon*, separados por um espaço intergênico de 4 – 16 pb, e são co-transcritos em um único cístron de aproximadamente 4 kb (WARREN, 1997; MURAWSKA et al., 2013; BI et al., 2014; PALMA et al., 2014).

Estas proteínas são produzidas no início da fase logarítmica de crescimento, atingindo seu máximo na fase estacionária e mantendo os níveis elevados de expressão durante a fase de esporulação (SHI et al., 2004).

Vip1/Vip2 apresentam peso molecular aproximado de 100 e 50 kDa, contendo peptídeos sinais, característicos de *Bacillus* (30 e 50 aa, respectivamente), na porção N-terminal de ambas as proteínas (SHI et al., 2004, 2007; SHINGOTE et al., 2013). Após a clivagem do peptídeo sinal, durante a secreção, as proteínas exibem 82 kDa e 45 kDa, respectivamente (BI et al., 2014).

Essas proteínas pertencem à família de toxinas actina-ADP-ribosilantes. As similaridades de sequências com proteínas de *Clostridium* indica que Vip1 é responsável pela ligação aos receptores de membrana e translocação de Vip2 através da membrana enquanto à Vip2 é atribuída a atividade enzimática (SELLAMI; SLIM; JAMOUSSE, 2016).

2.2.4.1.1 Modo de ação das proteínas Vip1/Vip2

Em geral, os mecanismos de ação das proteínas Vip não são bem compreendidos. Para a atividade das toxinas binárias, são descritas várias etapas que se iniciam com a ingestão das toxinas pelas larvas. Uma vez ingeridas, a protoxina Vip1 é ativada proteoliticamente no intestino médio do inseto por proteases como a tripsina, formando monômeros ativos. Os monômeros ativos de Vip1 originam oligômeros que interagem com os receptores presentes na membrana do intestino médio do inseto e inseridos nesta membrana promovem a formação de poros. Os poros formados são assimétricos e ânion moderadamente seletivos, que permitem a translocação de Vip2 para dentro do citoplasma através de endossomos (LEUBER et al., 2006; PALMA et al., 2014; CHAKROUN et al., 2016; SELLAMI; SLIM; JAMOUSSE, 2016).

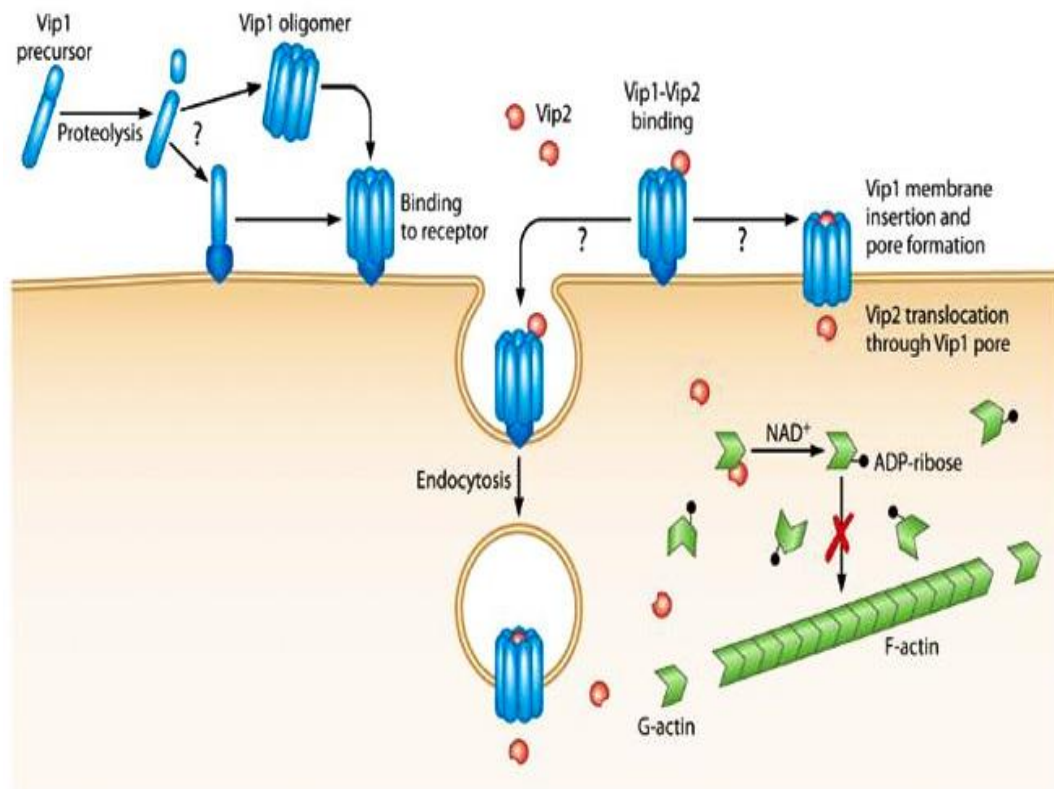


Figura 7. Modelo proposto de ação para as toxinas binárias Vip1/Vip2. A protoxina Vip1 é processada proteoliticamente por proteases no intestino do inseto e, quando ativada liga-se aos receptores específicos. Vip2 liga-se aos oligômeros de Vip1 e entra na célula por endocitose onde catalisa a transferência de um grupo ADP-ribose de NAD para monômeros de actina inibindo sua polimerização (CHAKROUN et al., 2016).

Uma vez no citoplasma, o domínio catalítico de Vip2 promove a transferência de um grupo ADP-ribose de NAD para actina bloqueando a polimerização e em consequência, inibindo a formação de microfilamentos que desestabilizam o citoesqueleto levando à morte celular (Figura 7) (JUCOVIC et al., 2008).

2.2.4.2 Vip3

Os primeiros genes *vip3* foram obtidos a partir das linhagens AB88 e AB424 de *B. thuringiensis* e denominados *vip3Aa1* e *vip3Ab1*, respectivamente (ESTRUCH et al., 1996). Estes genes possuem 2,4 kb e estão normalmente localizados em grandes plasmídeos (MESRATI et al., 2005). Presume-se que os genes *vip3A* estão localizados a 101 bp upstream do códon de início e que as regiões promotoras -35 e -10 são semelhantes ao promotor σ^E de *Bacillus subtilis* e σ^{35} de *B. thuringiensis* sugerindo que a transcrição desse gene é dirigida pela holoenzima $E \sigma^{35}$, (MESRATI et al., 2005; CHAKROUN, 2015).

Vip3 possui aproximadamente 787 aa com peso molecular entre 88 e 90 kDa, quando ingeridas pelas larvas de lepidópteros são processadas pelas peptidases intestinais em fragmentos proteolíticos de 20 e 62 kDa, considerados como a forma ativa da toxina (LIU et al., 2011; CHAKROUN; FERRÉ, 2014).

A porção N-terminal, responsável pela translocação da proteína pela membrana celular e enovelamento destas proteínas, é conservada e contém o peptídeo sinal, com resíduos carregados positivamente (Asn-2 – Asn-7) formando um core hidrofóbico (Thr-8 – Ile-34) que é similar a outros peptídeos sinal descrito para *Bacillus*. De forma distinta, este peptídeo não é processado durante a secreção (ESTRUCH et al., 1996; DOSS et al., 2002; PALMA et al., 2014; CHAKROUN, 2015).

A região C-terminal, responsável pela especificidade desta proteína, é variável (CHAKROUN et al., 2016). Argumenta-se que os últimos aminoácidos desta porção são críticos para a atividade e estabilidade das proteínas Vip3, uma vez que,

quaisquer mutações nesses resíduos alteram a toxicidade da proteína (SELVAPANDIYAN et al., 2001; GAYEN; HOSSAIN; SEN, 2012).

A estrutura tridimensional das proteínas Vip3 não está elucidada. Predições da estrutura secundária sugere que α -hélices compõem a porção N-terminal enquanto o C-terminal é formado por estruturas em β -hélices e espirais (RANG et al., 2005; WU et al., 2007).

2.2.4.2.1 Modo de ação das proteínas Vip3

As proteínas Vip3 demonstram atividade inseticida contra uma ampla variedade de insetos da ordem Lepidoptera exibindo essa mesma atividade contra insetos que possuem menor susceptibilidade às proteínas Cry (PALMA et al., 2014).

O modo de ação destas proteínas ainda não está elucidado e indica que as etapas de ação das proteínas Vip3 são muito similares ao modo de ação das proteínas Cry como a ativação da proteína, ligação a receptores específicos (diferentes daqueles utilizados pelas proteínas Cry) presentes no intestino médio do inseto e formação de poro (PALMA et al., 2014; CHAKROUN et al., 2016). Um dos fatores a ser esclarecido é o fragmento de 20 kDa resultante do processamento proteolítico. Este é copurificado com o fragmento de 62 kDa sugerindo que mesmo após a ativação, a proteína mantém os dois fragmentos em conjunto (Figura 8) (CHAKROUN et al., 2016).

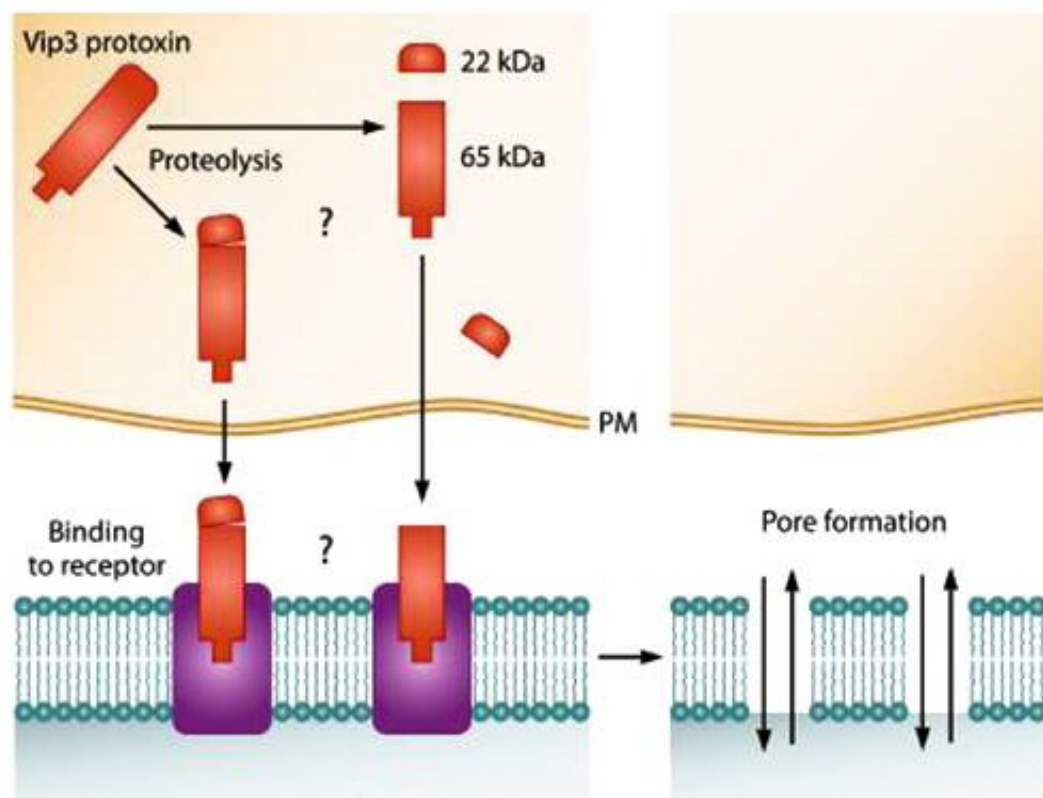


Figura 8. Modelo proposto de ação para as proteínas Vip3. A protoxina é processada proteoliticamente por proteases no intestino do inseto. O fragmento ativo de 65 kDa liga-se aos receptores específicos (com o fragmento de 22 kDa ainda ligado ou não). Então os poros são formados levando a morte celular (CHAKROUN et al., 2016).

