

**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Paulo Geovani Silva Martins**

**Prospecção de proteínas e genes de isolados de  
*Bacillus thuringiensis* associados ao desenvolvimento  
do controle biológico de praga em cana-de-açúcar  
(*Saccharum* spp.)**

**Recife**

**2016**

**Paulo Geovani Silva Martins**

**Prospecção de proteínas e genes de isolados de  
*Bacillus thuringiensis* associados ao desenvolvimento  
do controle biológico de praga em cana-de-açúcar  
(*Saccharum* spp.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética da Universidade Federal de  
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para  
obtenção do título de Doutor em Genética.

**Orientador:** Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior

**Coorientador:** Dr. Amaro de Castro Lira Neto

**Recife**

**2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Martins, Paulo Geovani Silva**

**Prospecção de proteínas e genes de isolados de *Bacillus thuringiensis* associados ao desenvolvimento do controle biológico de praga em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) / Paulo Geovani Silva Martins – Recife: O Autor, 2016.**

**169 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Tercílio Calsa Junior**

**Coorientador: Amaro de Castro Lira Neto**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Genética, 2016.**

**Inclui referências e anexos**

**1. Micro-organismos- genética 2. *Bacillus thuringiensis* 3. Cana-de-açúcar I. Calsa Junior, Tercílio (orientador) II. Lira Neto, Amaro de Castro (coorientador) III. Título**

**579.135**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-179**

**Paulo Geovani Silva Martins**

**Aprovado em 11/03/2016**

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Amaro de Castro Lira Neto**  
**Instituto Agronômico de Pernambuco**

---

**Dra. Maria Clara Pestana Calsa**  
**Centro Universitário Maurício de Nassau**

---

**Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra**  
**Instituto Agronômico de Pernambuco**

**Recife**

**2016**

*Agradeço imensamente aos meus pais João e Maria das Neves pelo apoio incondicional recebido em todos os momentos da minha vida. Por terem ensinado os verdadeiros valores da vida, estarem sempre ao meu lado, serem referencial de persistência dignidade e honestidade, a minha eterna gratidão. Aos meus irmãos e amigos Hamilton e Fabrício.*

*Sem vocês essa etapa não se cumpriria e por isso,*

*Dedico*

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, proteção e por me dar força em todos os momentos.

Aos meus pais por acreditarem no meu potencial, me apoiarem em todas as decisões e ser sempre o meu porto seguro.

Os meus irmãos Hamilton e Fabrício pela convivência, companheirismo e amizade.

Ao Marcondes Rodrigues de Oliveira pela boa convivência, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Tercilio Calsa Junior por acreditar no meu trabalho, pela orientação e por auxiliar no meu crescimento profissional.

Ao Dr. Amaro de Castro Lira Neto pela coorientação e bom convívio.

Ao Prof. Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira do Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo total apoio para a execução dos testes de patogenicidade.

A Doutoranda Liliane Marques da Silva do Laboratório de Patologia de Insetos da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela atenção, paciência, ensinamentos e pela grande amizade.

A Rebeqa Alves e Anderson Machado também do Laboratório de Entomologia Agrícola pela ajuda na execução dos testes de patogenicidade.

As Doutoras Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra e Maria Luiza Bastos pela amizade e constantes ensinamentos.

Ao Sr. Edwardo Mendes e a Núbia Nascimento, laboratoristas do laboratório de Genômica do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), pelo carinho e grande amizade.

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) por disponibilizar o Laboratório de Genômica para a execução de parte do projeto.

Ao CETENE pela parceria e de forma especial a Central Analítica e a Dra. Júlia Furtado Campos pelo auxílio na realização das análises de espectrometria de massas.

Ao Doutorando do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP) Adauto Gomes Barbosa Neto pela boa convivência, amizade e auxílio nas análises proteômicas.

Aos outros membros e amigos do Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), Marciana Bizerra de Moraes, Romel Duarte Vilela, Melquesedec de Sousa Oliveira, Elton Pedro Nunes, Juliana Maria de Souza e Fabiana Aparecida Cavalcante Silva, pela amizade, excelente convívio, pelos risos e momentos de alegria movidos a café que me proporcionaram. Meu muito obrigado!

Aos egressos do LGPP – Amanda Emanuella Rocha de Souza, João Dutra, Maria Franciyellen Lima Tavares da Silva, Renata Santos de Oliveira, Renata Rodrigues de Almeida, Raul Felipe e Taciana Conceição Manso, o meu agradecimento pelas alegrias vividas.

A ex-técnica do LGPP Celuza Castro dos Santos, pelo carinho e atenção dispensados e por assumir em muitos momentos a condição de mãe que aconselha e ouve os desabafos, muito obrigado.

As minhas grandes amigas Lorena Queiroz e Mitsuhia Bandin por entenderem a ausência e me incentivarem nesta caminhada.

As minhas tias Maria José e Telma, as minhas primas Karolyne e Thayse pelo carinho e apoio.

A minha avó Maria Vieira da Silva (*in memoriam*) pelo carinho, pela força que sempre me deu e pelo seu exemplo de vida, dignidade, honestidade força e fé em Deus... Muito, muito obrigado.

A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética (UFPE).

A todos que fizeram parte dessa caminhada e contribuíram de alguma forma para que a realização deste trabalho se tornasse possível.

Muito Obrigado!

## Resumo

A cultura da cana-de-açúcar possui importância econômica para o Brasil pela produção de açúcar e etanol. No entanto, parte da produção é ameaçada pelo ataque de insetos-praga, destacando-se a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), que causa graves perdas econômicas. O controle biológico é alternativo ao controle químico e consiste no emprego de inimigos naturais como patógenos, que regulam a população de insetos-praga em níveis não-prejudiciais. Dentre os patógenos destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que produz toxinas, codificadas pelos genes *cry*, no formato de cristais proteicos com atividade entomotóxica para diversas ordens de insetos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização de novas estirpes de Bt com potencial entomotóxico para controle biológico da *D. saccharalis* em cana-de-açúcar. Amostras de solo coletadas possibilitaram o isolamento de 97 colônias bacterianas com características fenotípicas compatíveis para Bt. O DNA extraído foi amplificado com *primers* para os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, ativos contra dípteros e lepidópteros. Em 11,4% e 12,4% dos isolados foram constatados os genes *cry2* e *cry9*, respectivamente, e 10 destes patogenicidade variando entre 3,47% a 20,05% para *D.saccharalis*. Após comparação dos perfis proteômicos dos isolados Bt.Pri 4.7, Bt.Pri 4.29, Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11, de maior e menor potencial patogênico de cada classe gênica, foram identificadas proteínas como a shikimate quinase, envolvida na produção de toxinas em Bt, e que auxiliam o entendimento da patogênese deste micro-organismo.

**Palavras-chave:** entomotóxico, proteínas Cry, *Diatraea*, proteoma

## Abstract

Sugarcane production has economical importance to Brazil, especially due to production of sugar and ethanol. However, a proportion of the production is lost owing to damage of pest insects, including sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*), which cause severe economical lost in the sugar/ethanol industry. Biological control, alternatively to chemical control, which cause damage to human health and environment, is based on use of natural enemies such as pathogens that regulated pest insects population to a non-prejudicial level. Among pathogens, especially bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) that produce toxins, encoding by *cry* genes, which are protein crystal with entomotoxicity activity for diverse insect orders. The present work aims to isolate and characterize new strains of Bt with potential entomotoxicity to biological control of *D. saccharalis* in sugarcane. Soil samples collected allowed the isolation of 97 bacterial colonies phenotypically compatible to Bt. DNA extracted was used in PCR reaction using primers to amplify *cry1*, *cry2* and *cry9* genes, with activity against Lepidoptera and Diptera. In 11.4 and 12.4% of the strains was observed fragments with pattern expected for *cry2* and *cry9* genes, respectively, and ten isolated shown pathogenicity ranging from 3.47% to 15.62% for *D. saccharalis*. After comparing the proteomic profiles of the isolates Bt.Pri 4.7 Bt.Pri 4.29, Bt.CDi 1.3 and Bt.CDi 1.11 of major and minor pathogenic potential of every gene class proteins were identified as shikimate kinase, involved in the production of Bt toxins, and assist the understanding of the pathogenesis of this microorganism.

Key words: biological control, Cry proteins, insect, *Diatraea*, proteome

## Lista de Ilustrações

### Revisão da Literatura

- Figura 1:** Mapeamento da cultura da cana-de-açúcar no território brasileiro. Fonte: CONAB, 2015. 22
- Figura 2:** Ciclo biológico da *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana). 26
- Figura 3:** Célula de *B. thuringiensis* com esporo e cristal (Regis *et al.*, 2001; com modificações). 30
- Figura 4:** Estrutura terciária de proteínas Cry obtidas por cristalografia. Fonte: Pigott e Ellar 2007; Boonserm *et al.*, 2005. 36
- Figura 5:** Esquema da ação das toxinas Cry. (Figuras USDA, GMO Safety; Embrapa. 38

### Capítulo I

- Figura 1:** Visualização das colônias 24h após plaqueamento da suspensão contendo amostras de solo em meio Valicente e Barreto (2003): **A** e **B** Amostra de Mucugê Chapada Diamantina (BA) e Primavera (PE), respectivamente. Visualização dos isolados purificados após segunda repicagem: **C, D, E** e **F**. 58
- Figura 2:** Teste da catalase positiva com formação de bolhas na superfície da biomassa bacteriana. **A** e **B**: Isolados de Mucugê na Chapada Diamantina (BA). **C** e **D**: Isolados de Primavera (PE). 59
- Figura 3:** Visualização dos isolados após coloração com Azul de Coomassie. Seta **A**: Inclusão cristalina; Seta **B**: Esporo. Objetiva de 100x (ampliação 1.000x). 59
- Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green. **A**: Amplificações com primer Cry2 nos isolados de Primavera. **M**: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. **B**: Amplificações com primer Cry9 nos isolados de Mucugê da Chapada Diamantina e Primavera. **M**: Marcador 1 kb Ready Ladder. 62

## Capítulo II

- Figura 1.** SDS-PAGE (Poliacrilamida 12,5%) mostrando os perfis de proteínas solúveis totais de isolados de *B. thuringiensis*. Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11 isolados portadores do gene *cry9* e Bt.Pri 4.7, Bt.Pri 4.29 e HD-1 (estirpe padrão), portadores do gene *cry2*. Marcador de baixo peso molecular (M), em KDa. 91
- Figura 2:** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais dos isolados de *B. thuringiensis*. **A:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.CDi 1.3; **B:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.CDi 1.11. 92
- Figura 3:** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais dos isolados de *B. thuringiensis*. **A:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.Pri 4.29. 92
- Figura 4:** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais dos isolados de *B. thuringiensis*. **A:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Extrato proteico obtido da estirpe HD-1. 93
- Figura 5:** Imagens digitalizadas do 2D-PAGE e com a determinação dos *spots* em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. **A, B e C:** 2D-PAGE do isolado Bt.CDi 1.3; **D, E e F:** 2D-PAGE do isolado Bt.CDi 1.11. 96
- Figura 6:** Imagens digitalizadas do 2D-PAGE e com a determinação dos *spots* em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. **A, B e C:** 2D-PAGE do isolado Bt.Pri 4.7; **D, E e F:** 2D-PAGE do isolado Bt.Pri 4.29. 97
- Figura 7:** Imagens digitalizadas do 2D-PAGE e com a determinação dos *spots* em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. **A, B e C:** 2D-PAGE da estirpe HD-1; **D, E e F:** 2D-PAGE do isolado Bt.Pri 4.7. 98
- Figura 8:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Ontologia gênica para localização subcelular das proteínas identificadas nas comparações: **A:** Bt.CDi 1.11 e Bt.CDi 1.3, portadores do gene *cry9*; **B:** HD-1 (estirpe padrão) e Bt.Pri 4.7, portadores do gene *cry2*; **C:** Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.7, portadores do gene *cry2*. 112
- Figura 9:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas nas comparações: **A:** Bt.CDi 1.11 e Bt.CDi 1.3, portadores do gene *cry9*; **B:** HD-1 (estirpe padrão) e Bt.Pri 4.7, portadores do gene *cry2*; **C:** Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.7, portadores do 115

gene *cry2*.

## Discussão Geral

**Figura 1:** Modelo proposto para o possível mecanismo de ação dos isolados Bt.Pri 4.7, Bt.CDi 1.3 e da estirpe padrão HD-1. **Proteínas de Bt.Pri 4.7:** <sup>1</sup>Holo-acil-transportador de proteína sintase; <sup>2</sup>Octanoil transferase; <sup>3</sup>Sulfurtransferase tRNA; <sup>4</sup>Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase; <sup>5</sup>ATP sintase subunidade  $\alpha$ . **Proteínas da estirpe HD-1:** <sup>6</sup>Proteína de cristal pesticida Cry1Aa; <sup>7</sup>Proteína desconhecida de 29.1 kDa da região *cryB1 5'*; <sup>8</sup>Proteína de cristal pesticida Cry1Ab; <sup>9</sup>Proteína de cristal pesticida Cry1Ac; <sup>10</sup>Proteína ribossomal 50S L31B; <sup>11</sup>Fator de alongamento Tu; <sup>12</sup>Chaperonina 60 kDa. **Proteínas de Bt.CDi 1.3:** <sup>13</sup>Proteína A do estágio IV de esporulação; <sup>14</sup>3-desidroquinase desidratase; <sup>15</sup>Chaperonina HSP70; <sup>16</sup>1-Pirrolina-5-Carboxilato desidrogenase; <sup>17</sup>Subunidade  $\alpha$  da V-ATP sintase. Figura do epitélio do intestino médio de Raymond *et al.*, (2010), com modificações.

136

## Anexo II

**Figura 1:** Amplificações dos genes *cry3*, *cyt1* e *vip3A*. **a.** Gene *cry3* amplificado no isolado Bt.Pri 3.5; **b.** Amplificação do gene *cyt1* em P12; **c.** Gene *vip3A* amplificado em Bt.CDi 5 onde foi utilizado como controle positivo a cepa HD-1. As setas apontam para as amplificações obtidas. M = Marcador molecular ladder 1kB da Invitrogen

155

## Anexo III

**Figura 1:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de processo biológico assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.3; **B:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.11.

160

**Figura 2:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de processo biológico assim como a legenda de cores disponível para cada

161

categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas na estirpe HD-1.

**Figura 3:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de processo biológico assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.29. 162

**Figura 4:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) para função molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de função molecular assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.3; **B:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.11. 164

**Figura 5:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) para função molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de função molecular assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 4.7; **B:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas na estirpe HD-1. 165

**Figura 6:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) para função molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de função molecular assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.29. 166

## Lista de Tabelas

### Capítulo I

<b>Tabela 1:</b> <i>Primers</i> universais utilizados para ampliações de genes <i>cry</i> .	55
<b>Tabela 2:</b> Perfil genético dos amplificados.	61
<b>Tabela 3:</b> Médias de mortalidade percentual ( $\pm$ EP) de <i>Diatraea saccharalis</i> por isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> com $10^8$ esporos/mL.	64

### Capítulo II

<b>Tabela 1:</b> Total de <i>spots</i> coletados com Anova significativa e com razão de variação de %vol $\geq 1,5$ para os <i>spots</i> comuns, nas comparações entre os isolados que possuem o gene <i>cry2</i> Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29; Bt.Pri 4.7 x HD-1 e entre os portadores de <i>cry9</i> Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11.	99
<b>Tabela 2:</b> Eficiência das análises em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação.	100
<b>Tabela 3:</b> Classificação da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot.	102
<b>Tabela 4:</b> Anotação presumível das DEPs de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> , de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa Mascot. O <i>Ratio</i> significa à razão de variação entre as %vol dos <i>spots</i> comuns na comparação entre os isolados Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.29. ANOVA refere-se ao valor <i>p</i> calculado para significância estatística da diferença na %vol entre os <i>spots</i> da comparação, sendo considerada significativa se $p \leq 0,05$ . Estão apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE para cada <i>spot</i> .	103
<b>Tabela 5:</b> Anotação presumível das DEPs de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> , de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa Mascot. O <i>Ratio</i> significa à razão de variação entre as %vol dos <i>spots</i> comuns na comparação entre os isolados Bt.Pri 4.7 e a estirpe HD-1. ANOVA refere-se ao valor <i>p</i> calculado para significância estatística da diferença na %vol entre os <i>spots</i> da comparação, sendo considerada significativa se $p \leq 0,05$ . Estão apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE para cada <i>spot</i> .	106
<b>Tabela 6:</b> Anotação presumível das DEPs de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> , de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa Mascot. O <i>Ratio</i> significa à razão de variação entre as %vol dos <i>spots</i> comuns na comparação entre os isolados Bt.CDi 1.3 e CDi 1.11. ANOVA refere-se ao valor	109

$p$  calculado para significância estatística da diferença na %vol entre os *spots* da comparação, sendo considerada significativa se  $p \leq 0,05$ . Estão apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE para cada *spot*.

## Anexo I

**Tabela 1:** Características morfofisiológicas dos isolados de amostras de solos 48h após plaqueamento em meio Valicente e Barreto (2003). 149

**Tabela 2:** Características morfofisiológicas dos isolados de amostras de solc 24h após plaqueamento em meio Valicente e Barreto (2003). 150

**Tabela 3:** Características morfofisiológicas do isolados de amostras de solos 24h após plaqueamento em meio Valicente e Barreto (2003). 151

## Anexo II

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para amplificação gênica. 154

**Tabela 2:** Perfil genético dos amplificados. 155

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AN	Ágar Nutriente
2D	Eletroforese bidimensional
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BSA	Albumina do soro bovino
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
<i>cry</i>	Gene
Cry	Proteínas cristais
Cyt	Endotoxinas Citolíticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP'	Dinucleotídeo
FAO	<i>Food and Agricultural Organization of the United Nations</i>
IEF	Focalização isoeletrica
Kb	Tamanho do fragmento de DNA por 1000 pares de base
kDa	Kilodaltons
LB	Meio Luria-Bertani
MS	Espectrometria de massa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pI	Ponto isoeletrico
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i> (Identificação por padrão de massas de peptídeos)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TBE	Tris base, ácido bórico e EDTA
Vip	Proteína Inseticida Vegetativa

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	18
<b>2. Revisão da Literatura</b>	21
2.1 Cana-de-açúcar: Breve histórico e importância econômica	21
2.2 Pragas associadas à cana-de-açúcar	24
2.3 Métodos de controle das pragas associadas a cana-de-açúcar	27
2.4 <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
2.5 Genômica e proteômica de <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
2.6 Entomopatogenicidade de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
2.7 Produtos a base de <i>B. thuringiensis</i>	41
<b>3. Objetivos</b>	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2 Objetivos específicos	45
<b>4. Capítulo I</b>	46
Prospecção de genes de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> associados ao desenvolvimento do controle biológico de <i>D. saccharalis</i> na cultura da cana-de-açúcar ( <i>Saccharum</i> spp.)	
<b>5. Capítulo II</b>	78
Proteômica diferencial de <i>Bacillus thuringiensis</i> com níveis distintos de patogenicidade para praga da cana-de-açúcar ( <i>Saccharum</i> spp.)	
<b>6. Discussão Geral</b>	132
<b>7. Conclusões Gerais</b>	137
<b>8. Referências Bibliográficas</b>	138
<b>Anexo I – Caracterização morfológica dos isolados</b>	148
<b>Anexo II – Prospecção de genes <i>cry</i>, <i>cyt</i> e <i>vip</i></b>	153
<b>Anexo III – Ontologia Gênica</b>	157
<b><i>Curriculum vitae</i> (Lattes)</b>	167

## 1. Introdução

Dentro do cenário socioeconômico brasileiro a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) se destaca como uma das culturas de maior importância por ser a base da produção do açúcar e do etanol, que é considerado como fonte alternativa de energia. A produção de cana-de-açúcar no Brasil vem apresentando patamares elevados e as perspectivas são de incrementos até a safra de 2021. Embora apresente perspectivas de crescimento, a cultura da cana-de-açúcar é alvo constante de pragas das mais diversas espécies. Esta suscetibilidade a disseminação de pragas compromete a planta e por consequência, desacelera a produção e afeta a obtenção dos seus principais derivados (MAPA, 2011; CONAB, 2014; Garcia, 2013).

Entre as pragas que utilizam a cana-de-açúcar como hospedeiro, os insetos ganham destaque como um dos principais fatores limitantes da produção de cana-de-açúcar no Brasil. Entre os insetos a *Diatraea saccharalis*, conhecida popularmente como broca da cana-de-açúcar, é reputada como uma das mais importantes pragas da cultura da cana pela dificuldade em seu combate devido ao fato de parte do seu ciclo biológico ocorrer no interior dos colmos (Pinto, 2006; Vacari *et al.*, 2012; Svedese *et al.*, 2013).

O resultado mais relevante da infestação por *D. saccharalis* é a diminuição no peso na cana com consequente queda da produção de açúcar e álcool, seus principais derivados, em aproximadamente 0,5% quando o índice de infestação na lavoura é de apenas 1% (Gallo *et al.*, 2002). Como tentativa de minimizar estes e outros danos causados pela *D. saccharalis* durante a infestação, formulações químicas são administradas nas lavouras. No entanto, este método de controle em muitos casos é ineficiente e ainda traz problemas ambientais e de saúde

pública por serem compostos que permanecem por anos na natureza e normalmente atingem espécies não alvo (Franceschini *et al.*, 2001).

Visando a diminuição na utilização das formulações químicas, o Controle Biológico através da utilização de inimigos naturais é uma alternativa promissora para redução de populações de pragas nas lavouras incluindo nas de cana-de-açúcar. Entre os muitos agentes utilizados, o *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma das mais bem sucedidas estratégias dentro do controle biológico (Brodeur, 2012; Walqui *et al.*, 2013).

O Bt é uma bactéria cosmopolita encontrada nos mais diversos ambientes que apresenta forma de bastonete, capacidade de formar esporos e sintetizar proteínas com atividade inseticida. Estas proteínas inseticidas são produzidas na forma de cristais na fase estacionária da célula como resultado da expressão de genes denominados *cry*. As inclusões cristalinas (proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas) são acumuladas nas células e liberadas no meio ao final da esporulação (Bravo *et al.*, 2005; Fiuza *et al.*, 2012).

Inúmeros genes *cry* foram identificados e as proteínas por eles codificadas apresentam toxicidade específica para diversas ordens de insetos como Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Homoptera, Hymenoptera, Mallophaga. A ação das proteínas Cry sobre os insetos susceptíveis se dá após a ingestão dos cristais, solubilização, ativação por proteases e ligação a receptores intestinais de alta afinidade, com consequente formação de poros nas membranas e destruição celular. Em um breve período de tempo é possível observar os efeitos da infecção e morte do inseto (Grossi-De-Sá *et al.*, 2007; Bravo e Soberón, 2008).

A ação e os efeitos descritos em insetos susceptíveis não são observados em seres humanos e outros mamíferos (Sanahuja *et al.*, 2011); por este motivo a

prospecção de isolados e identificação de seus genes e proteínas ocorre de forma constante para possibilitar o maior conhecimento sobre a patogenicidade do Bt e também sua possível utilização em métodos de controle de pragas.

Após o isolamento as técnicas que envolvem a Biologia Molecular estão sempre presentes na caracterização de novos isolados de Bt com os genes normalmente sendo prospectados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com *primers* consolidados. Nos últimos anos as técnicas da área da Proteômica como a Eletroforese Bidimensional (2D) aliada a Espectrometria de Massas (ME) ganharam força e foram incorporadas nas pesquisas envolvendo Bt por possibilitar a identificação das proteínas realmente expressas pelo genoma em dado momento (Rosas García *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Gong *et al.*, 2012).

Deste modo, o presente trabalho objetivou a criação de um banco de *Bacillus thuringiensis* com posterior identificação de genes *cry* presentes, avaliação do potencial de isolados sobre *D. saccharalis* (broca da cana-de-açúcar) e comparação dos proteomas utilizando eletroforese bidimensional 2D de isolados com níveis distintos de patogenicidade, seguido da identificação por espectrometria de massas dos peptídeos diferencialmente expressos e que possam estar envolvidos na patogênese de Bt contra insetos.

## 2. Revisão da Literatura

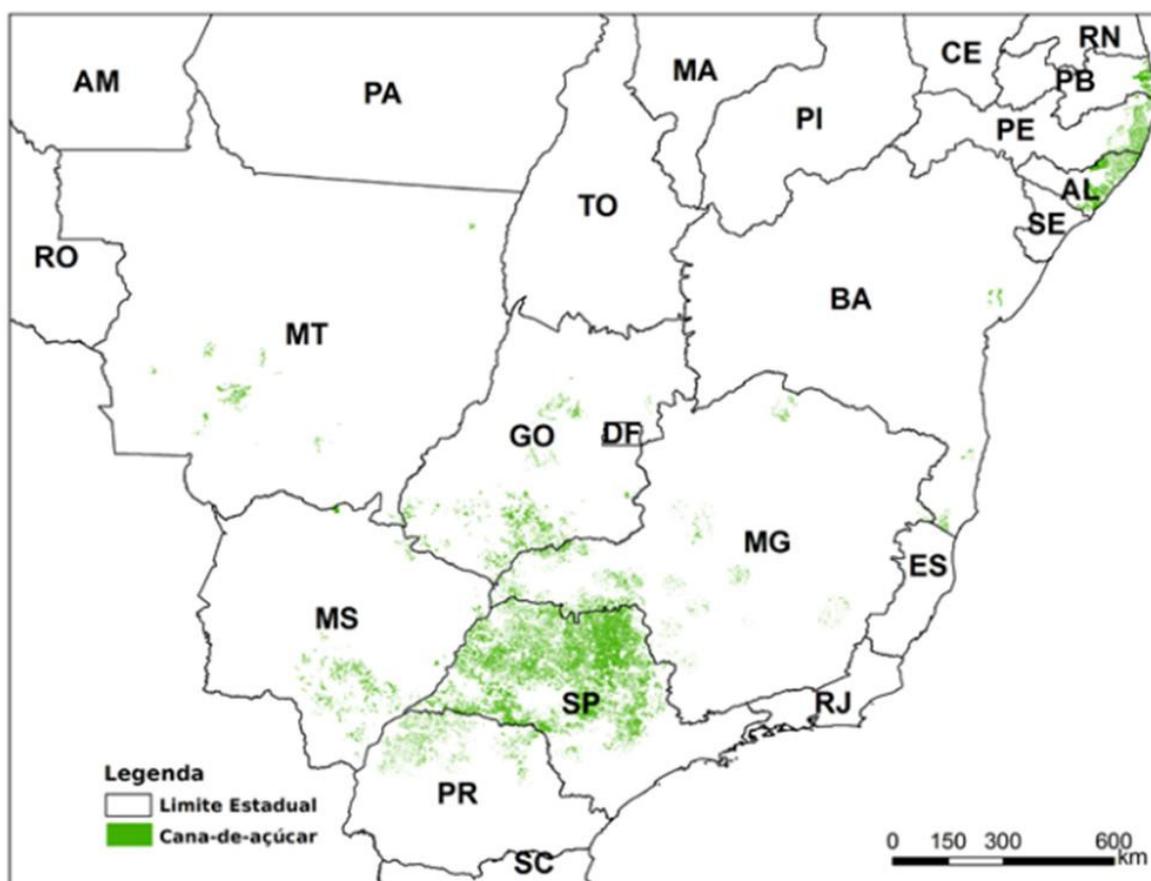
### 2.1 Cana-de-açúcar: Breve histórico e importância econômica

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao gênero *Saccharum L.*, que apresenta dois centros de diversidade, um localizado no Velho Mundo (Ásia e África) e outro no Novo Mundo (Américas do Norte, Central e Sul). Dentro deste gênero existem ao menos seis espécies, com a cana-de-açúcar cultivada apresentando-se como um híbrido multiespecífico e por isso recebendo a designação *Saccharum spp.* (Toppa *et al.*, 2010; Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011). De origem asiática, os primeiros relatos desta cultura na América do Sul datam do período das expedições de Cristóvão Colombo, na região da República Dominicana e do México (Brandão, 1985).

No século XVI, sob o domínio dos portugueses, teve início a ocupação do território brasileiro pela cultura canavieira. As primeiras plantas de cana-de-açúcar trazidas e estabelecidas no Brasil eram originárias da Ilha da Madeira e a cultura foi introduzida inicialmente na Capitania de São Vicente (São Paulo), pelo então governador Martin Afonso de Souza. Na região Nordeste as primeiras plantações de cana foram implementadas nas áreas do Recôncavo Baiano e Zona da Mata Pernambucana. Em pouco tempo a produção açucareira tornou-se a principal atividade econômica da costa brasileira, com a primeira usina de açúcar estabelecida em 1532 (Szmrecsanyi, 1979; Cândido da Silva, 2010; Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011).

Desde então, a cultura da cana-de-açúcar é uma das principais atividades econômicas do nosso país, com área cultivada para a safra de 2015/2016 sendo estimada em aproximadamente 9.000 mil hectares e uma produção de 655,16 mil

toneladas. O estado de São Paulo detém 52% (4.648,2 mil hectares) da área plantada, permanecendo como maior produtor, seguido por Goiás com 10% (908 mil) e Minas Gerais com 8% (715,3 mil hectares). Na região Nordeste os estados de Alagoas e Pernambuco destacam-se como principais produtores com 4,2% (380,3 mil hectares) e 3,1% (273,4 mil hectares), respectivamente (Figura 1) (CONAB, 2015).



**Figura 1:** Mapeamento da cultura da cana-de-açúcar no território brasileiro. Fonte: CONAB, 2015.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2014), de toda produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2014/2015, 56,28% destinaram-se a produção de Etanol (23,74 % na forma anidra, e 32,54% hidratado) e 43,72% foi utilizada para a produção de açúcar. O Brasil é responsável por cerca de 46% da exportação mundial de açúcar com tendências

favoráveis a manutenção do posto de maior exportador; enquanto a produção do etanol é basicamente voltada para o mercado interno com o ápice do consumo de 16,5 bilhões de litros registrado em 2009. Nos anos subsequentes houve um decréscimo do consumo de etanol, mas com tendência de recuperação a partir de 2014 com produção de aproximadamente 14 milhões de litros de etanol total (CONAB, 2014B).

A versatilidade da cultura da cana-de-açúcar possibilita a geração de empregos em nosso país, estimando-se que aproximadamente 3,85 milhões de pessoas tenham atividades relacionadas à cana-de-açúcar (UNICA, 2010). Os números do setor sucroalcooleiro tendem a crescer pelas perspectivas de expansão apresentadas no estudo de Projeções do Agronegócio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em 2011, no qual se projeta uma área de 11,52 milhões de hectares com colheita de 934,59 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2020/2021. Entretanto, a cultura canavieira e conseqüentemente sua produtividade é constantemente ameaçada por variáveis climáticas (Ex.: temperatura e precipitação), além da presença nas lavouras de ervas daninhas, nematóides (Ex.: *Meloidogyne incognita*) e insetos de diversas ordens. Os insetos-praga figuram entre os principais fatores limitantes da produção de cana-de-açúcar no Brasil (Miranda *et al.*, 2003; Cheavegatti-Gianotto *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2012; Kumar e Yalew, 2012; Garcia, 2013; Yirefu *et al.*, 2013).

## 2.2 Pragas associadas à cana-de-açúcar

Mais de 67.000 espécies de insetos são responsáveis por algum tipo de dano às plantações no mundo (Herrera-Estrella, 1999). Logo, a presença de insetos-praga está entre os principais fatores limitantes da produção do agronegócio mundial. No Brasil, o ataque de insetos às lavouras ocasionam perdas na ordem de 18 bilhões de reais (Zarbin e Rodrigues, 2009)

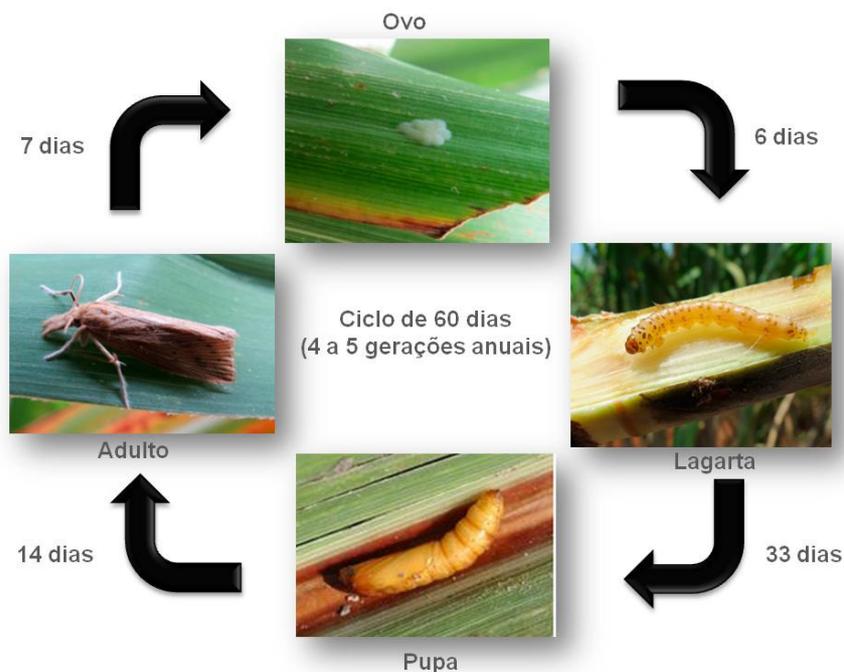
Pinto (2006) relatou que mais de 1.500 espécies de insetos utilizam a cana-de-açúcar para alimentação. Entre esta gama de insetos-pragas que utilizam a cana-de-açúcar como hospedeira, *Mahanarva fimbriolata* (Stal) (cigarrinha-das-raízes da cana-de-açúcar), *Sphenophorus levis* (Vaurie) (bicudo-da-cana), *Telchin licus licus* (Drury) (broca gigante) e a *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) (broca da cana-de-açúcar) ganham maior notoriedade pelos graves danos diretos e indiretos causados à cultura (Polanczyk *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2008; Oliveira, 2009).

Possivelmente originária da América Central e América do Sul, a *Diatraea saccharalis* é considerada como uma das pragas mais nocivas para a cultura da cana-de-açúcar na maior parte dos países onde esta é cultivada, incluindo o Brasil (Polanczyk *et al.*, 2004, Svedese *et al.*, 2013). Além da cana-de-açúcar a *D. saccharalis* também é responsável pelo ataque a outras plantas da família das gramíneas como o arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L.) (Hamm *et al.*, 2012).

Segundo Botelho e Macedo (2002), a broca-da-cana apresenta as fases de ovo, larva, pupa e adulto durante o seu ciclo de vida, tendo portanto um desenvolvimento holometabólico. A oviposição pelas mariposas na parte inferior ou superior das folhas inicia o ciclo. A postura pode conter de 5 até 50 ovos (de

coloração amarelada) com a eclosão das larvas ocorrendo em um intervalo de quatro a nove dias. O parênquima foliar é utilizado como alimento e em seguida as lagartas dirigem-se para as proximidades do colmo, onde perfuram para alimentar-se da polpa. No interior da planta as lagartas passam por ecdises (cinco a seis) até atingirem o tamanho aproximado de 2,5 cm. Nesta fase as lagartas apresentam coloração amarelo-palha e cápsula cefálica marrom. Posteriormente as lagartas transformam-se em pupas de coloração castanha e entre nove e catorze dias os adultos emergem. Os indivíduos na fase adulta apresentam hábitos noturnos, com a oviposição iniciando ao final do dia (Gallo *et al.*, 2002; Cruz, 2007).

O ciclo biológico da broca-da-cana em campo se completa entre 53 e 60 dias a depender das condições climáticas (Figura 2). Em condição de laboratório, o ciclo biológico apresenta duração média de 65 dias, quando ovos, pupas e adultos são mantidos a  $22 \pm 1$  °C, com umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e 12 horas de fotoperíodo e larvas a  $26 \pm 1$  °C, com umidade relativa de  $80 \pm 10\%$  e 12 horas de fotoperíodo (Gallo *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2007).



Fotos: José F. Garcia e N. Hummel

**Figura 2:** Ciclo biológico da *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana).

O momento crítico do ataque da *D. saccharalis* para a cultura da cana-de-açúcar se dá na fase larval, quando durante a alimentação são provocados danos diretos e indiretos aos tecidos das plantas. Os danos podem consistir em perda de peso, aberturas de galerias que tendem a provocar o tombamento dos colmos, aumento dos entrenós, entre outros. Os danos indiretos são frequentemente associados à invasão das galerias por micro-organismos oportunistas, a exemplo do fungo *Fusarium moniliforme* (Shel.), que promovem a diminuição da pureza do caldo, menor rendimento de açúcar e contaminações da fermentação alcoólica (Macedo e Botelho, 1988; Margarido e Castilho, 1988; Gallo *et al.*, 2002).