2.2.5 Interações entre proteínas Cry e Vip

Estudos referentes a sinergismo e/ou antagonismo entre as proteínas inseticidas são importantes para prover evidências de possíveis efeitos inesperados, tanto sobre insetos-alvos, quanto sobre organismos não alvos. Esses ensaios tornaram-se exigências de algumas agências regulatórias nos Estados Unidos e outros países para avaliar a segurança de plantas geneticamente modificadas, combinando diferentes proteínas inseticidas com o mesmo ou diferentes modos de

ação (LEVINE et al., 2015). As avaliações sobre interações sinérgico-antagônicas consideram protetores incorporados nas plantas (PIPs) individuais ou combinados, uma vez que misturas de toxinas podem ser mais eficazes do que as toxinas individuais e também atrasam o aparecimento da resistência em insetos-alvos (TABASHNIK, 1992; LI; BOUWER, 2014; LEVINE et al., 2015).

Na tentativa de explicar essas interações, algumas hipóteses têm sido propostas. Como exemplo, para interações antagônicas, é sugerido que as duas proteínas poderiam interagir fisicamente formando um complexo que inativaria essas toxinas. Outra possível explicação poderia ser que o complexo formado ocultaria o epítipo da proteína mais tóxica impedindo a interação com os receptores (LEMES et al., 2014).

Assim, como os efeitos antagônicos não estão elucidados, os mecanismos para as interações sinérgicas também não são compreendidos. Uma hipótese seria que a combinação de poros formados por diferentes toxinas provocaria a ruptura osmótica e intensificaria a toxicidade devido ao aumento da permeabilidade (LEE et al., 1996; XUE et al., 2005). Outra possibilidade seria a combinação destas proteínas compondo hetero-oligômeros com maior afinidade para os receptores que as estruturas homo-oligoméricas. E por fim, uma hipótese sugere que a mistura de toxinas presentes no intestino médio do inseto inibe a ligação de proteínas ineficazes aos receptores, facilitando ligação das demais toxinas (SCHNEPF et al., 1998; AZIZOGLU et al., 2016).

2.2.6 Plantas Bt

A bactéria *B. thuringiensis* foi um dos primeiros agentes microbianos empregados no controle biológico de insetos, na forma de produtos comerciais, devido características como especificidade, facilidade de produção e armazenamento, seletividade e segurança para demais insetos não-alvo. Porém, características como baixa estabilidade em campo, devido a fatores abióticos, favoreceram a busca por novos mecanismos que pudessem aproveitar melhor a atividade entomopatogênica desta bactéria.

Uma das primeiras aplicações da engenharia genética nos anos 80 foi à introdução, nas plantas, de genes que conferiam características agronomicamente importantes. Assim sendo, os genes codificadores para as toxinas de *B. thuringiensis*, presentes em diferentes plantas, possibilitam a produção destas toxinas em diferentes tecidos vegetais, conferindo uma proteção frente às pragas mais importantes (FERRÉ; RIE; MACINTOSH, 2008).

A primeira planta geneticamente modificada para controle de insetos, “plantas Bt”, foi comercializada em 1996, inicialmente nos Estados Unidos e Europa e, expressava somente uma proteína Cry com atividade entomopatogênica para insetos que ocasionavam danos as culturas. Assim, a proteína Cry1Ab era expressa em milho, como Cry1Ac em algodão e Cry3A em batatas (SANAHUJA et al., 2011; CARRIÈRE; FABRICK; TABASHNIK, 2016). No Brasil, as plantas Bt foram inicialmente comercializadas em 2005, quando foi liberado o plantio de algodão que expressava Cry1Ac. Após, outras culturas, como milho e soja foram liberadas para

comercialização e atualmente continuam sendo adotadas. Em 2015, no Brasil, foram plantados 44,2 milhões de hectares de plantas transgênicas (JAMES, 2015).

O uso de produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* e/ou plantas Bt tem ocasionado o aparecimento de populações resistentes de alguns insetos. O primeiro caso de resistência relatado em campo foi para *Plutella xylostella* Lineu, 1758 (Lepidoptera: Plutellidae) (FERRÉ; VAN RIE, 2002; CRICKMORE, 2016;). Após, resistência em diferentes espécies tem sido relatada; relacionadas ao uso de pulverização com produtos Bt [*Trichoplusia ni* Hübner, 1803 (Lepidoptera: Noctuidae)] e às plantas modificadas [*Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae), *Busseola fusca* Fuller, 1901 (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* Saunders, 1844 (Lepidoptera: Gelechiidae) e *Diabrotica virgifera* LeConte, 1868 (Coleoptera: Chrysomelidae)] (TABASHNIK et al., 2013; CARRIÈRE; FABRICK; TABASHNIK, 2016).

Com isso, medidas para manejar a resistência têm sido tomadas. Entre elas, o desenvolvimento de uma segunda geração de plantas geneticamente modificadas. A primeira geração de plantas Bt expressava uma única proteína inseticida. Na segunda geração, utiliza-se uma técnica conhecida como piramidação onde as plantas expressam uma combinação de duas ou mais toxinas ativas que tornam as culturas mais eficazes, diminuindo a possibilidade de aparecimento de populações resistentes. Assim, plantas expressando tanto proteínas Cry quanto Vip são obtidas (FERRÉ; VAN RIE, 2002; IVES et al., 2017).

III. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho foi subdividido em três importantes estudos: 1) analisar a toxicidade de proteínas Vip3Aa e Cry1 e as interações (sinérgicas ou antagônicas) frente às larvas de *G. molesta*; 2) clonar e expressar os genes *vip1Bb3* e *vip2Bb4* em uma linhagem de *B. thuringiensis* para possíveis avaliações da toxicidade frente a coleópteros; 3) explorar o genoma de um isolado brasileiro de *B. thuringiensis* (BR145), com atividade tóxica para *H. armigera* e *C. includens*, quanto à presença de genes *cry* e *vip*, e seus fatores de virulência para futuras aplicações biotecnológicas.

3.1 Objetivos Específicos

Quanto ao primeiro estudo:

- Expressar, purificar e ativar as proteínas Vip3Aa e Cry1 a partir de clones em *E. coli* recombinantes.
- Verificar a toxicidade das proteínas Cry1 e Vip3Aa na mortalidade de larvas de *G. molesta*.
- Avaliar as interações sinérgicas e antagônicas destas proteínas através de bioensaios.

Referente ao segundo estudo:

- Clonar os genes *vip1Bb3* e *vip2Bb4* de *B. thuringiensis* V-J20.2 em linhagens de *E. coli* e em uma linhagem de *B. thuringiensis*.
- Expressar os genes *vip2Bb4* e *vip1Bb3* em células de *B. thuringiensis*.

Ao terceiro:

- Avaliar a atividade inseticida da linhagem BR145 para *H. armigera* e *C. includens*.
- Analisar o genoma da linhagem *B. thuringiensis* BR145 buscando encontrar novos genes *vip* e *cry* que possam apresentar atividade inseticida com possibilidade de disponibilização para futuras aplicações.
- Avaliar a presença de outros fatores virulência de *B. thuringiensis* que contribuem para a atividade entomopatogênica desta bactéria.

Publicação I

Susceptibility of Grapholita molesta Busck, 1916 (Lepidoptera: Tortricidae) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Invertebrate Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jipSusceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixturesAna Paula Scaramal Ricietto^{a,b}, Joaquín Gomis-Cebolla^b, Gislayne Trindade Vilas-Bôas^a, Juan Ferré^{b,*}^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil^b ERI de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED), Department of Genetics, Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 August 2016

Revised 14 September 2016

Accepted 23 September 2016

Available online 26 September 2016

Keywords:

Oriental fruit moth
Vip3 proteins
Cry proteins
Antagonism
Tortricidae

ABSTRACT

The Oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), is a major pest of fruit trees worldwide, such as peach and apple. *Bacillus thuringiensis* has been shown to be an efficient alternative to synthetic insecticides in the control of many agricultural pests. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of *B. thuringiensis* individual toxins and their mixtures for the control of *G. molesta*. Bioassays were performed with Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3Aa, Vip3Af and Vip3Ca, as well as with the commercial products DiPel® and XenTari®. The most active proteins were Vip3Aa and Cry1Aa, with LC₅₀ values of 1.8 and 7.5 ng/cm², respectively. Vip3Ca was nontoxic to this insect species. Among the commercial products, DiPel® was slightly, but significantly, more toxic than XenTari®, with LC₅₀ values of 13 and 33 ng commercial product/cm², respectively. Since Vip3A and Cry1 proteins are expressed together in some insect-resistant crops, we evaluated possible synergistic or antagonistic interactions among them. The results showed moderate to high antagonism in the combinations of Vip3Aa with Cry1Aa and Cry1Ca.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacterium that produces several types of insecticidal proteins, such as Cry, Cyt, Vip, and Sip proteins, along with other virulence factors contributing to its pathogenicity. Among them, Cry and Vip3 proteins are the ones that have been best characterized (Vilas-Bôas et al., 2012; Palma et al., 2014). Cry proteins are produced during the sporulation phase as parasporal crystals and some of them exhibit a specific toxic effect to insects belonging to different orders, mainly Lepidoptera, Coleoptera and Diptera (Schnepf et al., 1998; Ricietto et al., 2013; Palma et al., 2014). Vip3 proteins are produced during the vegetative growth and are not concentrated in crystals since they are secreted to the environment or the culture medium (Estruch et al., 1996; Chakroun et al., 2016). Vip3 proteins are very toxic to Lepidoptera (Chakroun et al., 2012; Hernández-Martínez et al., 2013). The mode of action of Cry proteins involves solubilization and activation by gut proteases, recognition and binding to midgut receptors, pore formation, and cell lysis, finally causing the death of the insect (Bravo et al., 2007). Vip3 proteins are also cleaved by midgut proteases and bind to specific receptors in the

insect midgut, which are different from those of Cry proteins (Chakroun et al., 2016).

Biopesticides based on *B. thuringiensis* have been used since the middle of the last century. They are widely used in organic farming and, compared to chemical insecticides, they have some advantages since they lack safety periods and are harmless to non-target organisms, including insect predators and other beneficial insects. On the other hand, due to the low persistence of the active ingredient in the environment, repeated applications is common practice. This has led to some outbreaks of resistance to *B. thuringiensis* commercial products (Ferré & Van Rie, 2002) and more recently, to Bt-crops (transgenic crops protected from insects by the expression of *cry* or/and *vip3* genes) expressing a single Cry protein (Tabashnik et al., 2009).