*D. saccharalis* é disseminada em todas as regiões do Brasil e para cada 1% de infestação desta praga na lavoura de cana-de-açúcar estima-se uma diminuição no peso na cana, na produção de açúcar e álcool em torno de 0,77%, 0,25% e 0,20% respectivamente (Gallo *et al.*, 2002). O controle da *D. saccharalis* utilizando produtos químicos é normalmente ineficiente em virtude de parte do

desenvolvimento deste inseto ocorrer no interior do colmo. Este aspecto impulsionou estudos com métodos de controle mais eficientes e menos adversos (Vacari *et al.*, 2012).

### **2.3 Métodos de controle das pragas associadas à cana-de-açúcar**

Os métodos de controle de pragas nas lavouras, especialmente insetos, é usualmente realizado com a aplicação de formulações químicas que normalmente acarretam em riscos à saúde humana e ao meio ambiente; além de requerer décadas para que ocorra sua total degradação (Franceschini *et al.*, 2001).

Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva, em 10 anos houve um aumento considerável na utilização de defensivos químicos no Brasil de aproximadamente 253 milhões de litros; com a cultura da cana-de-açúcar ocupando o terceiro lugar no *ranking* nacional de consumidores por utilizar 10% deste total (entre inseticidas, fungicidas, acaricidas e outros produtos) o que equivale a aplicação de 4,8 litros/hectare (ABRASCO, 2012).

Em oposição ao método químico, o controle biológico tem despontado como excelente alternativa para o controle de insetos-praga por empregar espécies de inimigos naturais. Segundo Brodeur (2012), esta alternativa vem sendo praticada há séculos e é considerada uma abordagem amigável para o ecossistema. O controle biológico visando à redução da população de pragas nas lavouras de cana-de-açúcar pode ser realizado através do emprego de insetos, fungos e bactérias (Macedo *et al.*, 2012; Svedese *et al.*, 2013; Dinardo-Miranda *et al.*, 2014).

Algumas destas estratégias de controle estão sendo usadas para o combate da *Diatraea saccharalis*. Uma das estratégias mais eficientes é a utilização de insetos como a vespa *Cotesia flavipes* (Cameron) (Hymenoptera, Braconidae) e o *Trichogramma galloi* (Zucchi) (Hymenoptera, Trichogrammatidae) que parasitam respectivamente, as lagartas e os ovos de *D. saccharalis*, provocando a redução da infestação desta praga nos canaviais (Lima Filho e Lima, 2001; Da Silva *et al.*, 2012). Entre os fungos, o *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin tem causado morte significativa de *D. saccharalis* e demonstrado potencial de uso para programas de controle biológico desta praga (Svedese *et al.*, 2013).

O controle biológico de *D. saccharalis* também tem sido realizado pela utilização de bactérias como o *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt). Os métodos de controle com *B. thuringiensis* sobre *D. saccharalis* empregam desde formulações que contenham esporos e cristais proteicos considerados entomotóxicos e que são produzidos por este micro-organismo, até a criação de plantas geneticamente modificadas que expressam constitutivamente toxinas de Bt (Van Frankenhuyzen, 2009; Waqui *et al.*, 2013).

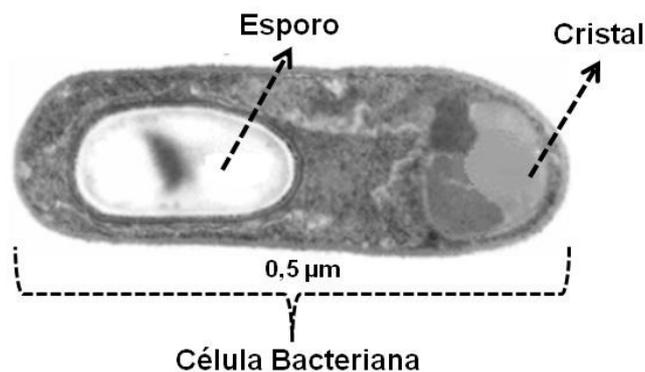
#### **2.4 *Bacillus thuringiensis***

A primeira descrição deste micro-organismo data de 1901 quando foi descoberto por Ishiwata (Ishiwata, 1901) ao estudar as possíveis causas da mortalidade do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) no Japão. Ishiwata apontou uma bactéria esporulante como a responsável pela morte do *Bombyx mori* e a denominou de *Bacillus sotto*. Em 1911 este micro-organismo volta a ser descrito nos isolamentos realizados por Berliner em traça-de-farinha (*Anagasta kuehniella*)

e ele o nomeia como *Bacillus thuringiensis* (Bt) em homenagem a província de Thuringia, localizada na Alemanha, local no qual foi encontrado primeiro inseto da traça-de-farinha infectado, sendo este o nome mantido atualmente (Glare e O'Callaghan, 2000). No entanto, Sanahuja *et al.* (2011) relatam a possível utilização de esporos de Bt no Egito antigo, sendo portanto as propriedades inseticidas deste micro-organismo reconhecidas muito antes da sua descrição científica.

Os primeiros produtos inseticidas contendo subespécies de *B. thuringiensis* foram comercializados na França em 1930 (Shelton *et al.*, 2002), no entanto a eficácia inseticida dos cristais produzidos e liberados por esse micro-organismo só veio a ser comprovada em experimentos realizados por Angus em 1956.

*Bacillus thuringiensis* está inserido na família *Bacillaceae*, que apresenta dois gêneros denominados *Clostridium* e *Bacillus*, e reúne a maioria das espécies com capacidade de formação de esporos. O Bt é um bastonete Gram-positivo com aproximadamente 1 µm de largura por 5 µm de comprimento, quando na natureza; apresentando flagelos e capacidade de formar esporos (Konecka *et al.*, 2006). Estes esporos apresentam formato elipsoidal, estando localizados nas regiões central ou paracentral da célula mãe. O Bt é uma espécie aeróbia não restrita e seu crescimento se dá na faixa entre 10 a 45 °C, sendo facilmente distinguida das outras espécies do gênero pela a presença intracelular de um cristal proteico (Figura 3) (Vilas-Bôas *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Célula de *B. thuringiensis* com espora e cristal (Regis *et al.*, 2001; com modificações).

De acordo com Pinto *et al.* (2009/2010) o *Bacillus thuringiensis* apresenta duas fases durante o seu desenvolvimento denominadas de fase vegetativa e fase estacionária. Neste aspecto se torna semelhante ao desenvolvimento descrito para outras bactérias do gênero *Bacillus*. A fase vegetativa é caracterizada pelo crescimento exponencial das células e ocorre no momento de grande disponibilidade de nutrientes no meio, enquanto a fase estacionária se dá quando o meio se torna hostil, com as bactérias adequando-se à baixa disponibilidade de nutrientes.

Esta bactéria é encontrada naturalmente no solo e também em outros substratos como: insetos mortos, plantas, água e detritos podendo ser isolada por métodos relativamente simples (Maduell *et al.*, 2007; Monnerat *et al.*, 2007; Guz *et al.*, 2009; Muniady *et al.*, 2011; Konecka *et al.*, 2012). O Bt é reconhecidamente responsável pela síntese de inclusões cristalinas durante a fase de esporulação, que apresentam capacidade inseticida. Estas inclusões são denominadas de proteínas Cry (Cristal) ou  $\delta$ -endotoxinas; que são codificadas pelos genes também denominados *cry* (Yamamoto e Dean, 2000; Martínez e Caballero, 2002;

Swiecicka *et al.*, 2002; Uribe *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Bravo *et al.*, 2005; Fiuza *et al.*, 2012).

Além da síntese das proteínas Cry, o Bt sintetiza outras proteínas e fatores de virulência que também apresentam atividade inseticida; destacando-se as proteínas Cyt e Vip. As endotoxinas citolíticas (proteínas Cyt), assim como as Cry, são sintetizadas na fase de esporulação, no entanto, não se verificam homologias entre estas duas classes de proteínas (Lereclus *et al.*, 1993, Bravo *et al.*, 2011), enquanto as proteínas inseticida vegetativas (Vip) são sintetizadas no sobrenadante da cultura tanto na fase vegetativa como na fase de esporulação (Estruch *et al.*, 1997).

Além das proteínas citadas acima e reconhecidamente ativas contra insetos das mais diversas ordens; outras toxinas produzidas por Bt foram descobertas como a  $\beta$ -exotoxina, conhecida como thuringiensina (Heimpel, 1967), e a parasporina (Mizuki *et al.*, 2000); juntando-se ainda outros fatores de virulência como: enterotoxinas, fosfolipases, hemolisinas e quitinases (Höfte e Whiteley, 1989; De Maagd *et al.*, 2001). A parasporina difere das outras toxinas produzidas por Bt por não apresentar capacidade inseticida, porém vem despertando grande curiosidade na área das ciências médicas pela sua capacidade de ação contra protozoários patogênicos e células cancerosas humanas (Cappello *et al.*, 2006; Ohba *et al.*, 2009, Krishnan *et al.*, 2010).

## 2.5 Genômica e Proteômica de *Bacillus thuringiensis*

Com o avanço das pesquisas, o *Bacillus thuringiensis* cada vez mais ganha destaque como agente de controle para insetos pragas, por isso a comunidade científica passou a investir no estudo da sua variabilidade genética através de técnicas das áreas da Genômica e Proteômica. A prospecção e a caracterização de novos genes são normalmente realizadas através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e cada vez mais as análises de expressão gênica, tanto transcriptômicas quanto proteômicas, têm contribuído para a descoberta de novos fatores de virulência expressos por cepas de Bt (Rosas García *et al.*, 2008).

Por meio de técnicas da biologia molecular, sabe-se atualmente que o genoma do Bt é composto por inúmeros elementos extracromossomais e plasmídeos. Dos 2,4 a 5,7 Megabases (Mb) que compõem o genoma do Bt, os elementos extracromossomais representam 10 a 20% e os plasmídeos apresentam tamanho variando de 2 a 200 Kpb (Carlson *et al.*, 1994; Schnepf *et al.*, 1998; Pérez, 2004).

Em relação aos genes de Bt, os *cry* são os mais conhecidos e cerca de 770 foram identificados e estão distribuídos com base na homologia das proteínas em 68 diferentes classes ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)). Sabe-se também que uma linhagem de Bt pode conter em seu genoma uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou ainda apresentar diferentes genes cujos produtos irão formar o mesmo cristal de proteína. A localização preferencial em plasmídeos conjugativos, além da frequente associação a elementos genéticos móveis, são as características determinantes da diversidade destes genes e conseqüentemente da ocorrência de linhagens de bactérias contendo diferentes

combinações que resultam em perfis distintos de toxicidade (Capalbo *et al.*, 2005).

A regulação da expressão dos genes *cry* dá-se através de fatores *sigma* específicos da fase de esporulação ou através de fatores específicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Ingliš *et al.*, 1998). No entanto, a expressão do gene *cry* de Bt ocorre geralmente na fase estacionária da célula, acumulando seu produto na célula mãe, na forma de uma inclusão cristalífera (protoxinas) que é liberada no meio ao final da esporulação (Lereclus *et al.*, 2000).

O resultado da expressão dos genes *cry* são as proteínas também denominadas Cry distribuídas em diferentes classes que apresentam pesos moleculares variando entre 40 e 140 kDa (Bravo, 1997). Normalmente os pesquisadores têm determinado o perfil molecular das proteínas encontradas por métodos como o de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), pois a análise dos polipeptídeos em SDS-PAGE pode auxiliar e complementar os dados de toxicidade pelo padrão de bandas observadas no gel, sendo fundamental para verificar a expressão dos genes (Loguercio *et al.* 2002; Porcar e Juárez-Pérez, 2003; Grossi-De-Sá *et al.*, 2007; Kitami *et al.*, 2011, FIUZA, 2012).

Posteriormente a verificação do padrão de bandas em gel SDS o estudo do proteoma por análise bidimensional, ou eletroforese 2D, que consiste na separação das proteínas em uma primeira dimensão pelo ponto isoelétrico (PI) através da focalização isoelétrica (IEF) e na segunda dimensão pelo peso molecular (MM); pode fornecer uma visão mais ampla da presença de proteínas, abundância e de possíveis modificações pós-traducionais além de gerar uma maior compreensão sobre a fisiologia, patogênese e mecanismo de combate ao

sistema imunológico do hospedeiro (Rocha *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012). Proteínas de três fases de crescimento de isolado de Bt foram analisadas por Li *et al.* (2012) utilizando a técnica 2D que permitiu a detecção de aproximadamente 980 proteínas somadas as três fases. As proteínas diferencialmente expressas foram analisadas usando MALDI-TOF/TOF que após busca em banco de dados, permitiu a identificação de proteínas de significativa regulação nas três fases e agrupamento das demais em grupos de fatores bioativos, metabolismo, formação de cristal e esporo, síntese de proteínas, entre outras funções. Gong *et al.* (2012) também utilizaram a técnica 2D e análise MS-TOF/TOF para estudos com expressão de proteínas em diferentes fases de Bt que foram capazes de revelar alterações metabólicas e da regulação da translocação da síntese de proteínas. Rang *et al.* (2015) realizaram uma abordagem comparativa entre genoma e proteoma com gel 2D seguido de nano-LC-MS/MS para análise de isolado de Bt e foi possível, através da comparação das duas bases de dados, inferir que alguns genes haviam sido silenciados ou que foram expressos em níveis muito baixos.

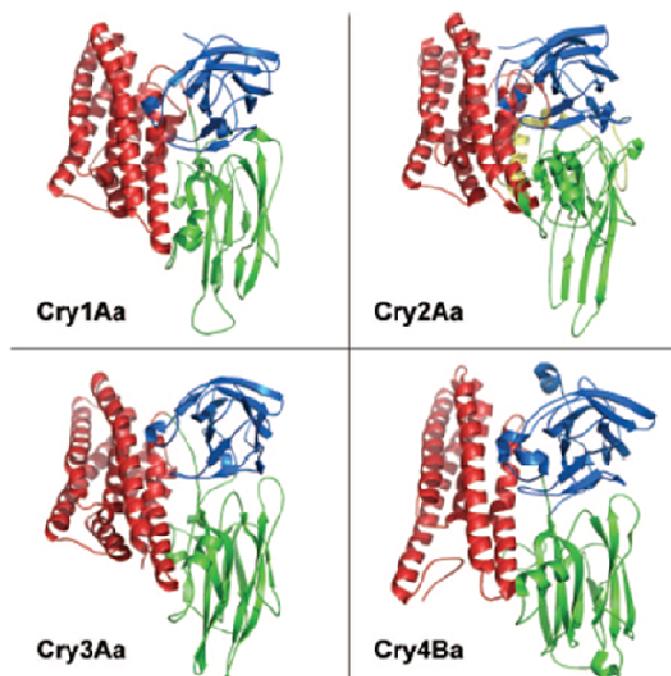
A espectrometria de massas subsequente à análise 2D como observado, é fundamental para a total compreensão da composição dos cristais de proteínas de Bt, pois estes são normalmente formados por mais de uma proteína, além de apresentar grande utilidade no sequenciamento dos peptídeos possibilitando o entendimento da conformação proteica (Ranasinghe e Akhurst, 2002; Lee *et al.*, 2006).

Segundo Habib e Andrade (1998), a configuração dos cristais formados é consequência da composição e estrutura das  $\delta$ -endotoxinas presentes; logo, os cristais podem apresentar formas indefinidas ou podendo ainda distinguindo-se entre formas bipiramidais, cuboide, romboide, ovoide e esférico.

As proteínas Cry são compostas por duas regiões distintas denominadas de região N-terminal (Amino-terminal) e C-terminal (Carboxy-terminal). A porção N-terminal é a região onde se localiza a toxina ativa e a porção C-terminal, que ainda não tem função totalmente elucidada, mas acredita-se que essa região é necessária para que ocorra a formação do cristal no interior na bactéria (Höfte e Whiteley, 1989; Park *et al.*, 2000; De Maagd *et al.*, 2003; Samir *et al.*, 2006).

Algumas das proteínas Cry que apresentam atividades contra diferentes insetos já tiveram sua estrutura terciária solucionada através de cristalografia, incluindo as proteínas: Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa e Cry4Ba (Galitsky *et al.*, 2001; Morse *et al.*, 2001; Boonserm *et al.*, 2005, 2006) (Figura 4). Através das estruturas terciárias foi possível revelar a organização das proteínas em três domínios que são denominados como I, II e III.

O Domínio I é formado por sete alfa-hélices e está diretamente envolvido na inserção da proteína na membrana e conseqüentemente com a formação de poros; os domínios II e III estão envolvidos com o reconhecimento e com a interação a receptores do intestino médio dos insetos susceptíveis, sendo o domínio II (ou beta-prisma) constituído por três folhas dobradas e simétricas, formando as beta-folha e o domínio III é formado por duas beta-folha antiparalelas (De Maagd *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2005, 2007; Boonserm *et al.*, 2005).



**Figura 4:** Estrutura terciária de proteínas Cry obtidas por cristalografia. Fonte: Pigott e Ellar 2007; Boonserm *et al.* (2005).

Outros genes importantes são responsáveis pela expressão das endotoxinas Cyt e Vip, contidos em plasmídeos de aproximadamente 125 kb e de maior massa molecular (Estruch *et al.*, 1996; Glare e O'Callaghan, 2000). As proteínas Cyt (divididas nos grupos Cyt1A, Cyt1B, Cyt1C; Cyt2A, Cyt2B e Cyt3A) apresentam peso molecular variando entre 25-28 kDa e são compostas por duas regiões N e C-terminais, assim como as Cry, no entanto diferem destas por serem formadas por um único domínio composto por duas cadeias externas que apresentam forma de  $\alpha$ -hélice e uma cadeia localizada internamente com forma de  $\beta$ -folha pregueada. (Glare e O'Callaghan, 2000; De Maagd *et al.*, 2003; Angelo *et al.*, 2010; Crickmore *et al.*, 2013). As proteínas Vip (divididas nas subfamílias Vip1, Vip2 e Vip3) apresentam uma massa molecular variando de 88 a 100 kDa (Whitehouse, 2007) e ao menos para as proteínas Vip3A sabe-se que são secretadas sem a porção N-terminal (Estruch *et al.*, 1996).

As características das proteínas e de outras toxinas secretadas por *Bacillus thuringiensis*, bem como seus mecanismos de ação, apresentam importância científica por possuírem atividade entomopatogênica; contribuindo para o destaque deste micro-organismo como um dos principais agentes utilizados em controle biológico devido as suas características de especificidade, aliada a ausência de danos ao seres humanos e ao meio ambiente, uma vez que as toxinas apresentam atividade restrita ao trato digestivo dos insetos (Kumar, Chandra e Pandey, 2008; Sanahuja *et al.*, 2011).

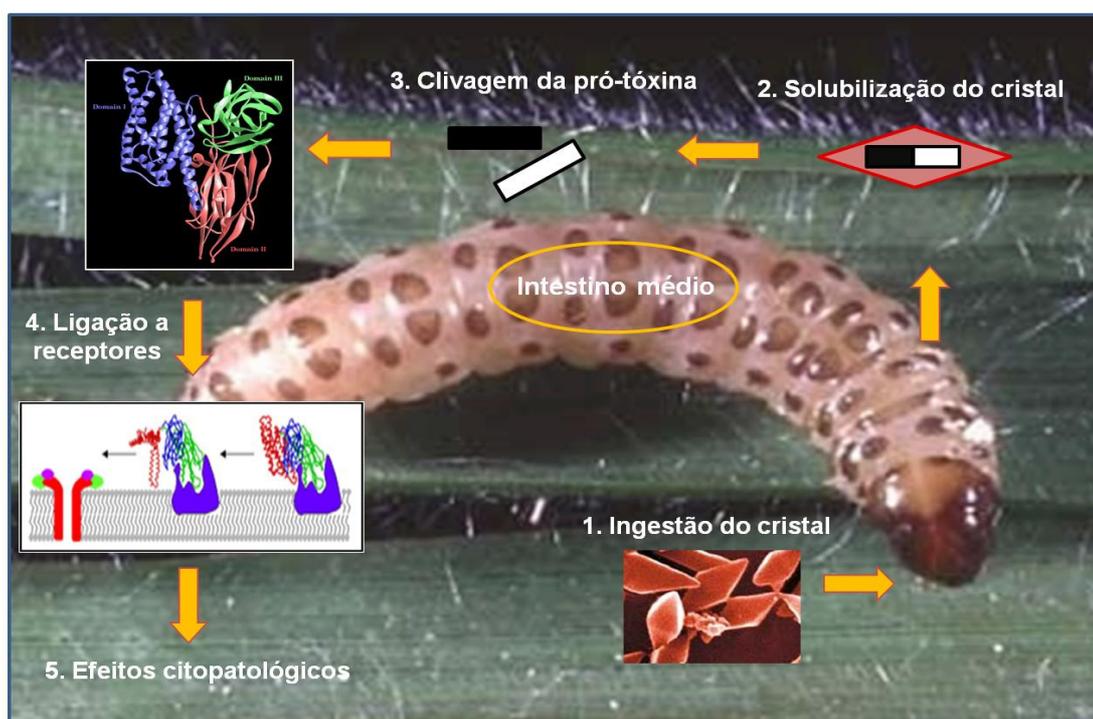
## **2.6 Entomopatogenicidade de *Bacillus thuringiensis***

As propriedades inseticidas dos cristais de proteínas produzidos por Bt foram reveladas ao serem encontrados esporos e cristais em lagartas mortas da traça-da-farinha, e no instante em que se observou que essas lagartas, quando em contato direto com os esporos/cristais, não apresentavam qualquer sintoma; porém quando as folhas revestidas com essa mistura eram ingeridas, as lagartas cessavam a alimentação e morriam (Sanahuja *et al.*, 2011).

Na atualidade, sabe-se que as toxinas e inclusões de proteínas produzidas podem apresentar toxicidade específica para espécies de diversas ordens de insetos como Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Homoptera, Hymenoptera, Mallophaga; apresentando também atividade contra espécies de nematoides e outros invertebrados (De Maagd *et al.* 2003; Kotze *et al.*, 2005; Grossi-De-Sá *et al.*, 2007; Bravo e Soberon, 2008). A variabilidade das toxinas Cry conhecidas atualmente permite que se compreendam quais são os elementos importantes na

função da toxina, sua especificidade ao inseto alvo (Pigott e Ellar, 2007) e seu mecanismo de ação.

As proteínas Cry são produzidas na forma inativa (protoxinas) e posteriormente à ingestão pela larva do inseto suscetível, o cristal de proteína é solubilizado ao entrar em contato com o pH alcalino do intestino (Figura 5). Após o passo de solubilização, as protoxinas são ativadas pela ação de proteases intestinais que irão produzir a forma ativa das toxinas. Estas toxinas ligam-se a receptores locais de alta afinidade que estão presentes na superfície das células epiteliais do intestino médio e que possibilitam a formação de poros nas membranas, causando a destruição das células (Knaak *et al.*, 2010).



**Figura 5:** Esquema da ação das toxinas Cry. (Figuras USDA, GMO Safety; Embrapa)

O mecanismo de ação é bem caracterizado. Tem início no momento da solubilização dos cristais de protoxinas em pH alcalino, sendo portanto necessário que os cristais encontrem um ambiente redutor e assim ocorra a ruptura das

pontes dissulfeto localizadas na porção C-terminal das proteínas Cry. As condições necessárias para o início do mecanismo como descrito anteriormente, são normalmente observadas no intestino médio de larvas de inseto, tornando-os suscetível às toxinas (Knowles, 1994).

Uma vez em contato com o pH alcalino e estando sob ação de enzimas proteolíticas, as protoxinas são clivadas e liberam a porção N-terminal ativa e em seguida se ligam a receptores que as mantém presas à membrana. Logo após a interação entre toxina e receptor, observa-se uma mudança conformacional da molécula, permitindo sua inserção no epitélio e promovendo a formação de oligômeros de toxinas e poros na membrana (Delécluse *et al.*, 2000).

Segundo Knowles (1994), as toxinas ativas proporcionam um aumento da absorção da glicose, iniciando os sintomas histopatológicos que podem ser observados no intervalo entre 1 e 5 minutos após a ingestão. Após este curto período, observa-se a paralisia do intestino médio, aumento do pH da hemolinfa e redução do pH do lúmen (intervalo de 5 à 10 minutos); posteriormente verifica-se o aumento do fluxo e concentração de  $K^+$  da hemolinfa, colapso metabólico celular (intervalo de 10 à 30 minutos), lise celular e ruptura da membrana basal. Entre uma e sete horas ocorre a paralisia geral, com consequente morte por falta de alimento ou septicemia sendo observada entre um e três dias.

As etapas descritas anteriormente são comuns aos dois modelos atualmente aceitos para explicar o mecanismo de ação das toxinas Cry. O mais antigo modelo de ação é denominado “formação de poros” e parece ser o mais comum entre as ordens Diptera, Lepidoptera e Coleoptera. Esse modelo explica que a ligação da toxina com os receptores específicos provoca a formação de oligômeros de toxinas que se ligam a receptores secundários da membrana da

célula intestinal, culminando com a inserção da toxina oligomérica na membrana das células epiteliais do intestino, resultando na formação dos poros (Bravo *et al.*, 2007; Bravo e Soberón, 2008).

No modelo de “transdução de sinal” (o mais recente dos modelos), explica que a proteína Cry se liga com receptores específicos induzindo várias reações intracelulares. Estas reações envolveriam a proteína G e a adenilato ciclase aumentando a concentração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular e conseqüentemente ativando a proteína quinase; danificando a célula pelo desequilíbrio de pressão interna (Bravo e Soberón, 2008). Independente do modelo, a ação da toxina paralisa o aparelho digestório ocasionando a morte do inseto (Bravo e Soberón, 2008; Vallete-Gell *et al.*, 2008).

O mecanismo de ação das proteínas Cyt é semelhante ao das proteínas Cry, começando pela síntese como protoxinas e com posterior remoção de pequenas porções nas extremidades N e C-terminais (Gill *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1996), porém estas não se ligam com receptores de proteínas; interagindo diretamente com a membrana lipídica para a formação dos poros (Li *et al.*, 1996; Promdonkoy e Ellar, 2003). Segundo De Maagd *et al.*, (2003), a principal ação das proteínas Cyt é contra insetos da ordem Diptera e alguns trabalhos têm apresentado resultados que comprovam uma sinergia entre tipos de proteínas Cry e Cyt (Pérez *et al.*, 2005).

As Vip proteínas são secretadas durante o crescimento bacteriano que se dá antes da fase de esporulação, não sendo verificada homologia entre suas sequências com sequências das  $\delta$ -endotoxinas (Cry e Cyt) (Estruch *et al.*, 1996; Mahon *et al.*, 2012). Os estudos sobre o mecanismo de ação de membros das classes das proteínas Vip apontam que, assim como as proteínas Cry, a atividade

é iniciada no epitélio intestinal; no entanto, apresentam a vantagem de se ligarem mais rapidamente aos receptores de membranas das células do epitélio, começando uma degeneração progressiva (Yu *et al.*, 1997, 2011). As proteínas Vip apresentam ação tóxica específica para insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera (Estruch *et al.*, 1996; Warren, 1997; Sattar *et al.*, 2008).

Algumas cepas de Bt são responsáveis pela produção de uma exotoxina termoestável chamada de  $\beta$ -exotoxina ou também denominada como thuringiensina. Sabe-se que esta exotoxina é secretada no meio de cultura quando se inicia o processo de esporulação, sendo considerado um análogo nucleotídico de DNA e apresentando peso molecular de 701 Daltons. Esta toxina tem demonstrado ação tóxica a insetos das ordens dos Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hemípteros e também a outros grupos como os protozoários, platelmintos e nematódeos (Hernández *et al.*, 2003). A thuringiensina atua principalmente na inibição da RNA polimerase por competir pelo ATP gerando danos na formação dos fusos mitóticos, apresentando então efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen e Salamiou, 2000).

## **2.7 Produtos à base de *B. thuringiensis***

Apontados como excelente alternativa frente aos inseticidas químicos, os produtos cuja base são esporos e cristais (ou a mistura de ambos) de *Bacillus thuringiensis* correspondem a cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas (Vilas-Bôas *et al.*, 2007; Konecka *et al.*, 2011).

Inseticidas a base de Bt possuem atividade eficaz e são considerados amigos do ambiente por apresentarem gama de hospedeiro específica; ou seja,

não apresentam influência negativa sobre animais não-alvo; são inofensivos aos seres humanos e a outros mamíferos uma vez que estes não possuem os sítios de ligação para as toxinas; são biodegradáveis e, portanto, não poluentes (Kumar, Chandra e Pandey, 2008; Sanahuja *et al.*, 2011).

Segundo Mishra *et al.* (2015) a utilização de biopesticidas tem uma propensão cada vez mais crescente na América Latina em culturas orgânicas. No Brasil, a utilização de biopesticidas vem crescendo e já no ano de 2010 estimou-se que aproximadamente 3 milhões de hectares recebiam tratamentos anuais com formulações que continham micro-organismos (Kabaluk *et al.*, 2010). No final de 2011, 26 biopesticidas eram comercializados no Brasil, destes, 9 produtos eram formulados a base de Bt. (<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/pagina-inicial/servicos-e-sistemas/sistemas/agrofit>).

Sucesso na aplicação desses biopesticidas a base de Bt e de novas estirpes deste micro-organismo continuam sendo relatados em vários países. A eficiência destas formulações foi atestada em diferentes estádios do desenvolvimento de lepdópteros a exemplo do *Spodoptera littoralis* (Bois.) (curuquerê); inseto que ataca culturas de grande importância econômica como algodão, milho e trigo (Porcar e Caballero, 2000; Dutton *et al.*, 2003; Pineda *et al.*, 2007; Alfazairy *et al.*, 2012). Vários sorotipos de *Bacillus thuringiensis*, entre eles o *B. kurstaki* e o *B. tolworthi* também apresentaram atividade contra *D. saccharalis* que figura entre as principais pragas da cana-de-açúcar (Rosas-Garcia, 2006; Gitahy *et al.*, 2007; Van Frankenhuyzen, 2009).

Grande parte das estirpes de Bt isoladas são destinadas para produção de pesticidas biológicos para pragas agrícolas. No entanto, alguns isolados Bt da

subespécie *israelensis* apresentam eficiência e estão sendo aplicados contra insetos que trazem sérios problemas de saúde pública como *Anopheles albimanus* e *Aedes aegypti*, vetores da malária e de arboviroses como a dengue, chikungunya e zica, respectivamente (Fillinger *et al.*, 2003; Santos, 2012; Marcondes e Ximenes, 2015; Honório *et al.*, 2015). Isolados de *Bacillus thuringiensis* que não possuem atividade inseticida, mas que produzem proteínas paraesporais também são estudados principalmente no Japão por terem apresentado eficiência contra células cancerosas humanas de forma seletiva (Wong, 2010).

A biotecnologia deu novos rumos ao uso do *B. thuringiensis* ao possibilitar a criação de plantas modificadas geneticamente que produzem as toxinas Cry de forma contínua em seus tecidos, desta forma facilitando o controle de insetos, principalmente aqueles que perfuram os tecidos das plantas (Soberón *et al.*, 2009).

Nos anos 90 teve início a comercialização de plantas transgênicas que apresentavam resistência a insetos. Na época foram introduzidas plantações de milho, batata e de algodão com a capacidade de expressar genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*. As variedades transgênicas comerciais a princípio expressavam uma única proteína Cry com atividade lepidóptera específica, a exemplo do algodão Bollgard que expressava a proteína Cry1Ac. Posteriormente proteínas Cry com atividade coleóptera específica começaram a ser utilizadas, assim como o consórcio de mais de um gene *cry* que expressam proteínas com atividade contra lepidópteros e coleópteros em uma mesma cultivar (Gatehouse, 2011).

Atualmente, as plantas geneticamente modificadas com maior comercialização no mundo são as resistentes ao ataque de insetos-praga e esta

característica é conferida pela expressão de toxinas de Bt (Trtikova *et al.*, 2015). Culturas, a exemplo da soja, tomate, repolho e do arroz já foram transformadas geneticamente e expressam proteínas Cry com atividade tóxica para insetos, além de variedades de cana-de-açúcar que tiveram genes *cry1* introduzidos e estão apresentando bons resultados contra insetos da ordem Lepidoptera (Braga *et al.*, 2001; 2003; Coombs *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2003; Xiang-Qian *et al.*, 2007; Homrich *et al.*, 2008; Arvinth *et al.*, 2010).

Após 20 anos de implantação, o maior percentual de área com plantas geneticamente modificadas permanecem dominadas por alguns países como os Estados Unidos da América, o primeiro a adotar culturas transgênicas e maior cultivador com 73,1 milhões de hectares o que corresponde a 40,3% da área mundial; Brasil em segundo lugar com 42,2 milhões de hectares e 23,3% da área, seguido da Argentina com 24,30 milhões de hectares e 13,4% (Clive, 2015).

Culturas que expressam única ou múltiplas toxinas de Bt têm demonstrado substanciais benefícios ambientais e econômicos para grandes e pequenos agricultores em vários países como a redução da aplicação de inseticidas e aumento da produtividade (Thirtle *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Kathage e Qaim, 2012). Porém, Bobrowski *et al.* (2003) admitem que um dos principais desafios da utilização de plantas capazes de expressar as toxinas de Bt é evitar o desenvolvimento de resistência na população de insetos. A resistência às toxinas de Bt já foram relatadas em diferentes espécies de insetos, portanto a continuidade do sucesso das plantas geneticamente modificadas e de outras estratégias de controle está diretamente relacionada à prospecção de novos isolados e a identificação de novas proteínas de Bt; assim como estudos sobre sua expressão, ação e especificidade.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Identificar genes *cry* e proteínas diferencialmente expressas em isolados de *Bacillus thuringiensis* com maior e menor potencial entomotóxico, útil no controle biológico da *D. saccharalis*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Criar uma coleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Bt).
2. Caracterizar molecularmente, nos isolados de Bt, genes que codificam para toxinas Cry.
3. Verificar por bioensaios o potencial de patogenicidade para *D. saccharalis* de isolados de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao banco.
4. Analisar comparativamente os perfis proteômicos de isolados com maior e menor potencial de patogenicidade sobre os insetos-praga, e identificar proteínas diferencialmente expressas.

## 4. Capítulo 1

**Título: Prospecção de genes de isolados de *Bacillus thuringiensis* associados ao desenvolvimento do controle biológico de *D. saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**

Paulo Geovani Silva Martins<sup>1</sup>, Amaro de Castro Lira Neto<sup>2</sup>, Carlos Henrique Madeiros Castelletti<sup>2</sup>, Liliane Marques da Silva<sup>3</sup>, Herbert Álvaro Abreu de Siqueira<sup>3</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Genoma, Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Patologia de Inseto, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

O manuscrito será submetido ao periódico Applied and Environmental Microbiology, Qualis A2.

## Resumo

A cultura da cana-de-açúcar possui importância econômica para o Brasil e para o Estado de Pernambuco pela produção de açúcar e etanol. No entanto, parte da produção é perdida devido ao ataque de insetos-praga, destacando-se a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) que causa graves perdas econômicas para o setor sucroalcooleiro. O controle de pragas através de inseticidas químicos pode causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, sendo necessários métodos alternativos para o controle de insetos-praga. Neste contexto, o controle biológico alternativo ao controle químico consiste no emprego de inimigos naturais como parasitoides, predadores ou patógenos que promovem a regulação da população de insetos-praga a níveis não-prejudiciais. Dentre estes patógenos destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) que produz toxinas codificadas pelos genes *cry* no formato de cristais proteicos com atividade entomotóxica para diversas ordens de insetos. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e caracterização de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* com potencial entomotóxico para controle biológico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. Foram coletadas amostras de solo que resultaram no isolamento de 97 colônias bacterianas, sendo 28 originárias do Estado da Bahia (município de Mucugê - Chapada Diamantina) e 69 do Estado de Pernambuco (municípios de Brejão, Primavera e Recife). As colônias obtidas apresentaram características fenotípicas, presença de esporos e cristais proteicos compatíveis com os descritos para Bt. O DNA total foi extraído usando o Kit comercial Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega) conforme recomendações do fabricante, quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e em seguida utilizado para ampliações com *primers* universais para os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, ativos contra dípteros e lepidópteros. Durante as ampliações não houve detecção de genes *cry1* nos isolados; no entanto, 11,35% e 12,4% apresentaram fragmentos com padrões estimados na literatura para os genes *cry2* e *cry9*, respectivamente. As ampliações evidenciaram distinção na distribuição dos genes de forma dependente da região geográfica de origem dos isolados, uma vez que todos os que apresentaram o gene *cry2* são oriundos de Pernambuco enquanto que os portadores de genes *cry9* são originários da Bahia. Os isolados *cry2* e *cry9* foram testados por bioensaios com a finalidade de verificar a patogenicidade para *D.saccharalis* e dez deles apresentaram patogenicidade variando entre 3,47% a 20,05%.

Palavras-chave: controle biológico, proteínas Cry, inseto, *Diatraea*

## Abstract

The sugarcane production has economical importance to Brazil, especially due to production of sugar and ethanol. However, a proportion of the production is lost owing to damage of pest insects, including the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*), which cause severe economical lost in the sugar/ethanol industry. The pest insects control through chemical insecticides can cause damage to human health as well as the environment, which requires alternative methods to control of pest insects. In this contest, biological control alternatively to chemical control consists in the use of natural enemies like parasitoids, predators or pathogens that regulated pest insect's population to a non-prejudicial level. The present work aims to isolate and characterize new strains of *Bacillus thuringiensis* with potential entomotoxi to biological control of *D. saccharalis* in sugarcane. Were collected soil samples that allowed the isolation of 97 bacteria colonies, with 28 originated from Bahia state (municipalitie Mucugê - Chapada Diamantina) and 69 from Pernambuco (municipalities of Brejão, Primavera and Recife). The colonies isolated shows phenotypic characteristics; presence of spores and protein crystals compatible with that one described for Bt. The DNA extraction was conducted using the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification (Promega) kit following manufacturer's recommendation, with quantification conducted in NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Then, the DNA was used in PCR amplification reaction using universal primers for *cry1*, *cry2* and *cry9* genes, which have activity against lepidoptera and diptera. After PCR amplification there was no detection of *cry1* genes in the strains; nevertheless, 11.35% and 12.4% shown fragment pattern reported on the literature for *cry2* and *cry9* genes, respectively. Amplifications evidenced distinct distribution of genes linked to geographic region of strain's location, with all strain that have *cry2* gene originated from Pernambuco, while all strains encompassing *cry9* genes were originated from Bahia. The strains with *cry2* and *cry9* were tested through bioassay with the aim to verify pathogenicity for *D.saccharalis*, with ten of those have shown pathogenicity ranging from 3,47% to 20,05%.

Key words: biological control, Cry proteins, insect, *Diatraea*

## 1. Introdução

A cultura da cana-de-açúcar ocupa lugar de destaque na economia mundial e brasileira por apresentar versatilidade em sua utilização. Entre os subprodutos oriundos da cana-de-açúcar, o açúcar e o etanol são considerados os mais importantes, levando-se em conta tanto o volume de produção anual quanto o seu impacto na economia regional e nacional. Os investimentos no setor sucroalcooleiro elevaram o Brasil para o primeiro lugar no *ranking* de países produtores com estimativa de produção 655,16 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em aproximadamente 8,95 milhões de hectares na safra 2015/2016, incremento de 3,2% em relação à safra passada. A região Sudeste apresenta a maior área plantada (5.584,9 mil ha), seguida da Centro-Oeste (1.816,2 mil ha) e região Nordeste (947,0 mil ha) com o Estado de Pernambuco figurando em segundo lugar com 264 mil ha de área plantada e produção estimada em 13,85 milhões de tonelada (CONAB, 2015).

Mesmo com a produção estando em patamares elevados, a cultura da cana-de-açúcar apresenta perdas consideráveis em seu rendimento devido a problemas fitossanitários ocasionados por ervas daninhas, fungos, nematoides e insetos das mais variadas espécies, cujo ataque provoca perdas de até 20% na produção de açúcar e etanol (Santos, 2008; Turner, 2011; Carvalho *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Entre os insetos, a *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae) é considerada a mais importante praga da cultura da cana por provocar danos diretos e indiretos gerando, entre outras perdas, a queda na produtividade e a baixa qualidade dos subprodutos (Macedo e Botelho, 1988; Margarido e Castilho, 1988; Gallo *et al.*, 2002). Originária das Américas Central e do Sul, este

inseto encontra-se hoje disseminado em todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar do Brasil (Gallo *et al.*, 2002; Dinardo- Miranda, 2008).

Por vários anos o controle de pragas associadas às lavouras de cana-de-açúcar, incluindo a *D. saccharalis*, foi realizado com defensivos químicos elevando a cultura canavieira ao posto de terceiro maior consumidor destes produtos no Brasil. O uso de defensivos químicos normalmente onera os custos da produção e provocam graves problemas ambientais e de saúde pública (ABRASCO, 2012; Oliveira e Silva e Costa, 2012; ABRASCO, 2015).

O controle biológico, dentro do manejo integrado de pragas, passou a ser uma alternativa viável de combate as pragas difundidas nas lavouras de cana-de-açúcar e de outras culturas de importância econômica através da utilização de inimigos naturais (Martins *et al.*, 2011; Brodeur, 2012). Entre os agentes do controle biológico a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) ganha destaque como um dos principais e eficientes métodos de controle.

O Bt é encontrado naturalmente no solo, serapilheira, restos de animais mortos e outros substratos. A sua entomopatogenicidade está ligada, entre outros fatores, à produção durante a fase de esporulação de cristais compostos por proteínas denominadas Cry (do inglês – *crystal*) ou  $\delta$ -endotoxinas codificadas por genes também denominados *cry*. Estas proteínas possuem sítios de ligação específicos localizados no intestino médio dos insetos (Monnerat *et al.*, 2007; Guz *et al.*, 2009; Muniady *et al.*, 2011; Fiuza *et al.*, 2012; Konecka *at al.*, 2012).

A ação patológica das proteínas expressas pelo Bt se desencadeia em curto período após a ingestão dos cristais pelas lagartas. Uma vez ingeridos os cristais são solubilizados pelo pH alcalino do intestino, passam por processo de clivagem após entrarem em contato com proteases do intestino médio, ligam-se

aos receptores específicos presentes da superfície das células epiteliais promovendo o aparecimento de poros na membrana, os quais provocam desequilíbrio osmótico (Knaak *et al.*, 2010).

Os efeitos da infecção por Bt são visíveis pouco tempo após a ingestão dos cristais, ocorrendo a paralisia muscular e conseqüentemente do aparelho digestório, septicemia, e morte por inanição (Bravo e Saberón, 2008; Vallete-Gell, *et al.*, 2008). Este tipo de controle é considerado seguro para os seres humanos e para o meio ambiente por não gerar poluição e tão pouco apresentar ação contra insetos não alvo e outros animais (Kumar *et al.*, 2008; Sanahuja *et al.*, 2011).

A utilização desta bactéria entomopatogênica em métodos de controle pode se dá através da produção de biopesticidas que contenham esporos e/ou cristais de proteína para aplicação direta nas lavouras; ou ainda por meio de eventos de transgenia que permitem que as plantas expressem as proteínas codificadas pelos genes oriundos de Bt de forma contínua (Soberón *et al.*, 2009).

Para combater o possível aparecimento de resistência por parte dos insetos, garantir a descoberta de novos genes e mais fatores entomotóxicos; grupos de pesquisa de todas as partes do mundo continuam prospectando novos isolados para compor coleções de Bt que possam ser utilizados como agentes de controle biológicos para insetos pragas, seja pela produção de novas formulações ou destinando os genes para transgenia. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo montar uma coleção de *Bacillus thuringiensis*, prospectar genes *cry* e analisar o potencial tóxico frente à *D. saccharalis*.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Amostragem e Isolamento de cepas de *B. thuringiensis***

Amostras de solo foram coletadas em março de 2013 em quatro municípios de dois estados do Nordeste brasileiro: Brejão (9°3'0"S; 36°29'0"W), Primavera (08°19'53"S; 35°21'11"W), e Recife (8°3'0"S; 34°54'0"W) em Pernambuco e Mucugê (13°00'19"S; 41°22'15"W) na Chapada Diamantina, Bahia. A coleta das 50 g de solo em cinco pontos distintos em cada localidade foi realizada com espátulas estéreis a uma profundidade de 5 cm para evitar a ação direta dos raios ultravioleta sobre as amostras que foram armazenadas a -20°C até o processamento. O isolamento das cepas de Bt foi realizado seguindo a metodologia descrita por Valicente e Barreto (2003), para o isolamento de bactérias Gram-positivas esporulantes.

### **2.2 Caracterização morfológica, teste da catalase e presença de cristais de proteína**

#### **2.2.1 Caracterização morfológica**

As colônias obtidas foram morfológicamente caracterizadas seguindo as indicações de Ruiz Escudero *et al.* (2004) e Solís (2009). Os aspectos analisados foram: tamanho, forma, contorno, coloração, elevação e consistência. Após a caracterização morfológica os isolados passaram por duas repicagens consecutivas em meio de cultura, segundo Valicente e Barreto (2003) visando à purificação (Figura 1).

Os isolados receberam a denominação Bt.CDi (isolados de Mucugê, Chapada Diamantina), Bt.Pri (isolados de Primavera) Bt.Bre (isolado de Brejão),

Bt.Rec 1 e Bt. Rec 2 (isolados de Recife) e numeração sequencial para diferenciar os isolados da mesma região.

### **2.2.2 Teste da catalase**

Para determinar a capacidade de degradação enzimática do peróxido de hidrogênio pelos isolados, foi gotejado sobre a biomassa bacteriana cultivada em meio de cultura Valicente e Barreto (2003) o reagente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 3%. O borbulhamento pela biomassa bacteriana resultante da quebra do peróxido de amônio foi fotodocumentado sob luz branca.

### **2.2.3 Presença de cristais de proteína**

Para a detecção de corpúsculos de inclusão cristalina foi utilizada a técnica de coloração com azul de Coomassie. Para verificar a presença de esporos e inclusões cristalinas, os isolados foram crescidos em meio Luria-Bertani (LB) (5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de triptona, 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl) contendo penicilina G (10 µg/mL). Os isolados foram incubados em agitador orbital a 170 rpm a 30°C durante 72 h. Após incubação, a suspensão bacteriana foi misturada à solução corante azul de Coomassie (0,0025 g/mL de azul de Coomassie, 0,5 mL/mL de metanol, 0,07 mL/mL de ácido acético glacial) e os corpúsculos cristalinos foram observados em microscópio óptico a 100x.

## **2.3 Estocagem**

Os isolados com características de Bt foram repicados em meio AN (1,0 g/L extrato de carne, 5,0 g/L de peptona de carne, 25 g/L de agar, pH=7,0) e estão mantidos em B.O.D à 28°C. Alternativamente, os isolados foram repicados em

círculos de papel filtro autoclavado após incubação em meio Luria-Bertani (LB) contendo 1,25 mg/L de Penicilina G sob agitação de 170 rpm a 28,5°C durante 72 h. Os papелotes foram umedecidos com 200 µL do meio, secos em temperatura ambiente e estocados a 4°C. Os isolados estão sendo mantidos no Laboratório de Genoma do Instituto Agrônômico de Pernambuco - IPA.

## 2.4 Extração de DNA total

Após isolamento e caracterização morfológica, as colônias foram incubadas em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio Luria-Bertani (LB) e 10 µg/mL de penicilina G em agitador tipo *shaker* sob agitação de 200 rpm a 30°C durante 15-18h.

A extração de DNA foi realizada utilizando o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), conforme recomendação do fabricante. Após a extração, a pureza e integridade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Em seguida as amostras de DNA foram quantificadas em NanoDrop® 2000c, diluídas com água ultrapura autoclavada a 1:100 (30 a 50 ng) e armazenadas a -20°C.

## 2.5 Amplificações dos genes *cry* via PCR

Para caracterização pela técnica de PCR foram utilizados os *primers* para os genes *cry1*, *cry2* e *cry9* (Tabela 1), que expressam para proteínas ativas contra insetos das ordens Diptera e Lepidoptera. As reações de amplificação foram realizadas conforme descrição de Rosas García *et al.* (2008). Os produtos finais foram analisados por eletroforese em géis de agarose 0,8%, em tampão Tris-

borato-EDTA/TBE 0,5X corados com brometo de etídio, e visualizados em transiluminador UV. O tamanho dos produtos de PCR foram determinados utilizando o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) ou 1 kb Ready Ladder (Amresco).

**Tabela 1:** Primers universais utilizados para ampliações de genes *cry*.

Gene	Primers	Sequência	Fragmento estimado (pb)	Ta (°C)	Referência
<i>cry1</i>	I(+)	5'-TRACRHTDDBDGTATTAGAT-3'		45	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997).
	I(-)	5'-MDATYCTAKRTCTTGACTA-3'	1500-1600		
<i>cry2</i>	II(+)	5'-TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT-3'		49	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)
	II(-)	5'-AACTCCATCGTTATTTGTAG-3'	1556		
<i>cry9</i>	Un9(+)	5'-CGGTGTTACTATTAGCGAGGGCGG-3'		48	Ben-Dov <i>et al.</i> (1999)
	Un9(-)	5'-GTTTGAGCCGCTTCACAGCAATCC-3'	351		

(+): direto; (-) reverso. Ta: Temperatura de anelamento. \* Código universal para as bases degeneradas: R = A, G; H = A, T, C; B = C, G, T; M = A, C; S = C, G; N = A, C, G, T.

## 2.6 Criação e Manutenção de *D. saccharalis*

A criação de *D. saccharalis* foi estabelecida a partir de ovos obtidos junto à criação-estoque do Laboratório de Patologia de Insetos/UFRPE utilizando a metodologia descrita por Silva *et al.* (2013).

## 2.7 Crescimento de Isolados para teste de patogenicidade em *Diatraea saccharalis*.

Os isolados foram crescidos em meio Ágar nutriente (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo penicilina G na concentração de 100 mg/L e incubados a 30°C por 24 h para germinação. Após esse período, os isolados foram transferidos para Erlenmeyer (300 mL), contendo 200 mL de meio T3 líquido (Bacto-triptona, 1,5 g; bacto-triptose, 1 g; extrato de levedura, 0,75 g; MnCl<sub>2</sub>, 0,0025 g; e tampão fosfato

50 mM, pH 6,8; 0,5 L), incubados a 30°C, 200 rpm, por 72 h (Travers *et al.* 1987, Martin e Travers 1989) para produção de esporos e cristais.

Após o período de incubação, os isolados foram centrifugados a 1700  $\times g$  por 15 min a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados em 10 mL de água ultrapura esterilizada. Este procedimento foi repetido por três vezes, e ao final foram adicionados 5 mL de solução de NaCl (0,9%) aos *pellets* que foram estocados a 4°C. Logo após, a mistura de esporos e cristais foram quantificadas para posterior preparo das suspensões de trabalho utilizadas nos bioensaios. Diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em água ultrapura esterilizada foram preparadas determinando-se o número de células bacterianas conforme metodologia descrita por Alves *et al.* (1998). A quantificação de esporos foi conduzida em microscópio de contraste de fase usando câmara de Neubauer.

## 2.8 Teste de Patogenicidade

Para a realização dos bioensaios, foi utilizada uma alíquota de 30  $\mu L$  de suspensão de esporos + cristal/ml a  $10^8$  de cada isolado de *B. thuringiensis* e também das estirpes *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo HD-1) (Btk) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Sorotipo HD-73) como controles positivos. Triton X-100 a 0,01% foi adicionado às suspensões que foram aplicadas sobre a superfície da dieta artificial previamente distribuída em bandejas para bioensaios de 128 células (Bio-Serv Frenchtown, NJ); destas 96 continham as suspensões esporo/cristal e 32 destinadas aos controles negativos com NaCl (0,9%) e Triton X-100 (0,01%). Após secagem da suspensão, duas lagartas neonatas de *D. saccharalis* foram acondicionadas em cada célula da bandeja posteriormente fechada com tampas transparentes e ventiladas (Bio-Serv Frenchtown, NJ). As bandejas foram

mantidas em câmara incubadora (BOD), regulada para  $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa (UR) e fotoperíodo de 12h L: 12h E.

Para cada isolado e estirpes foram realizadas três repetições de 48 células por bandeja; com avaliações ao 7º dia. A morte das lagartas foi atestada com a ausência de locomoção após leve toque com pincel de cerdas macias e pela pigmentação escurecida do tectumento.

## **2.9 Análises Estatísticas**

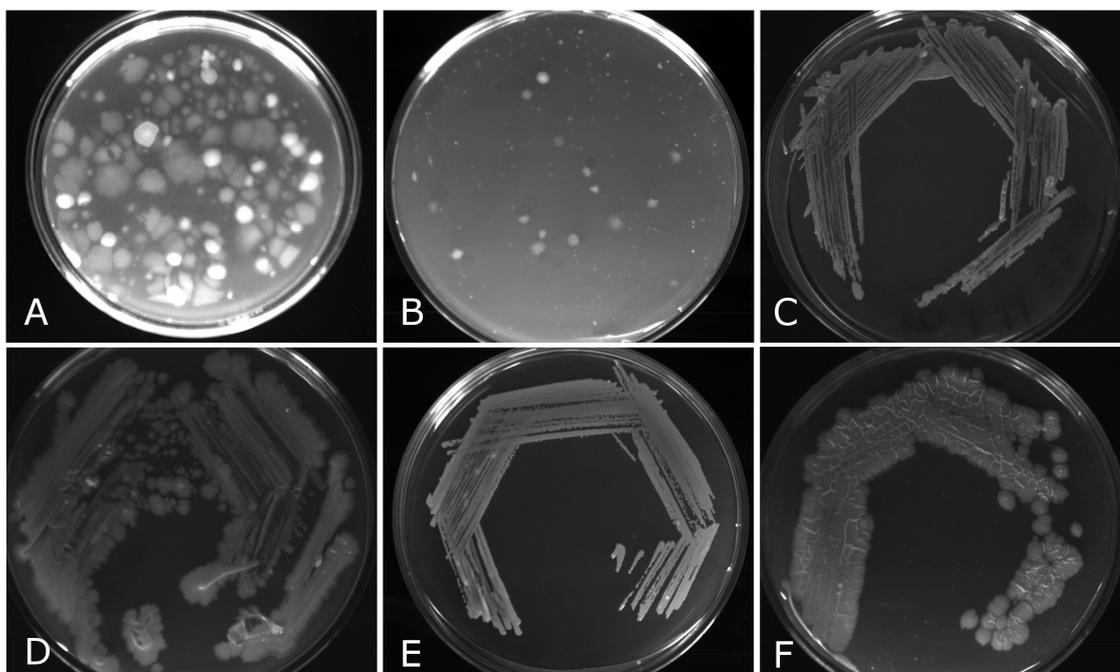
Os dados de mortalidade foram com base nos resultados para o tratamento testemunha (Abbott, 1925). Percentagens corrigidas de mortalidade das larvas foram sujeitas a uma análise de variância (PROC GLM) usando o pacote estatístico ASSISTAT Versão 7.7 beta (Silva, 2015), após serem testados para normalidade (testes de Kolmogorov-Smirnov). Dados que não assumiram normalidade foram transformados por raiz de X ( $\sqrt{X}$ ), onde X é a taxa de mortalidade obtida a partir da proporção entre o número de larvas mortas e o número total de larvas utilizadas no bioensaio. A mortalidade média dos isolados foi comparada pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## **3. Resultados obtidos**

### **3.1 Isolamento e caracterização morfológica**

Noventa e sete isolados foram obtidos, sendo 28 oriundos de Mucugê, região da Chapada Diamantina (BA), 66 de Primavera (PE), um de Brejão (PE) e dois de Recife (PE) (Figuras 1). Os 97 isolados apresentaram crescimento rápido em até 24 h e as características morfológicas, como tamanho das colônias variando entre 1,67 e 15,35; forma circular, contorno irregular, coloração banco

acinzentado e opaco, elevação plana e ligeiramente consistente foram compatíveis com as descritas para espécies de *Bacillus thuringiensis*. Os dados de caracterização morfológica dos isolados estão disponíveis no Anexo I.

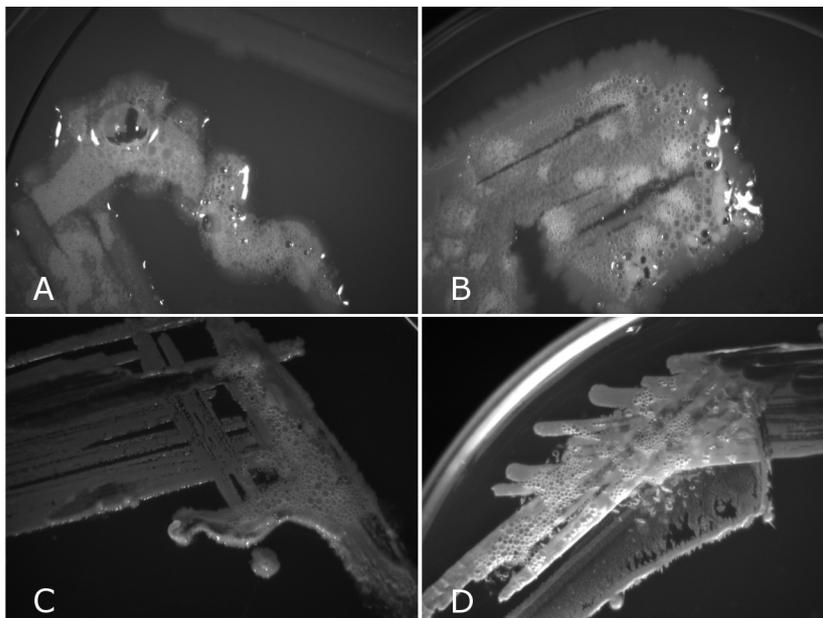


**Figura 1:** Visualização das colônias 24h após plaqueamento da suspensão contendo amostras de solo em meio Valicente e Barreto (2003): **A** e **B** Amostra de Mucugê, Chapada Diamantina (BA) e Primavera (PE), respectivamente. Visualização dos isolados purificados após segunda repicagem: **C, D, E** e **F**.

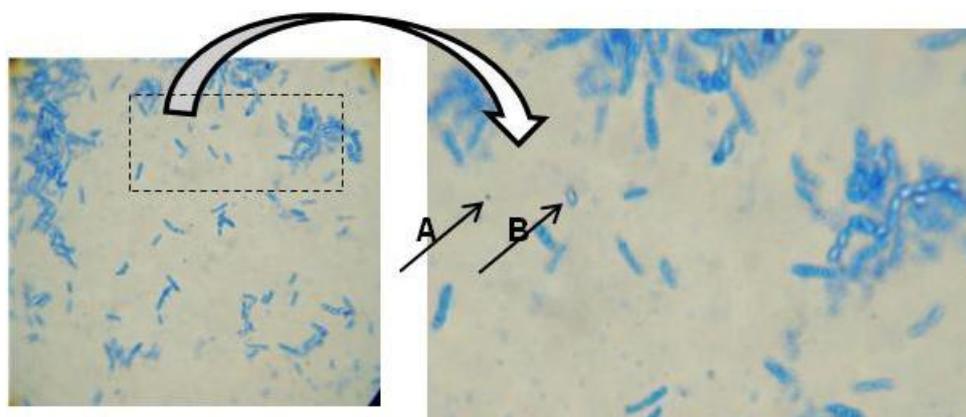
### 3.2 Teste da catalase e presença de esporos e cristais de proteína

Para os 97 isolados, a prova da produção de catalase foi considerada positiva pela observação de borbulhamento pela biomassa bacteriana, devido a liberação de oxigênio (Figura 2); constatando-se, portanto, que todos os isolados apresentam a enzima catalase. A coloração com azul de Comassie por sua vez possibilitou a comprovação, após observação em microscópio óptico de todos os isolados que compõe a nossa coleção, da forma bacilar e a presença de esporos

e pequenas partículas pigmentadas semelhantes a inclusões cristalinas como podem ser observadas na Figura 3.



**Figura 2:** Teste da catalase positiva com formação de bolhas na superfície da biomassa bacteriana. **A e B:** Isolados de Mucugê na Chapada Diamantina (BA). **C e D:** Isolados de Primavera (PE).



**Figura 3:** Visualização dos isolados após coloração com Azul de Coomassie. Seta **A:** inclusão cristalina; Seta **B:** esporo. Objetiva de 100x (ampliação 1.000x).

### 3.3 Amplificações dos genes *cry* via PCR

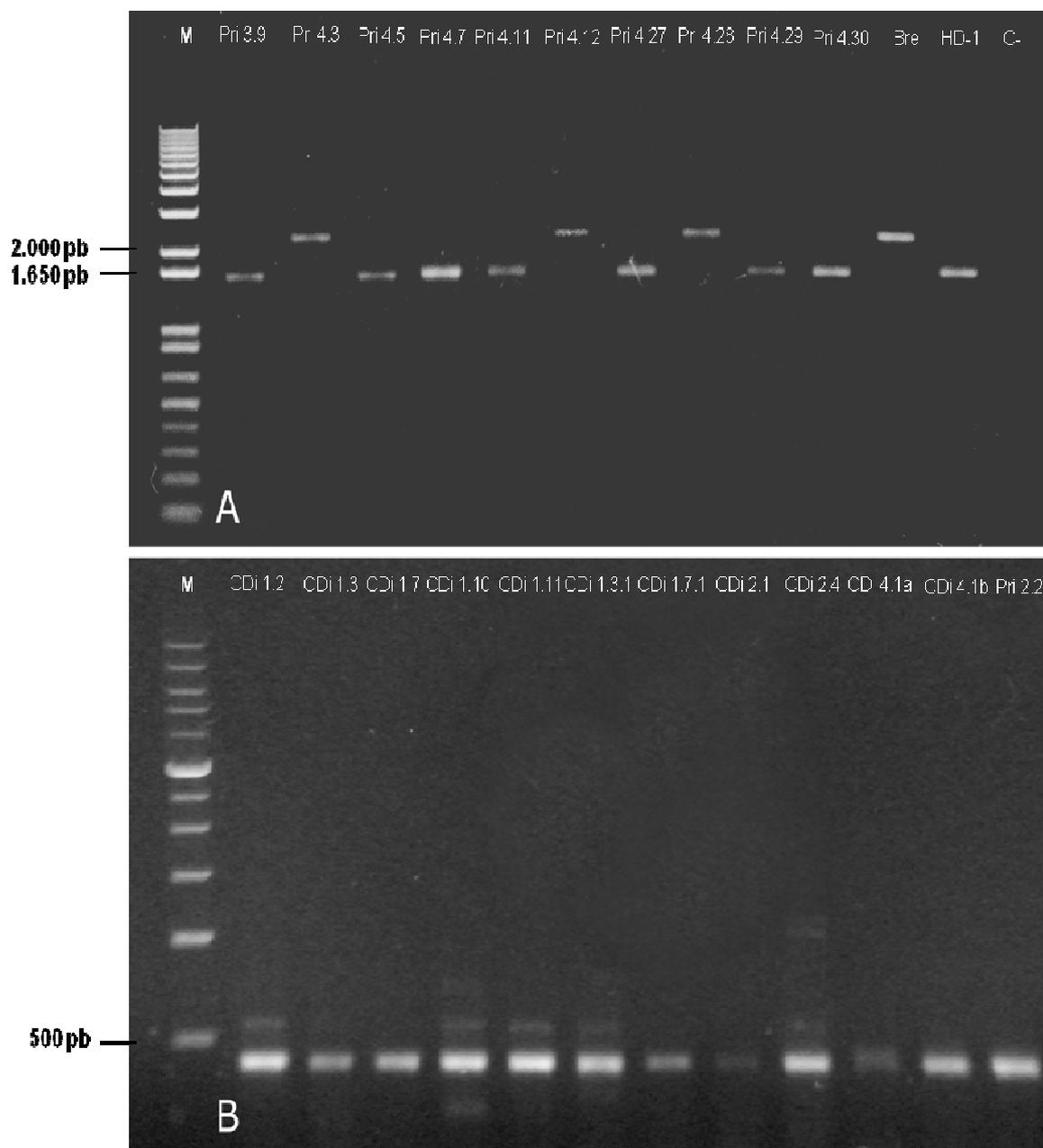
Na genotipagem por PCR utilizando os *primers* Cry1 para os 97 isolados não houve geração de *amplicons*, indicando a ausência da classe gênica *cry1* nestas bactérias. Para o par de *primers* Cry2 (Figura 4 A), foram obtidos resultados positivos em 11 isolados. Os produtos de PCR amplificados para o gene *cry2* são de aproximadamente 1.600 pb. Para os outros 86 isolados analisados não foram observadas amplificações utilizando os *primers* Cry2.

Para os oligonucleotídeos Cry9, 12 isolados oriundos da Chapada Diamantina e 1 de Primavera apresentaram fragmentos de amplificação de aproximadamente 350 pb (Figura 4 B). O produto amplificado nos 12 isolados é compatível com os descritos para genes *cry9* amplificados com este par de *primers*.

Os resultados das amplificações dos genes *cry* podem ser visualizados na Tabela 2. Resultados de amplificações para outros genes analisados, porém não discutidos neste trabalho, podem ser observados no Anexo II.

**Tabela 2:** Perfil genético dos amplificados.

<b>Isolados da Chapada Diamantina</b>	<b><i>cry1</i></b>	<b><i>cry2</i></b>	<b><i>cry9</i></b>
Bt.CDi 1.2	-	-	+
Bt.CDi 1.3	-	-	+
Bt.CDi 1.7	-	-	+
Bt.CDi 1.10	-	-	+
Bt.CDi 1.11	-	-	+
Bt.CDi 1.3.1	-	-	+
Bt.CDi 1.7.1	-	-	+
Bt.CDi 2.1	-	-	+
Bt.CDi 2.4	-	-	+
Bt.CDi 4.2a	-	-	+
Bt.CDi 4.2b	-	-	+
<b>Isolados de Primavera</b>	<b><i>cry1</i></b>	<b><i>cry2</i></b>	<b><i>cry9</i></b>
Bt.Pri 2.2	-	-	+
Bt.Pri 3.9	-	+	-
Bt.Pri 4.3	-	+	-
Bt.Pri 4.5	-	+	-
Bt.Pri 4.7	-	+	-
Bt.Pri 4.11	-	+	-
Bt.Pri 4.12	-	+	-
Bt.Pri 4.27	-	+	-
Bt.Pri 4.28	-	+	-
Bt.Pri 4.29	-	+	-
Bt.Pri 4.30	-	+	-
<b>Isolado de Brejão</b>	<b><i>cry1</i></b>	<b><i>cry2</i></b>	<b><i>cry9</i></b>
Bt.Bre	-	+	-
<b>Estirpes padrão</b>	<b><i>cry1</i></b>	<b><i>cry2</i></b>	<b><i>cry9</i></b>
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (HD-1)	+	+	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> (HD-73)	+	-	-



**Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Green. **A:** Amplificações com primer Cry2 nos isolados de Primavera. **M:** Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. **B:** Amplificações com primer Cry9 nos isolados de Mucugê da Chapada Diamantina e Primavera. **M:** Marcador 1 kb Ready Ladder.

### 3.4 Teste de Patogenicidade

Nos testes de patogenicidade com *D. saccharalis* utilizando os 23 isolados que amplificaram genes *cry2* e *cry9*, 13 não apresentaram nenhum grau de patogenicidade sob as lagartas. Dez isolados apresentaram toxicidade para *D. saccharalis* sendo os isolados Bt.Pri 4.7 (*cry2*), Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.7.1 (ambos *cry9*) os que ocasionaram mortalidade em média de 20,05%, 16,31% e 11,11% respectivamente. Os isolados Bt.Bre (*cry2*) e Bt.CDi 1.3.1 (*cry9*) ocasionaram mortalidade de 10,76% e 15,62%. Os isolados Bt.Pri 4.3, Bt.Pri 4.29 (ambos *cry2*), Bt.CDi 1.2, Bt.CDi 1.7, Bt.CDi 1.11 (*cry9*), ocasionaram mortalidade de até 5%. Os isolados Bt.Pri 4.7 (*cry2*), Bt.CDi 1.3.1 e Bt.CDi 1.7.1 (ambos *cry9*) se destacaram em uma das repetições do bioensaio por terem ocasionado mortalidade nas lagartas de *D. saccharalis* de 47,00%, 35,45% e 28,12% respectivamente (Tabela 3).

**Tabela 3:** Médias de mortalidade percentual ( $\pm$ EP) de *Diatraea saccharalis* por isolados de *Bacillus thuringiensis* com  $10^8$  esporos/mL.

<i>D. saccharalis</i>			
Isolados	N <sup>1</sup>	Médias de mortalidade (%) <sup>2</sup>	$\pm$ EP <sup>3</sup>
Bt.Pri 4.3	288	5,20 b	5,20
Bt.Pri 4.7	240	20,05 b	11,96
Bt.Pri 4.29	288	3,47 b	3,47
Bt.Bre	288	10,76 b	8,68
<i>Gene cry9</i>			
Bt.CDi 1.2	288	4,86 b	3,31
Bt.CDi 1.3	288	16,31 b	9,55
Bt.CDi 1.7	288	4,86 b	3,41
Bt.CDi 1.11	288	3,47 b	3,47
Bt.CDi 1.3.1	288	15,62 b	4,20
Bt.CDi 1.7.1	288	11,11 b	8,51
Controle Positivo			
HD-1 <sup>4a</sup>	288	69,72 a	15,14
HD-73 <sup>4b</sup>	288	82,46 a	9,31

<sup>1</sup> Número total de insetos testados.

<sup>2</sup> Médias de mortalidade percentual ao 7º dia de avaliação. Letras iguais indicam que não houve diferença pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>3</sup> Erro padrão.

<sup>4</sup> Estirpes padrão: **a.** *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo HD-1) (Btk); **b.** *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Sorotipo HD-73).

#### 4. Discussão

Vários estudos têm por objetivo isolamento de novas cepas de *B. thuringiensis* por ser um micro-organismo com grande utilidade em processos biotecnológicos como produção de biopesticida e aplicação de seus genes codificadores de proteínas entomotóxicas em programas de transgenia de várias culturas economicamente importantes. Embora estejam presentes nos mais diversos ambientes, grande parte dos isolados são oriundos de amostras de solo, substrato utilizado para o isolamento das bactérias no presente estudo e também por Campanini *et al.* (2012) e Gama *et al.* (2013), que isolaram cepas promissoras em amostras de solo de Ilha Bela (São Paulo) e Malang (Indonésia).

O *Bacillus thuringiensis* pode ser isolado por procedimentos relativamente simples como o descrito por Valicente e Barreto (2003), que utilizam as orientações da OMS, seguido da identificação das bactérias em meio contendo penicilina. Métodos de isolamento de estirpes de *Bacillus* entomopatogênicos foram testados por Ferreira da Silva *et al.* (2002) e estes autores demonstraram que o método de isolamento proposto pela OMS juntamente com a posterior identificação dos isolados em meio contendo penicilina, procedimento empregado para o isolamento das 97 bactérias que compõem a coleção, é o mais eficiente para o isolamento de Bt.

A caracterização morfológica é outro passo crucial na identificação de isolados bacterianos. Os dados morfológicos descritos por Ruiz Escudero *et al.* (2004) e Solís (2009) para Bt, serviram de parâmetro para a caracterização morfológica realizada neste trabalho. A morfologia observada nos 97 isolados foi compatível com a descrição desses autores e estes dados também são corroborados pelos resultados descritos por Praça *et al.* (2009), Zakeel *et al.*

(2009), Josephine *et al.* (2009). De forma complementar a caracterização morfológica, autores como Josephine *et al.* (2009), López-Pazos *et al.* (2009) e Kannan *et al.* (2012), confirmaram por análises microscópicas as características de forma, presença de esporos e de inclusões cristalíferas em seus isolados. Essas análises têm se mostrado fundamentais na classificação das bactérias como *B. thuringiensis* e vêm incorporando novas técnicas a exemplo da coloração com azul de Coomassie, que auxilia a observação por corar as estruturas de forma distinta. A coloração com azul de Coomassie possibilitou a observação da forma e da presença de esporos e cristais nos isolados da coleção criada, assim como foi fundamental na observação destas estruturas nos trabalhos realizados por Zakeel *et al.* (2009) e Lakxmy *et al.* (2011).

Além da caracterização morfológica associada a análise da presença de cristais de proteínas, a identificação de novos isolados de Bt também é realizada por caracterização bioquímica. Provas bioquímicas como catalase, indol, hidrólise do amido, lecitinase foram utilizados por Goudar *et al.* (2012) e Oves *et al.* (2013) para identificação de novos isolados de Bt oriundos; respectivamente, de solo, serapilheira e de produtos de compostagem da região sul da Índia e de solos da região norte também da Índia. Estes autores apontam reações positivas para catalase em isolados de Bt assim como Kaur *et al.* (2006). A observação de reações positivas para catalase nos 97 isolados do presente estudo corroboram os dados e as observação dos autores acima referidos.

A forma de caracterização da possível entomopatogenicidade mais utilizada em estudos com isolados de Bt continua sendo a caracterização molecular dos genes *cry* via PCR; embora Pinto e Fiúza (2003) alertem para variação observada na frequência gênica deste micro-organismo, devido a

influências de fatores abióticos tais como características físico-químicas do solo, entre outros. Esta variação pode explicar a ausência de genes *cry1* nos isolados analisados, mesmo com essa classe gênica estando descrita por Rosas-García *et al.* (2008), como a mais frequente em Bt presentes na natureza. Estes autores também apontaram a ausência de amplificação de genes *cry1* em seus isolados e atribuem essa ausência a adaptações ambientais que também podem ser a causa da ausência de *cry1* nos isolados analisados. Mendoza *et al.* (2012) também descrevem a baixa frequência do gene *cry1* e, assim como outros autores atribuem esse resultado as diferentes origens geográficas e climáticas dos isolados envolvidos em seus estudos.