Grapholita molesta (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) is native from Asia, although it is present in all temperate zones of Europe, America, Africa and Australia. It is considered a pest of economic importance around the world since it causes damage to production of fruits like peaches, nectarines, apricots and apples, and can be associated with attacks in others crops (Myers et al., 2007; Piñero and Dorn, 2009; Kirk et al., 2013). Data on the insecticidal activity of *B. thuringiensis* Cry proteins for the control of other Tortricidae pests, such as *Cydia pomonella* and *Lobesia botrana*, have been reported (Boncheva et al., 2006; Ruiz de Escudero et al., 2007). However, despite the fact that formulations

* Corresponding author at: Departamento de Genética, Facultad de CC. Biológicas, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot (Valencia), Spain.
E-mail address: juan.ferre@uv.es (J. Ferré).

of *B. thuringiensis* have been tested in the field and laboratory for the control of *G. molesta* (Rama et al., 2001; Monteiro and Souza, 2010), there are no reports on the activity of individual *B. thuringiensis* proteins on this pest.

In the present study, we show the effectiveness of *B. thuringiensis* bioinsecticides for the control of *G. molesta*, test the insecticidal activity of some individual Cry1A and Vip3 proteins, and show an antagonistic effect in some of their combinations.

2. Materials and methods

2.1. Insects

A colony of *G. molesta* was established and maintained at the University of Valencia (Spain), originally obtained from Entomos AG (Switzerland). Insects were reared on semi-artificial diet (Guennelon et al., 1981) under controlled conditions of temperature (25 ± 2 °C), humidity (RH $70 \pm 10\%$) and photoperiod (16:8 h light:dark) (Arioli et al., 2007). The same diet and rearing conditions were used in the bioassays.

2.2. Cry and Vip3 proteins

Escherichia coli clones carrying plasmids with *cry1Aa*, *cry1Ac* and *cry1Ca* genes were kindly provided by Ruud de Maagd (Plant Research International, Wageningen, Netherlands). The *vip3Aa16* gene was kindly provided by Slim Tounsi (Centre de Biotechnologie de Sfax) and *vip3Af1* by Jeroen Van Rie (Bayer CropScience, Ghent, Belgium). The *vip3Ca2* gene was isolated from an autochthonous *B. thuringiensis* strain (Palma et al., 2012).

Cry proteins were expressed, solubilized and trypsin activated as described elsewhere (Hernández-Martínez et al., 2008) and stored frozen in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0. IPTG was used to induce expression of Vip3A proteins from *E. coli* BL21 cells and Vip3Ca from *E. coli* WK6 cells. The cells were then centrifuged and resuspended in lysis buffer (20 mM phosphate saline buffer, pH 8.0 with 3 mg/mL lysozyme, 10 µg/mL DNase and 100 µM PMSF) and incubated with shaking for 30 min at 37 °C. The cells were lysed by sonication and the supernatant recovered by centrifugation at 27,000g and filtered through sterile 0.45 µm and 0.22 µm cellulose acetate filters. The Vip3 proteins were purified by isoelectric point precipitation (IPP) (Chakroun et al., 2012) with 0.1 M acetic acid to reach pH 5.5 (Vip3Aa), pH 5.4 (Vip3Af) or pH 5.95 (Vip3Ca). The partially purified Vip3 proteins were solubilized and stored frozen in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 9.0.

The concentration of Cry1 and Vip3 proteins was estimated by the Bradford method (Bradford, 1976). The quality of the expressed proteins was checked by 12% SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich) staining (Fig. 1). Cry1A activated proteins were observed as bands of around 62 kDa and Vip3 protoxins as bands of approximately 89 kDa.

2.3. *Bacillus thuringiensis* commercial products

DiPel DF® (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) and XenTari GD® (*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*) (formulations as wettable granules) were kindly provided by Kenogard S.A. (Barcelona, Spain).

2.4. Bioassays

Different concentrations of formulations and protein solutions were dispensed on the diet surface. Prior to the sample application, the surface of the diet was sterilized under UV light for 10 min. A volume of 50 µL of each concentration was applied on the surface

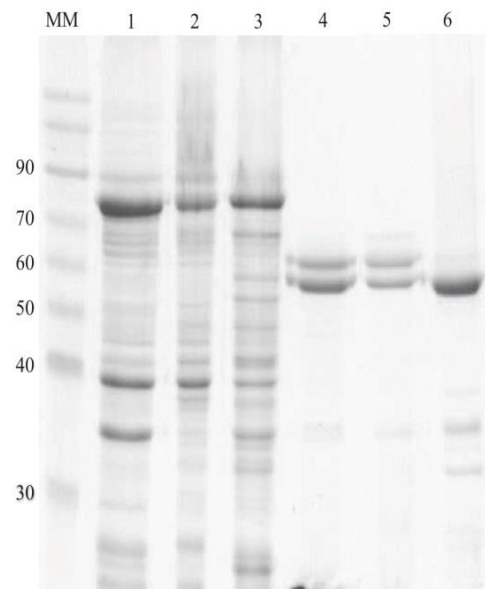


Fig. 1. SDS-PAGE of *Escherichia coli* lysates. MM, Molecular Mass Markers "PINK Plus Prestained Protein Ladder" (Genedirex); lane 1, Vip3Aa; lane 2, Vip3Af; lane 3 Vip3Ca; lane 4, Cry1Aa; lane 5, Cry1Ac; lane 6 Cry1Ca.

of solidified diet (2 cm² multiwell plates, Bio-Cv-16, C-D International) and let dry in a flow hood. Once dried, one larva was transferred to each well using 16 neonates per replicate, with two replicates per concentration. Preliminary assays were done at 100 and 1000 ng/cm² for DiPel®, XenTari® and Cry1 proteins, and at 2500 ng/cm² for Vip3 proteins. The larvae mortality was scored after 7 days.

Dose-response bioassays were performed only for those proteins causing a mortality higher to 90% in the preliminary assays. At least seven serial dilutions and a control with just buffer were tested for each protein. Bioassays were carried out in triplicate with sixteen neonate larvae per replicate (n = 48). Mortality was scored after 7 days. Only bioassays for which the mortality in the controls was lower than 12% were considered.

2.5. Statistical analyses

Estimates of LC₅₀ and LC₉₀ were obtained using the POLO-PC software (LeOra software, Berkeley, CA). LC₅₀ and LC₉₀ values were considered significantly different if their 95% fiducial limits (FL₉₅) did not overlap.

Tests for possible synergistic/antagonistic interactions between Vip3Aa and Cry1 proteins were initially performed at a single concentration of each protein. The expected mortality was estimated, assuming simple independent action, by the formula:

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)$$

which is equivalent to equation 11.33 of Finney (1971). P_1 and P_2 represent the proportions of dead larvae for toxins 1 and 2, respectively. Significance of deviations between the observed and expected mortality values was determined using Fisher's exact test and Chi-square test. A second type of experiment to test for interactions between Vip3Aa and Cry1 proteins was carried out with dose-response assays in which the proportions of two proteins in the mixture were close to the ratio between their LC₅₀ values. The expected LC₅₀ value of the mixture was estimated assuming simple

similar action (Finney, 1971) according to the formula of Tabashnik (1992), which derives from equation 11.8 from Finney (1971):

$$LC_{50(m)} = \left[\frac{r_a}{LC_{50(a)}} + \frac{r_b}{LC_{50(b)}} \right]^{-1}$$

where a and b refer to the components the mixture, r_a and r_b are the relative proportions of a and b. The ratio of the observed LC_{50} of the mixture over the expected $LC_{50(m)}$ is a measure of the antagonism. An antagonism factor (AF) greater than 1 indicates an antagonistic interaction. If the ratio is equal to 1 indicates an additive toxicity, and a value lower than 1 indicates that the interaction is synergistic.

3. Results

3.1. Susceptibility of *G. molesta* to Cry and Vip proteins and *B. thuringiensis* commercial products

A first approach to determine whether *G. molesta* was susceptible to *B. thuringiensis* commercial products and their individual insecticidal proteins consisted on performing bioassays at a high concentration of the insecticidal samples (Table 1). The two commercial products (DiPel® and XenTari®) produced high mortality to *G. molesta* neonate larvae. Among the Cry1 and Vip3 proteins, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3Aa and Vip3Af showed high toxicity to *G. molesta*. In contrast, Vip3Ca was nontoxic.

Response-dose assays were carried out for those samples that showed highest insecticidal activity. DiPel® was slightly more toxic

Table 1
Susceptibility of *G. molesta* neonates to Cry1 activated toxins, Vip3A protoxins, and *B. thuringiensis* commercial products.^a

		Mortality (%)		
		100 ng/cm ²	1000 ng/cm ²	2500 ng/cm ²
Commercial product	DiPel®	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	
	XenTari®	80.00 ± 0.11	100.00 ± 0.00	
Toxin	Cry1Aa	97.00 ± 0.03	100.00 ± 0.00	
	Cry1Ac	93.00 ± 0.07	96.87 ± 0.03	
	Cry1Ca	60.00 ± 0.07	100.00 ± 0.00	
	Vip3Aa			100.00 ± 0.00
Protoxin	Vip3Af			94.00 ± 0.00
	Vip3Ca			23.00 ± 0.03

^a Bioassays were performed with 16 larvae per replicate, with two replicates (n = 32), and the mortality was scored at 7 days.

^b Nanograms of formulated product in the case of the commercial products, and of solubilized protein in the case of individual proteins.

Table 2
Susceptibility of *G. molesta* neonates to Cry1 activated toxins and Vip3A protoxins in dose-response assays^a.

Protein	Slope ± SE ^b	LC ₅₀ (FL ₉₅) ^c	LC ₅₀ (FL ₉₅) ^c
Cry1Aa	0.59 ± 0.08	7.5 (2.7–29)a,b	1120 (160–154,000)a
Cry1Ac	1.21 ± 0.12	24 (11–64)b,c	252 (86–2700)a
Cry1Ca	1.13 ± 0.11	57 (30–116)c	780 (310–4000)a
Vip3Aa	0.49 ± 0.77	1.8 (0.5–4.5)a	700 (130–37,000) a
Vip3Af	0.81 ± 0.10	27 (13–86) b, c	1000 (240–20,000) a
Vip3Ca		>3600	
DiPel®	1.75 ± 0.22	13 (9–17)	69 (46–127)
XenTari®	1.40 ± 0.14	33 (18–56)	269 (137–818)

^a Bioassays were performed with 16 larvae per replicate, with three replicates (n = 48), and the mortality was scored at 7 days.

^b Standard error.

^c Values expressed in ng/cm² with 95% fiducial limits. LC values followed by the same letter (in the same column) are not significantly different based on the overlap of FL.

than XenTari®, with significantly lower LC_{50} and LC_{90} values (Table 2). Among the individual proteins, all except Vip3Ca were very active, with LC_{50} values between 1.8 ng/cm² (Vip3Aa) and 57 ng/cm² (Cry1Ca). Despite significant differences at the LC_{50} level, no significant differences of activity were found at the LC_{90} level among the active proteins.