Segundo Pinto *et al.* (2009/2010), o grupo de genes *cry2* também é um dos mais estudados entre os genes de Bt. Martínez e Caballero (2002) e Mendoza *et al.* (2012) relataram frequência de respectivamente, 91 e 71%, desses genes entre seus isolados. Segundo Pinto e Fiúza (2003), a frequência de genes *cry2* para isolados brasileiros é de aproximadamente 2,17%, ficando abaixo da frequência normalmente descrita no mundo. A frequência observada por estes autores para isolados autóctones do Brasil diferem dos resultados aqui descritos, que apresentaram frequência do gene *cry2* de 11,34%. Para estes genes, Rosas-García *et al.* (2008) também apontam a evidência de que a distribuição e a frequência é dependente da região geográfica, sendo esta classe gênica encontrada com mais frequência na Ásia, como relatado por Zhang *et al.* (2000) e Wang *et al.* (2003) do que na América Latina (Bravo *et al.*, 1998).

Os genes *cry9* são muito relatados em estudos com Bt e algumas vezes aparecem com mais frequência do que os genes *cry1* e *cry2* como demonstrado por Pinto e Fiuza (2003) e Rosas-García *et al.* (2008). A frequência de genes *cry9*

neste estudo foi de aproximadamente 12,40% com os *primers* Cry9. Esta frequência é aproximada aos 10,2% descritos por Ben-Dov *et al.* (1999) e 15% por Wang *et al.* (2003) em seus estudos com isolados oriundos de Israel e China, respectivamente. Porém não corrobora os dados de Pinto e Fiuza (2003) que relatam frequência de 47,8% de genes *cry9* em isolados do Rio Grande do Sul (Brasil).

Autores como Grecco *et al.* (2010) e Campanini *et al.* (2012) realizaram testes de patogenicidade para seleção de novos isolados de Bt com ação entomotóxica. Nos estudos de Gitahy *et al.* (2007) foram testadas cinco novas estirpes brasileiras de *B. thuringiensis* e apenas a S76 proporcionou uma alta mortalidade (100%) a *D. saccharalis*. As outras quatro estirpes testadas apresentaram mortalidade abaixo de 3%, porcentagem inferior as observadas para nossos isolados menos patogênicos para *D. saccharalis* Bt.Pri 4.29 e Bt.CDi 1.11, ambos ocasionaram mortalidade de 3,47%. No mesmo estudo, Gitahy *et al.* (2007) evidenciaram um declínio da patogenicidade da estirpe HD-1 de 100 para 69,10% durante os testes. Em nosso bioensaio também foi constatada essa queda na taxa de mortalidade de *D. saccharalis* ocasionada por HD-1 (69,72%), mesmo com essa estirpe sendo considerado um padrão de patogenicidade para lepidópteros.

Polanczyk *et al.* (2004) isolaram 139 bactérias e nos testes de patogenicidade contra *Spodoptera frugiperda* apenas sete (5%) mostraram-se ativos, com três deles ocasionando morte entre 20 e 45% dos insetos. Os outros quatro isolados apresentaram atividade entre 5 e 15%. Em nosso trabalho, das 97 bactérias isoladas 23 foram testadas e dez destas (43,47%) apresentaram atividade contra *D. saccharalis* embora a maior média de patogenicidade seja de

20,05% do isolado Bt.Pri 4.7 com gene *cry2*. Os outros nove isolados apresentaram média de patogenicidade variando entre 3,4 e 16,3%, valores superiores ao máximo de 3% descritos por Gitahy *et al.* (2007) para isolados brasileiros sobre *D. saccharalis*. Observamos, contudo, que em uma das repetições do bioensaio três dos nossos isolados apresentaram valores de patogenicidade consideráveis de aproximadamente 28, 35 e 47% (isolados Bt.CDi 1.7.1, Bt.CDi 1.3.1 e Bt.Pri 4.7, respectivamente).

Diferenças no grau de patogenicidade de isolados de Bt estão diretamente relacionadas aos genes contidos e as proteínas por estes expressas. A estirpe HD-1, por exemplo, apresenta genes das famílias *cry1* e *cry2*, que embora comunguem de um mesmo mecanismo de ação apresentam toxicidades distintas como descrito por Sebastião *et al.* (2015).

Os autores acima referidos ao avaliarem a toxicidade de subclasses de proteínas Cry1, verificaram que a proteína Cry1Ac é mais tóxica que a Cry1Ab e 1Aa para o *Helicoverpa armigera* Hübner, um lepidóptero que causa danos graves a culturas como algodão, soja e milho; como informado por Ávila *et al.* (2013). Davolos *et al.* (2015) também demonstraram atividades distintas entre proteínas da classe Cry1 para *D. saccharalis* com a Cry1Ab apresentando os melhores resultados frente a Cry1Ac, Cry1Fa e Cry1Aa.

Diferenças de toxicidade de proteínas Cry foram também descritas por Avilla *et al.* (2005) que relatam um maior grau de patogenicidade da proteína Cry1Ac do que a Cry2Aa sob *H. armigera*. Todos esses dados contribuem para o entendimento da baixa toxicidade dos isolados Bt.Pri. 4.7 e Bt.Pri 4.29 que apresentam o gene *cry2* porém não foi constatada a presença de genes *cry1*,

sugerindo que o maior grau de patogenicidade da estirpe HD-1 pode estar ligado as proteínas expressas por este gene.

Outro dado relevante foi descrito por Silva *et al.* (2013) que relataram uma larga amplitude na atividade tóxica de isolados de Bt sob espécies de *Diatraea*. Estes autores identificaram um mesmo isolado que se destacava no controle de *D. flavipennella* por apresentar-se 100 vezes mais tóxico para esta espécie do que para *D. saccharalis*. Esta toxicidade diferenciada entre as duas espécies de *Diatraea* pode estar relacionada às diferenças de atividade proteolítica, defesas imunológicas ou receptores distintos entre essas espécies. Estes relatos evidenciam a necessidade de novos testes de patogenicidade dos isolados prospectados frente a outras espécies de lepidópteros para avaliação do seu potencial uso em métodos de controle biológico em outras pragas agrícolas.

O potencial patogênico de isolados de Bt pode ser comprometido por algum mecanismo de resistência nas populações dos insetos utilizados em bioensaios. É notório que a resistência de insetos às toxinas expressas pelo Bt se deve a três fatores mencionados no relatório ILSI/HESI (1998), com dois deles estando relacionado à genética e a biologia/ecologia das pragas alvo. Normalmente a resistência às toxinas Cry é ligada a mutações em genes que interferem na interação toxina-receptor ou que estejam envolvidos em qualquer etapa do mecanismo de ação das toxinas no intestino do inseto como descrito por Fernandez *et al.* (2008) e Heckel *et al.* (2007), e que pode ser a razão da baixa mortalidade na população utilizada. Contudo, o aspecto mais importante sugerido por Rang *et al.* (2015), está na compreensão e conhecimento das substâncias com atividade insecticida presentes em isolados de *B. thuringiensis* e que podem ser identificadas por técnicas de proteômica para auxiliar o entendimento dos

mecanismos de ação das toxinas expressas e os diferentes níveis de patogenicidade observados.

## **5. Conclusão**

As metodologias de isolamento e caracterização utilizadas são eficientes para montagem de coleções de *Bacillus thuringiensis*.

Não foi detectado o gene *cry1* nos 97 de isolados analisados, entretanto; em 11,34% e 12,37% foram detectados os genes *cry2* e *cry9*, respectivamente;

Verificamos a redução da patogenicidade da estirpe padrão HD-1 nos bioensaios, o que sugere uma possível resistência da população de *D. saccharalis* às toxinas dos Bt utilizados.

Os isolados portadores dos genes *cry2* e *cry9* presentes na coleção são promissores no combate de outras espécies de insetos.

## **Agradecimentos**

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e de forma especial ao Laboratório de Genoma que possibilitou a realização das etapas iniciais do projeto. A Rebeka Alves do Laboratório de Patologia de Inseto da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela contribuição para a realização dos testes de patogenicidade.

## 7. Referências

- Abbott WSA (1925) Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265-267.
- Alves SB, Almeida JEM., Moino Jr A e Alves LFA (1998) Técnicas de laboratório, p. 637-711. In: Alves SB (ed) Controle microbiano de insetos. 1ª edição. Piracicaba, FEALQ, pp 1163.
- Ávila CJ, Vivan LM e Tomquelski GV (2013) Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Circular Técnica, Embrapa: 1-12.
- Avilla C, Vargas-Osuna E, Gonzalez CJ, Ferré J and Gonzalez-Zamora JE (2005) Toxicity of several  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *Jour of Inver Path* 90:51-54.
- Araújo JR, Botelho PSM, Araújo SMSS, Almeida LC e Degaspari N (1985) Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC* 36:45-48.
- Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) (2012) DOSSIÊ ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Rio de Janeiro, World Nutrition, pp 1-98.
- Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) (2015) DOSSIÊ ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Rio de Janeiro, World Nutrition, pp 1-623.
- Ben-Dov E, Wang Q, Zaritsky A, Manasherob R, Barak Z, Schneider B, Khamraev A, Baizhanov M, Glupov V and Margalith Y (1999) Multiplex PCR Screening To Detect cry9 Genes in *Bacillus thuringiensis* Strains. *Applied And Environmental Microbiology* 65:3714–3716.
- Bravo A and Soberón M (2008) How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 10:573-9.
- Bravo A, Sarabia S, López L, Ontiveros E, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos FJ, Peña G, Nuñez-Valdez ME, Soberón M and Quintero R (1998) Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64:4965– 4972.
- Brodeur J (2012) Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evol Appl* 5:470-80.
- Campanini EB, Davolos CC, Alves ECC and Lemos MVF (2012) Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains that contain Dipteran-specific cry genes from Ilha Bela (São Paulo, Brazil) soil samples. *Braz. J. Biol* 72:243-247.
- Campanini EB; Davolos CC; Alves ECC e Lemos MVF (2012) Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. *Bragantia* 3:362-369.
- Carvalho MM, Bueno RCOF, Carvalho LC, Godoy AF e Favoreto AL (2013) Importância econômica e generalidades para o controle de *Telchin licus*

- Drury, 1773 (Lepidoptera: Castniidae) em cana-de-açúcar. *Biosfera* 17:1623-1637.
- Companhia Nacional De Abastecimento (2011) Acompanhamento da Safra Brasileira. Cana-de-Açúcar. Safra 2015/2016. Segundo levantamento. Brasília, 38 pp.
- Davolos CC, Hernandez-Martinez P, Crialesi-Legori PCB, Desidério JA, Ferré J, Escriche B e Lemos MVF (2015) Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J Invert Path* 127:32-34, 2015.
- Dinardo-Miranda LL (2008) Pragas. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (eds) Cana-de-açúcar. 1ª edição. Instituto Agrônomo, Campinas, pp349-404.
- Fernández LE, Gómez I, Pacheco S, Arenas I, Gill SS, Bravo A and Soberón M (2008) Employing phage display to study the mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Peptides* 29:324-329.
- Ferreira da Silva S, Sousa Dias JMC e Monnerat RG (2002) Comparação entre três Métodos de Isolamento de *Bacillus* Entomopatogênicos. Embrapa, Brasília, 1 ed, 3p.
- Fiuza LM, Schünemann R, Pinto LM and Zanettini MH (2012) Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz J Biol* 2:363-9.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS and Omoto C (2002) Entomo Agríc. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gama ZP, Nakagoshi N, Suharjono, Setyowati.F (2013) Toxicity studies for indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates from Malang city, East Java on *Aedes aegypti* larvae. *Asian Pac J Trop Biomed* 3:111-117.
- Gitahy PM, Souza MT, Monnerat RG, Arrigoni EB and Baldani JI (2007) A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Braz J Micro* 38:531-537.
- Goudar G, Alagawadi AR, Krishnaraj PU and Goud KB (2012) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates of western ghats and their insecticidal activity against diamond back moth (*Plutella xylostella* L.). *Karnataka J Agric Sci* 25:199-202.
- Grecco ED, Polanczyk RA e Pratisoli D (2010) Seleção e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* berliner com atividade tóxica para *Trichoplusia ni* huebner (Lepidoptera: Noctuidae). *Arq Inst Biol* 4:685-692.
- Guz K, Bugla-Ploskonska G and Doroszkiewicz W (2009) The occurrence, biodiversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from the insect pest *Lymantria dispar* (Poland). *Polish Jour Micro* 2:155-161.
- Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zahao JZ, Shelton AA, Gould F and Tabashnik BE (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *Journal Invert Pathol* 3: 192-197.

- Hensley SD and Hammond Jr AM (1968) Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. *J Econ Entomol* 61:1742-1743.
- International Life Science Institute – Health and Environmental Science Institute (1998) An evolution of the insect resistance management in Bt field corn: a science based framework for risk assessment and risk management: report of an expert panel. ILSI Press, Washington, 78p.
- Josephine R, Sreeramanan CM, Wang LY and Xavier R (2009) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Gunung Jerai forest (Malaysia) with insecticidal activity against lepidopteran and dipteran insects. *Inter Jour Eng Technol* 1:300-305.
- Juárez-Páez VM, Ferrandis MD and Frutos R (1997) PCR-Based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl Environ Microbiol* 63:2997–3002.
- Kannan P, Xavier R, Josephine R, Marimuthu K, Kathiresan S and Sreeramanan S (2012) The occurrence of *Bacillus thuringiensis* strains in chemical intensive rice growing ecosystem. *Afr J Microbiol Res* 6:5147-5152.
- Kaur P, Joshi N and Brar KS (2006) Morphological and biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolates and their evaluation against *Plutella xylostella* Linnaeus. *J. Biol. Control* 20:191-195.
- Knaak N, Franz AR, Santos GF and Fiuza LM (2010) Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. *Smith Caterpillars* (Lepidoptera, Noctuidae). *Braz J Biol* 3:677-684.
- Konecka E, Baranek J, Hrycak A and Kaznowski, A (2012) Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. *The Science World Jour* 1-5.
- Kumar S, Chandra A and Pandey KC (2008) *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J Environ Biol* 5:641-53.
- Lakshmy AP, Xavier R, Reena Josephine C.M, Lee Yw, Marimuthu K, Kathiresan S, and Sreeramanan, S (2011) Mosquitocidal activity of a native *Bacillus thuringiensis* isolate Bt ReX02 from Gunung Jerai Forest, Malaysia against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus*. *European Review Medical Pharmaco Scien* 15:149-155.
- López-Pazos SA, Martínez JW, Castillo AX and Salamanca JAC (2009) Presence and significance of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins associated with the Andean weevil *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev Biol Trop* 57:1235-1243.
- Macedo N and Botelho PSM (1988) Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). *Bras Açuca* 2:2- 11.
- Margarido LAC and Castilho H J (1988) *Brasil Açucareiro* 2:41-46.
- Martin PAW and Travers RS (1989) Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* 55:2437-2442.

- Martínez C and Caballero P (2002) Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *J Appl Microbiol* 92:745-52.
- Martins AL, Zampieron SLM and Cruz I (2011) Eficiência *Trichogramma galloi* no combate à *Diatraea saccharalis* na cana-de-açúcar em Passos – MG – Brasil. *Revista Verde* 4:190–195.
- Mendoza G, Portillo A, Arias E, Ribas RM and Olmos J (2012) New combinations of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *International Microbiology* 15:209-216.
- Miranda LLD, Gil MA and Menegatti CC (2003) Danos causados por nematóides a variedades de cana-de-açúcar em cana planta. *Nematologia Brasileira* 27:69-73.
- Monnerat RG, Batista AC, Medeiros PTS, Martins E, Melatti V, Praça L, Dumas V, Demo C, Gomes ACM, Falcao R, Brod CS, Silva-Werneck JO and Berry C (2007) Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biolog Contr* 41:291-295.
- Muniady S, Rathinam X and Subramaniam S (2011) Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from chicken manure samples. *African Journal Microbiol Resea* 20:3131-3137.
- Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM and Frizzas MR (2014) Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. *Crop Protection* 56:50-54.
- Oliveira e Silva MF e Costa LM (2012) A indústria de defensivos agrícolas. *BNDES Setorial* 35:233–276.
- Oves M, Khan MS, Zaidi A (2013) Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. *Saudi Journal Biological Sciences* 20:121–129.
- Pinto LMN, Berlitz DL, Castilhos-Fortes R, Fiuza LM (2009/2010). Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotec Ciên Desenvol* 38:24-31.
- Pinto LMN and Fiuza LM (2003) Distribuição de genes cry de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc Rural* 33:699-702.
- Polanczyk, RA, Silva RFP e Fiuza, LM (2004) Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev Bras Agroci* 2:209-214.
- Praça LB, Morinaga C, Medeiros PT, Melatti VM, Martins ES, Dumas VF, Falcão R e Monnerat RG (2009) Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* coletadas em solos do oeste baiano. *Universitas: Ciências da Saúde* 7:1-18.
- Rang J, He H, Wang T, Ding X, Zuo M, Quan M, Sun Y, Yu Z, Hu S, Xia L. Comparative Analysis of Genomics and Proteomics in *Bacillus thuringiensis* 4.0718. *PLOS ONE*, 10(3), 1-15, 2015.

- Rosas-García NM, Mireles-Martínez M, Hernández-Mendoza JL and Ibarra JE (2008) Screening of cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from avocado orchards in Mexico, and their insecticidal activity towards *Argyrotaenia* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Journal Appli Microbiol* 104:224–230.
- Ruiz Escudero I, Ibañez I, Padilla MA, Carnero A and Caballero P (2004) Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 30:703-713.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T and (2011) Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 3:283-300.
- Santos AS (2008) Doenças causadas por fungos In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (eds) *Cana-de-açúcar*. Instituto Agronomico de Campinas, Campinas, p 882
- Sebastião I, Lemes ARN, Figueiredo CS, Polanczyk RA, Desidério JA, Lemos MVF (2015) Toxicidade e capacidade de ligação de proteínas Cry1 a receptores intestinais de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesq Agropec Bras* 11:999-1005.
- Silva FAS (2015) ASSISTAT: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG. Disponível em <<http://www.assistat.com/>>.
- Silva LM (2013) Caracterização molecular e atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para as brocas da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Soberón M, Gill SS and Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. *Cell Mol Life Sci* 8:1337-49.
- Solís BC (2009) Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis* Berliner autóctonos de Cuba. *Fitosanidad* 13:109-116.
- Travers RS, PA Martin and Reichelderfer CF (1987) Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 53:1263-1266.
- Turner P (2011) WEED CONTROL In: Meyer JH, Rein P, Turner P, K Mathias, McGregor C, Wise B (eds) *Good management practices manual for the cane sugar industry*. 1st edition. INTERNA FINANCE CORPOR, South Africa, pp.143-170
- Valicente FH and Barreto MR (2003) *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 32:639-644.
- Valette-Gelly I, Lemaitre B and Bocard F (2008) Bacterial strategies to overcome insect defenses. *Nature Rev Microbiol* 4:302-313.
- Wang J, Boets A, Van Rie J and Ren G (2003) Characterization of cry1, cry2, and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J Invertebr Pathol* 82:63-71.

- Zakeel MCM, Dissanayake DMD and Weerasinghe PA (2009) Molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from a selected site in Nochchiyagama, Anuradhapura in Sri Lanka. Trop Agriculture Rese Extens 12:32-34.
- Zhang HY, Yu, ZN and Deng WX (2000) Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. J Invertebr Pathol 76:191–197.

## 5. Capítulo 2

**Título: Proteômica diferencial de *Bacillus thuringiensis* com níveis distintos de patogenicidade para praga da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**

Paulo Geovani Silva Martins<sup>1</sup>, Amaro de Castro Lira Neto<sup>2</sup>, Adauto Gomes Barbosa Neto<sup>1</sup>, Tercilio Calsa Junior<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Genoma, Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brasil.

O manuscrito será submetido ao periódico Proteomics, Qualis A2.

## Resumo

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva cosmopolita em forma de bastonete conhecida pela expressão, normalmente na fase de esporulação, de cristais proteicos (proteínas Cry ou  $\delta$ -endotoxinas) com atividade entomopatogênica. Estes cristais são ativos contra diversas ordens de insetos e seu mecanismo de ação é iniciado após ingestão, envolvendo receptores específicos do intestino médio, assim como outros fatores de virulência expressos pelo Bt com ação sinérgica à das proteínas Cry. Estudos em nível proteômico têm sido realizados buscando a identificação destes fatores de virulência e/ou regulação para maior compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenicidade do Bt. Assim, este trabalho teve por objetivo a comparação dos perfis proteômicos utilizando eletroforese bidimensional (2D-PAGE) dos isolados Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.29, do isolado Bt.Pri 4.7 e da estirpe *B. thuringiensis subsp.* Kurstaki (HD-1), todos portadores do gene *cry2* e dos isolados Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11, portadores do gene *cry9*. A escolha destes isolados para a comparação das proteínas diferencialmente expressas foi atrelada aos graus divergentes de patogenicidade observados *in vivo* contra *Diatraea saccharalis*, uma das mais importantes pragas da cultura da cana-de-açúcar. As proteínas totais solúveis dos isolados foram extraídas após 48 h de crescimento. Após verificação da integridade em SDS-PAGE, as proteínas foram focalizadas isoelectricamente, separadas por peso molecular e as imagens dos géis foram digitalizados em *scanner* de transparência. Posteriormente os géis foram analisados no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences) que possibilitou a detecção de 1.830 *spots*, dos quais 229 foram considerados proteínas diferencialmente expressas (DEPs). As DEPs foram excisadas dos géis e digeridas com tripsina para identificação via espectrometria de massas. Os espectros gerados foram analisados para identificação presumível das proteínas contra bancos de dados de acesso público através do programa Mascot. Entre as proteínas identificadas, algumas estão envolvidas em diferentes funções; como fator de alongação G com ação imunogênica, proteína ribossomal S2 que atua na mediação de toxicidade, shikimato quinase envolvida na produção de proteínas de toxicidade inespecífica em Bt, e a proteína A do estágio IV de esporulação, necessária na produção de esporos e cristais proteicos. Os resultados obtidos podem contribuir para o entendimento dos diferentes graus de patogenicidade entre isolados de Bt que apresentam genes *cry* de mesma classe.

**Palavras-chave:** Proteoma, fatores de virulência, toxicidade

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a cosmopolitan Gram-positive bacteria with rod-shaped known by the expression, normally in the sporulation phase, of protein crystals (proteins Cry or  $\delta$ -endotoxins) with entomopathogenic activity. These crystals are active against diverse insect orders, and their mechanism of action activated after digestion, including specific receptors in the mid-cut as well as other virulence factors expressed by Bt with synergic action to Cry proteins. Studies at proteomic level have been conducted to identify these virulence and/or regulation for better understanding of the mechanisms involved in Bt pathogenicity. Thus, this work aims to compare proteomic profiles using two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) of the strains Bt.Pri 4.7 and Bt.Pri 4.29 as well as the strains Bt.Pri 4.7 and *B. thuringiensis subsp. Kurstaki* (HD-1), all encoding cry 2 gene and the strains Bt.CDi 1.3 and Bt.CDi 1.11, which encodes cry 9 gene. The chosen of these strains for comparing proteins differential expression was associated with distinct level of pathogenicity observed in vivo against *Diatraea saccharalis*, one of the most important pests of the sugarcane culture. Total soluble proteins from the strains were extracted after 48h of growing. After integrity confirmation by SDS-PAGE, the proteins were focused isoelectric, separated by molecular weight and, then gel images were digitalized through a scanner of transparency. Lately, the gels were analyzed using the software ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences), which allowed the detection of 1.830 spots, while 229 were identified as proteins differentially express (DEPs). The DEPS were extracted from the gels and digested with trypsin for identification using mass spectrometry. The spectrums observed were analyzed for proteins identification against databases with open access using the program Mascot. Among the proteins identified, were annotated that associated with different functions such as elongation G with immunogenic action, ribosomal protein S2 that acts mediating the toxicity, shikimate kinase linked to production of inespecif toxicity in Bt, and protein A specific to stage IV of the sporulation. The results obtained can contribute for the understanding of the different levels of pathogenicity between the Bt strains that encoding genes cry from the same class.

**Key words:** Proteome, virulence factors, toxicity

## 1. Introdução

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva encontrada naturalmente no solo e também em outros substratos que apresenta forma de bastonete, flagelos e a capacidade de formar esporos (Konecka *et al.*, 2006; Muniady *et al.*, 2011; Konecka *et al.*, 2012). Este micro-organismo apresenta duas fases de desenvolvimento: a vegetativa e a estacionária. Na fase estacionária com a baixa disponibilidade de nutrientes ocorre a expressão dos genes *cry* cujos produtos são as proteínas também denominadas Cry, que se acumulam na célula mãe na forma de uma inclusão cristalífera (protoxinas) liberadas no meio ao final da esporulação (Lereclus *et al.* 2000; Pinto *et al.*, 2009/2010).

As toxinas e inclusões de proteínas produzidas pelo Bt possuem toxicidade específica para espécies de diversas ordens de insetos como Lepidóptera, Coleóptera, Díptera, Homoptera, Hymenoptera, Mallophaga; além de apresentar também atividade contra espécies de nematoides e outros invertebrados (De Maagd *et al.*, 2003; Kotze *et al.*, 2005; Grossi-De-Sá *et al.*, 2007; Bravo e Soberon, 2008).

A ação das proteínas Cry se dá após a ingestão da forma inativa da proteína e posterior solubilização no intestino da larva do inseto susceptível. Após ativação, as toxinas ligam-se a receptores locais de alta afinidade presentes na superfície das células epiteliais do intestino médio, gerando a formação de poros nas membranas e destruição das células com conseqüente paralisia do aparelho digestório e morte do inseto por inanição (Bravo e Saberón, 2008; Vallete-Gely, *et al.*, 2008; Knaak *et al.*, 2010). Por apresentar esta característica entomopatogênica o Bt se destaca como um dos principais agentes de controle biológico de insetos-praga de grandes culturas (Frankenhuyzen, 2009; Alfazairy *et*

*al.*, 2012) e a busca de novos sorotipos que portem genes codificadores de proteínas cristais é um esforço importante (Liu *et al.*, 2015).

Devido a sua importância, vários métodos de análises estão sendo empregados na identificação e caracterização das proteínas Cry. Estes métodos possibilitaram o conhecimento da composição, peso, sequências destas proteínas e permitiram a distribuição das mesmas em classes homólogas (Bravo, 1997; Samir *et al.*, 2006). Ainda em menor escala, mas não menos relevante, outros estudos têm analisado a expressão gênica diferencial entre isolados de Bt distintos, para identificar proteínas potencialmente envolvidas em aumentar ou diminuir a entomopatogenicidade e especificidade.

A proteômica, cuja proposta é definir o conjunto de proteínas expressas em qualquer amostra biológica em dado tempo e sob certas condições, através da abordagem diferencial com a utilização da eletroforese bidimensional (2D) e posterior espectrometria de massas, também passou a ser utilizada para fornecer uma visão ampla da presença de proteínas, abundância e de possíveis modificações pós-traducionais gerando, entre outros conhecimentos, a compreensão sobre a patogênese do Bt (Aebersold e Mann, 2003; Li *et al.*, 2012).

Os estudos proteômicos podem aprofundar a compreensão das funções e expressão de genes patogênicos de Bt por abordar de forma dinâmica as redes de interação entre as proteínas expressas (Rang *et al.*, 2015). Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo comparar os proteomas utilizando eletroforese bidimensional 2D de isolados de *B. thuringiensis* com níveis distintos de patogenicidade sobre *D. saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), e identificar por espectrometria de massas os peptídeos diferencialmente expressos.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Extração de Proteínas

Os isolados Bt.Pri 4.7, Bt.Pri 4.29 (ambos *cry2*), Bt.CDi 1.3, Bt.CDi 1.11 (ambos *cry9*) com médias de mortalidade respectivamente de 20,05; 3,5; 16,31 e 3,5%; pertencentes ao banco de *B. thuringiensis* do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) e a estirpe padrão *B. thuringiensis kurstaki* (HD-1), gentilmente cedida pela Embrapa Milho e Sorgo, foram utilizados para os estudos de proteômica diferencial.

Inicialmente os isolados foram crescidos em meio ágar nutriente (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo penicilina G na concentração de 100 mg/L e incubados a 30°C por 24 h para germinação. Após esse período, os isolados foram transferidos para erlenmeyer (300 mL), contendo 50 mL de meio T3 líquido (bacto-triptona 1,5 g; bacto-triptose 1 g; extrato de levedura 0,75 g; MnCl<sub>2</sub> 0,0025 g; e tampão fosfato 50 mM, pH 6,8; 0,5 L), incubados a 29°C, 200 rpm, por 24 h (Travers *et al.* 1987, Martin e Travers 1989).

Após as 24 h de crescimento, três novos erlenmeyers (300 mL) contendo 45 mL de meio T3 líquido receberam cada um 5 mL do pré-inóculo e foram agitados por 48 h a 29°C, 150 rpm. Após o período de agitação, a absorbância (600 nm) de cada réplica biológica foi determinada. Alíquotas de absorbância equivalente de cada réplica biológica foram distribuídas em tubos *falcons* de 15 mL. As proteínas totais foram extraídas segundo a metodologia descrita por Barbosa Neto *et al.* (2014) com adaptações.

O meio contendo a suspensão bacteriana foi centrifugado a 10.000 *xg* por 20 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspensão em 0,5 mL de água ultrapura autoclavada

e 0,5 mL de NaOH 0,6 M, e centrifugado a 10.000 *xg* (ou 10.000 rcf) por 5 min a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 0,4 mL de tampão de amostra SDS [Tris-HCl pH 6,8 (600 mM), 4% β-mercaptoetanol, 4% SDS, 0,1% azul de Bromofenol, 5% glicerol e água ultrapura q.s.], a amostra foi aquecida por 3 min a 100°C e centrifugado por 9.000 *xg* por 15 min a 4°C.

O sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 mL novo e reservado a -20°C. Ao *pellet* foram adicionadas *glassbeads* e 0,4 mL de Tampão de Amostra SDS e vortexado por 3 min com posterior centrifugação a 10.000 *xg*, 4°C por 15 min. O sobrenadante desta fase foi misturado ao estocado a -20°C aos quais foi adicionado Acetato de Amônio 0,1 M e deixados *overnight* para precipitação das proteínas. Após essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 7.197 *xg* por 40 min a 4°C e o *pellet* ressuspense em 1 mL de acetona a 80% com posterior centrifugação a 7.197 *xg* por 40 min a 4°C. O *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 20 min a 14.000 rpm a 4°C. Após secagem as amostras foram ressuspensas em 100 ul de tampão uréia-tiureia (8:2).

As proteínas totais foram quantificadas conforme método descrito por Bradford (1976). As leituras foram realizadas em triplicata por meio de espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) a 595 nm. A verificação da integridade dos extratos de proteínas das amostras foi feita mediante visualização em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5%. Após verificação da integridade as amostras foram estocadas em freezer a -80°C até sua utilização.

## **2.2 Eletroforese bidimensional**

### **2.2.1 Focalização isoelétrica (IEF)**

A IEF foi realizada em fita IPG de 11 cm e pH 3-10 linear (GE Life Sciences) para 180 µg de proteínas totais das amostras dissolvidas em solução de ureia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 1,5% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfocinas 0,5% (v/v) (IPG buffer, pH 3-10 linear; GE Life Sciences) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). As fitas foram hidratadas em IPG-Box (GE Life Sciences) por 18 h em temperatura ambiente. Após o período de hidratação as fitas foram focalizadas no sistema Multiphor II (GE Life Sciences) em quatro etapas nas seguintes condições: i) 500 V, 1 h; ii) 800 V, 1 h; iii) 7.000 V; 1 h (gradiente); e iv) 2.200 V (constante). Após serem focalizadas, as fitas foram armazenadas a -80°C até que realização da segunda dimensão.

### **2.2.2 Eletroforese (2D-PAGE)**

Para a realização da segunda dimensão (eletroforese), as fitas anteriormente focalizadas passaram por uma etapa de redução e de alquilação. Para a redução as fitas foram imersas em tampão de equilíbrio contendo 2% DTT (ditiotreitól) e traços de corante bromofenol por 20 min. Posteriormente as fitas foram imersas em nova solução de equilíbrio contendo 4% de IAA (iodoacetamida) e traços do corante bromofenol por mais 20 min.

A segunda dimensão foi realizada no sistema Omnipor MV 20 (Biosystems) em SDS-PAGE a 12,5%, utilizando uma fita de IEF por gel. A eletroforese foi realizada com as seguintes etapas: 40 mA por 15 min, 80 mA por 30 min, 100 mA por 2,5 h; voltagem fixa de 300 V. Os géis foram realizados em

triplicata para cada tratamento analisado. Após eletroforese, os géis permaneceram por 30 min em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%), posteriormente foram imersos em solução de coloração [metanol 20%, ácido acético 5% e água deionizada, solução de azul de Coomassie (Phastgel Blue R, GE Life Sciences) 50%] durante 18 h. Em seguida, os géis foram imersos em solução descorante (etanol 20%, ácido acético 5%) por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 h. Após o processo de descoloração, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético 5%).

### **2.2.3 Digitalização e análise de imagens**

Os géis foram digitalizados com auxílio de *scanner* de transparência ImageScanner III (GE Life Sciences) calibrado para densidade ótica, utilizando-se o programa LabScan 6.0 (GE Life Sciences) com os seguintes parâmetros: modo de transparência, resolução de 150 dpi e filtro vermelho, ideal para coloração de géis com azul de Coomassie. Anteriormente a captura da imagem, foi realizada uma etapa de calibração do scanner utilizando a fita de calibração Kodak 3, com valores de densidade ótica ou difusa definidos, conforme procedimentos recomendados pelo fabricante. Após digitalização as imagens dos géis foram analisadas no software de análise ImageMaster 2D Platinum v.7.05 (GE Life Sciences).

Todas as triplicatas (réplicas técnicas) de géis de cada tratamento foram submetidas aos mesmos parâmetros de análise comparativa para detecção e seleção de *spots* (manchas coradas delimitadas e representativas de proteínas), conforme descrito por Pacheco *et al.* (2013), com inspeção visual para eliminação

de possíveis interferentes como bolhas e artefatos da coloração. Nas comparações das triplicatas entre os tratamentos, foram selecionados como *spots* diferenciais aqueles que apresentaram razão de variação no parâmetro normalizado porcentagem de volume (%vol)  $\geq 1,5$  e ANOVA  $\leq 0,05$ . Estes *spots* selecionados foram denominados DEPs (proteínas diferencialmente expressas).

#### 2.2.4 Digestão com tripsina

Os *spots* que apresentaram variação significativa entre tratamentos (proteínas com acúmulo diferencial estatisticamente significativo) foram excisados manualmente de uma das réplicas técnicas (géis) com auxílio de bisturi e incubados em solução descolorante contendo metanol 50% e ácido acético 2,5% durante 18 h, em temperatura ambiente para remoção do corante.

Após desidratação em acetonitrila 100%, as proteínas (*spots*) sofreram redução e em seguida alquilação. Inicialmente, os fragmentos de gel foram reidratados com 10 mM DTT em 50 mM de bicarbonato de amônio e incubados por 30 min a 60°C. O excesso do líquido foi removido e substituído por 30  $\mu$ L de solução 10 mM IAA em 50 mM de bicarbonato de amônio. Posteriormente, os fragmentos foram mantidos no escuro por 30 min, à temperatura ambiente.

O líquido excedente foi então removido, os fragmentos lavados com 100 mM de bicarbonato de amônio e novamente desidratados com acetonitrila 100%. Subsequentemente a essas etapas foram adicionados 30-50  $\mu$ L (até cobrir o fragmento de gel) de solução com 20 ng/ $\mu$ L de tripsina para digestão da proteína com as amostras incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram

acrescentados à solução anterior 30-50  $\mu\text{L}$  (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5% de ácido trifluoroacético (TFA) em 50% de acetonitrila], incubada por 1 h em gelo e centrifugada até 10.000xg para coleta e transferência do sobrenadante novo tubo. A extração das proteínas foi realizada duas vezes.

O sobrenadante de cada *spot* foi concentrado em concentrador à vácuo (*Speed-vac*, Eppendorf) e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises por espectrometria de massas.

### 2.2.5 Espectrometria de massas

Os espectros MS e MS/MS foram obtidos em espectrômetro Autoflex III MALDI-ToF/ToF (Bruker Daltonics) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, Recife-PE, usando matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma/C8982) e conforme os protocolos de análise padronizados de: tipagem por massa de peptídeos (PMF - *peptide mass fingerprinting*; método refletido positivo RP\_Proteomics\_HPC) e busca de íons (*ion search*, método LIFT). Os íons foram acelerados a 19 KV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

## 2.3 Análises de Bioinformática

### 2.3.1 Identificação presumível

Para a análise por PMF, os espectros obtidos tiveram seus arquivos *peaklist.xml* analisados no *software* Mascot (Matrix Inc.) utilizando o método de PMF contra os bancos de dados: *Bacillus thuringiensis*, gentilmente disponibilizado pelo Laboratório de Espectrometria de Massas Dalton

(<http://daltonlab.iqm.unicamp.br>), do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP; Bactéria (Eubactéria) e Firmicutes (Bactérias Gram-positivas) que encontram-se disponíveis na versão *online* do Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Os parâmetros admitidos para as comparações foram estabelecidos seguinte forma: banco *Bacillus thuringiensis* – 1) base de dados: bthuringiensis; 2) taxonomia: todas as entradas; 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância 1.2 Da. Bancos de Bactéria (Eubactéria) ou Firmicutes – 1) base de dados: Swissprot; 2) taxonomia: Bactéria (Eubactéria) ou Firmicutes (Bactérias Gram-positivas); 3) modificação fixa: carbamidometil (C); 4) modificação variável: oxidação (M); e 5) tolerância de 200 ou 150 ppm.

Para as amostras não identificadas via PMF e reanalisadas por MS/MS os espectros foram identificados por meio da análise dos arquivos *peaklist.xml* utilizando os método de busca de íons (*ion search*) frente aos mesmos bancos de dados anteriormente mencionados e com os mesmos parâmetros, diferenciando apenas: tolerância MS/MS 0,6 Da e valor respectivos de massa/carga (m/z) de cada íon precursor.

As identificações foram consideradas significativas quando o *score* era superior ao valor limite (*cut-off*) que equivale a  $-10.\log(P)$ , com o P sendo considerado como a probabilidade da similaridade encontrada ao acaso e admitindo-se que os valores que estejam acima do *score* do valor limite apresentam significância estatística ( $p < 0,05$ ). As proteínas expressas pelos isolados possibilitaram na anotação dos DEPs associados aos acessos do banco de dados do UniProt (<http://www.uniprot.org>) e os respectivos descritores (Tabela 3).

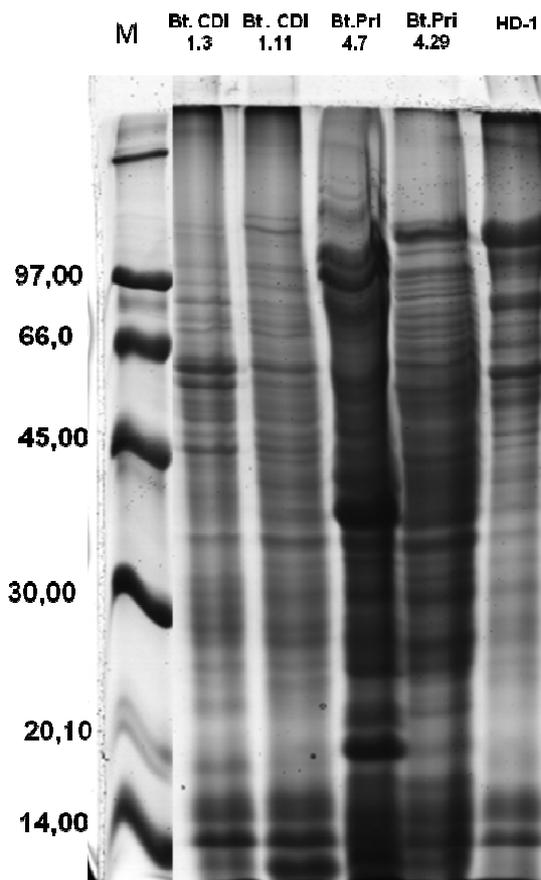
### 2.3.2 Ontologia gênica (GO)

Para as análises de Ontologia Gênica utilizando a ferramenta Blast2GO versão 3.1 (disponível em: <https://www.blast2go.com/>), as sequências das proteínas foram recuperadas através da ferramenta *Retrieve ID* do UniProt no formato FASTA. Foi realizado o Blast das sequências usando o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology and Information*), com os seguintes parâmetros: programa: blastp; base de dados: nr; *cut-off* (*e-value*):  $10^{-5}$ . Em seguida, as sequências foram analisadas nos programas InterProScan (Quevillon *et al.*, 2005) para buscar assinaturas proteicas similares, e *Mapping*, onde foram mapeados os termos de ontologia gênica (GO). Posteriormente as proteínas foram anotadas considerando as configurações: filtro para *e-Value-hit*:  $10^{-5}$ ; *cut-off* de anotação: 55; ponderação (*weight*) para GO: 5; e filtro de GO por taxonomia: Firmicutes. Após anotação, foi realizada a análise estatística relacionada com os resultados de anotação para busca do código identificador da enzima (EC). A distribuição dos termos GO foi analisada no nível 3 para processo biológico, função molecular e componente celular.

## 3. Resultados

### 3.1 Extração de proteínas

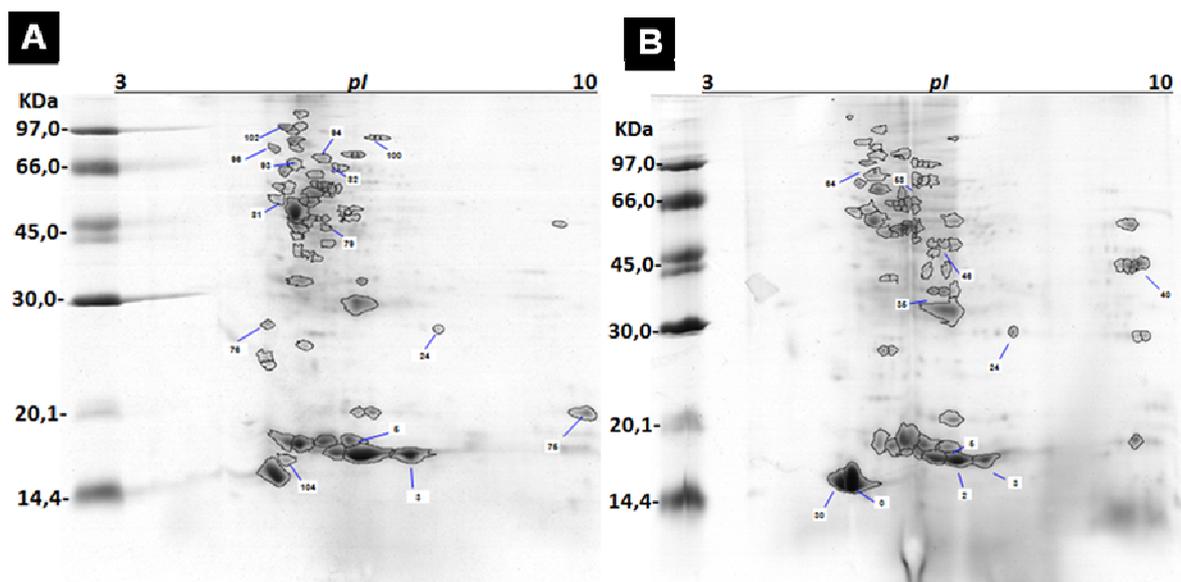
O protocolo descrito por Barbosa Neto *et al.* (2014) e modificado para as extrações de proteínas totais de Bt possibilitou a recuperação e solubilização de proteínas com diferentes massas moleculares que apresentaram integridade e baixa concentração de interferentes, permitindo assim a utilização nas análises proteômicas posteriores (Figura 1).



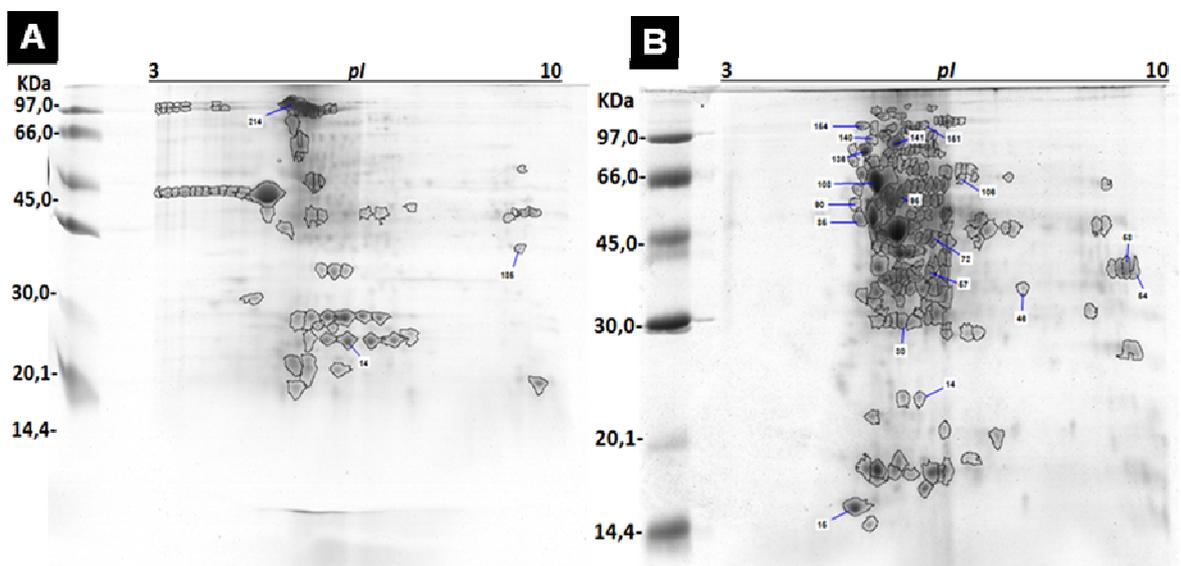
**Figura 1.** SDS-PAGE (Poliacrilamida 12,5%) mostrando os perfis de proteínas solúveis totais de isolados de *B. thuringiensis*. Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11 isolados portadores do gene *cry9* e Bt.Pri 4.7, Bt.Pri 4.29 e HD-1 (estirpe padrão), portadores do gene *cry2*. Marcador de baixo peso molecular (M), em KDa.

### 3.2 Eletroforese bidimensional (2D)

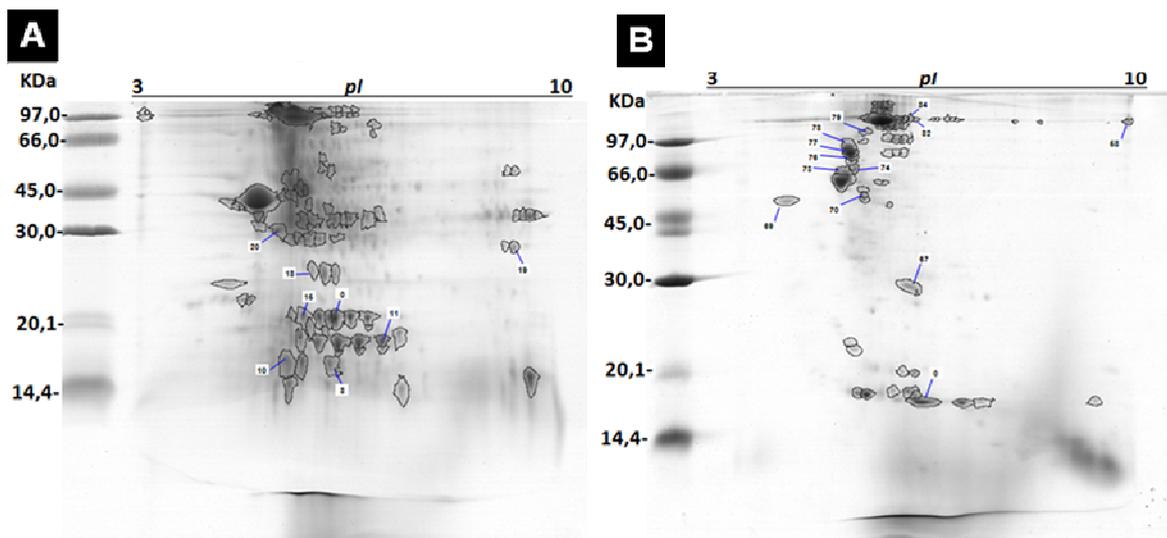
Três géis 2D-PAGE (réplicas técnicas) foram obtidos das réplicas biológicas reunidas de cada isolado de *B. thuringiensis* analisado, produzindo um total de 15 géis. Exemplos destes géis com os *spots* delimitados são mostrados nas Figuras 2-4.



**Figura 2:** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais dos isolados de *B. thuringiensis*. **A:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.CDi 1.3; **B:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.CDi 1.11.



**Figura 3:** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais dos isolados de *B. thuringiensis*. **A:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.Pri 4.29.



**Figura 4:** Imagens de géis 2D-PAGE com localização de *spots* utilizando extrato de proteínas totais dos isolados de *B. thuringiensis*. **A:** Extrato proteico obtido do isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Extrato proteico obtido da estirpe HD-1.

### 3.3 Digitalização e análise de imagens

Após as análises, foi constatado que as réplicas dos géis do mesmo isolado apresentaram similaridade significativa, com média de coeficiente de correlação obtida de 0,948 entre as réplicas do isolado Bt.CDi 1.3; 0,960 no isolado Bt.CDi 1.11, 0,8504 em Bt.Pri 4.7, 0,9384 em Bt.Pri 4.29, e no isolado HD-1 a correlação foi de 0,9468. Esta correlação entre réplicas permitiu as análises subsequentes dos *spots*.

A eletroforese 2D permitiu a detecção total de 1.830 *spots* nas amostras de réplicas técnicas das três comparações realizadas.

#### 3.3.1 Comparação entre isolados de Bt mais e menos patogênicos portadores do gene *cry9*

Na comparação entre os isolados Bt.CDi 1.3 (mais patogênico) e Bt.CDi 1.11 (menos patogênico) foram obtidos 477 *spots* com os géis de Bt.CDi 1.3

apresentando a média de aproximadamente 84 *spots*/gel (variação entre 69 a 109) e os géis do isolado Bt.CDi 1.11 com média de 75 *spots*/gel (variação entre 55 a 92).

Após as análises dos géis digitalizados (Figura 5), foram detectados nesta comparação um total de 115 *spots* distintos e, deste total, 90 foram exclusivos sendo 41 *spots* exclusivos de Bt.CDi 1.3, 49 exclusivos de Bt.CDi 1.11 e 25 comuns a ambos os isolados (Tabela 1). Dos 115 *spots* distintos, 44 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) e dez destes, razão de variação (*ratio*)  $\geq 1,5$ . Destes 44 *spots* submetidos à identificação por MS, 24 são pertencentes ao isolado Bt.CDi 1.3, 11 ao isolado Bt.CDi 1.11 e 9 são comuns a ambos.

### **3.3.2 Comparação entre isolados de Bt mais e menos patogênico portadores do gene *cry2***

A comparação entre os isolados Bt.Pri 4.7 (mais patogênico) e Bt.Pri 4.29 (menos patogênico), foi a responsável pela geração do maior número de *spots* com um total de 895. Destes, o isolado Bt.Pri 4.7 apresentou uma média de aproximadamente 94 *spots*/gel (variação entre 78 a 115) e o isolado Bt.Pri 4.29 apresentando média de 204 *spots*/gel (variação entre 183 a 226).

A análises dos géis digitalizados (Figura 6), detectou 219 *spots* distintos e deste total 204 *spots* foram exclusivos sendo 43 de Bt.Pri 4.7, 161 de Bt.Pri 4.29 e 15 *spots* foram comuns a ambos os isolados (Tabela 1). Dos 219 *spots* distintos 147 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) e 15 destes, razão de variação (*ratio*)  $\geq 1,5$ . Destes 147 *spots* submetidos à identificação por

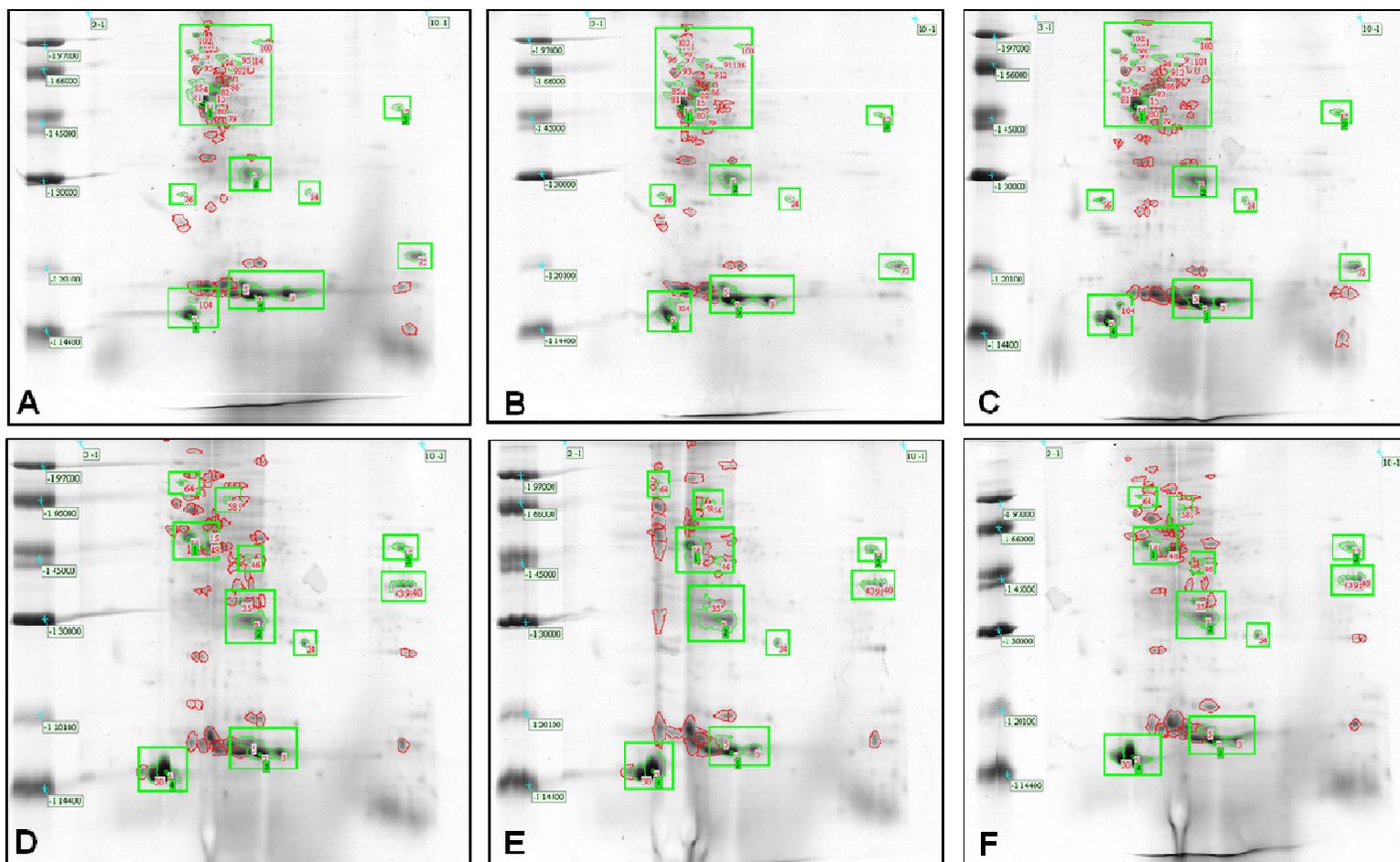
MS, 16 foram pertencentes ao isolado Bt.Pri 4.7, 128 ao Pri 4.29 e dois foram comuns.

### **3.3.3 Comparação entre o isolado de Bt Bt.Pri 4.7 e estirpe padrão de alta virulência HD-1, portadores do gene *cry2*.**

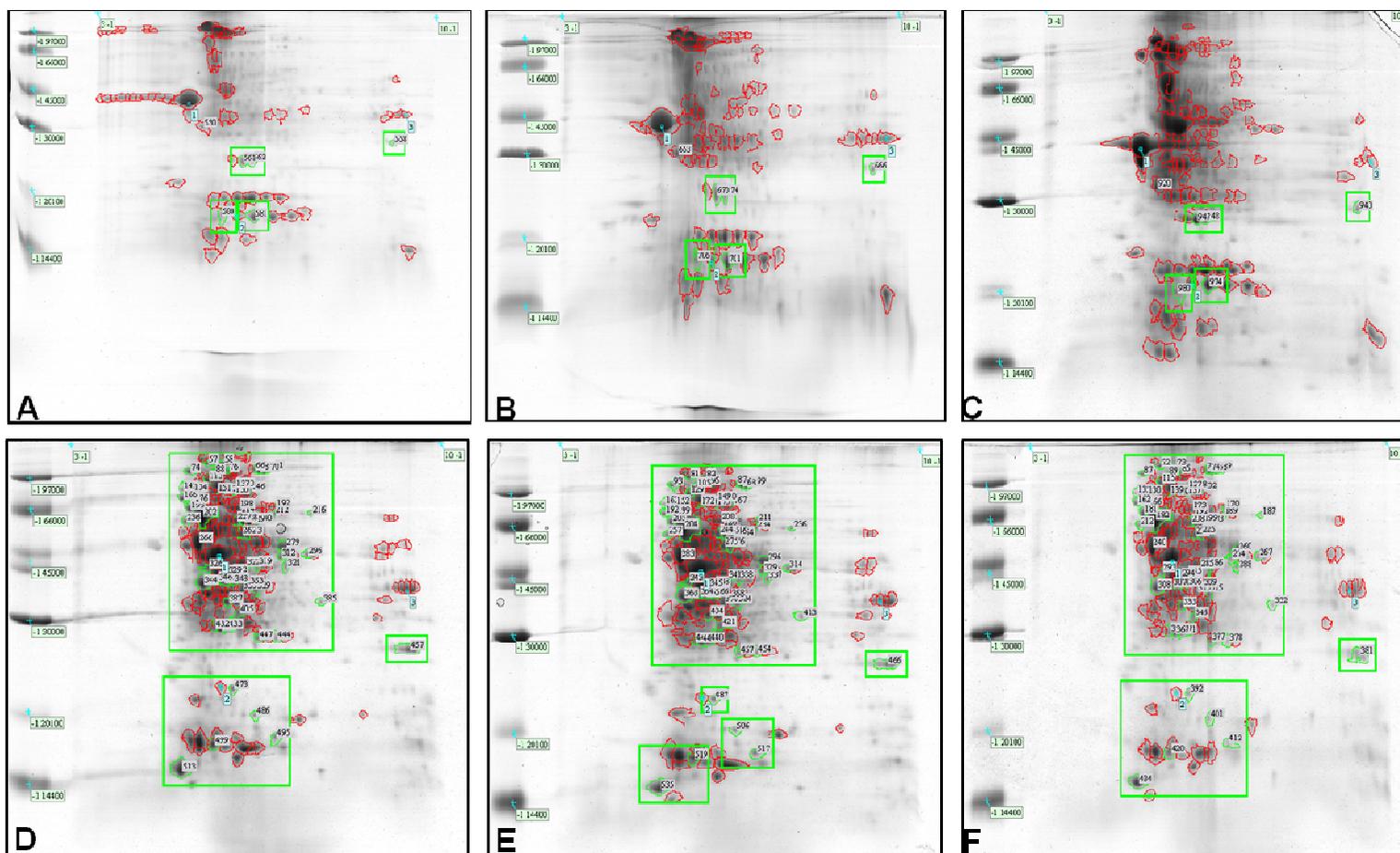
Na comparação entre o isolado Bt.Pri 4.7 (mais patogênico entre os isolados) e a estirpe padrão HD-1, foram obtidos 458 *spots* com as médias de aproximadamente 90 (variação 88 a 93) e 62 (variação de 44 a 67) *spots/gel*, respectivamente.

Nesta comparação 96 *spots* foram detectados e considerados distintos (Figura 7), e deste total, 88 foram exclusivos sendo 50 *spots* de Bt.Pri 4.7, 38 da estirpe HD-1 e 8 comuns a ambos os isolados (Tabela 1). Dos 95 *spots* distintos, apenas 38 apresentaram variação significativa na %vol (ANOVA  $\leq 0,05$ ) com 15 destes possuindo razão de variação (*ratio*)  $\geq 1,5$ . Destes 38 *spots* submetidos à identificação por MS, 14 *spots* foram exclusivos de Bt.Pri 4.7, 23 da estirpe HD-1 e apenas um *spot* comum a ambos.

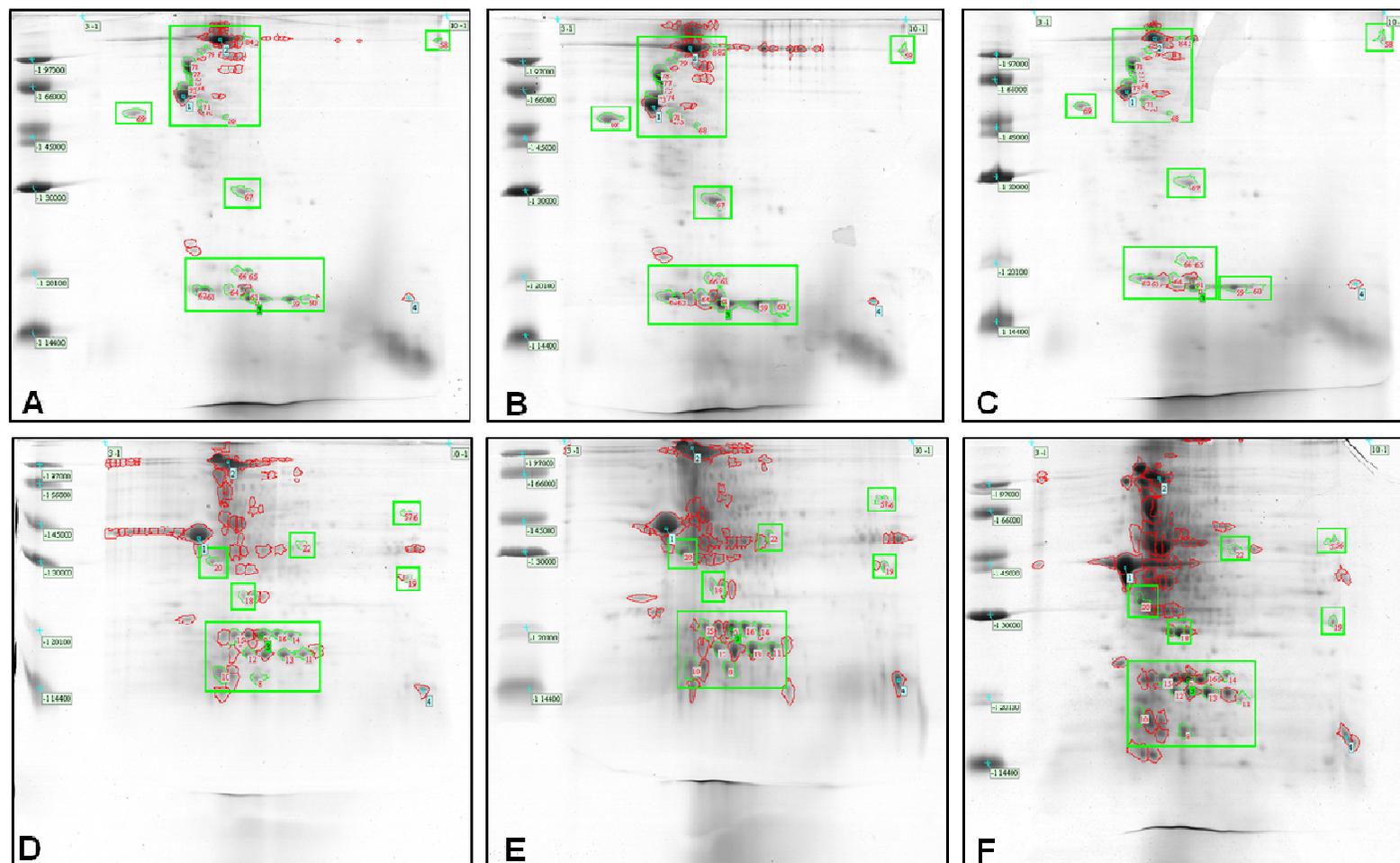
Dentro das três comparações acima descritas, um total 229 *spots* foram considerados DEPs e foram excisados dos géis para identificação via MS.



**Figura 5:** Imagens digitalizadas do 2D-PAGE e com a determinação dos *spots* em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. **A, B e C:** 2D-PAGE do isolado Bt.CDi 1.3; **D, E e F:** 2D-PAGE do isolado Bt.CDi 1.11.



**Figura 6:** Imagens digitalizadas do 2D-PAGE e com a determinação dos *spots* em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. **A, B e C:** 2D-PAGE do isolado Bt.Pri 4.7; **D, E e F:** 2D-PAGE do isolado Bt.Pri 4.29.



**Figura 7:** Imagens digitalizadas do 2D-PAGE e com a determinação dos *spots* em análise no programa ImageMaster Platinum 7.05. **A, B e C:** 2D-PAGE da estirpe HD-1; **D, E e F:** 2D-PAGE do isolado Bt.Pri 4.7.

**Tabela 1:** Total de *spots* coletados com Anova significativa e com razão de variação de %vol  $\geq 1,5$  para os *spots* comuns, nas comparações entre os isolados que possuem o gene *cry2* Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29; Bt.Pri 4.7 x HD-1 e entre os portadores de *cry9* Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11.

	Comparações					
	Gene <i>cry2</i>				Gene <i>cry9</i>	
	Bt.Pri 4.7	Bt.Pri 4.29	Bt.Pri 4.7	HD-1	Bt.CDi 1.3	Bt.CDi 1.11
<i>Spots</i> coletados para MS	147		38		44	
Média por réplica de gel	94	204	90	62	84	75
<i>Spots</i> comuns <sup>1</sup>	3		1		9	
Maior volume dos <i>spots</i> comuns	3	-	-	1	5	4
ANOVA $\leq 0,05$	3	-	-	1	5	4
<i>ratio</i> $\geq 1,5$ <sup>2</sup>	2	-	-	1	4	4
<i>spots</i> exclusivos <sup>3</sup>	16	128	14	2 3	24	11
ANOVA $\leq 0,05$	16	128	14	2 3	24	11
DEPs <sup>4</sup>	18	128	14	2 4	128	15

<sup>1</sup> *Spots* observados em ambos

<sup>2</sup> Razão de variação de %vol  $\geq 1$ .

<sup>3</sup> Não detectados no outro isolado por 2D-PAGE.

<sup>4</sup> Proteínas diferencialmente expressas (*spots* comuns com ANOVA significativa e Ratio  $> 1,5$  + exclusivos com ANOVA significativa).

### 3.4 Espectrometria de massas (PMF e MS/MS)

A espectrometria de massas dos DEPs selecionados após análise comparativa em 2D-PAGE possibilitou a obtenção de espectros nas comparações Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29 (isolado Cry2 mais virulento x isolado Cry2 menos virulento), Bt.Pri 4.7 x HD-1 (isolado Cry2 mais virulento x isolado Cry2 padrão de alta virulência) e Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11 (isolado Cry9 mais virulento x isolado Cry9 menos virulento) descritos detalhadamente na Tabela 2. As análises por PMF ou

pela busca de íons resultaram na obtenção de espectros de massa com qualidade suficiente para a identificação de 63 proteínas pela utilização do programa Mascot. Das comparações entre Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.29; e entre Bt.Pri 4.7 e a estirpe HD-1, todos portadores do gene *cry2*, foi possível a identificação de 26 e 21 proteínas, respectivamente. Da comparação entre os isolados Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11, ambos portadores do gene *cry9*, 16 proteínas foram identificadas. Os DEPs que não foram passíveis de identificação por PMF ou busca de íons estão sendo analisados via sequenciamento *de novo*.

**Tabela 2:** Eficiência das análises em espectrometria de massas para os DEPs selecionados para identificação.

	Comparações					
	Gene <i>cry2</i>				Gene <i>cry9</i>	
	Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29		Bt.Pri 4.7 x HD-1		Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11	
	Total	%	Total	%	Total	%
Deps coletados	147	100	38	100	44	100
Analísados PMF	147	100	38	100	44	100
Analísáveis	139	94,55	38	100	44	100
Identificados <sup>1</sup>	25	17,98	20	52,63	15	34,09
Não identificados <sup>2</sup>	114	82,01	18	47,36	29	65,90
Analísados por MS/MS	114	82,01	18	47,36	29	65,90
Analísáveis	114	82,01	18	47,36	29	65,90
Identificados <sup>1</sup>	1	0,72	1	2,63	1	2,27
Não identificados <sup>2</sup>	113	81,29	17	44,72	28	63,65
Anotados	26	17,68	21	55,26	16	36,36
Não identificados	113	81,29	17	44,72	28	63,65

<sup>1</sup>Com *score* Mascot significativo ( $p < 0,05$ )

<sup>2</sup>Sem *score* Mascot significativo ( $p > 0,05$ )

### 3.5 Análises de Bioinformática

#### 3.5.1 Identificação presumível e anotação das DEPs

A Tabela 3 foi obtida através das análises dos espectros de PMF e MS/MS no programa Mascot, considerando as similaridades significativas, ou seja, com *score* de identificação acima do *cut-off* ( $p \leq 0,05$ ) com proteínas do organismo de origem ou táxon mais próximo. Entre os bancos de dados utilizados para a identificação das proteínas, o de Firmicutes (bactérias Gram-positivas) contribuiu para a identificação de 50,80% dos DEPs. Os bancos de Bacteria e *Bacillus thuringiensis* contribuíram com 34,92 e 14,28% da identificação, respectivamente. Entre as comparações, a que apresentou a maior porcentagem de identificação dos DEPs foi entre os isolados com o gene *cry2* Bt.Pri 4.7 x HD-1 com 55,26%, seguida pela comparação dos isolados com *cry9* Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11 com 36,36%. Na comparação entre os isolados também *cry2* Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29, foram identificados 17,68% dos DEPs.

Os detalhes da identificação das proteínas diferenciais obtidas nas comparações realizadas estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

**Tabela 3:** Classificação da identificação obtida para as DEPs selecionadas, conforme táxon de maior similaridade pela análise no programa Mascot.

Bancos de dados utilizados	Comparações					
	Gene <i>cry2</i>				Gene <i>cry9</i>	
	Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29		Bt.Pri 4.7 x HD-1		Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11	
	DEPs		DEPs		DEPs	
	Total	%	Total	%	Total	%
DEPs <sup>1</sup>	147	100	38	100	44	100
Com identificação	26	17,68	21	55,26	16	36,36
<i>Bacillus thuringiensis</i>	4	2,04	3	7,89	2	4,54
Bactéria	15	10,20	0	0,00	7	15,90
Firmicutes (Bactérias Gram-positivas)	7	4,76	18	47,36	7	15,90
Sem identificação	122	83	17	44,74	28	63,64

<sup>1</sup>Proteínas diferencialmente expressas

**Tabela 4:** Anotação presumível das DEPs de isolados de *Bacillus thuringiensis*, de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa Mascot. O *Ratio* significa a razão de variação entre as %vol dos *spots* comuns na comparação entre os isolados Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.29. ANOVA refere-se ao valor  $p$  calculado para significância estatística da diferença na %vol entre os *spots* da comparação, sendo considerada significativa se  $p \leq 0,05$ . Estão apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE para cada *spot*.