3.2. Interactions of Vip3Aa with Cry1 proteins

Combinations between Vip3Aa and the active Cry1 proteins were tested to check for synergistic or antagonistic interactions. The concentrations to use in the mixture were chosen close to their respective LC_{50} values. The observed mortality was compared to the expected mortality assuming no interaction (Table 3). Significant antagonistic interactions were found for Vip3Aa-Cry1Aa and Vip3Aa-Cry1Ca (P < 0.001). No significant interaction was found for Vip3Aa-Cry1Ac.

The interaction Vip3Aa-Cry1Aa and Vip3Aa-Cry1Ca was investigated in dose-response assays at the 1:1 ratio and at ratios close to their respective LC_{50} ratios (LC_{50} Cry1 to LC_{50} Vip3 and vice versa). The results, at the LC_{50} level, confirmed the antagonism for both Vip-Cry combinations in the different ratios tested (Table 4).

Table 3
Susceptibility of *G. molesta* to combinations of Vip3Aa and Cry1 proteins^a.

Protein	Concentration (ng/cm ²)	Mortality (%)		P values	
		Observed ^b	Expected	Fischer's test	Chi-square test
Cry1Aa	5	32	45.8 ^c		
Cry1Ac	24	63	50 ^c		
Cry1Ca	57	64	50 ^c		
Vip3Aa	1.2	37	46.5 ^c		
Vip3Aa+Cry1Aa	1.2 + 5	12	57 ^d	<0.0001	<0.0001
Vip3Aa+Cry1Ac	1.2 + 24	69	76 ^d	0.80	0.61
Vip3Aa+Cry1Ca	1.2 + 57	42	77 ^d	0.0018	0.0013

^a Bioassays were performed with 16 larvae per replicate, with three replicates (n = 48), and the mortality was scored at 7 days.

^b Percentage of death insects due the action the individual toxins and their mixtures at the dose tested.

^c Expected mortality according to the Probit linear regression analysis (Table 2).

^d Expected mortality assuming simple independent action calculated with the 11.33 equation (Finney, 1971) using the observed mortality values for each individual protein.

Table 4
Evaluation antagonism, at the LC_{50} level, of different mixtures of Vip3Aa and Cry1 proteins to *G. molesta* larvae.^a

Proteins	Ratios ^b	b ± SE ^c	LC ₅₀ (ng/cm ²)		AF ^f
			Observed ^d	Expected ^e	
Cry1Aa	0:100	0.59 ± 0.08	7.5 (2.7–29.4)		
Vip3Aa+Cry1Aa	25:75	1.39 ± 0.14	31 (19–47)	4.2	7.4
	50:50	1.86 ± 0.20	71 (52–97)	2.9	24.5
	75:25	1.73 ± 0.22	60 (42–85)	2.2	27.0
Vip3Aa	100:0	0.49 ± 0.77	1.8 (0.5–4.5)		
Vip3Aa+Cry1Ca	97:3	1.38 ± 0.19	120 (48–288)	1.86	64.5
	50:50	1.47 ± 0.15	62 (33–116)	3.49	17.8
	3:97	1.57 ± 0.15	364 (250–536)	29.1	12.5
Cry1Ca	0:100	1.13 ± 0.11	57 (30–116)		

^a Bioassays were performed with 16 larvae per replicate, with three replicates (n = 48), and the mortality was scored at 7 days.

^b The ratios were expressed as percentage between Vip3 and Cry1 proteins in the mixture.

^c Slope ± standard error.

^d LC values with 95% fiducial limits.

^e Expected mortality considering simple similar action.

^f Antagonism factor (calculated as the ratio of the observed LC_{50} to expected LC_{50}).

Moreover, the data indicate that the degree of antagonism varied depending on the Vip3 to Cry ratio. For both Cry1 proteins, the antagonism was higher when the proportion of Vip3 in the mixture was higher. This phenomenon is much more evident with Cry1Ca and Vip3Aa: just a 3% of Cry1Ca in the mixture led to an AF = 64.5, which represents a reduction in the potency of Vip3Aa of 67-fold (LC_{50} of the mixture divided by the LC_{50} of Vip3Aa pure).

4. Discussion

Despite of *B. thuringiensis* being the most common biological agent used in pest control, little has been reported about the control of *G. molesta* and only some commercial formulations have been tested in field and under laboratory conditions. Some authors have reported contradictory data in relation to field assays. Rama et al. (2001) tested preparations of *B. thuringiensis* in Italian farms and no toxic effect against *G. molesta* was observed. The authors justified this result by the small short life of the tested formulations. In contrast, Monteiro and Souza (2010) reported that formulations of *B. thuringiensis* were able to control this pest to a level not significantly different to the chemical insecticides. The results obtained by us clearly show that DiPel® and XenTari® are very effective for the control of *G. molesta* under laboratory conditions.

The results with individual *B. thuringiensis* proteins showed that, with the exception of Vip3Ca, the rest were highly active against this pest. For Cry1 proteins, Cry1Aa was not significantly different to Cry1Ac at the LC_{50} level, but when compared to Cry1Ca, Cry1Aa is 7.6-fold more toxic. At LC_{90} level, no significant difference was found among the Cry1 proteins. For Vip3A proteins, Vip3Aa was 15-fold more toxic than Vip3Af at LC_{50} level, though this difference was not observed at the LC_{90} level.

Toxicity of Cry and Vip3 proteins against other pest species of the order Tortricidae has already been reported by other authors (Herrero et al., 2001; Boncheva et al., 2006; Sauka et al., 2007; Ruiz de Escudero et al., 2007; Li and Bouwer, 2012; Ruiz de Escudero et al., 2014; Baranek et al., 2015). In those cases, Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1C were toxic, as they are against *G. molesta*. For Vip3A proteins, Vip3Aa and Vip3Af are toxic to *C. pomonella* and *L. botrana*, as they are for *G. molesta*.

Studies on synergism/antagonism between insecticidal proteins are potentially important in providing evidence of possible unexpected effects, not only on the target pest, but on non-target organisms. This has even become a requirement by some regulatory agencies for safety assessment of GM crops combining different insecticidal proteins with the same or different mode of action (Levine et al., 2015). With *G. molesta*, we have found antagonistic interactions between Vip3Aa and Cry1Aa or Cry1Ca, though not between Vip3Aa and Cry1Ac. We have considered evidence of antagonism when the expected LC_{50} value did not fall within the fiducial limits of the observed LC_{50} value of the mixture. The antagonistic effect became more evident as the proportion of Vip3Aa in the mixture increased and this effect was especially drastic in the 97:3 Vip3Aa:Cry1Ca mixture, with an AF of 64.5 (Table 4). Interactions between Vip3Aa and Cry1 proteins had also been reported in other insect species. Combinations of Vip3Aa, Vip3Ae and Vip3Af with Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Ca were found antagonistic in *Heliothis virescens*. Furthermore, the combination Vip3Aa-Cry1Ca showed different results depending on the species tested. For *H. virescens* and *Spodoptera frugiperda*, the interaction was antagonistic, whereas, the same combination in *Diatraea saccharalis* was synergistic (Lemes et al., 2014). Mixtures of Vip3Aa, Vip3Ae and Vip3Af with Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca and Cry1Ea were tested against *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis includens* and synergistic interactions were found in most of them, especially the strong synergism of the combination Vip3Af-Cry1Ab in both

insect species (Crialesi-Legori et al., 2014). A Vip3Aa and Cry1Aa mixture resulted in a slight antagonism in *Spodoptera eridania* while presenting synergism in other three *Spodoptera* species (Bergamasco et al., 2013). In trying to explain antagonistic interactions, some authors suggested that the two proteins could form a complex that would lead to their inactivation (Lemes et al., 2014). Another speculative explanation would be that antagonism results from the interaction of both proteins with the same membrane protein, even if they bind to different epitopes (Lemes et al., 2014). In our study, being that Vip3Aa is much more toxic than Cry1Ca to *G. molesta* and as little as 3% of the latter is enough to decrease the potency of Vip3Aa so dramatically (67-fold), it seems clear that the Cry protein is blocking some key factor for the toxicity of Vip3Aa. Despite the fact that the phenomenon of the antagonistic/synergistic interaction between some Vip3A and Cry1 proteins seems quite general, the biochemical/physiological basis have not been searched for yet. Future work is needed to find out at which level the interactions are taking place (in the lumen, previously to binding to the membrane, at the binding step, or further down the toxic process) and, ideally, to pinpoint the determinants responsible for such interactions.

Acknowledgments

We thank R. González-Martínez, for her help in rearing the insect colonies. This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grants Ref. AGL2009-13340-C02-01 and AGL2012-39946-C02-01), by grants from the Generalitat Valenciana (ACOMP/2011/094, PROMETEO 2011/044 and GVPROMETEOII-2015-001), and by European FEDER funds. JGC was recipient of a PhD grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant ref. BES-2013-065848). APSR was supported CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) scholarship.

References

- Arioli, C.J., Molinari, F., Botton, M., Garcia, M.S., 2007. *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) laboratory rearing technique for insect production seeking studies of behaviour and control. *Boletim Pesquisa Desenvolvimento/Embrapa Uva Vinho* 13, 4–12.
- Baranek, J., Kaznowski, A., Konecka, E., Naimov, S., 2015. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. *J. Invertebr. Pathol.* 130, 72–81.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bergamasco, V.B., Mendes, D.R.P., Fernandes, O.A., Desidério, J.A., Lemos, M.V.F., 2013. *Bacillus thuringiensis* Cry11a10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 112, 152–158.
- Boncheva, R., Duklindjiev, S., Minkov, I., de Maagd, R.A., Naimov, S., 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 96–99.
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol.* 49, 423–435.
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., Ferré, J., 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 329–350.
- Chakroun, M., Bel, Y., Caccia, S., Abdelkefi-Mesrati, L., Escriche, B., Ferré, J., 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3A insecticidal protein. *J. Invertebr. Pathol.* 110, 334–339.
- Crialesi-Legori, P.C.B., Davolos, C.C., Lemes, A.R., Marucci, S.C., Lemos, M.V.F., Fernandes, O.A., Desidério, J.A., 2014. Interaction of Cry1 and Vip3A proteins of *Bacillus thuringiensis* for the control of lepidopteran insect pests. *Pesq. Agropec. Bras.* 49, 79–87.
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5389–5394.
- Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 47, 501–533.
- Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*. Cambridge University, Cambridge, UK.
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremont, J.C., El Idrissi Annari, M.A., 1981. Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpacapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie* 1, 59–64.