Spot ID	Ratio Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29	ANOVA	Acesso	Nome das proteínas	Score	Organismo	pI		MM (Da)	
							Cal	Obs	Cal	Obs
<b>Pri 4.7</b>										
14**	4.361	0,000827	A0R8U9	Holo-acil-transportador de proteína sintase	48	<i>Bacillus thuringiensis</i> (strain Al Hakam)	6,85	6,20	13.092	20.653
185	Exclusivo	0,000575	A5EPK7	Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase	51	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (strain BTAi1 / ATCC BAA-1182)	9,52	9,31	39.674	27.770
214	Exclusivo	0,002023	Q0C0Z8	ATP sintase subunidade $\alpha$	71	<i>Hyphomonas neptunium</i> (strain ATCC 15444)	6,24	5,28	55.553	111.380
<b>Pri 4.29</b>										
15	Exclusivo	0,0000106	Q0SW76	Proteína UvrABC do sistema B	61	<i>Clostridium perfringens</i> (strain SM101 / Type A)	5,09	5,04	75.663	15.413
30	Exclusivo	0,0000840	Q633N8	Ribonuclease HIII	46	<i>Bacillus cereus</i> (strain ZK / E33L)	9,68	5,95	34.290	29.402
46	Exclusivo	0,000298	B4ECN1	Proteína ribossômica 30S S2		<i>Burkholderia cenocepacia</i> (strain ATCC BAA-245 / DSM 16553 / LMG 16656 / NCTC 13227 /	7,03	7,74	27.098	34.737
54	Exclusivo	0,0318508	B0CLD7	Subunidade I da NADH-quinona oxidoreductase	68	<i>Brucella suis</i> (strain ATCC 23445 / NCTC 10510)	6,73	9,49	18.950	38.239

Continuação

57	Exclusivo	0,0012891	A0RLH0	Peroxidase heme-dependente BALH_4887	48	<i>B. thuringiensis</i> (strain Al Hakam)	4,99	6,23	28.747	37.995
58	Exclusivo	0,0070209	Q39E45	Transaldolase	71	<i>Burkholderia lata</i> (strain ATCC 17760 / LMG 22485 / NCIMB 9086 / R18194 / 383)	5,26	9,39	35.214	38.020
72	Exclusivo	0,00000109	B1YRQ5	Subunidade $\alpha$ da RNA polimerase dependente de DNA	105	<i>Burkholderia ambifaria</i> (strain MC40-6)	5,76	6,30	35.798	44.774
85	Exclusivo	0,00185708	A9AGW2	Enolase	150	<i>Burkholderia multivorans</i>	4,76	5,16	45.932	51.336
90	Exclusivo	0,0019154	C3P0A3	Enolase	86	<i>B. thuringiensis</i> (strain Al Hakam)	4,66	5,10	46.446	57.276
95*	Exclusivo	0,00502443	A0RL97	ATP sintase subunidade $\alpha$	52	<i>B. thuringiensis</i> (strain Al Hakam)	5,30	5,80	54.667	58.603
106	Exclusivo	0,00000512	Q1JUP4	$\alpha$ -cetoglutarato-semialdeído desidrogenase	87	<i>Azospirillum brasilense</i>	6,29	6,82	50.914	65.934
108	Exclusivo	0,0000532	Q39J12	Chaperonina 2 60 kDa	161	<i>B. lata</i> (strain ATCC 17760 / LMG 22485 / NCIMB 9086 / R18194 / 383)	5,09	5,45	57.086	64.305
120	Exclusivo	0,0417203	B4S8Z9	Shikimate quinase	68	<i>Prosthecochloris aestuarii</i> (strain DSM 271 / SK 413)	9,32	6,00	22.581	75.341
122	Exclusivo	0,0178316	A9AFC7	Aspartato-tRNA(Asp/Asn) ligase	101	<i>Burkholderia multivorans</i> (strain ATCC 17616 / 249)	5,67	5,79	68.086	76.952
136	Exclusivo	0,000959	Q39JC8	Chaperona DnaK	192	<i>B. lata</i> (strain ATCC 17760 / LMG 22485 / NCIMB 9086 / R18194 / 383)	4,91	5,28	69.886	84.144

Continuação

140	Exclusivo	0,00207767	Q6HPR1	Fator de alongamento G	145	<i>B. thuringiensis</i> subsp. konkukian (strain 97-27)	4,91	5,35	76.515	93.640
141	Exclusivo	0,00165229	Q1BRU5	Fator de alongamento G2	176	<i>B. cenocepacia</i>	5,35	5,76	77.798	91.569
150	Exclusivo	0,0161272	A0RC09	Proteína de ciclo celular GpsB	46	<i>B. thuringiensis</i> (strain AI Hakam)	6,62	6,03	13.111	10.394
152	Exclusivo	0,0105652	A0RHF1	Proteína RecA	50	<i>B. thuringiensis</i> (strain AI Hakam)	5,24	6,09	37.273	104.059
154	Exclusivo	0,00000272	B6EPU4	Proteína ribossomal 50S L15	70	<i>Aliivibrio salmonicida</i> (strain LFI1238)	11,13	5,22	14.898	106.447
179	Exclusivo	0,0151472	A0R8H8	Fator de alongamento Tu	143	<i>B. thuringiensis</i> (strain AI Hakam)	4,93	5,05	43.026	40.032

---

\*Identificado via MS/MS; \*\* Spot comum, porém com maior razão de variação entre as % vol

**Tabela 5:** Anotação presumível das DEPs de isolados de *Bacillus thuringiensis*, de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa Mascot. O *Ratio* significa a razão de variação entre as %vol dos *spots* comuns na comparação entre os isolados Bt.Pri 4.7 e a estirpe HD-1. ANOVA refere-se ao valor  $p$  calculado para significância estatística da diferença na %vol entre os *spots* da comparação, sendo considerada significativa se  $p \leq 0,05$ . Estão apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE para cada *spot*.

Spot ID	Ratio Bt.Pri 4.7 x HD-1	ANOVA	Acesso	Nome das proteínas	Score	Organismo	pI		MM (Da)	
							Cal	Obs	Cal	Obs
<b>Pri 4.7</b>										
8	Exclusivo	2,71E-04	Q8RCA4	Ornitina carbamoiltransferase	69	<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> subsp. <i>tengcongensis</i> (strain DSM 15242 / JCM 11007 / NBRC 100824 / MB4)	5,58	6,18	35.126	16.005
10	Exclusivo	0,0149323	P32815	Proteína desconhecida da região gldA 3'	61	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	6,36	5,38	24.651	16.740
11	Exclusivo	0,0110868	Q03QN5	Fator de alongamento Tu	64	<i>Lactobacillus brevis</i> (strain ATCC 367 / JCM 1170)	4,73	7,19	43.612	18.392
15	Exclusivo	0,0151636	B3WE52	GTPase Obg	71	<i>Lactobacillus casei</i> (strain BL23)	5,22	5,73	46.240	20.542
18	Exclusivo	0,0330196	Q5KW56	Provável sulfotransferase tRNA	65	<i>Geobacillus kaustophilus</i> (strain HTA426)	8,98	5,96	45.814	25.587
19*	Exclusivo	5,75E-04	A5EPK7	Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase	51	<i>Bradyrhizobium</i> sp. (strain BTAi1 / ATCC BAA-1182)	9,52	9,29	39.674	27.818
20	Exclusivo	5,88E-04	B9MQ23	Octanoil transferase	64	<i>Caldicellulosiruptor bescii</i> (strain ATCC BAA-1888 /	8,62	5,28	26.267	30.817

Continuação

**HD-1**

DSM 6725 / Z-1320)

0 **	2.850	0,0020233	Q0C0Z8	ATP sintase subunidade $\alpha$	71	<i>Hyphomonas neptunium</i> (strain ATCC 15444)	6,24	6,28	55.553	18.833
58	Exclusivo	0,0028677	P0A367	Proteína de cristal pesticida Cry1Aa	136	<i>B. thuringiensis</i> subsp. aizawai	5,00	9,91	134.057	119.811
67	Exclusivo	4,46E-06	Q034T0	Proteína ribossomal 50S L31B	61	<i>L. casei</i> (strain ATCC 334)	9,36	6,12	9.542	28.937
69	Exclusivo	1,57E-04	P21733	Proteína desconhecida de 29.1 kDa da região cryB1 5'	46	<i>B. thuringiensis</i> subsp. kurstaki	3,72	4,00	29.947	52.617
70	Exclusivo	0,0127564	A0R8H8	Fator de alongamento Tu	52	<i>B. thuringiensis</i> (strain Al Hakam)	4,93	5,31	43.026	53.984
73	Exclusivo	1,32E-06	P0A367	Proteína de cristal pesticida Cry1Aa	89	<i>B. thuringiensis</i> subsp. aizawai	5,00	4,97	134.057	64.193
74	Exclusivo	0,00159688	A0R8W4	Chaperonina 60 kDa	56	<i>B. thuringiensis</i> (strain Al Hakam)	4,79	5,14	57.368	65.641
76	Exclusivo	1,27E-04	P0A372	Proteína de cristal pesticida Cry1Ab	76	<i>B. thuringiensis</i> subsp. aizawai	5,04	5,08	131.284	75.226
77	Exclusivo	3,05E-04	P05068	Proteína de cristal pesticida Cry1Ac	153	<i>B. thuringiensis</i> subsp. kurstaki	5,03	5,07	134.160	79.429
78	Exclusivo	1,44E-05	P0A367	Proteína de cristal pesticida Cry1Aa	112	<i>B. thuringiensis</i> subsp. aizawai	5,00	5,04	134.057	87.550
79	Exclusivo	9,38E-04	P05068	Proteína de cristal pesticida Cry1Ac	120	<i>B. thuringiensis</i> subsp. kurstaki	5,03	5,37	134.160	105.274
82	Exclusivo	0,00280843	P0A367	Proteína de cristal pesticida Cry1Aa	112	<i>B. thuringiensis</i> subsp.	5,04	6,11	131.284	122.990

Continuação						aizawai				
84	Exclusivo	0,00191479	P0A372	Proteína de cristal pesticida Cry1Ab	171	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	5,04	6,04	131.284	123.668

---

\*Identificado via MS/MS; \*\* *Spot* comum, porém com maior razão de variação entre as % vol

**Tabela 6:** Anotação presumível das DEPs de isolados de *Bacillus thuringiensis*, de acordo com a maior similaridade ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa Mascot. O *Ratio* significa a razão de variação entre as %vol dos *spots* comuns na comparação entre os isolados Bt.CDi 1.3 e CDi 1.11. ANOVA refere-se ao valor *p* calculado para significância estatística da diferença na %vol entre os *spots* da comparação, sendo considerada significativa se  $p \leq 0,05$ . Estão apresentados o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM, em Da) calculados do acesso similar e observados na 2D-PAGE para cada *spot*.

Spot	Ratio Bt.CDi 1.3 x Bt. CDi 1.11	ANOVA	Acesso	Nome das proteínas	Score	Organismo	pI		MM (Da)	
							Cal	Obs	Cal	Obs
<b>Bt 1.3</b>										
5**	1.674	0,0423215	A3DHP0	Subunidade $\alpha$ da V-ATP sintase	64	<i>Clostridium thermocellum</i> (strain ATCC 27405 / DSM 1237 / NBRC 103400 / NCIMB 10682)	5,21	6,27	65.494	17.910
14**	1.946	0,0245881	C3P9Q3	Fator de alongamento Tu	62	<i>Bacillus anthracis</i> (strain A0248)	4,93	5,27	43.026	51.737
79	Exclusivo	0,00706141	A0R8H8	Fator de alongamento Tu	108	<i>B. anthracis</i> (strain A0248)	4.93	5.70	43.026	46.006
80	Exclusivo	0,0221482	Q634M5	Repressor de transcrição indutivo por calor HrcA	46	<i>Bacillus cereus</i> (strain ZK / E33L)	5,95	5,46	37.905	48.500
81	Exclusivo	5,57E-04	A0RKS3	Enolase	129	<i>B. thuringiensis</i> (strain AI Hakam)	4,66	4,91	46.446	54.167
84	Exclusivo	0,723742	B7IMU0	Amino peptidase citossólica	65	<i>B. cereus</i> (strain G9842)	4,80	5,06	53.596	57.518
85	Exclusivo	0,0337014	Q81SW4	Proteína A do estágio IV de esporulação	141	<i>B. anthracis</i>	4,69	4,92	55.636	58.187
86	Exclusivo	0,00144814	B7IUW8	1-Pirrolina-5-Carboxilato	96	<i>B. cereus</i> (strain G9842)	5,43	5,77	56.418	58.459

Continuação		desidrogenase									
96	Exclusivo	1,71E-04	B7HCU0	Chaperonina 60 kDa	119	<i>B. cereus</i> (strain B4264)	4,66	4,85	65.783	80.591	
98	Exclusivo	0,00740629	B7HJ45	Fator de alongamento G	168	<i>B. cereus</i> (strain B4264)	4,91	5,20	76.504	88.605	
102	Exclusivo	2,62E-04	O66440	3-desidroquinase desidratase	73	<i>Aquifex aeolicus</i> (strain VF5)	5,90	5,06	25.069	103.134	
104*	Exclusivo	0,00118558	Q1AVS8	Fator desencadeante de resposta	46	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> (strain DSM 9941 / NBRC 16129)	4,67	5,00	53.893	16.636	
<b>Bt 1.11</b>											
38		0,00402762	Q99Y12	Galactose-6-fosfato-isomerase subunidade 2 Laca A	62	<i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M1	5,22	9,50	15.474	39.533	
48		0,022553	P42481	Fator alongamento Tu	85	<i>Thiomonas delicata</i>	5,58	5,61	43227	50.296	

\*Identificado via MS/MS; \*\* Spot comum, porém com maior razão de variação entre as % vol

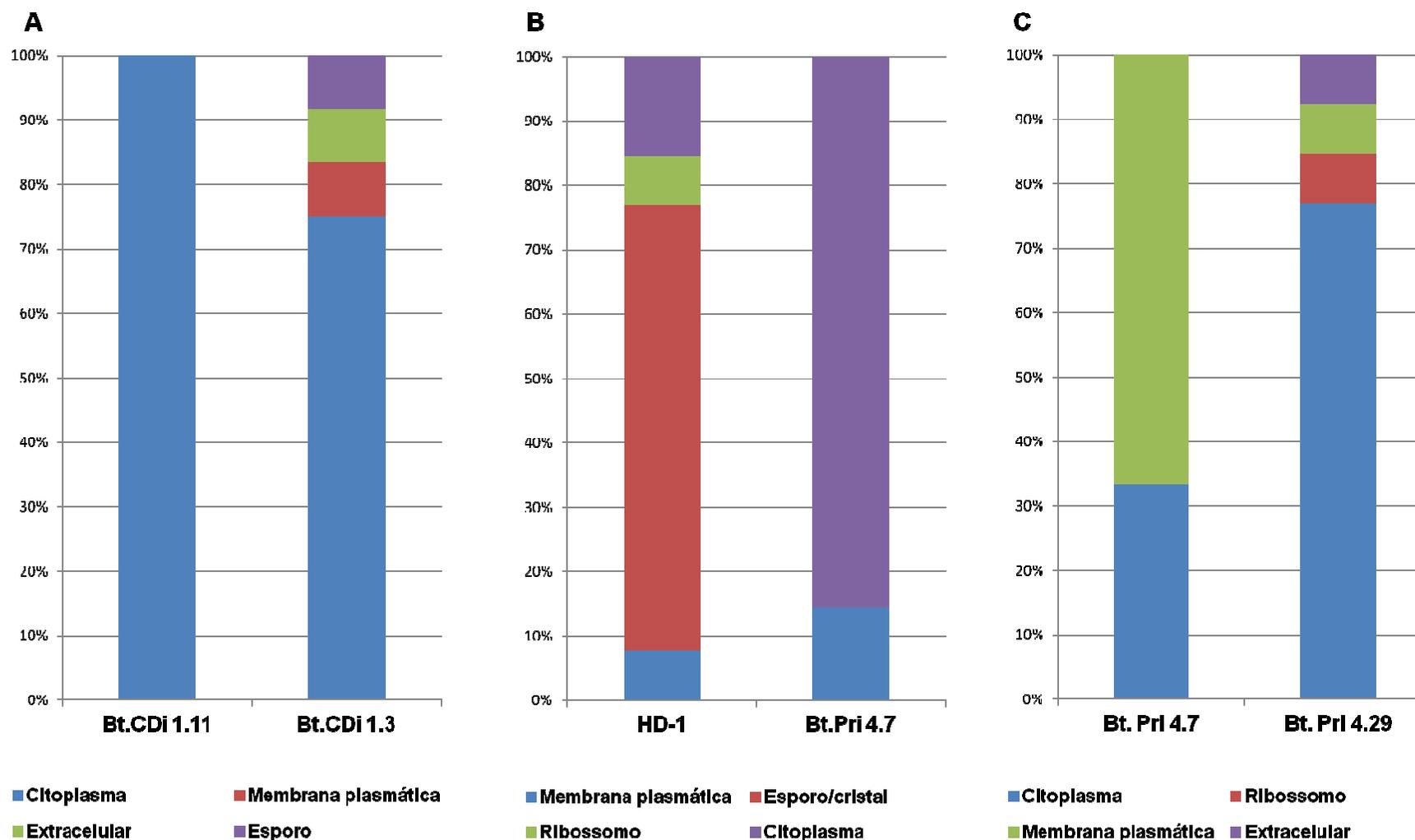
### 3.6 Ontologia gênica (GO)

#### 3.6.1 Localização Subcelular

A ferramenta Blast2GO através dos termos de Ontologia Gênica para Localização Subcelular (Figuras 8) para os isolados com genes *cry2*, Bt.Pri 4.7 (mais patogênico) e Bt.Pri 4.29 (menos patogênico), demonstrou que em Bt.Pri 4.7 grande parte das proteínas estão localizadas na membrana plasmática (Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase e ATPase  $\alpha$ ) e algumas no citoplasma; enquanto que em Bt.Pri 4.29 as proteínas identificadas estão, em sua maioria, presentes no citoplasma.

A comparação entre o isolado Bt.Pri 4.7 (mais patogênico entre os isolados testados) e a estirpe HD-1 (de alto potencial patogênico), ambos portadores do gene *cry2*, aponta para uma maior prevalência de proteínas localizadas em esporos e cristais (Ex.: Cry1Aa) e no citoplasma na estirpe HD-1. No isolado Bt.Pri 4.7, as proteínas identificadas estão localizadas no citoplasma, seguido por proteínas localizadas na membrana plasmática.

A localização subcelular desvendada por Ontologia Gênica das proteínas identificadas na comparação entre Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11 (portadores do gene *cry9*), demonstrou que em Bt.CDi 1.3 (mais patogênico) as proteínas estão mais abundantes no citoplasma, porém algumas estão localizadas em esporos (Proteína A do Estágio IV de esporulação), membrana plasmática (V-ATPase  $\alpha$ ) e também na porção extracelular (Enolase). No isolado Bt.CDi 1.11 (menos patogênico) existe a predominância de proteínas localizadas no citoplasma.



**Figura 8:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Ontologia gênica para localização subcelular das proteínas identificadas nas comparações: **A:** Bt.CDi 1.11 e Bt.CDi 1.3, portadores do gene *cry9*; **B:** HD-1 (estirpe padrão) e Bt.Pri 4.7, portadores do gene *cry2*; **C:** Bt. Pri 4.7 e Bt. Pri 4.29, portadores do gene *cry2*.

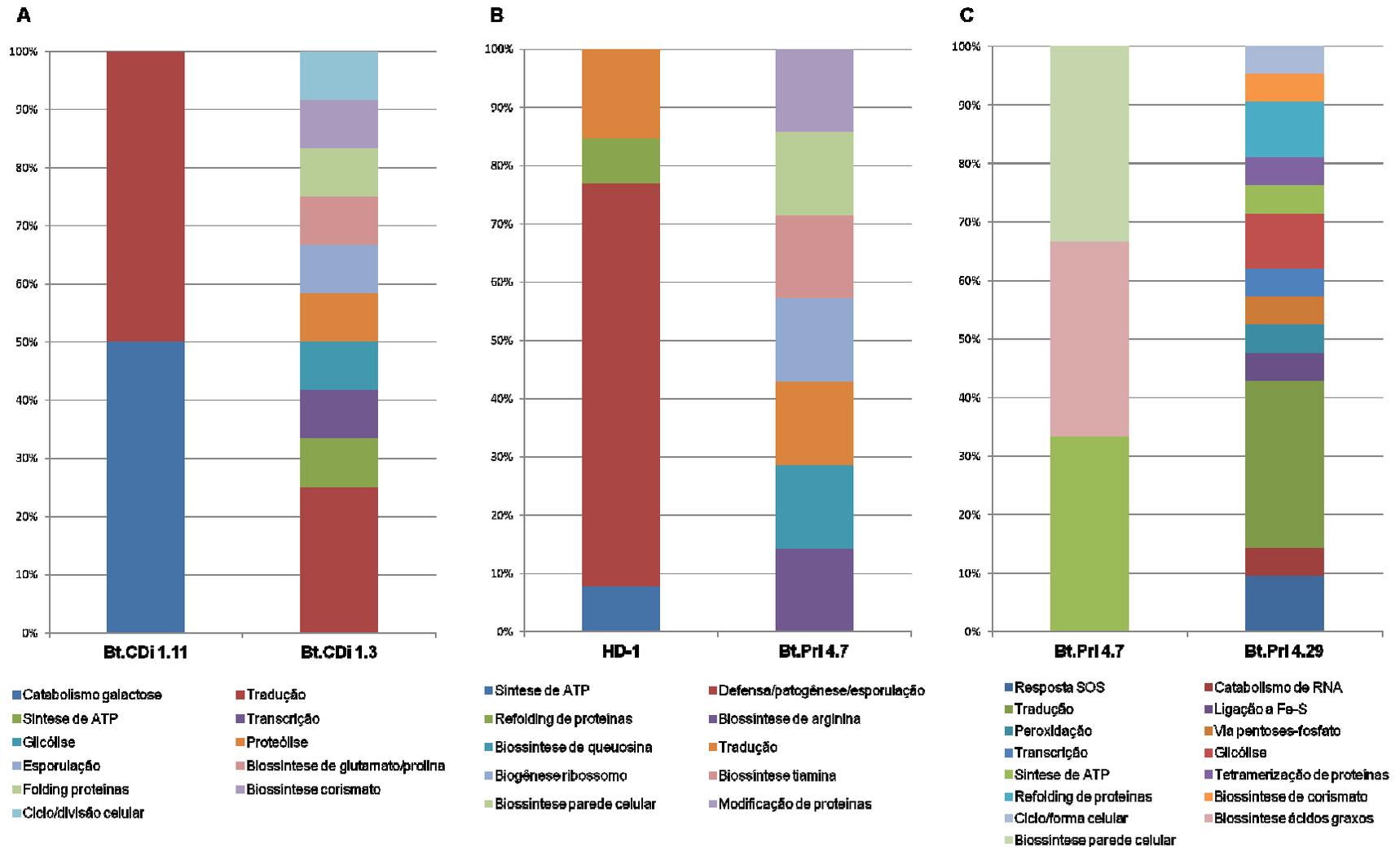
### 3.6.2 Processo Biológico

Com os termos de GO para Processo Biológico (Figura 9) na comparação entre os isolados Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.29 (portadores do gene *cry2*) foi possível verificar que boa parte das proteínas do isolado Bt.Pri 4.7 (mais patogênico) estão envolvidas na síntese de ATP (ATPase  $\alpha$ ) e em processos de biossíntese de ácidos graxos (Holo-acil-transportador de proteína sintase) e de parede celular (Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase); enquanto no isolado Bt.Pri 4.29 (menos patogênico) as proteínas distribuem-se entre vários processos biológicos, com as mais frequentes estando envolvidas a processos de tradução.

Na comparação entre o isolado Bt.Pri 4.7 (mais patogênico entre os isolados testados) e a estirpe HD-1 (de alto potencial patogênico), ambos portadores do gene *cry2*, houve maior predominância na estirpe HD-1 de proteínas envolvidas em processos de defesa, patogênese e esporulação (Cry1Aa, CryB1 5'29.1 kDa, Cry1Ab e Cry1Ac); além de proteínas envolvidas no processo de tradução (Fator de alongamento Tu). No entanto, no isolado Bt.Pri 4.7, as proteínas estão mais envolvidas em processos de biossíntese de tiamina e de parede celular (sulfurtransferase tRNA e Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase, respectivamente) e também em modificações de proteínas (Octanoil transferase).

Entre os isolados Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11 (portadores do gene *cry9*), o Bt.CDi 1.3 (mais patogênico) apresenta proteínas envolvidas em processos como proteólise (Aminopectidase), esporulação (Proteína A do estágio IV de esporulação), biossíntese de glutamato e prolina (P5C dehydrogenase); *folding* de proteínas (HSP70 chaperona) e biossíntese de corismato (3-desidroquinase desidratase). No isolado Bt.CDi 1.11 (menos patogênico) houve maior identificação de proteína envolvidas nos processos de catabolismo da galactose e tradução.

A Ontologia Gênica mais detalhada para processos biológicos e também função molecular das proteínas identificadas pode ser observado no Anexo III.



**Figura 9:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas nas comparações: **A:** Bt.CDi 1.11 e Bt.CDi 1.3, portadores do gene *cry9*; **B:** HD-1 (estirpe padrão) e Bt.Pri 4.7, portadores do gene *cry2*; **C:** Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.7, portadores do gene *cry2*.

#### 4. Discussão

A análise proteômica tem como uma de suas principais finalidades auxiliar no entendimento da fisiologia de um organismo. Há alguns anos, a análise das proteínas expressas por *Bacillus thuringiensis*, através da utilização de electroforese em gel de poliacrilamida (SDS–PAGE), surgiu como forma de complementação à caracterização de novos isolados. Porcar e Juarez Pérez (2003) e Mendonça *et al.* (2012) por exemplo, utilizaram esta técnica na determinação da composição de cristal parasporal e toxicidade, identificação de genes críticos e confirmação da expressão de genes identificados via PCR. No presente trabalho, foi possível a identificação de bandas com tamanhos que correspondem ao estimado para as proteínas expressas pelos genes *cry2* e *cry9* (70 e 130 KDa, respectivamente), detectados nos isolados analisados via PCR em estudos anteriores.

Apenas com o padrão de bandas em géis SDS-PAGE como as observadas no presente trabalho, Fakruddin *et al.* (2012) confirmaram a identidade de seus isolados como pertencendo a classe de Bt assim como Loguercio *et al.* (2002) e Kannan *et al.* (2012) sugeriram, respectivamente, que a análise dos perfis proteicos totais e das proteínas secretadas no meio de cultura em SDS-PAGE podem indicar a diversidade dos isolados e o possível espectro de atividade biológica.

Os estudos a nível proteômico utilizando a técnica de eletroforese bidimensional (2D), como realizado no presente trabalho, vem contribuindo amplamente para a identificação da proteínas expressas em dado momento e sob certas condições em vários organismos. Em *B. thuringiensis* esta técnica é normalmente empregada para a identificação de proteínas expressas por um mesmo isolado nas diferentes fases de vida como nos estudos de Li *et al.* (2012), ou quando submetido a variações do ambiente como realizado por Wu *et al.* (2011).

A proposta do presente trabalho, no entanto, foi identificar proteínas diferencialmente expressas em isolados distintos, porém com a presença de ao menos um gene *cry* em comum, e assim identificar outros fatores que podem contribuir para os diferentes graus de patogenicidade observados nos isolados utilizados. Li *et al.* (2012) demonstraram a importância e eficiência da técnica 2D para a identificação dos fatores de virulência, pois estes possuem ação sinérgica com os genes *cry*, e contribuem para a ação entomopatogênica. Neste sentido, as análises realizadas com os isolados de Bt revelaram a presença de proteínas com funções metabólicas, síntese de proteínas e de aminoácidos, proteínas de formação de cristais e esporos, além de resposta a estresse, entre outras. Nossos resultados reforçam as conclusões de Li *et al.* (2012).

Entre as proteínas identificadas nas presentes análises, algumas se destacaram por apresentarem funções descritas e específicas em Bt. A enzima transaldolase (Tal), por exemplo, foi identificada na comparação entre os isolados portadores do gene *cry2*, Bt.Pri 4.7 x Bt.Pri 4.29, e segundo Gong *et al.* (2012) está diretamente envolvida na via glicolítica de *B. thuringiensis*. Estes autores estudaram as principais proteínas envolvidas no metabolismo de Bt e a Tal aparece em altas concentrações durante a fase estacionária, sendo metabolizada pela via da pentose fosfato. Içgen *et al.* (2002) e Öskan *et al.* (2003) apontam, no entanto, um efeito inibidor de altas concentrações de glicose na síntese da  $\delta$ -endotoxina (proteínas Cry). Portanto, a presença da transaldolase indica que houve a produção de glicose no isolado Bt.Pri 4.29 que possivelmente inibiu a síntese de proteínas Cry e contribuiu para sua baixa virulência.

O fator de alongamento G (EF-G), duas vezes identificado no isolado Bt.Pri 4.29 na mesma comparação, e também no isolado Bt.CDi 1.3 em sua comparação

com o Bt.CDi 1.11 (ambos *cry9*), foi descrito por DelVecchio *et al.* (2006) como sendo normalmente produzido por isolados de *B. thuringiensis* e apresentar ação imunogênica sobre os hospedeiros. Neste mesmo isolado, foram identificadas as proteínas 50S ribossomal L15 e subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase dependente de DNA descritas respectivamente por Pridgeon *et al.* (2013) como um componente de proteínas também imunogênicas e Shinoy *et al.* (2013) como uma importante proteína imunorreativa que pode elucidar os processos de patogênese como os observado em *Burkholderia multivorans* e *Burkholderia cenocepacia* em humanos.

Além do Fator de alongamento G o de alongamento Tu (EF-Tu), identificado nas comparações entre isolados com genes *cry2* e também entre os isolados *cry9*; está envolvido com a síntese de proteínas de tradução. Este fator de alongamento forma um complexo ternário com a guanosina trifosfato (GTP) e aminoácidos tRANs para carregar o ribossomo A possibilitando a codificação do mRNA através da interação códon-anticodon. Foi identificada a duplicação da expressão destes fatores de alongamento, especialmente do fator G, no final da fase *log* e início da fase estacionária em Bt, e este aumento de expressão estaria ligado a síntese de proteínas, provavelmente Cry, na fase estacionária segundo Gong *et al.* (2012), Ito e Yokoyama (2010) e Takeshita e Tomita (2010); além de estarem relacionados à ativação de esporos dormentes, segundo as observações de Keijser (2007).

Assim como o fator de alongamento G, a enolase foi identificada duas vezes no isolado Bt.Pri 4.29. A enolase foi descrita por DelVecchio *et al.* (2006) como uma das mais proeminentes proteínas esporais expressas por de *B. thuringiensis*, sendo também descrita em outros organismos do gênero *Bacillus*. Em organismos como *P. larvae*, a enolase é considerada por Antúnez *et al.* (2011) como um fator de virulência e Pancholi *et al.* (2003) ressaltam sua presença em agentes patogênicos

sendo utilizada para a invasão de tecidos dos hospedeiros. Entretanto a função da enolase neste processo não está completamente elucidada como mencionado por Chung *et al.* (2011), porém pode haver alguma correlação com a ligação dos esporos ao epitélio do hospedeiro por ser a enolase considerada um antígeno imunodominante de esporos de *B. thuringiensis* como observado por DelVecchio *et al.* (2006). A enolase também foi identificada no isolado mais patogênico Bt.CDi 1.3 em sua comparação com o Bt.CDi 1.11, ambos *cry9*.

A proteína ribossômica 30S S2 também presente nas identificações foi descrita como um parceiro mediador de toxicidade por agir em interação com a proteína Vip3 (Singh *et al.*, 2010). Esta interação se dá de tal modo que a interferência na expressão desta proteína resultou em redução da toxicidade da proteína Vip3A. Singh *et al.* (2010) também relatam que a interação entre a proteína ribossomal S2 fica evidenciada nas superfícies das células dos insetos suscetíveis e posteriormente no citoplasma destas células já em estágios iniciais de lise. Como as proteínas deste estudo não foram oriundas de infecção nos insetos não há como inferir se realmente ocorre a interação entre S2-Vip3 no isolado Bt.Pri 4.29. Outro fator relevante é que as proteínas Vip3, agindo isoladamente, são até 15 vezes menos ativas em relação a proteína da classe Cry1 para *D. saccharalis*, conforme descrito por Lemes *et al.* (2014); contudo estes mesmos autores apontam que para própria *D. saccharalis* pode ocorrer sinergismo entre Vip3A e Cry1Ca expressa pela classe gênica *cry1*, não detectada em Bt.Pri 4.29 como observado em estudos anteriores. Estes fatores podem elucidar a baixa toxicidade deste isolado para *D. saccharalis*, mesmo com indícios da expressão da proteína Vip3.

A Proteína Chaperona DnaK foi expressa por Bt.Pri 4.29 na comparação com o Bt.Pri 4.7 mas também pelo isolado Bt.CDi 1.3 da comparação com o Bt.CDi 1.11.

Esta proteína foi identificada por Wu *et al.* (2011) na estirpe de *B. thuringiensis* YBT-1520, que apresenta alta atividade inseticida contra larvas de lepidópteros. No entanto, Chitlaru *et al.* (2007) sugerem que a DnaK tenha uma atuação como fator de virulência em *B. anthracis* e apontam que em outros agentes patogênicos ela possui papel importante no processo patológico pela mediação da adesão aos tecidos do hospedeiros. Autores como Pinto *et al.* (2007), Naseem *et al.* (2010) e McGowin *et al.* (2010) atribuem funções na patogênese à DnaK por verificarem respostas imunológicas em vários animais infectados com agentes patológicos que secretam esta proteína. Este resultado sugere que esta chaperona DnaK possui maior associação com entomopatogenicidade em isolados de Bt Cry9 do que em isolados Cry2, uma vez que o isolado Bt.CDi 1.3 (com gene *cry9*) apresenta patogenicidade de 16%, enquanto o isolado Bt.Pri 4.29 (*cry2*), 3,47%.

A proteína shikimato quinase identificada em Bt.Pri 4.29 é descrita por Liu *et al.* (2010) como diretamente envolvida na produção e fosforilação da turingiensina ( $\beta$ -exotoxina) de tal forma que o silenciamento do gene *thuE* que a expressa inibe a produção da turingiensina em mutantes. Glare e O'Callaghan (2000) e Polanczyk e Alvez (2003) descrevem a turingiensina como uma proteína tóxica e de baixo peso molecular, ativa contra alguns insetos. Segundo estes autores a toxicidade da turingiensina está diretamente ligada a inibição da RNA polimerase, porém esta proteína não possui especificidade e deste modo contribui para a uma toxidade global das bactérias que a expressam; porém Wu *et al.* (2002) destacam a maior capacidade patogênica da turingiensina contra besouros (ordem Coleoptera) e em algumas espécies de ácaros (ordem Acarina), representantes de ordens distintas a da *D. saccharalis* utilizada para o teste de patogenicidade do isolado referido.

O complexo NADH-quinona oxidoreductase subunidade I identificado em Bt.Pri 4.29 foi descrito por Efremov e Sazanov (2011) como o primeiro e maior complexo enzimático da cadeia respiratória, sendo reconhecidamente envolvido em importantes atribuições no metabolismo de energia celular enquanto a Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo-transferase de Bt.Pri 4.7, codificada pelo gene *mraY*, foi descrita por Tam *et al.* (2006) como pertencendo a parede celular e estando envolvida na resposta a estresse em *Bacillus subtilis*. A RecA foi outra proteína identificada e está envolvida em respostas a tensão e agentes causadores de danos ao DNA, proporcionando resistência ao estresse (Cox, 2007) e estando envolvida no mecanismo de resposta SOS em bactérias.

Na comparação entre os isolados Bt.CDi 1.3 x Bt.CDi 1.11, ambos com gene *cry9*, foi identificada em Bt.CDi 1.3 a proteína 1-Pirrolina-5-Carboxilato Desidrogenase assim como nos estudos de Mukhopadhyay *et al.* (2009) ao analisarem esporos de *B. anthracis*, quando foi apontada como estando envolvida no metabolismo energético. Esta proteína foi relatada por Li *et al.* (2012) ao analisarem o proteoma da cepa *Bacillus thuringiensis* 4.0718 em diferentes fases de crescimento e considerada como agente participante da síntese de aminoácidos e de proteínas. Ainda nos estudos de Li *et al.* (2012), da mesma forma que nos nossos resultados, a proteína A do estágio IV de esporulação (SpoIVA) foi identificada e segundo a descrição destes autores está envolvida na formação dos cristais proteicos e esporos e portanto atua na produção destes elementos patogênicos no isolado Bt.CDi 1.3 que apresentou aproximadamente 16% de atividade para *D. saccharalis*. Ao menos em *Bacillus subtilis* a função desta proteína citoplasmática expressa imediatamente após a formação do septo assimétrico está bem caracterizada e Catalano *et al.* (2001) sugerem ainda que a SpoIVA é especializada

na morfogênese e fixação do revestimento dos esporos, atuando também no compartimentação da célula mãe.

Huang *et al.* (2012) apontam para a presença de proteínas chamadas acessórias em Bt que estariam diretamente envolvidas aos processos de formação dos cristais proteicos e também da sua superexpressão. Entre as classes de proteínas acessórias Huang e colaboradores citam a proteína desconhecida de 29.1 kDa da região cryB1 5' que foi identificada nos nossos estudos na estirpe HD-1, referência em patogenicidade, em sua comparação com nosso isolado Bt.Pri 4.7.

Nesta comparação também foram identificados fatores de alongamento, e um deles foi o fator de alongamento Tu. Este fator é descrito por Wilson e Nierhaus (2007) e Ito e Yokoyama (2010) que sugerem seu envolvimento na regulação da síntese de proteínas relacionadas à translação, portanto Gong *et al.* (2012) propuseram que este fator seja mais expresso em momentos que requerem maior tradução por facilitarem a síntese de proteínas, embora Li *et al.* (2012) identificaram esta proteína nas três fases do ciclo do isolado de Bt por eles estudado.

A GTPase Obg descrita em Bt.Pri 4.7 é uma família de proteínas translacionais (trGTPases) que tem como exemplos de membros os fatores de alongação Tu e G já discutidos anteriormente e amplamente descritos em Bt como demonstrado nas análises de Margus *et al.* (2007).

A Octanoyl transferase expressa pelo nosso isolado Bt.Pri 4.7 é um catalisador que está relacionado a síntese de lipoato e portando está envolvido no metabolismo de lipoato em bactérias. São descritos cinco complexos multienzimáticos dependente de lipoato e três destes cinco são complexos desidrogenases alfa-cetoácidos destacando-se entre eles o complexo Piruvato Desidrogenase (PDH). Este complexo é composto de múltiplas cópias de três

subunidades enzimáticas referidas como E1, E2, E3. Walter e Aronson (1999) indicam que em *Bacillus thuringiensis* a subunidade E2 de PDH se liga ao DNA para regular a expressão dos genes de protoxina durante a fase de esporulação. A octanoil transferase identificada em Bt.Pri 4.7 sugere a produção de toxinas neste isolado que apresenta média de 20,05% patogenicidade para *D. saccharalis*.

A Chaperonina 60 kDa também foi descrita por DelVecchio *et al.* (2006) e a relataram como uma proteína altamente expressa em Bt. Estes resultados foram observados na comparação dos perfis proteômicos de antígenos imunodominantes dos esporos de *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* e estes autores indicam a Chaperonina 60 kDa como sendo uma proteína imunogênica de *B. anthracis* também sendo descrita em *B. thuringiensis*, possivelmente estando envolvida na patogênese de Bt, porém sem observação em *B. cereus*. Chenau *et al.* (2013) consideram a Chaperonina 60 kDa como uma das proteínas marcadoras candidatas para a identificação e distinção de esporos destas três espécies de *Bacillus*.

Oito *spots* distintos foram identificadas como proteínas cristais pesticidas da família Cry1 na estirpe HD-1 em sua comparação com o isolado Bt.Pri 4.7. Estas proteínas apresentaram similaridades com Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e Naimov, Dukiandjiev e De Maagd (2003) e Bravo *et al.* (2007), entre outros autores, relatam que as proteínas da família Cry1 são normalmente as mais ativas para insetos lepidópteros, portanto sendo um dos fatores responsáveis pelo alto grau de patogenicidade desta estirpe.

As proteínas Cry são expressas na fase de esporulação e são acumuladas na célula mãe em forma de inclusão cristalífera denominadas de protoxinas que são liberadas sempre ao final da esporulação segundo Lereclus *et al.* (2000). O

mecanismo de ação desta família de proteínas Cry é bem descrito e Sebastião *et al.* (2015) estudando a atividade destas três subclasses que proteínas Cry1, demonstram que as proteínas Cry1Ac é 10 vezes mais tóxica que a Cry1Ab e 30 vezes mais tóxica que Cry1Aa para o lepidóptero *Helicoverpa armigera* Hübner. Davolos *et al.* (2015) também realizaram testes com as toxinas Cry1A e apontaram uma maior toxicidade de Cry1Ab seguida de Cry1Ac contra a *D. saccharalis* (Fabr.) um lepidóptero causador de danos em importantes culturas como a cana-de-açúcar. Avilla *et al.* (2005) ainda apontam para um maior grau de patogenicidade de proteínas da classe Cry1, não expressas no isolado analisado Bt.Pri 4.7, quando comparada a Cry2 ao menos para o lepidóptero *H. Armigera*.

Após a indentificação das proteínas por eletroforese 2D seguido de esperctrometria de massas, muitos autores buscam entender quais as funções por estas realizadas. Neste sentido, a ontologia gênica vem contribuindo para a identificação dos processos biológicos, quais as funções moleculares em que as proteínas possam estar envolvidas e também a sua localização subcelular. Em relação à ontologia gênica para localização subcelular, nos isolados Bt.Pri 4.7, Bt.Pri 4.7, Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11; como também foi verificado por Gardy (2006) em *B. thuringiensis* soroveriedade *Konkukian*, houve maior prevalência na identificação de proteínas localizadas no citoplasma, seguido de proteínas da membrana plasmática e proteínas extracelulares. No entanto, na estirpe padrão HD-1, proteínas de esporo e cristais foram as mais identificadas. Liu *et al.* (2012), também utilizando a ontologia gênica, fizeram a classificação das proteínas expressas identificadas em categorias funcionais para compreender como o  $\text{Cu}^{2+}$  pode influenciar no processo de produção de proteínas cristais em *B. thuringiensis* e a maior parte das proteínas foram classificadas como estando envolvidas em processos celulares e de metabolismo,

assim como observado em nossos resultados que também corroboram os resultados de Huang *et al.* (2012) que identificaram proteínas das fases vegetativas, de início de esporulação e final da esporulação. O agrupamento das proteínas identificadas neste estudo considerando a função revelou que a nas três fases do ciclo de Bt existe a prevalência de proteínas metabólicas funcionais e de participação em processos celulares.

As proteínas identificadas no presente estudo apontam para a eficiência das análises 2D seguida da espectrometria de massas para a identificação de fatores de virulência expressos por isolados de Bt. Esta ferramenta pode ser considerada como uma abordagem importante para a identificação de proteínas, porém como se trata de uma análise diferencial não considera as proteínas que não diferem estatisticamente em nível de expressão. Esta característica pode responder pelo não aparecimento das proteínas Cry2 e Cry9 nos isolados estudados, e Cry2 na estirpe HD-1, cujos genes foram identificados via PCR em análises anteriores. A expressão do gene *cry1* na estirpe HD-1 pode ser o fator determinante para o grande potencial patogênico desta estirpe frente a lepidópteros, tendo em vista que em teoria os genes *cry2* expressos por HD-1 e Bt.Pri4.7 não diferiram estatisticamente pela análise proteômica realizada.

## 5. Conclusão

A comparação entre os isolados com maior e menor grau de patogenicidade para *D. saccharalis* possibilitou a identificação de proteínas relacionadas com a atividade patogênica de *Bacillus thuringiensis*.

A identificação das proteínas de isolados de *B. thuringiensis* abre caminho para novas pesquisas e para um melhor entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nos processos de patogênese.

## Agradecimentos

A CAPES pela concessão de bolsa de estudo para o desenvolvimento da pesquisa. À Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) que possibilitou a análise das proteínas no MALDI-TOF. Ao Prof. Dr. Fábio Cesar Gozzo, coordenador do Laboratório de Espectrometria de Massas Dalton (<http://daltonlab.iqm.unicamp.br>) do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP pela disponibilização do banco de dados de *Bacillus thuringiensis*.

## 6. Referências

- Aebersold R and Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198–207.
- Alfazairy AA, El-Ahwany AM, Mohamed EA, Zaghloul HA and El-Helow ER (2012) Microbial control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) by Egyptian *Bacillus thuringiensis* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* 2:155-162.
- Antúnez K, Anido M, Arredondo D, Evans JD and Zunino P (2011) *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology [S.I.]* 1-2: 83-89.
- Avilla C, Vargas-Osuna E, Gonzalez CJ, Ferré J and Gonzalez-Zamora JE (2005) Toxicity of several  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. *Jour of Inver Path* 90:51-54.
- Barbosa Neto AG, Pestana-Calsa MC, De Morais MA and Calsa TJr (2014) Proteome responses to nitrate in bioethanol production contaminant *Dekkera bruxellensis*. *Journal of Proteomics* 2: 104-111.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:48–254.
- Bravo A (1997) Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol* 9:2793-801.
- Bravo A, Gill SS and Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423–435.
- Bravo A and Soberón M (2008) How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 10:573-9.
- Catalano FA, Meador-Parton J, Popham DL and Driks A (2001) Amino acids in the *Bacillus subtilis* morphogenetic protein SpoIVA with roles in spore coat and cortex formation. *Journal of Bacteriol* 5: 1645–1654.
- Chitlaru T, Gat O, Grosfeld H, Inbar I, Gozlan Y and Shafferman A (2007) Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infection and Immunity* 6: 2841–2852.
- Chung MC, Tonry JH, Narayanan A, Manes NP, Mackie RS, Gutting B, Mukherjee DV, Popova TG, Kashanchi F, Bailey CL, Popov SG (2011) *Bacillus anthracis* interacts with plasmin (ogen) to evade C3b-Dependent innate immunity. *PLoS ONE* 3:1 – 10.
- Cox MM (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1:41-63.
- Davolos CC, Hernandez-Martinez P, Cialesi-Legori PCB, Desidério JA, Ferré J, Escriche B and Lemos MVF (2015) Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J Invertebr Pathol* 127: 32-34.
- De Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N and Schnepf HE (2003) Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet* 37: 409-433.

- Delvecchio VG, Connolly JP, Alefantis TG, Walz A, Quan MA, Patra G, Ashton JM, Whittington JT, Chafin RD, Liang X, Grewal P, Khan AS and Mujer CV (2006) Proteomic profiling and identification of immunodominant spore antigens of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 9: 6355-6363.
- Efremov RG and Sazanov LA (2011) Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature* 476: 414–420.
- Fakruddin MD, Sarke N, Ahmed MM and Noor R (2012) Protein profiling of *Bacillus thuringiensis* isolated from agro-forest soil in Bangladesh. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol* 20:139-145.
- Gardy, SF (2006) Computational prediction and comparative analysis of protein subcellular localization in bacteria. Tese de Doutorado. Simon Fraser University.
- Glare TR and O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis biology, ecology and safety*. John Wiley & Sons, 350 pp.
- Gong Y, Mingshun L, Xu D, Wang H, He J, Wu D, Chen D, Qiu N, Bao Q, Sun M and Yu Z (2012) Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *J Proteomics* 75: 1235-1246.
- Grossi-De-Sa MF, Quezado De Magalhaes M, Silva MS, Silva SM, Dias SC, Nakasu EY, Brunetta PS, Oliveira GR, Neto OB, Sampaio OR, Soares LH, Ayub MA; Siqueira HA and Figueira EL (2007) Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cry1ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Biol* 5: 773-82.
- Huang S, Ding X, Sun Y, Yang Q, Xiao X, Cao Z and Xia L (2012) Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* at different growth phases by using an automated online two-Dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry strategy. *Appl Environ Microbiol* 15: 5270–5279.
- Içgen Y, Içgen B and Ozcengiz G (2002) Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res Microbiol* 9: 605-609.
- Ito T and Yokoyama S (2010) Two enzymes bound to one transfer RNA assume alternative conformations for consecutive reactions. *Nature* 467:612–6.
- Knaak N, Franz AR, Santos GF and Fiuza LM (2010) Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. *Smith Caterpillars* (Lepidoptera, Noctuidae). *Braz J Biol* 3: 677-84.
- Konecka E, Baranek J, Hrycak A and Kaznowski A (2012) Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. *The Scientific World Journal*, p.1-5.

- Kannan P, Xavier R, Josephine R, Marimuthu K, Kathiresan S and Sreeramanan S (2012) The occurrence of *Bacillus thuringiensis* strains in chemical intensive rice growing ecosystem. *Afr J Microbiol Res* 6:5147-5152.
- Keijser BJF, Beek AT, Rauwerda H, Schuren F, Montijn R, Spek HVD and Brul S (2007) Analysis of Temporal Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Germination and Outgrowth *J Bacteriol* 9: 3624–3634.
- Konecka E, Kaznowski A, Ziemnicka J and Ziemnicki K (2006) Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydra pomonella* L. *Journ Invert Pathol* 94: 56- 63.
- Kotze Ac, O'grady J, Gough Jm, Pearson R, Bagnall Nh, Kemp Dh and Akhurst Rj (2005) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. *Int J Parasitol* 9: 1013-1022.
- Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferre J, Lemos MVF and Desiderio JA (2014) Synergism and Antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLOS ONE* 10: 1-8.
- Lereclus D, Agaisse H, Grandvalet C, Salamitou S and Gominet M (2000) Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol* 4-5: 295-299.
- Li X, Ding X, Xia L, Sun Y, Yuan C and Yin J (2012) Proteomic Analysis of *Bacillus thuringiensis* Strain 4.0718 at Different Growth Phases. *The Scientific World Journal*, 1-10.
- Liu X, Zuo M, Wang T, Sun Y, Liu S, Hu S, He H, Yang Q, Rang J, Quan M, Xia L and Ding X. Proteomic analysis of the influence of Cu<sup>2+</sup> on the crystal protein production of *Bacillus thuringiensis* X022. *Microb Cell Fact* 14:153.
- Liu XY, Ruan LF, Hu ZF, Peng DH, Cao SY, Yu ZN, Liu Y, Zheng JS and Sun M (2010) Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. *J Biol Chem* 50: 39191–39200.
- Loguercio LL, Barreto ML, Rocha TL, Santos CG, Teixeira FF and Paiva E (2002) Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip –derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. *J Appl Microbiol* 93:269–277.
- McGowin CL, Spagnuolo RA, and Pyles RB (2010) *Mycoplasma genitalium* rapidly disseminates to the upper reproductive tracts and knees of female mice following vaginal inoculation. *Infection and Immunity* 2: 726–736, 2010.
- Mendoza G, Portillo A, Arias E, Ribas RM and Olmos J (2012) New combinations of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* strains isolated from northwestern Mexico. *Int Microbiol* 15:209-216.
- Mukhopadhyay S, Akmal A, Stewart AC, Hsia R and Read TD. Identification of *Bacillus anthracis* spore component antigens conserved across diverse *Bacillus cereus sensu lato* Strains. *Mol Cell Proteomics* 6: 1174-1191.
- Muniady S, Rathinam X and Subramaniam S (2011) Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from chicken manure samples. *African Journal of Microbiol Res* 20: 3131-3137.

- Naimov S, Dukiandjiev S and De Maagd RA (2003) A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. *Plant Biotechnology Journal* 1: 51–57.
- Naseem S, Meens J, Jores J, Heller M, Dübel S, Hust M and Gerlach G F (2010) Phage display-based identification and potential diagnostic application of novel antigens from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Veterinary Microbiology* 3-4: 285–292.
- Öskan M, Dilek FB, Yetis U and Özcengiz O (2003) Nutritional and cultural parameters influencing antidipteran delta-endotoxin production. *Research Microbiol* 1: 49-53.
- Pacheco CM, Pestana-Calsa MC, Gozzo FC, Nogueira RJMC, Menossi M, Calsa T Jr (2013) Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. *J Proteome Res* 12:5681-95.
- Pancholi V, Fontan P and Jin H (2003) Plasminogen-mediated group a streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microb Pathog* 35: 293-303.
- Pinto PM, Chemale G, De Castro LA, Costa AP, Kich JD, Vainstein MH, Zaha A and Ferreira HB (2007) Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Veterinary Microbiology* 1-2: 83–93.
- Pinto LMN, Berlitz DL, Castilhos-Fortes R and Fiuza LM (2009/2010) Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotec Ciência Desen* 38: 24-31.
- Polanczyk R e Alvez S (2003) *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociencia* 2: 1-10.
- Porcar M and Juarez-Perez V (2003) PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev* 26:419-432.
- Pridgeon JW, Yildirim-Aksoy M, Klesius PH, Kojima K, Mobley JA, Srivastava KK and Reddy PG (2013) Identification of *gyrB* and *rpoB* gene mutations and differentially expressed proteins between a novobiocin-resistant *Aeromonas hydrophila* catfish vaccine strain and its virulent parent strain. *Veterinary Microbiology* 166: 624–630.
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R and Lopez R (2005) InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res* 33: 116-120.
- Rang J, He H, Wang T, Ding X, Zuo M, Quan M, Sun Y, Yu Z, Hu S and Xia L (2015) Comparative analysis of genomics and proteomics in *Bacillus thuringiensis* 4.0718. *PLOS ONE* 3: 1-15.
- Samir N, Elena MU, Mieke WH, Stefan D, Ivan N and De Maagd R (2006). Carboxy-terminal effects on crystal formation and insecticidal properties of colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Mol Biotechnol* 3: 185-196.
- Sebastião I, Lemes ARN, Figueiredo CS, Polanczyk RA, Desidério JA and Lemos MVF (2015) Toxicidade e capacidade de ligação de proteínas Cry1 a

- receptores intestinais de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesq Agropec Bras* 11: 999-1005.
- Shinoy M, Dennehy R, Coleman L, Carberry S, Schaffer K, Callaghan M, Doyle S and McClean S (2013) Immunoproteomic Analysis of Proteins Expressed by Two Related Pathogens, *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*, during Human Infection. *PLOS ONE* 11:n 1-15.
- Singh G, Sachdev B, Sharma N, Seth R and Bhatnagar RK (2010) Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*. *Appl Environ Microbiol* 21: 7202–7209.
- Takeshita D and Tomita K. Assembly of Q{beta} viral RNA polymerase with host translational elongation factors EF-Tu and -Ts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15733–8.
- Tam LT, Eymann C, Albrecht D, Sietmann R, Schauer F, Hecker M and Antelmann H (2006). Differential gene expression in response to phenol and catechol reveals different metabolic activities for the degradation of aromatic compounds in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol* 8: 1408-1427.
- Vallete-Gely I, Lemaitre B and Bocard F (2008) Bacterial strategies to overcome insect defenses. *Nature Reviews Microbiol* 4: 302-313.
- Walter T and Aronson A (1999). Specific binding of the E2 subunit of pyruvate dehydrogenase to the upstream region of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *J Biol Chem* 274: 7901–7906.
- Wilson DN and Nierhaus KH (2007) The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 187–219.
- Wu D, He J, Gong Y, Chen D, Zhu X, Qiu N, Sun M, Li M and Yu Z (2011) Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *Proteomics* 13: 2580-2591.
- Wu W, Hsu YL, Ko YF and Yao LL (2002) Effect of shear stress on cultivation of *Bacillus thuringiensis* for thuringiensin production. *Applied Microbiol Biotechnol* 1: 175-177.
- Yao Y, Tang H, Su F and Xu P (2015) Comparative genome analysis reveals the molecular basis of nicotine degradation and survival capacities of *Arthrobacter*. *Scientific Reports* 8642: 1-10.

## 6. Discussão Geral

Devido o reconhecido potencial entomopatogênico o *Bacillus thuringiensis* é objeto de pesquisas em praticamente todos os países nos quais são mantidas coleções como fonte de genes que expressam suas proteínas inseticidas.

As coleções apresentam número de isolados diferenciado e estes são normalmente prospectados de diferentes substratos de acordo com Muleta *et al.* (2009) tais como insetos mortos, grãos armazenados e solo que é o substrato mais utilizado e fonte dos isolados da nossa coleção, inicialmente composta 97 bactérias originários de três localidades distintas da região Nordeste. Um passo crucial pós isolamento de bactérias é a caracterização morfológica e para *B. thuringiensis* Ruiz Escudero *et al.* (2004) e Solís (2009) relatam a fácil distinção pelo contorno, coloração, textura entre outras características morfológicas. As características descritas por estes e outros autores foram observadas nos isolados do presente estudo.

Outra etapa importante e principal razão para a montagem de coleções de Bt é prospecção dos genes que expressam proteínas inseticidas e que podem ser utilizados em vários processos biotecnológicos. Esta prospecção é realizada através da técnica de PCR com *primers* consolidados para as diversas classes dos genes conhecidos. Os genes mais comuns em isolados de Bt são os *cry*, responsáveis pela expressão das proteínas também denominadas Cry e que são classificadas até o presente momento em 73 classes segundo Crickmore *et al.* (2014). Estas proteínas são expressas na fase de esporulação com a classe gênica *cry1*, que codificam proteínas ativas contra lepidópteros, sendo apontada por Rosas-García *et al.* (2008) como a mais abundante em Bt. No entanto, estes mesmos autores não detectaram

esta classe em seus isolados, assim como observado no presente estudo, e atribuíram esta ausência a adaptações ambientais.

A classe de proteínas Cry2 é a segunda mais abundante, com frequência estimada entre 71 e 91 % segundo Mendoza *et al.* (2012) e Martínez e Caballero (2002), e assim como para os genes *cry1*, é variável e dependente da localização geográfica. A frequência de genes *cry2* em isolados brasileiros é referida por Pinto e Fiúza (2003) em aproximadamente 2%, esta sendo considerada baixa em comparação ao normalmente descrito e diferenciando significativamente da frequência de 11,34% observada em nossos isolados. As frequências dos genes *cry1* e *cry2* podem ser superadas pela do gene *cry9* como observado por Rosas-García *et al.* (2008) e corroborando pelos nossos resultados que apresentaram 12,40% de frequência deste gene, estando portanto de acordo com os resultados de Wang *et al.* (2003).

A confirmação do potencial patogênico de isolados de Bt é normalmente realizada por bioensaios como os realizados por Campanini *et al.* (2012) que observaram porcentagem de toxicidade variando entre 3 e 100% para *D. saccharalis* entre isolados autóctones brasileiros; valores entre os quais está inserida a porcentagem de 20,05% do nosso isolado mais patogêncio para esta mesma espécie. Um fato importante observado em nossos testes de patogenicidade foi a porcentagem de aproximadamente 69,72% da estirpe HD-1 também observada por Gitahy *et al.* (2007), embora esta seja considerada uma estirpe de alta patogenicidade para lepidópteros. Estes valores de patogenicidade observados para a estirpe HD-1 podem sugerir uma modificação em nível dos receptores específicos das proteínas Cry nos insetos testados que levaria a um certo grau de resistência na população utilizada para os ensaios.

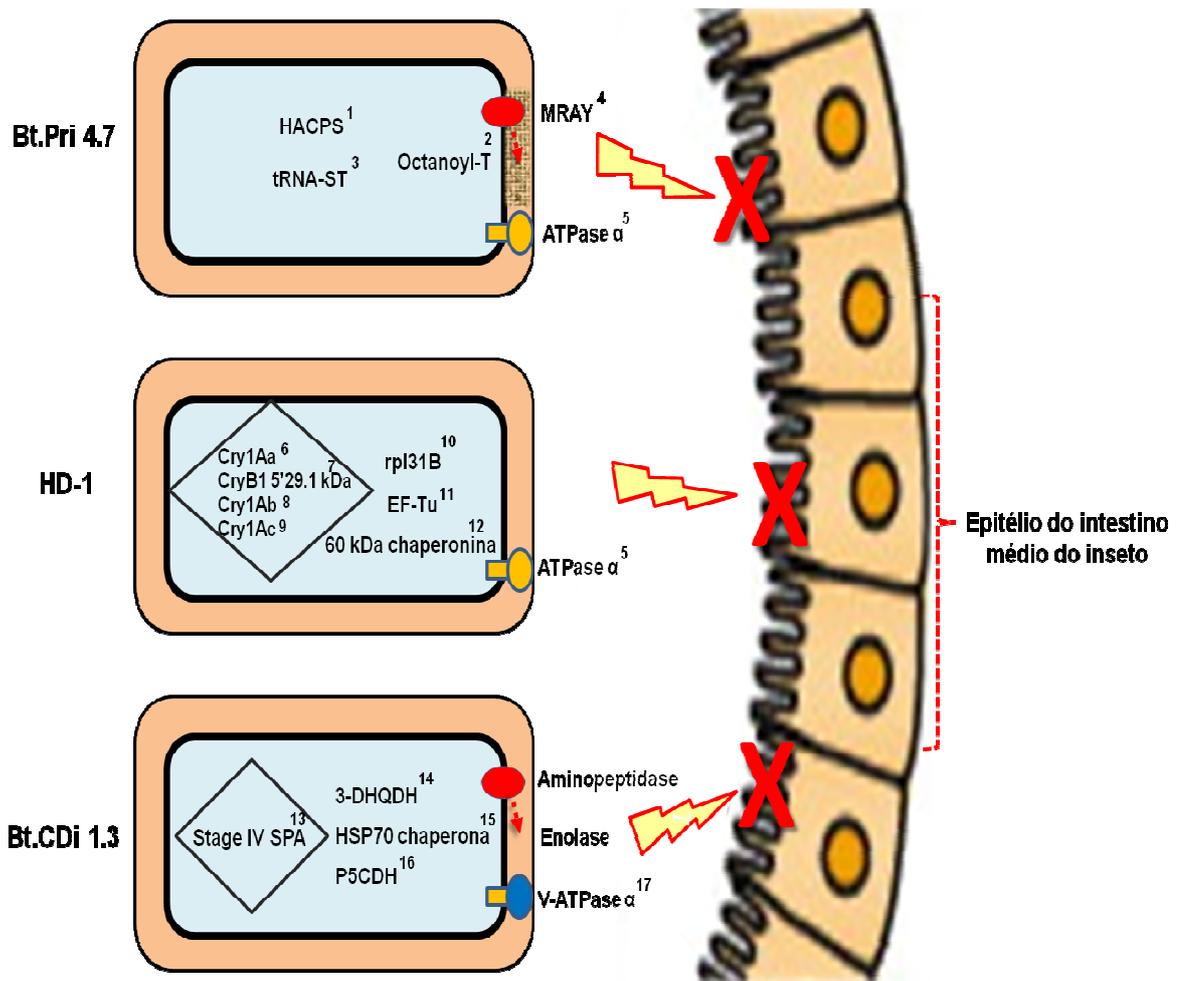
A patogenicidade de isolados de Bt não pode ser unicamente relacionada à presença de genes *cry*, pois estes também podem produzir outras classes de proteínas e fatores de virulência extras que também apresentam atividade inseticida. Entre estas proteínas inseticidas destacam-se as endotoxinas citolíticas (proteínas Cyt) e as vegetativas (Vip) que são sintetizadas respectivamente na fase de esporulação assim com as proteínas Cry, embora não apresentem homologias como relatado por Bravo *et al.* (2011); e no sobrenadante da cultura tanto na fase vegetativa como na fase de esporulação como descrito por Estruch *et al.* (1997). Além das proteínas Cyt e Vip existem outras toxinas produzidas por Bt e que já foram descobertas a exemplo da  $\beta$ -exotoxina, conhecida atualmente como huringiense e descrita por Heimpel em 1967 e Parasporina (Mizuki *et al.* 2000) além de enterotoxinas, fosfolipases, hemolisinas e quitinases descobertas por Höfte e Whiteley (1989); De Maagd *et al.* (2001) e relacionadas a patogenicidade do Bt.

Para compreender os mecanismos e os fatores de virulência envolvidos na patogênese ocasionada pelo Bt, grupos de pesquisa passaram a investigar o proteoma de isolados promissores. Li *et al.* (2012) e Gong *et al.* (2012) analisaram isolados em diferentes fases do ciclo biológico e identificaram proteínas de regulação, metabolismo, formação de cristal e esporo, entre outras. No presente estudos, a proteômica foi utilizada para auxiliar na compreensão dos diferentes graus de patogenicidade observados em isolados que apresentam a mesma classe de genes *cry* e identificar proteínas que possam estar diretamente envolvidas no processo de patogênese. Foram identificadas em nossas análises proteínas com funções distintas e que estão de alguma forma envolvidas na ação patogênica do Bt tais como fatores de alongamento G e Tu mencionadas por DeVecchio *et al.* (2006) e Yokoyama (2010) respectivamente, como agente imunogênico e regulador da

síntese de proteínas relacionadas a translação; enolase apontada por Antúnez *et al.* (2011) como fator de virulência em muitos organismos, a shikimato quinase que segundo Liu *et al.* (2010) é envolvida diretamente com a produção de turingienseína que contribui para toxicidade global de Bt; a proteína ribossomal S2 que Singh *et al.* (2010) consideram como mediador da toxicidade das proteínas Vip3A, entre outras.

As proteínas identificadas em Bt.Pri 4.7 e Bt.CDi 1.3, isolados mais patogênicos para *D. saccharalis* e com genes *cry2* e *cry9*, respectivamente, e na estirpe padrão de alta virulência para lepidópteros HD-1, sugerem mecanismos diferenciados de ação entomopatogênica (Figura 10). O isolado Bt.Pri 4.7 aparentemente utiliza pra a ação patogênica, proteínas presentes no citoplasma e na membrana plasmática, enquanto a HD-1, também com gene *cry2*, provavelmente utiliza proteínas de citoplasma e também as proteínas Cry sintetizadas. O isolado Bt.CDi 1.3, além de apresentar proteínas de membrana plasmática, citoplasma e envolvidas no processo de esporulação/formação de proteína Cry, possivelmente utiliza proteína extracelular para auxiliar no mecanismo de ação.

As proteínas identificadas evidenciam o potencial da análise proteômica como ferramenta para auxiliar na compreensão dos fatores de virulência envolvidos no mecanismo de patogênese de isolados de Bt e contribui para o entendimento dos diferentes graus de patogenicidade apresentados.



**Figura 1:** Modelo proposto para o possível mecanismo de ação dos isolados Bt.Pri 4.7, Bt.CDi 1.3 e da estirpe padrão HD-1. **Proteínas de Bt.Pri 4.7:** <sup>1</sup>Holo-acil-transportador de proteína sintase; <sup>2</sup>Octanoil transferase; <sup>3</sup>Sulfurtransferase tRNA; <sup>4</sup>Fosfo-N-acetilmurâmico-pentapeptídeo transferase; <sup>5</sup>ATP sintase subunidade α. **Proteínas da estirpe HD-1:** <sup>6</sup>Proteína de cristal pesticida Cry1Aa; <sup>7</sup>Proteína desconhecida de 29.1 kDa da região cryB1 5'; <sup>8</sup>Proteína de cristal pesticida Cry1Ab; <sup>9</sup>Proteína de cristal pesticida Cry1Ac; <sup>10</sup>Proteína ribossomal 50S L31B; <sup>11</sup>Fator de alongamento Tu; <sup>12</sup>Chaperonina 60 kDa. **Proteínas de Bt.CDi 1.3:** <sup>13</sup>Proteína A do estágio IV de esporulação; <sup>14</sup>3-desidroquinase desidratase; <sup>15</sup>Chaperonina HSP70; <sup>16</sup>1-Pirrolina-5-Carboxilato desidrogenase; <sup>17</sup>Subunidade α da V-ATP sintase. Figura do epitélio do intestino médio de Raymond *et al.*, (2010), com modificações.

## 7. Conclusões Gerais

1. As metodologias aplicadas para o isolamento e a caracterização foram eficientes para montagem da coleções de *Bacillus thuringiensis*.
2. A prospecção de genes *cry* nos 97 isolados que compõem a coleção revelou a presença dos genes *cry2* e *cry9* em 11,34% e 12,37% dos isolados, respectivamente.
3. Os isolados portadores dos genes *cry2* e *cry9* apresentam patogenicidade entre 3,47 e 20,05% para *D. saccharalis* e podem ser promissores no combate de outras espécies de insetos das ordens Diptera e Lepidoptera.
4. A comparação proteômica diferencial de isolados portadores de genes *cry2* e *cry9* com maior e menor grau de patogenicidade para *D. saccharalis* propiciou a identificação de proteínas relacionadas com a atividade patogênica de *Bacillus thuringiensis* abrindo novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nos processos de patogênese desta bactéria.

## 8. Referências Bibliográficas

- Alfazairy AA, El-Ahwany AM, Mohamed EA, Zaghloul HA and El-Helow ER (2012) Microbial control of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisd.) by Egyptian *Bacillus thuringiensis* isolates. *Folia Microbiol (Praha)* (2):155-62.
- Almeida LC, Dias Filho MM e Arrigoni EDB (2007) Primeira ocorrência de *Telchin licus* (Drury, 1773), a broca gigante da cana-de-açúcar, no Estado de São Paulo. *Revista de Agricultura* 5: 223– 225.
- Angelo EA; Vilas-Bôas GT and Castro-Gómez RJH (2010) *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação *Bacillus thuringiensis*: general characteristics and fermentation. *Ciências Agrárias* 4: 945-958.
- Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) (2012) DOSSIÊ ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos Agrotóxicos na Saúde. Rio de Janeiro, World Nutrition, pp 1-98.
- Bobrowski VL, Fiuza LM, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH (2003) Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural* 1: 843-850.
- Boonserm P, Davis P, Ellar DJ and Li J (2005) Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J Mo Biol* 348: 363–382.
- Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C and Lescar J (2006) Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J Bacteriol* 9:3391-401.
- Botelho PSM and Macedo N (2002) *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In Parra JRP, Botelho PSM, Corrêa-Ferreira BS and Bento JMS (eds.) *Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. Manole, São Paulo, pp 409-426.
- Brandão, A. Cana-de-açúcar: álcool e açúcar na história e no desenvolvimento social do Brasil. Brasília: Horizonte. 1985.
- Bravo A (1997) Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol* 9: 2793-801.
- Bravo A, Gill SS and Soberon M (2005) *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and Use. *Compreh Mol Insect Science* 6: 175-206.
- Bravo A, Gill SS and Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 4: 423-35.
- Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS and Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biology* 41: 423–431.
- Bravo A and Soberón M (2008) How to cope with insect resistance to Bt toxins? *Trends Biotechnol* 10: 573-9.
- Brodeur J (2010) Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens. *Evolutionary Applications* 5: 470-480.
- Cândido Da Silva G (2010) A representação sócio-econômica da cana-de açúcar-para a região da zona da mata de Pernambuco. *Geo Ambiente* 14: 136-157.

- Capalbo DMF, Vilas-Bôas GT, Arantes OMN and Suzuki MT (2005) *Bacillus thuringiensis*: Formulações e Plantas Transgênicas. Biotecnol Ciência Desenvol 34, 2005.
- Cappello M, Bungiro RD, Harrison LM, Bischof LT, Griffiths JS, Barrows BD and Aroian RV (2006) A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicus*. Proc National Academy Sciences 41: 15154-15159.
- Carlson CR, Johansen T, Lecadec MM and Kolsto AB (1994) Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. Applied Environ Microbiol 6: 1719-1725.
- Cheavegatti-Gianotto A, Abreu HMC, Arruda P, Bessalho Filho J, Burnquist W L, Creste S, Ciero L, Ferro JA, Figueira AVO, Filgueiras TS, Grossi-de-Sá MF, Guzzo EC, Hoffmann HP, Landell MGA, Macedo N, Matsuoka S, Reinach FC, Romano E, Silva WJ, Silva Filho MC and Ulian EC. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil. Tropical Plant Biol 4:62–89.
- Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira – Cana-de-açúcar, v. 2 – Safra 2015/16, n.2 – Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-27, dez. 2014.
- Companhia Nacional de Abastecimento. Perspectivas para a agropecuária, v.2, Safra 2014/2015. Brasília, 2014.
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Bravo A, Dean DH (2013) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível: < [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) (Março 6, 2013).
- Cruz I (2007) A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. Embrapa 1-12.
- Da Silva CCM, Marques EJ, Oliveira JV, Valente ECN (2012) Preference of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) for *Diatraea* (Lepidoptera: Crambidae). Acta Scientiarum Agronomy 1: 23-27.
- Da Silva AP, Pedrosa EMR, Chaves A, Maranhão SRVL., Guimarães LMPS e Rolim MM (2012) Reação de variedades de cana-de-açúcar ao parasitismo de *Meloidogyne incognita* e *M. Enterolobii*. Rev Bras Ciênc Agrár 7: 814-819.
- De Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N and Schnepf HE (2003) Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. Annual Review Genetics 37: 409-433.
- De Maagd RA, Bravo A and Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet 4: 193-9.
- Delécluse A, Juárez-Perez V and Berry C (2000) Vector-active toxins: structure and diversity. In: Charles JF, Delécluse A, nielsen-leroux C (eds) Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht pp 101-125.
- Dutton A, Romeis J and Bigler F (2003) Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: *Bt*-maize expressing Cry1Ab as a case study. BioControl 48: 611–636.

- Estruch J, Warren G, Mullins M, Nye G and Craig JK (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings National Academy Sciences* 93: 5389–5394.
- Estruch JJ, Carozzi NB, Desai N, Duck NB, Warren GW and Koziel MG (1997) Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 2: 137-141.
- Fillinger U, Knols BG and Becker N (2003) Efficacy and efficiency of new *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations against Afrotropical anophelines in Western Kenya. *Trop Med Int Health* 1: 37-47.
- Fiuza LM, Schünemann R, Pinto LM and Zanettini MH (2012) Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz J Biol* 2: 363-369.
- Franceschini M, Guimarães AP, Camassola M, Frazzon AP, Baratto CM, Kogler V, Vanusa da Silva M, Dutra V, Nakazoto L, Castro L, Santi L, Vainstein MH and Schrank A (2001). Biotecnologia aplicada ao controle biológico: O entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 23: 32-37.
- Freitas MRT, Silva EL, Mendonça AL, Silva CE, Fonseca APP, Mendonça AL, Santos JS, Nascimento RR and Sant'ana AEG (2007) The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. *Fl Entomol* 90: 309-313.
- Galitsky N, Cody V, Wojtczak A, Ghosh D, Luft JR, Pangborn W and English L (2001) Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 8: 1101-1109.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA., Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS and Omoto C (2002) *Entomologia agrícola*. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Garcia, JF (2013) *Manual de identificação de pragas da cana*. Campinas, 219p.
- Gatehouse AMR, Ferry N, Edwards MG and Bell HA (2011) Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Phil Trans R Soc B* 366: 1438–1452.
- Gill SS, Singh GJ and Hornung JM (1987) Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. *Infect Immun* 55: 1300–1308.
- Gitahy PM, Souza MT, Monnerat RG, Arrigoni EB and Baldani JI (2007) Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 531-537.
- Glare TR and O'callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. John Wiley & Sons 350 p.
- Gong Y, Li M; Xu D, Wang H, He J, Wu D, Chen D, Qiu N, Bao Q, Sun M and Yu Z (2012) Comparative proteomic analysis revealed metabolic changes and the translational regulation of Cry protein synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Proteomics* 75: 1235 – 1246.