- Hernández-Martínez, P., Ferré, J., Escriche, B., 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 97, 245–250.
- Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C.S., Van Rie, J., Escriche, B., Ferré, J., 2013. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. *J. Invertebr. Pathol.* 113, 78–81.
- Herrero, S., González-Cabrera, J., Tabashnik, B.E., Ferré, J., 2001. Shared binding sites in lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5729–5734.
- Kirk, H., Dorn, S., Mazzi, D., 2013. Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*), a globally invasive pest. *BMC Ecol.* 13, 1–11.
- Lemes, A.R., Davolos, C.C., Legori, P.C., Fernandes, O.A., Ferré, J., Lemos, M.V., Desiderio, J.A., 2014. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatrea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One* 9, 1–8.
- Levine, S.L., Tan, J., Mueller, G.M., Bachman, P.M., Jensen, P.D., Uffman, J.P., 2015. Independent action between DvSnf7 RNA and Cry3BB1 protein in Southern Corn Rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* and Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *PLoS One* 10, 1–15.
- Li, H., Bouwer, G., 2012. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Thaumatotibia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Crop Prot.* 32, 47–53.
- Monteiro, L.B., Souza, A., 2010. Tortricid moth control in apple with two formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kustaki* in Fraiburgo, SC. *Rev. Bras. Frutic.* 32, 423–428.
- Myers, C.T., Hull, L.A., Krawczyk, G., 2007. Effects of orchard host plants (apple and peach) on development of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 100, 421–430.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins* 6, 3296–3325.
- Palma, L., Hernández-Rodríguez, C.S., Maeztu, M., Hernández-Martínez, P., Ruiz de Escudero, I., Escriche, B., Muñoz, D., Van Rie, J., Ferré, J., Caballero, P., 2012. Vip3Ca, a novel class of vegetative insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7163–7165.
- Piñero, J.C., Dorn, S., 2009. Response of female oriental fruit moth to volatiles from apple and peach trees at three phenological stages. *Entomol. Exp. Appl.* 131, 67–74.
- Rama, F., Reggiori, F., Dal Pane, M., Molinari, F., Cravedi, P., Boselli, P., 2001. The control of *Cydia molesta* in pome fruit orchards using sex pheromones through the method of “disorientation”. *Bull. OILB-SROP.* 24, 117–122.
- Ricietto, A.P., Fazon, F.A., Carvalho Filho, C.D., Vilas-Boas, L.A., Vilas-Bôas, G.T., 2013. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Can. J. Microbiol.* 59, 28–33.
- Ruiz de Escudero, I., Banyuls, N., Bel, Y., Maeztu, M., Escriche, B., Muñoz, D., Caballero, P., Ferré, J., 2014. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. *J. Invertebr. Pathol.* 117, 51–55.
- Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Escriche, B., Caballero, P., 2007. Potential of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 337–340.
- Sauka, D.H., Sánchez, J., Bravo, A., Benintende, G.B., 2007. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. *J. Invertebr. Pathol.* 94, 125–129.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J., Carrière, Y., 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory and data. *J. Econ. Entomol.* 102, 2011–2025.
- Tabashnik, B.E., 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3343–3346.
- Vilas-Bôas, G.T., Alvarez, R.C., Santos, C.A., Vila Boas, L., 2012. Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O que existe além das proteínas Cry? *Entomo Bras.* 5, 1–10.

Publicação II

*Cloning and expression of vip1/vip2 genes in Bacillus thuringiensis
acrystalliferous strains*

Manuscrito a ser submetido ao periódico Journal of Biotechnology

To be submitted to: Journal of Biotechnology

Cloning and expression of *vip1/vip2* genes in *Bacillus thuringiensis* acrySTALLIFEROUS strain

Ana Paula Scaramal Ricietto^a, Joaquín Gomis-Cebolla^b, Juan Ferré^b, Gislayne Trindade Vilas-Bôas^{a*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b ERI de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED), Universitat de València, 46100 Burjassot, Spain

*Corresponding author: Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – Londrina (Paraná), Brazil

Tel.: (55) 43 3371 4752; e-mail: gvboas@uel.br

Abstract

The insectidal activity of *Bacillus thuringiensis* generally is attributed to Cry proteins, but Vegetative insecticidal proteins (Vip) are also important for the biological control of insects. Since these toxins displays different modes of action, the development of new strategies using Vip proteins together with Cry proteins is an important tool to get avoid the selection of resistant insects. Here, we report the cloning and overexpression of *vip1Bb3* and *vip2Bb4* genes in *Escherichia coli* and *B. thuringiensis* 407 Cry⁻. The full 3.9-kbp length operon contained *vip1Bb3* and *vip2Bb4* genes was isolated from genomic DNA, successfully cloned into pHT315-PxylA and overexpressed in *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ under the control of the inducible *xyIA* promoter. Vip1Bb3 and Vip2Bb4 proteins were secreted by *B. thuringiensis* cells during the vegetative stage of growth exhibiting approximately 82 kDa and 45 kDa (respectively).

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, cloning, expression, Vip1/Vip2 binary toxin

1. Introduction

Bacillus thuringiensis is a gram positive, spore-forming bacterium that synthesizes proteins with insecticidal activity, which has allowed its use in biological control for over many years as an alternative to synthetic pesticides (Schnepf et al., 1998). Generally, its insecticidal activity is attributed the Cry proteins, but *B. thuringiensis* produce others insecticidal proteins like Vip (also known as vegetative insecticidal protein). These proteins are secreted during vegetative growth and classified according the Bt Toxin Nomenclature Committee as Vip1, Vip2, Vip3 and Vip4 (Crickmore et al., 2017; Shi et al., 2004).

Vip1/Vip2 are binary toxins synthesizes from *B. thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Brevibacillus laterosporus* (Chakroun et al., 2016; Sellami et al., 2016b). The *vip1* and *vip2* genes codifying these proteins are located in megaplasmids and co-transcribe approximately 4 kb from a same operon (Murawska et al., 2013; Palma et al., 2014). These proteins are secreted into the culture medium as soluble proteins and can be detected in the supernatant of these cultures 15 h after inoculation persisting until the end of sporulation which reflects their high stability (Bi et al., 2014; Chakroun et al., 2016; Estruch et al., 1996; Warren, 1997).

The action mechanism of Vip toxins is unclear. However, to Vip1 and Vip2, assumption that Vip1 interact with specific receptors in midgut of insect promoting the pore formation. Thus, Vip2 is translocated to cytoplasm by endosome. Once into cytoplasm, Vip2 modifies monomeric actin of cytoskeleton blocking the polymerization inducing cell death (Jucovic et al., 2008; Leuber et al., 2006).

The development of resistance to some Bt proteins, observed in insects (Ferré and Van Rie, 2002; Tabashnik et al., 2009), is an important factor that instigate the search for new proteins with different modes of action. Since Vip proteins do not

share to receptor binding and have shown a distinct mode of action than Cry proteins (Chakroun et al., 2016; Lee et al., 2003; Sena et al., 2009), the development of new strategies using Vip proteins together with Cry proteins has been employed in biological control (Chakroun et al., 2016; Sena et al., 2009; Welch et al., 2015).

Despite Vip3 proteins have been widely used for Lepidopteran control (Estruch et al., 1996; Hernández-Martínez et al., 2013; Herrero et al., 2016; Liu et al., 2011), binary Vip1/Vip2 toxins share the preference in screening of insecticidal genes because their shown insecticidal activity against Coleoptera as *Diabrotica virgifera* (western corn rootworms) and *Diabrotica barberi* (northern corn rootworms) and Hemiptera like *Aphis gossypii*, important pests of corn and cotton (Sattar, 2011; Shingote et al., 2013; Warren, 1997; Yu et al., 2011b).

Therefore, to get avoid the selection of resistant insects, new genes must be employed in the development of new Bt-plants. Thereby, in the present study, an operon containing genes *vip1Bb3* and *vip2Bb4* was cloned and expressed in *B. thuringiensis*.

2. Materials and Methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

B. thuringiensis V-J20.2 strain containing *vip2Bb4* (KR065728.1) and *vip1Bb3* (KR065727.1) genes was kindly provided by Juan Ferré (Valencia, Spain) and the acrySTALLIFEROUS mutant strain *B. thuringiensis* 407Cry⁻, which did not has any *vip* gene (Lereclus et al., 1989) was used for this study.

Escherichia coli K-12 strain TG1 [F' *traD36 proAB lacIqZ ΔM15*] *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK- mK-)* was used as host for the plasmid construction's and cloning procedures. *E. coli* ET12567 [F- *dam13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zji-202::Tn10 recF143*

galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44] was used to prepare plasmid for *B. thuringiensis*. For culture, *E. coli* and *B. thuringiensis* strains were maintained on Luria-Bertani (LB) medium (tryptone 1, 0%, Yeast extract 0,5% e NaCl 1,0%) at 37°C and 30°C, respectively.

2.2 DNA manipulation and PCR conditions

Total DNA from *B. thuringiensis* V-J20.2 was extracted by Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* TG1 and *E. coli* ET12567 by a standard alkaline lysis procedure using innuPREP Plasmid Mini Kit Plus (Analytik Jena, Germany). Amplifications were carried out in a SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA) with Platinum SuperFi DNA Polymerase (Invitrogen, USA). Conditions for PCR amplifications were performed as recommended by manufacturer. The primers were designed based on Vip2Bb4 and Vip1Bb3 sequence deposited in Crickmore Database. The operon containing *vip2Bb4* and *vip1Bb3* genes was obtained by PCR with primers *vip2Bb4_F* (CGCGGATCCATGGTATCCAAAAAGTTAC) and *vip1Bb3_R* (CCCAAGCTTTTATAGATCTGAAATATTTAAATG) with *BamHI* and *HindIII* restriction sites in underlined. The PCR product (±4 kb DNA fragment) was purified by Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA).

2.3 Construction of plasmid

The plasmid pHT315-PxylA (Gominet et al., 2001) derived from pHT315 (Arantes and Lereclus, 1991) was used to express Vip2Bb4 and Vip1Bb3 proteins under xylose-inducible promoter. The amplicon containing the operon *vip2Bb4_vip1Bb3* was cloned into pHT315-PxylA vector by digestion with *BamHI* and *HindIII* endonucleases and then ligated with T4 DNA ligase (Invitrogen, USA) in

accordance with the manufacturer's recommendations. First of all, pHT315-PxylA Ω vip2Bb4_vip1Bb3 plasmid was transformed into *E. coli* TG1 and, posteriorly, in *E. coli* ET12567 by heat-shock method (Sambrook et al., 2001). For both, the selections of transformants were done by ampicillin resistant ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). The pHT315-PxylA Ω vip2Bb4_vip1Bb3 plasmid extracted from *E. coli* ET12567 was transformed into *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ by electroporation as anteriorly described (Lereclus et al., 1989) and the transformants were selected by erythromycin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$).

The pHT315-PxylA Ω vip2Bb4_vip1Bb3 plasmid was sequenced by ABI PRISM™ 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using oligonucleotides for the vector (PR AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA and xylA GGGGGAAATCACATGGCTCAATC), vip2Bb4_F and vip1Bb3_R. Sequences were analyzed using MEGA v.7.0.

2.4 Expression of vip2Bb4 and vip1Bb3 genes

A single colony of *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ strain harboring pHT315-PxylA Ω vip2Bb4_vip1Bb3 plasmid, was picked and grown in LB broth at 30°C on a shaker (180 rpm). At reached an optical density (600 nm) between 0.6 – 0.9 was added xylose to a final concentration of 20 mM to induce expression. After induction overnight at 30°C, the cells were centrifuged and resuspended in lysis buffer (20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 with 300 mM NaCl, 3 mg mL⁻¹ lysozyme and 100 μM PMSF) incubated with shaking for 30 min at 37°C and then keep on freezing at -20°C for 30 min. The cells were centrifuged at 27,000 x g and the supernatant recovered and filtered through sterile 0.22 μm cellulose acetate filters.

The expression was checked by 12% SDS-PAGE with Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich) staining.

3. Results and Discussion

Vip1/Vip2 are known like binary toxins because it is indispensable to act together to demonstrate toxicity (Chakroun et al., 2016; Sellami et al., 2016). This is based in assays that test the toxic activity through the Vip1 and Vip2 combinations or/and evaluate individually these proteins against insects from different orders (Chakroun et al., 2016).

The amplicon of *vip1/vip2* from *B. thuringiensis* V-J20.2 (~4 kb) was amplified using specific primers, successfully inserted into pHT315-PxylA vector, and transformants harboring inserts were isolated through resistants and confirmed with specific PCR, double digestion with *Bam*HI and *Hind*III and finally, sequencing with *vip1/vip2* genes and vector primers. The results shown that pHT315-PxylAΩ*vip2Bb4_vip1Bb3* contained two open reading frames (ORF: *vip2* and *vip1*). The comparative Blast analysis showed that the clones had 100% similarity comparing to the previously reported *vip2Bb4* (accession number KR065728.1) and *vip1Bb3* (accession number KR065727.1) genes.

These toxins are expressed and translation from the same operon (Palma et al., 2014; Shi et al., 2004), allowing to maintain high levels of expression (M. Chakroun et al., 2016). To test if these genes could encode functional toxins, *vip2Bb4* and *vip1Bb3* were cloned and expressed under the control of the *xylA* inducible promoter of pHT315-PxylA in the acrySTALLIFEROUS *B. thuringiensis* 407 Cry⁻. The recombinants were grown in LB medium with erythromycin and induced with xylose at overnight. After this time, the protein product was detected in supernatants and visualized by SDS-PAGE. Therefore, the expression of binary toxins Vip1Bb3 and Vip2Bb4 through pHT315-PxylAΩ*vip2Bb4_vip1Bb3* in *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ confirmed that these genes are located on a single operon and co-expressed

according (Bi et al., 2014; Murawska et al., 2013; Shi et al., 2007).

Secreted proteins contain a peptide signal that is cleaved before or after of transportation (Shi et al., 2007). Several studies have reported the importance of the peptide signal to the secreted Vip proteins (Palma et al., 2012; Rang et al., 2005; Sellami et al., 2016a; Selvapandiyan et al., 2001; Zhu et al., 2006).

Proteins Vip2Bb4 and Vip1Bb3 present molecular weight about 100 and 50 kDa containing typical peptide signals of *Bacillus*, in N-terminal region (30 – 50 aa, respectively) (Shi et al., 2007, 2004; Shingote et al., 2013). According Bi et al., (2014), after cleavage of signal peptide, Vip2Ag1 and Vip1Ad1 exhibit bands of approximately 40 kDa and 80 kDa, respectively. Vip2Bb4 and Vip1Bb3 exhibit bands of approximately 45 and 82 kDa, respectively (Fig.1), certifying those genes were successfully expressed. A DNA sequence encoding a secretion signal was identified in the *vip2Bb4* and *vip1Bb3* genes using SignalP tools. The signal peptides were identified in aminoacids 1 – 34 and 1 – 29 for Vip2Bb4 and Vip1Bb3, respectively. Additionally, the aminoacids 34 – 35 were identified as the cleavage site to Vip2Bb4, while the cleavage site of Vip1Bb3 was identified in the aminoacids 29 – 30.

Thus, this study comprises the first step in the identification process of toxins with potential for insect control. Vip1 and Vip2 proteins has insecticidal activity to several insects pests as *Diabrotica virgifera*, *Diabrotica barberi* and *A. gossypii* (Shingote et al., 2013; Warren, 1997; Yu et al., 2011a), therefore, it is necessary to study their effectiveness as insecticidal toxins against different insects pests.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), Spanish Ministry of Economy and Competitvity (Grants

Ref. AGL2009-13340-C02-01 and AGL2012-39946-C02-01). APSR was supported by PhD grant from CAPES. JGC was recipient of PhD grant from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant ref. BES-2013-065848).

Reference

- Bi, Y., Zhang, Y., Shu, C., Crickmore, N., Wang, Q., Du, L., Song, F., Zhang, J., 2014. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to Scarabaeoidea larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 753–760. doi:10.1007/s00253-014-5966-2
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., Ferré, J., 2016. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 329–350. doi:10.1128/MMBR.00060-15.Address
- Chakroun, M., Banyuls, N., Walsh, T., Downes, S., James, B., Ferré, J., 2016. Characterization of the resistance to Vip3Aa in *Helicoverpa armigera* from Australia and the role of midgut processing and receptor binding. *Sci. Rep.* 6, 24311. doi:10.1038/srep24311
- Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A., Dean, D.H., 2017. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [WWW Document]. URL http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt (accessed 1.1.17).
- Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5389–5394. doi:10.1073/pnas.93.11.5389
- Ferré, J., Van Rie, J., 2002. Biochemistry and Genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501–33.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., Lereclus, D., 2001. Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Mol. Microbiol.* 40, 963–975. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02440.x
- Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C.S., Rie, J. Van, Escriche, B., Ferré, J., 2013. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. *J. Invertebr. Pathol.* 113,

78–81. doi:10.1016/j.jip.2013.02.001

- Herrero, S., Bel, Y., Hernández-Martínez, P., Ferré, J., 2016. Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. *Curr. Opin. Insect Sci.* 15, 89–96.
doi:10.1016/j.cois.2016.04.006
- Jucovic, M., Walters, F.S., Warren, G.W., Palekar, N. V., Chen, J.S., 2008. From enzyme to zymogen: engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity. *Protein Eng. Des. Sel.* 21, 631–638.
doi:10.1093/protein/gzn038
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N., Chen, J., 2003. The Mode of Action of the *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein Vip3A Differs from That of Cry1Ab δ -Endotoxin. *Biochem. Pharmacol.* 69, 4648–4657.
doi:10.1128/AEM.69.8.4648–4657
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., Lecadet, M., 1989. Transformation and expression of a cloned delta endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211–217.
- Leuber, M., Orlik, F., Schiffler, B., Sickmann, A., Benz, R., 2006. Vegetative Insecticidal Protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for Oligomer and Channel Formation †. *Biochemistry* 45, 283–288.
doi:10.1021/bi051351z
- Liu, J., Yang, A., Shen, X., Hua, B., Shi, G., 2011. Specific binding of activated Vip3Aa10 to *Helicoverpa armigera* brush border membrane vesicles results in pore formation. *J. Invertebr. Pathol.* 108, 92–97. doi:10.1016/j.jip.2011.07.007
- Murawska, E., Fiedoruk, K., Bideshi, D.K., Swiecicka, I., 2013. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Strain IS5056, an Isolate Highly Toxic to *Trichoplusia ni*. *Genome Announc.* 1, e00108-13-e00108-13.
doi:10.1128/genomeA.00108-13
- Palma, L., Hernandez-Rodriguez, C.S., Maeztu, M., Hernandez-Martinez, P., Ruiz de Escudero, I., Escrache, B., Munoz, D., Van Rie, J., Ferre, J., Caballero, P., 2012.

- Vip3C, a Novel Class of Vegetative Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7163–7165. doi:10.1128/AEM.01360-12
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P., Caballero, P., 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins (Basel)*. doi:10.3390/toxins6123296
- Rang, C., Gil, P., Neisner, N., Rie, J. Van, Frutos, R., 2005. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis* Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis* †. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6276–6281. doi:10.1128/AEM.71.10.6276
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Third ed. ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sattar, S., 2011. Molecular Characterization of a Novel Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis* Effective Against Sap-Sucking Insect Pest. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 937–946. doi:10.4014/jmb.1105.05030
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 775–806.
- Sellami, S., Slim, T., Jamoussi, K., 2016b. Les protéines insecticides binaires Vip1 , Vip2 de la souche entomopathogène *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Agric.* 11, 80–85.
- Selvapandiyan, A., Arora, N., Rajagopal, R., Jalali, S.K., Singh, S.P., Bhatnagar, R.K., Venkatesan, T., 2001. Toxicity Analysis of N- and C-Terminus-Deleted Vegetative Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5855–5858. doi:10.1128/AEM.67.12.5855
- Sena, J.A.D., Hernandez-Rodriguez, C.S., Ferre, J., 2009. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2236–2237. doi:10.1128/AEM.02342-

08

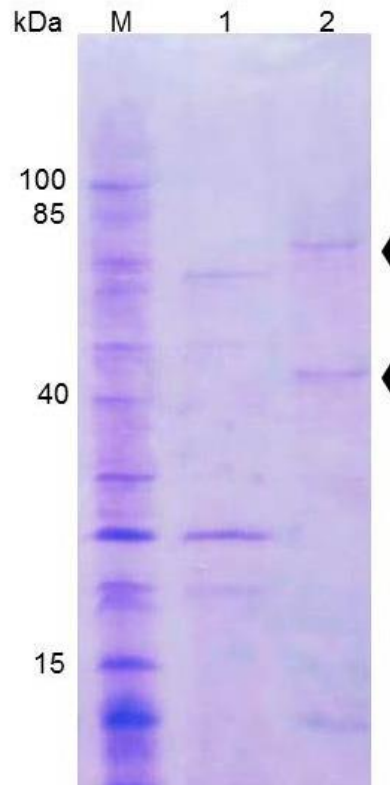
- Shi, Y., Ma, W., Yuan, M., Sun, F., Pang, Y., 2007. Cloning of vip1/vip2 genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 501–507. doi:10.1007/s11274-006-9252-z
- Shi, Y., Xu, W., Yuan, M., Tang, M., Chen, J., Pang, Y., 2004. Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. *J. Appl. Microbiol.* 97, 757–765. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02365.x
- Shingote, P., P. Moharil, M., R. Dhumale, D., V. Jadhav, P., S. Satpute, N., S. Dudhare, M., 2013. Screening of vip1/vip2 binary toxin gene and its isolation and cloning from local *Bacillus thuringiensis* isolates. *ScienceAsia* 39, 620. doi:10.2306/scienceasia1513-1874.2013.39.620
- Tabashnik, B.E., Van Rensburg, J.B.J., Carrière, Y., 2009. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J. Econ. Entomol.* 102, 2011–2025. doi:http://dx.doi.org/10.1603/029.102.0601
- Warren, G., 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. *Adv. Insect Control Role Transgenic Plants* 109–121. doi:10.1201/9780203211731.ch7
- Welch, K.L., Unnithan, G.C., Degain, B.A., Wei, J., Zhang, J., Li, X., Tabashnik, B.E., Carrière, Y., 2015. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. *J. Invertebr. Pathol.* 132, 149–156. doi:10.1016/j.jip.2015.10.003
- Yu, X., Liu, T., Liang, X., Tang, C., Zhu, J., Wang, S., Li, S., Deng, Q., Wang, L., Zheng, A., Li, P., 2011a. Rapid detection of vip1-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel vip binary toxin gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 325, 30–36. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02409.x
- Yu, X., Zheng, A., Zhu, J., Wang, S., Wang, L., Deng, Q., Li, S., Liu, H., Li, P., 2011b. Characterization of Vegetative Insecticidal Protein vip Genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Curr. Microbiol.* 62, 752–757.

doi:10.1007/s00284-010-9782-3

Zhu, C., Ruan, L., Peng, D., Yu, Z., Sun, M., 2006. Vegetative insecticidal protein enhancing the toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against *Spodoptera exigua*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 109–114. doi:10.1111/j.1472-765X.2005.01817.x

Figures Legends

Fig. 1 SDS-PAGE of *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ lysates. Lane 1: uninduced culture of *B. thuringiensis* pHT315-PxyIAΩvip2Bb4_vip1Bb3; Lane 2: induced culture of *B. thuringiensis* pHT315-PxyIAΩvip2Bb4_vip1Bb3 shown Vip1Bb3 (approximately 82 kDa) and Vip2Bb4 (approximately 45 kDa) protoxin (arrows). Marker: PageRuler™ Unstained Ladder (10 – 200 kDa) ThermoFisher Scientific, USA.



Publicação III

Complete genome sequence of Bacillus thuringiensis BR145, a strain with insecticidal activity against Lepidopteran pests

Manuscrito a ser submetido ao periódico Genome Announcements

To be submitted to: Genome Announcements

Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* BR145, a strain with insecticidal activity against Lepidopteran pests

Ana Paula Scaramal Ricietto^a, Kátia Brumatti Gonçalves^a, Renan José Casarotto Appel^a, Ivan Rodrigo Wolf^b, Carlos Roberto Maximiano da Silva^a, Daniel Ricardo. Sosa-Gómez^c, Gislayne Trindade Vilas-Bôas^a, Laurival Antonio Vilas-Boas^{a*}

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

^b Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo, Brazil

^c Embrapa Soja, Londrina, Paraná, Brazil

*Corresponding author: Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – Londrina (Paraná), Brazil

Tel.: (55) 43 3371 4752; e-mail: laurival.vboas@gmail.com

Abstract

Bacillus thuringiensis BR145, a Gram-positive, spore-forming bacterium isolated from soybean field in Southern Brazil with toxicity against *Helicoverpa armigera* and *Chrysodeixis includes*. The analysis of the genome revealed the insecticidal genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Ab*, *cyt1* and *vip3Aa* suggesting the use of this strain in new strategies of biological control.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal genes, virulence factors, *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis includes*.

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive bacterium with entomopathogenic activity associated the insecticidal proteins like Cry and Vip, which have been shown toxicity to the insects of orders Lepidopteran, Coleopteran, Dipteran and against species of others Filos (1–3). Due their insecticidal activity, *B. thuringiensis* have been used in biological control of agricultural pests that cause losses in crops.

B. thuringiensis BR145 was isolate in soybean field in Brazil (4). The strain showed positive results in assays with *Ecdytoplopha aurantiana* (Lima) (Lepidoptera: Tortricidae) (5), *Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1848 (Lepidoptera: Pyralidae) (6) and more two species, *Helicoverpa armigera* Hübner, 1805 (Lepidoptera: Noctuidae) (LC₅₀ 0,294 µg.cm⁻²) and *Chrysodeixis includes* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) (LC₅₀ 0,277 µg.cm⁻²).

Genomic DNA was isolated from BR145 using Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). Whole-genome sequencing was performed by Illumina Hiseq/Miseq, with the paired-end sequence strategy, which generated a total of 3,042,174 reads of high quality. The analysis methods were chosen according (7). The genome was assembled by *de novo* with SPAdes version 3.9.0 (8). The final draft genome consisted of 235 contigs (length>1000 bp), with a total size of 6,350,733 bp, N50 value of 84,578 and a G+C content 34,78%. The RAST server program (9) proposed that this strain contains 6,647 coding sequences and 224 RNA genes in 494 subsystems. We found five *cry* genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Ab*, *cyt1* and *vip3Aa*. Sequences that indicate insecticidal genes were compared using the Blast tool and all the *cry* genes, as well as the *vip3Aa* gene were found only in the plasmids. Genes associated the virulence factors as phospholipase, hemolysin, metalloprotease, enterotoxin and cytotoxin K were also located in this genome.

A BLASTn analysis of the BR145 contigs against the NCBI nonredundant database identified *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* as the closest relative.

Nucleotide sequence accession numbers. The complete genome sequence of *B. thuringiensis* BR145 strain will be deposited in GenBank.

Acknowledgements

Daniel R Sosa-Gómez and Fabio Paro from Entomology Laboratory (EMBRAPA Soja, Brazil) by assays against *H. armigera* and *C. includens*.

This work received support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. Ricietto, A.P.S., Appel, R.J.C., Silva, C.R.S and Wolf, I. were supported by fellowships from CAPES and CNPq.

Reference

1. **Deng C, Slamti L, Raymond B, Liu G, Lemy C, Gominet M, Yang J, Wang H, Peng Q, Zhang J, Lereclus D, Song F.** 2015. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. *ISME J* **9**:286–296.
2. **Palma L, Berry C.** 2016. Understanding the structure and function of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon* **109**:1–3.
3. **Vilas-Bôas GT, Alvarez RC, Santos CA, Vilas-Boas LA.** 2012. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? *EntomoBrasilis* **5**:1–10.
4. **Ricieto APS, Fazion FAP, Carvalho Filho CD, Vilas-Boas LA, Vilas-Bôas GT.** 2013. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Can J Microbiol* **59**:28–33.
5. **Zorzetti J, Ricietto APS, Fazion FAP, Meneguim AM, Neves PMOJ, Vilas-Boas LA, Rodrigues RB, Vilas-Bôas GT.** 2017. Selection and Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Eubacteriales: Bacillaceae) Strains for *Ecdytolopha aurantiana* (Lima) (Lepidoptera: Tortricidae) Control. *Neotrop Entomol* **46**:86–92.
6. **Zorzetti J, Ricietto APS, Fazion FAP, Meneguim AM, Neves PMOJ, Vilas-Bôas GT.** 2017. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains active against *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera, Pyralidae). *Acta Sci Agron.* (No prelo)
7. **Zorzetti J, Ricietto APS, da Silva CRM, Wolf IR, Vilas-Bôas GT, Neves**

- PMOJ, Meneguim AM, Vilas-Boas LA.** 2015. Genome Sequence of the Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* Strain BR58, a Biopesticide Product Effective against the Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*). *Genome Announc* **3**:e01232-15.
8. **Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G.** 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**:1072–1075.
9. **Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O.** 2008. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* **9**:75.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

Os clones dos genes *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ca* e *vip3Aa* de *B. thuringiensis* em sistemas heterólogos são efetivos para a expressão, purificação e ativação das proteínas Cry1A e Vip3Aa e estas são eficazes no controle de larvas de *G. molesta* das populações estudadas nos bioensaios. Contudo, não convém utilizar estas combinações no controle desta praga uma vez que apresentaram efeito antagônico quando testadas em conjunto.

Os genes *vip1Bb3* e *vip2Bb4* da linhagem V-J20.2 de *B. thuringiensis* foram transformados e expressos em *B. thuringiensis* 407 Cry⁻ e sua toxicidade será testada frente a coleópteros pelo laboratório de Genética e Bioquímica Aplicada do Dr. Juan Ferré. Com estes dados, poderemos compreender melhor o modo de ação desta família de toxinas binárias de *B. thuringiensis*.

As análises do genoma de *B. thuringiensis* BR145 confirmaram a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Ab*, *cyt1* e *vip3Aa* além dos demais fatores de virulência envolvidos na toxicidade de *B. thuringiensis* e os ensaios realizados com a linhagem BR145 mostraram toxicidade frente à *H. armigera* e *C. includens*.

Ao final, todos estes estudos apresentados nesta tese, nos permitiram transitar pelas inúmeras possibilidades de *B. thuringiensis*. Embora tenhamos trabalhado com diferentes linhagens, diferentes genes e proteínas, o enfoque principal de avaliar a toxicidade destes e compreender o modo de ação foi mantido. Para isso, utilizamos diferentes técnicas e análises, de forma a contribuir com a utilização desta bactéria

no controle biológico de diversos insetos, permitir o desenvolvimento e o emprego em futuras aplicações biotecnológicas.

VIII. REFERÊNCIAS

- ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: Dadhialla, T. S.; Gill, S. S. **Insect Midgut and Insecticidal Proteins**. 1. ed. USA: Elsevier (Advances in Insect Physiology), 2014. p. 39 - 87.
- ANDERSON, C. J. et al. Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. **Molecular Ecology**, v. 25, n. 21, p. 5296–5311, 2016.
- ARENAS, I. et al. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12497–12503, 2010.
- AZIZOGLU, U. et al. The synergic and antagonistic activity of Cry1Ab and Cry2Aa proteins against lepidopteran pests. **Journal of Applied Entomology**, v. 140, n. 3, p. 223–227, 2016.
- BATISTA NETO, O. A. **Bases para o manejo da resistência de *Bonagota salubricola* e *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) a inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro**. 2013. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP, Piracicaba, 2013.
- BEL, Y.; ESCRICHE, B. Common genomic structure for the Lepidoptera cadherin-like genes. **Gene**, v. 381, n. 1–2, p. 71–80, 2006.
- BI, Y. et al. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to Scarabaeoidea larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 753–760, 2014.
- BRAR, S. K. et al. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 323–342, fev. 2006.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A. et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 17–26, jan. 2013.

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

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.

BRETSCHNEIDER, A.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. Three toxins, two receptors, one mechanism: Mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 76, p. 109–117, 2016.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 161–168, 19 jan. 2015.

CARRIÈRE, Y.; FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 291–302, 2016.

CHAKROUN, M. et al. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 334–339, 2012.

CHAKROUN, M. **Biochemical and molecular study of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal proteins (Vip3A) mode of action in *Spodoptera* species** **Tesis Doctoral**. 2015.138 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidad de Valencia (Espanha), Valencia, 2015.

CHAKROUN, M. et al. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329–350, 2016.

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. In vivo and in vitro binding of Vip3Aa to *Spodoptera*

frugiperda midgut and characterization of binding sites by 125I radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 20, p. 6258–6265, 2014.

CHAVES, C. C. et al. Efeito de inseticidas em diferentes fases de desenvolvimento de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) e estruturas vegetais da macieira e do pessegueiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 842–852, dez. 2014.

CRAVA, C. M. et al. Midgut aminopeptidase N isoforms from *Ostrinia nubilalis*: Activity characterization and differential binding to Cry1Ab and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 10, p. 924–935, 2013.

CRAVA, C. M. et al. Susceptibility to cry proteins of a Spanish *Ostrinia nubilalis* glasshouse population repeatedly sprayed with *Bacillus thuringiensis* formulations. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 1–2, p. 78–86, 2014.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* resistance in *Plutella* - Too many trees? **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, p. 84–88, 2016.

CRICKMORE, N. et al. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt>. Acesso em: 1 jan. 2017.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 2013, n. Matthews 1999, p. 110–113, 2013.

DENG, C. et al. Division of labour and terminal differentiation in a novel *Bacillus thuringiensis* strain. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v. 9, n. 2, p. 286–296, 2015.

DOSS, V. A. et al. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 2, p. 368, abr. 2002.

DOURADO, P. M. et al. High susceptibility to Cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–15, 2016.

- ESTRUCH, J. J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 11, p. 5389–5394, 28 maio 1996.
- EVDOKIMOV, A. G. et al. Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. **Protein Science**, v. 23, n. 11, p. 1491–1497, nov. 2014.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal Genetically Modified Crops and Insect Resistance Management (IRM). In: Romeis, J.; Shelton, A. M.; Kennedy, G. G. **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs**. Netherlands: Springer, 2008. p. 41–85.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and Genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review Entomology**, v. 47, p. 501–33, 2002.
- FUNICHELLO, M. et al. Effect of transgenic and non-transgenic cotton cultivars on the development and survival of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 44, p. 5424–5428, 2013.
- GAYEN, S.; HOSSAIN, M. A.; SEN, S. K. Identification of the bioactive core component of the insecticidal Vip3A toxin peptide of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 21, n. S1, p. 128–135, 4 out. 2012.
- GÓMEZ, I. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, v. 459, p. 383–96, 2014.
- HENDRIKSEN, N. B. The Two Lives of *Bacillus thuringiensis*: Response to Ruan et al. and Loguercio and Argôlo-Filho. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 1–2, 2016.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. et al. Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-resistant *Spodoptera exigua*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–10, 2010.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. et al. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 78–81, maio 2013.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S. et al. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 219–225, 2009.

IVES, A. R. et al. Spatio-Temporal Variation in Landscape Composition May Speed Resistance Evolution of Pests to Bt Crops. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p.1 -20, 2017.

JAMES, C. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. **ISAAA Brief**, v. 51, 2015.

JONES, I. M.; KOPTUR, S.; VON WETTBERG, E. J. The use of extrafloral nectar in pest management: Overcoming context dependence. **Journal of Applied Ecology**, 2016.

JUCOVIC, M. et al. From enzyme to zymogen: engineering Vip2, an ADP-ribosyltransferase from *Bacillus cereus*, for conditional toxicity. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 21, n. 10, p. 631–638, 1 jul. 2008.

JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, jul. 2016.

KIM, Y. et al. Real-time monitoring of oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, populations using a remote sensing pheromone trap in apple orchards. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 14, n. 3, p. 259–262, set. 2011.

KIRK, H.; DORN, S.; MAZZI, D. Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. **BMC Ecology**, v. 13, n. 1, p. 12, 2013.

KNIGHT, K.; HEAD, G.; ROGERS, J. Relationships between Cry1Ac and Cry2Ab protein expression in field-grown Bollgard II® cotton and efficacy against *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Crop Protection**, v.

79, p. 150–158, jan. 2016.

LEE, M. K. et al. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 583–586, 1996.

LEITE, N. A. et al. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113286, 19 nov. 2014.

LEMES, A. R. ITA N. et al. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107196, 2014.

LEUBER, M. et al. Vegetative Insecticidal Protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for Oligomer and Channel Formation. **Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 283–288, jan. 2006.

LEVINE, S. L. et al. Independent action between DvSnf7 RNA and Cry3Bb1 protein in southern corn rootworm, *diabrotica undecimpunctata howardi* and colorado potato beetle, *leptinotarsa decemlineata*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

LI, G. et al. Binding properties of general odorant binding proteins from the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–22, 2016.

LI, H.; BOUWER, G. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 121, n. June, p. 7–13, set. 2014.

LIU, J. et al. Specific binding of activated Vip3Aa10 to *Helicoverpa armigera* brush border membrane vesicles results in pore formation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, n. 2, p. 92–97, out. 2011.

LIU, Y. et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific Reports**, v. 5, p.1 - 11, 16 set. 2015.

LUONG, T. T. A. et al. Feeding behaviour and survival of *Bacillus thuringiensis* -

resistant and *Bacillus thuringiensis* -susceptible larvae of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) exposed to a diet with *Bacillus thuringiensis* toxin. **Austral Entomology**, 2017.

MCGHEE, P. S. et al. Optimizing Aerosol Dispensers for Mating Disruption of Codling Moth, *Cydia pomonella* L. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 7, p. 612–616, 2016.

MESRATI, L. A. et al. Identification of a promoter for the vegetative insecticidal protein-encoding gene vip3LB from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, n. 1, p. 101–104, jun. 2005.

MONTEIRO, L. B.; SOUZA, A. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. Kustaki em Fraiburgo-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 423–428, jun. 2010.

MOURA, A. P. et al. Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial. **Circular Técnica 129**. Embrapa Hortaliças, 2014. p. 1 - 24.

MURAWSKA, E. et al. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Strain IS5056, an Isolate Highly Toxic to *Trichoplusia ni*. **Genome Announcements**, v. 1, n. 2, p. e00108-13-e00108-13, 21 mar. 2013.

MYERS, C. T.; HULL, L. A. Summary for Policymakers. In: Intergovernmental panel on climate change. **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. v. 100p. 1–30.

PALMA, J. et al. Molecular variability and genetic structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an important soybean defoliator in Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, p. 3296 - 3325, 2014.

PALMA, L.; BERRY, C. Understanding the structure and function of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**, v. 109, p. 1–3, 2016.

PARAMASIVA, I. et al. Crop hosts and genotypic resistance influence the biological

activity of *Bacillus thuringiensis* towards *Helicoverpa armigera*. **Crop Protection**, v. 64, p. 38–46, out. 2014.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 1, p. 3–22, 2013.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology**, jul. 2016.

PERALTA, C.; PALMA, L. Is the Insect World Overcoming the Efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins**, v. 9, n. 1, p. 39, 18 jan. 2017.

PERINI, C. R. et al. How to control *Helicoverpa armigera* on soybean in Brazil? What we have learned since its detection. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 16, p. 1426–1432, 21 abr. 2016.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007.

QUINTELA, E. D. Manejo Integrado de Pragas do Feijoeiro. **Circular Técnica 46**. Embrapa Feijão e Arroz, 2001. p 1 - 28.

RANG, C. et al. Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis* Novel Vip3-Related Protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6276–6281, 2005.

RASKO, D. A. et al. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 303–329, 2005.

RAYMOND, B. et al. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189–194, 2010.

ROH et al. *Bacillus thuringiensis* as a Specific, Safe, and Effective Tool for Insect Pest Control. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 547–559, 2007.

SANAHUJA, G. et al. Bacillus thuringiensis: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 3, p. 283–300, abr. 2011.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide Bacillus thuringiensis . A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, n. 1, p. 217–231, 2 jan. 2011.

SANTOS, C. A. et al. Conjugal transfer between Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus strains is not directly correlated with growth of recipient strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, n. 2, p. 171–175, out. 2010.

SATTAR, S. Molecular Characterization of a Novel Vegetative Insecticidal Protein from Bacillus thuringiensis Effective Against Sap-Sucking Insect Pest. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 9, p. 937–946, 28 set. 2011.

SCHNEPF, E. et al. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SELLAMI, S.; SLIM, T.; JAMOSSI, K. Les protéines insecticides binaires Vip1 , Vip2 de la souche entomopathogène Bacillus thuringiensis. **Revue Agriculture**, v. 11, p. 80–85, 2016.

SELVAPANDIYAN, A. et al. Toxicity Analysis of N- and C-Terminus-Deleted Vegetative Insecticidal Protein from Bacillus thuringiensis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5855–5858, 2001.

SHI, Y. et al. Expression of vip1/vip2 genes in Escherichia coli and Bacillus thuringiensis and the analysis of their signal peptides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 757–765, out. 2004.

SHI, Y. et al. Cloning of vip1/vip2 genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in Bacillus thuringiensis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 501–507, 21 mar. 2007.

SHINGOTE, P. et al. Screening of vip1/vip2 binary toxin gene and its isolation and cloning from local Bacillus thuringiensis isolates. **Science Asia**, v. 39, n. 6, p. 620,

2013.

SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Genotyping-by-sequencing approach indicates geographic distance as the main factor affecting genetic structure and gene flow in Brazilian populations of *Grapholita molesta* (Lepidoptera, Tortricidae). **Evolutionary Applications**, v. 8, n. 5, p. 476–485, jun. 2015.

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of Action of Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis* and Resistance Mechanisms. In: GOPALAKRISHNAKONE, P. et al. **Microbial Toxins**. Netherlands: Springer, 2016.

SORGATTO, R. J.; BERNARDI, O.; OMOTO, C. Survival and development of *Spodoptera frugiperda* and *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt cotton and implications for resistance management strategies in Brazil. **Environmental Entomology**, v. 44, n. 1, p. 186–192, 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 101–104, 2016.

SPECHT, A. et al. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 689–692, jun. 2013.

SWAMY, H. M. M.; ASOKAN, R. In silico gene Characterization and Biological Annotation of *Bacillus thuringiensis* Genome Sequences. **Advances in BioResearch**, v. 4, n. 4, p. 93–98, 2013.

TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3343–3346, 1992.

TABASHNIK, B. E. et al. Efficacy of genetically modified Bt toxins alone and in combinations against pink bollworm resistant to Cry1Ac and Cry2Ab. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–7, 2013.

TABASHNIK, B. E. et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, v. 5, p. 15107, 12 out. 2015.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 10 jun. 2013.

TABASHNIK, B. E.; WU, K.; WU, Y. Early detection of field-evolved resistance to Bt cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 301–306, 2012.

TAY, W. T. et al. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80134, 18 nov. 2013.

VARELA, N. et al. Synergism of pheromone and host-plant volatile blends in the attraction of *Grapholita molesta* males. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 141, n. 2, p. 114–122, nov. 2011.

VIDAL-QUIST, J. C.; CASTAÑERA, P.; GONZÁLEZ-CABRERA, J. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 749–759, 2009.

VILAS-BÔAS, G. T. et al. Fatores de Virulência de *Bacillus thuringiensis* Berliner: O Que Existe Além das Proteínas Cry? **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2012.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 673–687, jun. 2007.

WARREN, G. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. **Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants**, p. 109–121, 1997.

WELCH, K. L. et al. Cross-resistance to toxins used in pyramided Bt crops and resistance to Bt sprays in *Helicoverpa zea*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 149–156, nov. 2015.

WU, J. et al. Evidence for Positive Darwinian Selection of *Vip* Gene in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 7, p. 649–660, jul.

2007.

XU, C. et al. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. **Toxins**, v. 6, n. 9, p. 2732–2770, 16 set. 2014.

XUE, J.-L. et al. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1c from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 460–465, jun. 2005.

YU, H. et al. Arthropod abundance and diversity in transgenic Bt soybean. **Environmental entomology**, v. 43, n. 4, p. 1124–34, 2014.

YU, X. et al. Rapid detection of vip1-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel vip binary toxin gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 325, n. 1, p. 30–36, dez. 2011.

ZHANG, Q.; HUA, G.; ADANG, M. J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. **Insect Science**, v. 1958, p. 1–16, nov. 2016.

ZHANG, X. et al. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.