- Grossi-de-Sa MF, Quezado de Magalhaes M, Silva MS, Silva SM, Dias SC, Nakasu EY, Brunetta PS, Oliveira GR, Neto OB, Sampaio de Oliveira R, Soares LH, Ayub MA, Siqueira HA, Figueira EL (2007) Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cry1ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J Biochem Mol Biol* 5: 773-82.
- Guz K, Bugla-Ploskonska G and Doroszkiewicz W (2009) The occurrence, biodiversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from the insect pest *Lymantria dispar* (Poland). *Polish Journal of Microbiology* 2: 155-161.
- Habib MEM and Andrade CFS (1998) Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, SB (ed) Controle Microbiano de Insetos. 2seg edição.. FEALQ, Piracicaba, pp 383-446.
- Hamm JC, Sidhu JK, Stout MJ, Hummel NA and Reagan TE (2012) Oviposition Behavior of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) on Different Rice Cultivars in Louisiana. *Environmental Entomology* 3: 571-577.
- Hansen BN and Salamitou S (2000) Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Le RC (eds) Entomopathogenic *Bacteria*: From Laboratory to Field Application. Kluwer academic Publish, Netherlands, pp 41-44.
- Heimpel AM (1967) A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annual Review of Entomology* 12: 287-322.
- Hernández C, Martínez C, Porcar H and Ferré J (2003) Correlation Between Serovars of *Bacillus thuringiensis* and Type I Exotoxin Production. *Journal of Invert Pathol* 1: 57-62.
- Herrera-Estrella L (1999) Transgenic plants for tropical regions: Some consideration about their development and their transfer to the small farmer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 5978-5981.
- Höfte H and Whiteley HR (1989) Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* 53: 242-255.
- Homrich MS, Passaglia LMP, Pereira JF, Bertagnolli PF, Pasquali G, Zaidi MA, Altosaar I and Bodanese-Zanettini MH (2008). Resistance to *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepdoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. *Genetics and Molecular Biology* 31: 522-531.
- Honório NA, Câmara DCP e Calvet GA, Brasil P (2015) Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cad Saúde Pública* 5: 906-908.
- Ishiwata S (1901) On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho*, 114: 1-5.
- James C (2015) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA brief No. 49. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY.

- Kabaluk JT, Svircev AM, Goette IMS, Woo SG (2010) The use and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide. IOBC, Global, 108 pp.
- Kathage J and Qaim M (2012) Economic impacts and impact dynamics of Bt (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India. Proc Natl Acad Sci USA 29: 11652-11656.
- Kitami M, Kadotani T, Nakanishi K, Atsumi S, Higurashi S, Ishizaka T, Watanabe A and Sato R (2011) *Bacillus thuringiensis* Cry toxins bound specifically to various proteins via domain III, which had a galactose-binding domain-like fold. Biosci Biotechnol Biochem 2: 305-12.
- Knaak N, Franz AR, Santos GF and Fiuza LM (2010) Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. *Smith Caterpillars* (Lepidoptera, Noctuidae). Braz J Biol 3: 677-684.
- Knowles BH (1994) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. Advances in Insect Physiology 2: 275-308.
- Konecka E, Baranek J, Hrycak A and Kaznowski A (2012) Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. The Scientific World Journal :1: 1-5.
- Konecka E, Kaznowski A, Ziemnicka J and Ziemnicki K (2006) Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydra pomonella* L. Journal of Invert Patho 94: 56- 63.
- Kotze AC, O'grady J, Gough JM, Pearson R, Bagnall NH, Kemp DH and Akhurst RJ (2005) Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. Int J Parasitol 9: 1013-1022.
- Krishnan K, Ker JEA, Mohammed SM and Nadarajah VD (2011) Identification of Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as a binding protein for a 68-kDa *Bacillus thuringiensis* parasporal protein cytotoxic against leukaemic cells. Journal of Biomedical Science 1: 1-11.
- Kumar S, Chandra A and Pandey KC (2008) *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. J Environ Biol 5: 641-53.
- Kumar S and Yalaw AW (2012) Economic Impacts of Climate Change on Secondary Activities: A Literature Review. Low Carbon Economy 3: 39-48.
- Lereclus D, Agaisse H, Grandvalet C, Salameitou S and Gominet M (2000) Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. Int J Med Microbiol 4-5: 295-9.
- Lereclus D, Delécluse A and Lecadet MM (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In Entwistle PF, Cory JS, Baley MJ, Higgs S (eds) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. West Sussex, John Wiley & Sons, pp 37-69.
- Li J, Pandelakis AK and Ellar DJ (1996) Structure of the mosquitocidal d-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation. J Mol Biol 257: 129–152.

- Lima Filho M e Lima JOC (2001) Massas de ovos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em cana-de-açúcar: Número de ovos e porcentagem de parasitismo por *Trichogramma spp.* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em condições de laboratório. *Neotropical Entomology* 3: 483-488.
- Loguercio LL, Barreto ML, Rocha TL, Santos CG, Teixeira FF and Paiva E (2002) Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. *Journal of Applied Microbiology* 93: 269–277.
- Loguercio LL, Barreto ML, Rocha TL, Santos CG, Teixeira FF and Paiva E (2002) Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip –derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. *Journal of Applied Microbiology* 93: 269–277.
- Macedo N and Botelho PSM (1988) Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). *Brasil Açucareiro* 2: 2- 11.
- Maduell P, Armengol G, Liagostera M, Lindow S and Orduz S (2007) Immigration of *Bacillus thuringiensis* to beamn leaves from soil inoculum or distal plant parts, *J Appl Microbiol* 103: 2593-2600
- Mahon RJ, Downes SJ and James B (2012) Vip3A Resistance Alleles Exist at High Levels in Australian Targets before Release of Cotton Expressing
- Marcondes CB and Ximenes MFFM (2015) Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes* (Stegomyia) mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop*, 7pp
- Margarido L AC e Castilho H J (1988) *Brasil Açucareiro* 2: 41-46.
- This Toxin. *Plos One* 6: 1-6.
- Martínez C and Caballero P (2002) Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *J Appl Microbiol* 4: 745-52.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Assessoria de Gestão Estratégica. *Brasil Projeções do Agronegócio 2010/2011 a 2020/2021*, Brasília, junho de 2011.
- Miranda LLD, Gil MA and Menegatti CC (2003) Danos causados por nematóides a variedades de cana-de-açúcar em cana planta. *Nematologia Brasileira* 27: 69-73.
- Mishra J, Tewari S, Singh S, Arora NK (2015) Biopesticides: Where We Stand? *Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets* 37-75.
- Mizuki E, Park YS, Saitoh DH, Yamashita S, Akao T, Higuchi K and Ohba M (2000) Parasporin, a Human Leukemic Cell-Recognizing Parasporal Protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7: 625–634.
- Monnerat RG, Batista AC, Medeiros PTS, Martins E, Melatti V, Praça L, Dumas V, Demo C, Gomes ACM, Falcao R, Brod CS, Silva-Werneck JO and Berry C (2007) Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against

- Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biolog Contr* 41: 291-295.
- Morse RJ, Yamamoto T and Stroud RM (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 5: 409-417.
- Muniady S, Rathinam X and Subramaniam S (2011) Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from chicken manure samples. *African Journal Microbiol Resear.*20: 3131-3137.
- Ohba M, Mizuki E and Uemori A (2009) Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research* 1: 427-434.
- Oliveira HN (2009) Pragas da Cana-de-Açúcar Podem ser Introduzidas em Mato Grosso do Sul e Causar Prejuízos à Cultura. Comunicado Técnico 4p.
- Park HW, Bideshi DK and Federici BA (2000) Molecular genetic manipulation of truncated Cry1C protein synthesis in *Bacillus thuringiensis* to improve stability and yield. *Applied and Environ Microbiol* 10: 4449-4455.
- Pérez C, Fernández LE, Sun J, Folch JL, Gill SS, Soberón M and Bravo A (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci* 102: 18303–18308.
- Pérez VJ. *Genética y Biología Molecular de Bacillus thuringiensis*. In: Bravo A, Ceron J (Eds). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia, 2004, p.207-232.
- Pigott CR and Ellar DJ (2007) role of receptors in *bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol Mol Biology Rev* 2: 255–281.
- Pineda S, Schneider MI, Smagghe G, Martínez AM, Del Estal P, Viñuela E, Valle J and Budia F (2007) Lethal and sublethal effects of methoxyfenozide and spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 3: 773-80.
- Pinto AS, Cano MA.; Santos EM (2006) A broca-dacana, *Diatraea saccharalis*. In: Pinto AS, Batista Filho A, Ginarte CMA, Santos EM, Arrigoni EB, Stingel E, Tavares FM, Almeida JEM, Garcia JF, Bento JMS, Machado L A, Macedo LPM, Leite LG.; Almeida LC, Cano MAV, Botelho PSM (eds). *Controle de pragas da cana-de-açúcar*. Sertãozinho: Biocontrol, 2006. p. 9-13
- Pinto LMN, Berlitz DL, Castilhos-Fortes R and Fiuza LM (2009/2010) Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 38: 24-31.
- Polanczyk RA, Almeida LC, Padulla L and Alves SB (2004) Pragas de Cana-de-açúcar X métodos alternativos de controle. *Manejo de pragas de cana-de-açúcar, monitoramento, controle biológico e transgenia visando ao controle de praga de solo*. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 33: 14-17.
- Porcar M and Caballero P (2000). Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. *J Appl Microbiol* 2: 309-16.
- Porcar M, Juarez-Perez V (2003) PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev* 26: 419-432.

- Promdonkoy B and Ellar DJ (2003) Investigation of the poreforming mechanism of a cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J* 374: 255–259.
- Regis L, Oliveira CMF, Silva-Filha MH, Silva SB, Maciel A and Furtado AF 2001. Bacter- iological larvicides of diptera disease vectors. *Trends Parasitol* 17: 377-380.
- Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV, Paes NS, Silva MCM and Grossi-De-Sá MF (2005) Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Comunicado Técnico* 136, Embrapa.
- Rosas-García NM (2006) Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. *Pest Manag Sci* 9: 855-861.
- Samir N, Elena MU, Mieke WH, Stefan D, Ivan N and De Maagd RA (2006) Carboxy-terminal effects on crystal formation and insecticidal properties of colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins. *Molecular Biotechnology* 3: 185-196.
- Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T and Christou P (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J* 3: 283-300.
- Santos FP, Lopes J, Vilas-Bôas GT and Zequi JA (2012) Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with potential for control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *Acta Trop* 1: 64-70.
- Sattar S, Biswas PK, Hossain MA, Maiti MK, Sen SK and Basu A (2008) Search for vegetative insecticidal protein (VIPs) from local isolates of *Bacillus thuringiensis* effective against lepidopteran and homopteran insect pest. *Journal of Biopestic* 2: 216-222.
- Schnepf HE, Crickmore N, Van Rue J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR and Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal protein. *Microbiol Mol Biology Rev* 3: 775-806.
- Shelton AM, Zhao JZ and Roush RT (2002) Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review Entomology* 47: 845-881.
- Soberón M, Gill SS and Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci* 8: 1337-49.
- Svedese VM, Lima EÁLA and Porto ALF (2013) Horizontal Transmission and Effect of the Temperature in Pathogenicity of *Beauveria bassiana* Against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Braz Arch Biol Technol* 3: 413-419.
- Swiecicka I, Fiedoruk K and Bednarz G (2002) The occurrence and properties of *Bacillus thuringiensis* isolated from free-living animals. *Lett Appl Microbiol* 3: 194-198.
- Szmrecsanyi T (1979) O planejamento da agroindústria canavieira do Brasil: 1930-1975.

- Thirtle C, Beyers L, Ismael Y and Piesse J (2003) Can GM-technologies help the poor?: the impact of Bt Cotton in Makhathini Flats and KwaZulu-Natal, South Africa. *World Development* 4: 717-732.
- Toppa EVBI, Jadoski CJ, Julianetti A, Hulshof T, Ono EO and Rodrigues JD (2010) Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum Officinarum* L.). *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia* 3: 215-221.
- Trtikova M, Wikmark OG, Zemp N, Widmer A and Hilbeck A (2015) Transgene Expression and Bt Protein Content in Transgenic Bt Maize (MON810) under optimal and stressful environmental conditions. *PLOS ONE*, p.1-9.
- União da Indústria de Cana-de-açúcar – UNICA. Relatório de Sustentabilidade. 2010.
- Uribe D, Martinez W and Cerón J (2003) Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J Invertebr Pathol* 2: 119-27.
- Vacari AM, De Bortoli SA and Torres JB (2012) Relation between predation by *Podisus nigrispinus* and developmental phase and density of its prey, *Plutella xylostella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 1: 30-37.
- Valadares-Ingliš MCC, Souza MT and Shiler W (1998) Engenharia genética de microorganismos agentes de controle biológico. In: Mello IS, Azevedo JL (eds). *Controle biológico*. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. p. 102-225.
- Vallete-Gely I, Lemaitre B and Boccard F (2008) Bacterial strategies to overcome insect defenses. *Nature Reviews: Microbiology* 4: 302-313.
- Van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal Invert Patho* 1: 1-16.
- Vilas-Bôas GT and Lemos MVF (2007) Diversity of genes *cry* and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Canadian Journal of Microbiology* 8: 605-613.
- Wang J, Boets A, Van RIE J and Ren G (2003) Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J Invertebr Pathol* 1: 63-71.
- Waquil JM, Dourado PM, Carvalho RA, Oliveira WS, Berger GU, Head GPh e Martinelli S (2013) Manejo de lepidópteros-praga na cultura do milho com o evento Bt piramidado Cry1A.105 e Cry2Ab2. *Pesq agropec bras* 12: 1529-1537.
- Werren GW (1997) Vegetative insecticidal protein: Movel proteins for control of corn pests. In: Carozzi NB, Koziel M (eds). *Advances in insect control, the role of transgenic plants*. Taylors e Francis Ltda., p.109-12.
- Whitehous ME, Wilson ALJ and Constable GA (2007) Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic. *Australian Jour Agricul Res* 58: 273-285.
- Wong SYR (2010) *Bacillus Thuringiensis* Parasporal Proteins And Their Effect On Human Cancer Cells: An Overview. *leJSME* 2: 3-9.

- Wu K, Mu W, Liang G and Guo Y (2005) Regional reversion of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is associated with the use of Bt cotton in northern China. *Pest Manag Sci* 5: 491-498.
- Xiaohui Li, Xuezhi Ding, Liqiu Xia, Yunjun Sun, Can Yuan, and Jia Yin (2012) Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* Strain 4.0718 at different growth phases. *The ScientificWorld Journal*, p.1-10.
- Yamamoto T and Dean DH (2000) Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Le Roux C (eds). *Etmopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Netherlands: kluwer Academic Publisher, pp 81-100.
- Yirefur F, Tana T, Tafesse A and Zekarias Y (2013) Weed interference in the sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantations of Ethiopia. *Agriculture: Forestry and Fisheries* 6: 239-247.
- Yu CG, Mullins MA, Warren GW, Koziel MG and Estruch JJ (1997) The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein vip3a lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied Environ Microbiol* 2: 532–536.
- Yu X, Liu T, Liang X, Tang C, Jun Z, Wang S, Li S, Deng Q, Wang L, Zeng A and Li P (2011) Rapid detection of vip 1-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel *vip* binary toxin gene. *FEMS Microbiol Letters* 1: 30-36.
- Zarbin PHG e Rodrigues MACM (2009) Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. *Quim* 32: 722-731.

## **Anexo I**

**Tabela 1:** Características morfofisiológicas dos isolados de amostras de solos 48h após plaqueamento em meio Valicente e Barreto (2003).

Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	T(mm) <sup>2</sup>	FC <sup>3</sup>	CC <sup>4</sup>	T <sup>5</sup>	C <sup>6</sup>	EL <sup>7</sup>	CON <sup>8</sup>
Bt.CDi 1.1	<48	4,24	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.2	<48	7,11	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.3	<48	4,95	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.4	<48	3,55	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.5	<48	5,77	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.6	<48	4,54	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.7	<48	4,57	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.8	<48	3,51	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.9	<48	4,28	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.10	<48	4,03	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.11	<48	3,56	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 2.1	<48	15,35	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 2.2	<48	11,16	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 2.3	<48	8,41	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 2.4	<48	11,37	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 4.1	<48	14,12	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 4.2	<48	8,59	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 4.3	<48	4,95	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 4.4	<48	10,38	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 4.5	<48	5,52	ND	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 4.6	<48	5,37	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.1 10 <sup>-1</sup>	<48	8,07	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.2 10 <sup>-1</sup>	<48	13,08	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.3 10 <sup>-1</sup>	<48	2,66	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.4 10 <sup>-1</sup>	<48	8,82	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.5 10 <sup>-1</sup>	<48	7,25	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.6 10 <sup>-1</sup>	<48	2,84	C	I	O	B	P	LC
Bt.CDi 1.7 10 <sup>-1</sup>	<48	9,65	ND	I	O	B	P	LC
Bt.Bre	<48	4,54	C	I	O	B	P	LC
Bt.Lab 1	<48	4,09	C	I	O	B	P	LC
Bt.Lab 2	<48	5,00	C	I	O	B	P	LC

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 48h; <sup>2</sup>tamanho; <sup>3</sup>forma da colônia (C: circular, ND: não definida); <sup>4</sup>contorno da colônia (R: regular, I: irregular); <sup>5</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trans: translúcida); <sup>6</sup>cor (B: branco acinzentado, I: indeterminado); <sup>7</sup>elevação (P:Plana, A: achatada, C: cúpula); <sup>8</sup>consistência (LC: ligeiramente consistente, C: consistente).

**Tabela 2:** Características morfofisiológicas dos isolados de amostras de solos 24h após plaqueamento em meio Valicente e Barreto (2003).

Isolados	AC(h) <sup>1</sup>	T(mm) <sup>2</sup>	FC <sup>3</sup>	CC <sup>4</sup>	T <sup>5</sup>	C <sup>6</sup>	EL <sup>7</sup>	CON <sup>8</sup>
Bt.Pri 1.1	<24	3,30	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.2	<24	3,28	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.3	<24	3,07	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.4	<24	3,16	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.5	<24	2,31	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.6	<24	3,27	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.7	<24	4,27	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.8	<24	3,52	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.9	<24	5,34	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.10	<24	3,69	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.11	<24	3,39	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 1.12	<24	2,77	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.1	<24	3,32	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.2	<24	3,79	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.3	<24	3,69	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.4	<24	2,36	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.5	<24	2,35	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.6	<24	2,67	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.7	<24	2,79	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.8	<24	2,90	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.9	<24	4,01	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.10	<24	2,51	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.11	<24	4,14	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.12	<24	1,90	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.13	<24	2,33	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.14	<24	2,29	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.15	<24	3,13	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.16	<24	1,67	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.17	<24	1,68	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 2.18	<24	1,75	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 3.1	<24	3,09	C	I	O	B	P	LC

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 48h; <sup>2</sup>tamanho; <sup>3</sup>forma da colônia (C: circular, ND: não definida); <sup>4</sup>contorno da colônia (R: regular, I: irregular); <sup>5</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trans: translúcida); <sup>6</sup>cor (B: branco acinzentado, I: indeterminado); <sup>7</sup>elevação (P:Plana, A: achatada, C: cúpula); <sup>8</sup>consistência (LC: ligeiramente consistente, C: consistente).

**Tabela 3:** Características morfofisiológicas do isolados de amostras de solos 24h após plaqueamento em meio Valicente e Barreto (2003).

<b>Isolados</b>	<b>AC(h)<sup>1</sup></b>	<b>T(mm)<sup>2</sup></b>	<b>FC<sup>3</sup></b>	<b>CC<sup>4</sup></b>	<b>T<sup>5</sup></b>	<b>C<sup>6</sup></b>	<b>EL<sup>7</sup></b>	<b>CON<sup>8</sup></b>
Bt.Pri 3.3	<24	3,46	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 3.5	<24	4,60	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 3.6	<24	3,60	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 3.8	<24	4,48	ND	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 3.9	<24	2,90	ND	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.1	<24	4,27	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.2	<24	1,82	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.3	<24	2,24	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.4	<24	3,19	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.5	<24	2,47	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.6	<24	3,25	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.7	<24	2,48	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.8	<24	1,90	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.9	<24	3,38	ND	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.10	<24	2,76	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.11	<24	3,83	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.12	<24	3,30	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.13	<24	1,76	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.14	<24	3,11	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.15	<24	2,58	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.16	<24	2,07	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.17	<24	2,57	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.18	<24	1,92	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.19	<24	2,96	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.20	<24	2,42	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.21	<24	2,33	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.22	<24	2,16	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.23	<24	2,53	ND	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.24	<24	3,70	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.25	<24	2,76	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.26	<24	2,48	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.27	<24	3,01	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.28	<24	2,87	C	I	O	B	P	LC

## Continuação

Bt.Pri 4.29	<24	2,82	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.30	<24	2,11	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.31	<24	4,73	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.32	<24	4,00	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.33	<24	3,20	C	I	O	B	P	LC
Bt.Pri 4.34	<24	3,11	ND	I	O	B	P	LC

<sup>1</sup>Aparecimento da colônia: < 48h; <sup>2</sup>tamanho; <sup>3</sup>forma da colônia (C: circular, ND: não definida); <sup>4</sup>contorno da colônia (R: regular, I: irregular); <sup>5</sup>transparência (O: opaca; T: transparente, Trans: translúcida); <sup>6</sup>cor (B: branco acinzentado, I: indeterminado); <sup>7</sup>elevação (P:Plana, A: achatada, C: cúpula); <sup>8</sup>consistência (LC: ligeiramente consistente, C: consistente).

## **Anexo II**

## Metodologia

Para esta etapa de caracterização genética pela técnica de PCR foram utilizados os *primers* Cry3, Cry7/8, Vip3A, Cyt1 e Cyt2 (Tabela 1). As reações de amplificação e análise dos produtos finais foram realizadas conforme mencionado no Capítulo 1. A estirpe selvagem de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (HD-1) e *Bt israelenses* foram utilizadas como controles positivos para *vip3A* e demais iniciadores, respectivamente.

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para amplificação gênica.

Gene	Primers	Sequência	Fragmento estimado (pb)	Ta (°C)	Referência
<i>cry3</i>	Cry3(+)	5'- CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC -3'	620 kb	51	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)
	Cry3(-)	5'- CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT -3'			
<i>cry7 e 8</i>	Cry7/8II(+)	5'- AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC -3'	376 kb	48	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997).)
	Cry7/8(-)	5'- CTTCTAAACCTTGACTACTT -3'			
<i>cryVip3A</i>	Vip3A(+)	5'- CCTCTATGTTGAGTGATGTA-3'	1000 k	48	Jain <i>et al.</i> (2012)
	Vip3A(-)	5'- CTATACTCCGCTTCACTTGA -3'			
<i>cyt1</i>	Cyt1(+)	5'- AACCCCTCAATCAACAGCAAGG -3'	525 kb	55	Jain <i>et al.</i> (2012)
	Cyt1(-)	5'- GGTACACAATACATAACGCCACC -3'			
<i>cyt2</i>	Cyt2(+)	5'- AATACATTTCAAGGAGCTA -3'	469	45	Jain <i>et al.</i> (2012)
	Cyt2(-)	5'- TTTCATTTAACTTCATATC -3'			

Ta(°C) = Temperatura de anelamento; pb = pares de base

## Resultado

A caracterização genética revelou apenas três isolados contendo amplicons esperados para os genes *cry3*, *cyt1* e *vip3A* (tabela 2) que expressão para proteínas que apresentam atividade Coleoptera, Diptera e Lepidoptera específica, respectivamente. Desta forma, pode-se afirmar que dentre 103 isolados de Bt, há

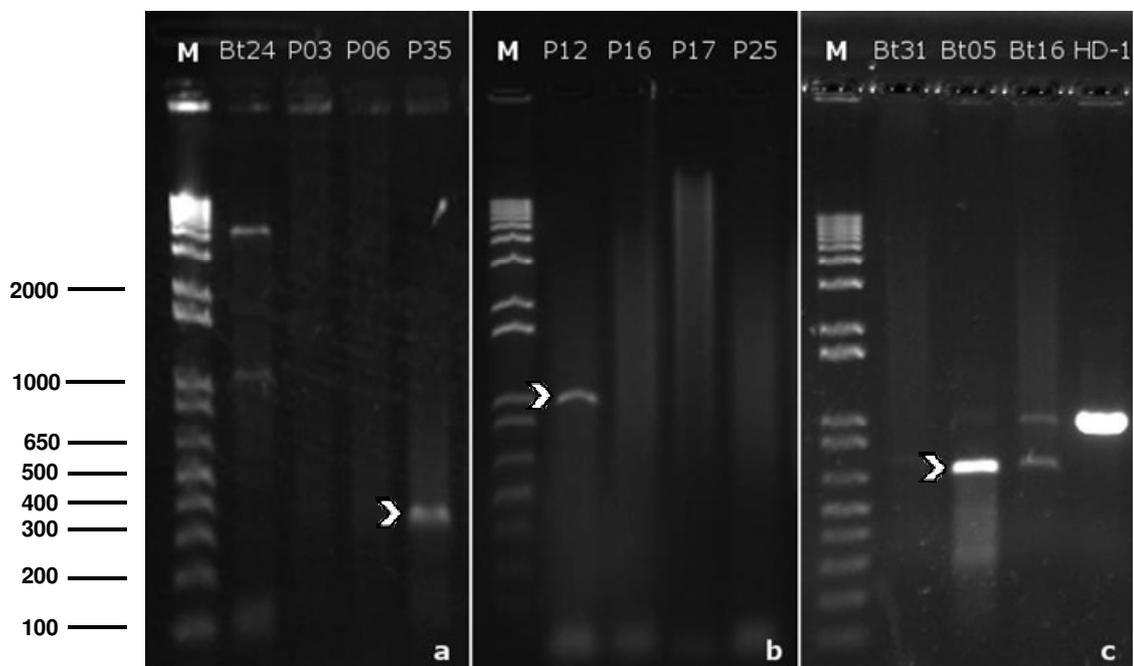
0,98% de frequência para cada gene amplificado. Não houve ampliações para os primers *Cry7/8* e *Cyt2* entre os isolados.

O gene *vip* fora detectado somente em um isolado pertencente à Chapada Diamantina na Bahia, diferentemente das duas classes gênicas *cry* e *cyt*, que foram detectadas em isolados retirados de solos de Pernambuco.

O peso molecular dos amplicons demonstrou variação para os amplificados em *cry3*, *cyt1* e *vip3A* que apresentam os seguintes valores estimados: 620pb, 522-525pb e 1000pb respectivamente (Figura 1).

**Tabela 2:** Perfil genético dos amplificados.

Isolados	<i>cry7 e 8</i>	<i>cry3</i>	<i>cyt1</i>	<i>vip3A</i>	<i>cyt2</i>
Bt.CDi 5	-	-	-	+	-
Bt.P 1.2	-	-	+	-	-
Bt.Pri 3.5	-	+	-	-	-



**Figura 1:** Amplificações dos genes *cry3*, *cyt1* e *vip3A*. **a.** Gene *cry3* amplificado no isolado Bt.Pri 3.5; **b.** Amplificação do gene *cyt1* em Bt.Pri 1.2; **c.** Gene *vip3A* amplificado em Bt.CDi 5 onde foi utilizado como controle positivo a cepa HD-1. As setas apontam para as ampliações obtidas. M = Marcador molecular ladder 1kB da Invitrogen

## Referências

- Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sinai R, Manasherob R, Khamraev A, Troitskaya E, Dubitsky A, Berezina N, Margalith Y (1997) Extended screening by PCR for seven cry-group genes from fieldcollected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol* 3:4883-4890.
- Jain D, Kachhwaha S, Jain R and Kothari (2012) PCR based detection of cry genes in indigenous strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from the soils of Rajasthan. *NISCAIR-CSIR* 11:491-494.

## **Anexo III**

## 1. Ontologia Gênica

### 1.1 Processo Biológico

A ferramenta Blast2GO através dos termos GO para processos biológicos revelou que as categorias das proteínas dos isolados Bt.CDi 1.3 e Bt.CDi 1.11 (ambos *cry9*) mais representativas foram as que estão envolvidas em processos de metabolismo primário (15%) e substância orgânica de processo metabólico (15%); metabolismo primário (19%) e processo metabólico celular (19%), respectivamente. E entre as que apresentam menor representatividade estão as envolvidas em processos de organização de parede celular, biogênese e processo catabólico.

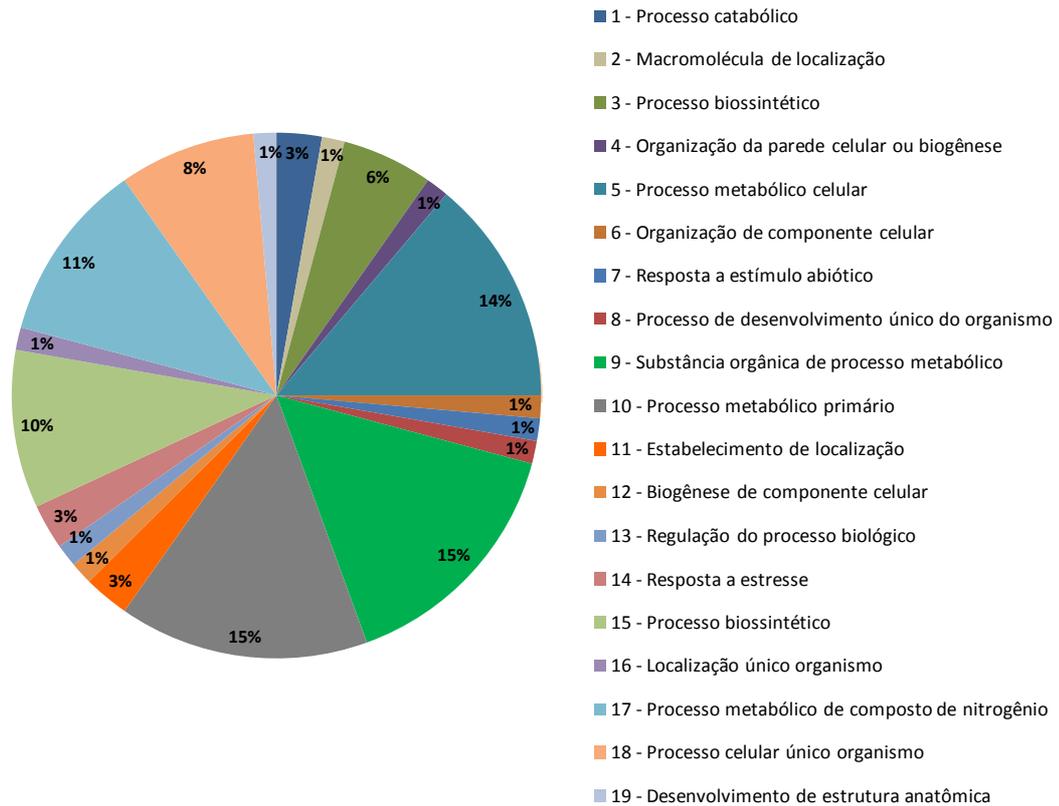
Na distribuição entre os termos GO para o isolado Bt.Pri 4.7 e a estirpe HD-1 (portadores de genes *cry2*), destacaram-se as categorias de processo metabólico celular, substância orgânica de processo metabólico e processo biossintético, todas apresentando distribuição de 13% no isolado Bt.Pri 4.7. Na estirpe HD-1 foi observada uma distribuição mais uniforme das categorias de processo biológico, com o envolvimento em patogênese apresentando 9% de distribuição. Em HD-1 também foi observado uma distribuição das proteínas em processos metabólicos celular (11%), processos metabólicos primários (11%) e categoria de resposta a estresse (9%), entre outras. Entre as que foram menos representativas, estão as proteínas com funções de processo catabólico (2%) nas proteínas de Bt.Pri 4.7 e processo metabólico com 3% distribuição em HD-1.

Nos isolados Bt.Pri 4.7 e Bt.Pri 4.29 (ambos *cry2*) os termos GO foram distribuídos em processos de metabolismo celular, metabolismo de substância orgânica e processo metabólico primário, todas apresentando distribuição de 15% no isolado Bt.Pri 4.29. Em Bt.Pri 4.7, as maiores distribuições observadas foram para processo metabólico celular e processo metabólico de substância orgânica, ambas

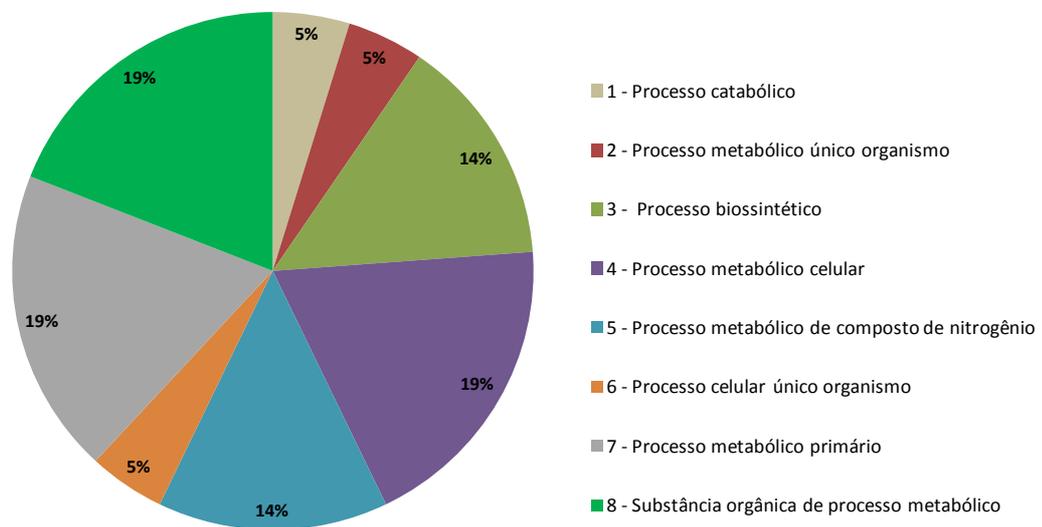
com 11%. Entre as menores distribuições estão novamente processo metabólico (em Bt.Pri 4.7) e desenvolvimento de estrutura anatômica (em Bt.Pri 4.29) com 4 e 1% respectivamente.

A distribuição completa dos termos GO das proteínas para processo biológico dos nossos isolados e também da estirpe HD-1 pode ser observada em detalhes nas Figuras 1,2 e 3.

A

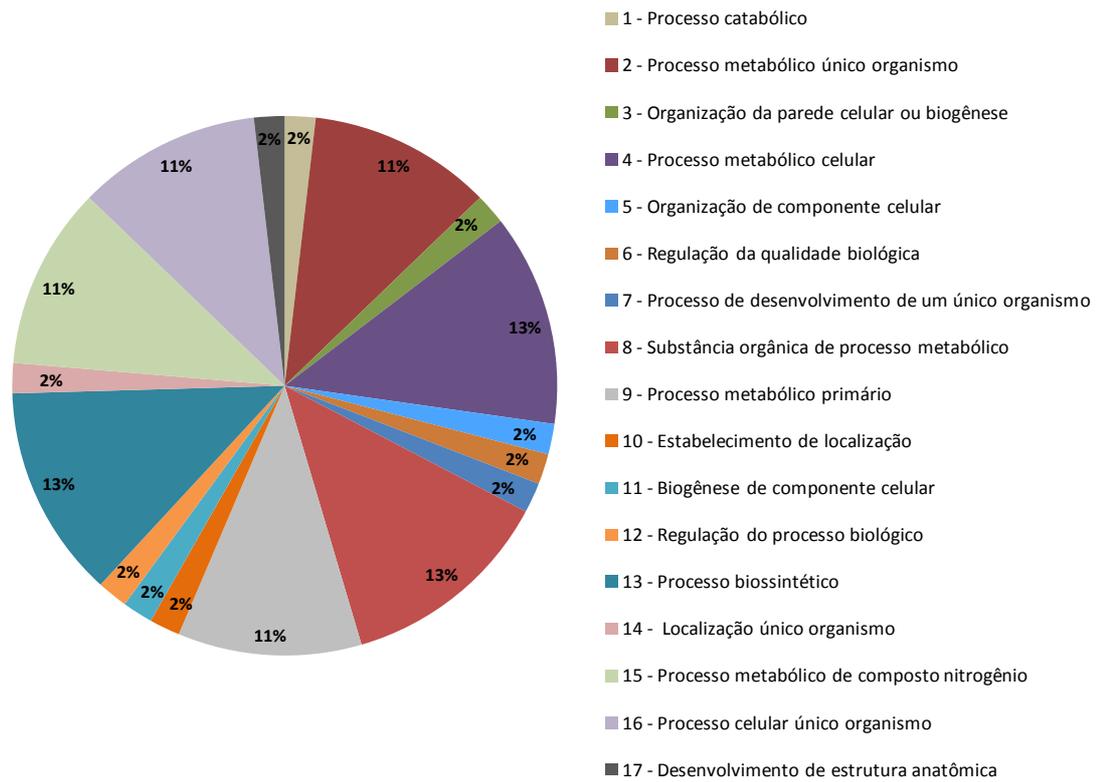


B

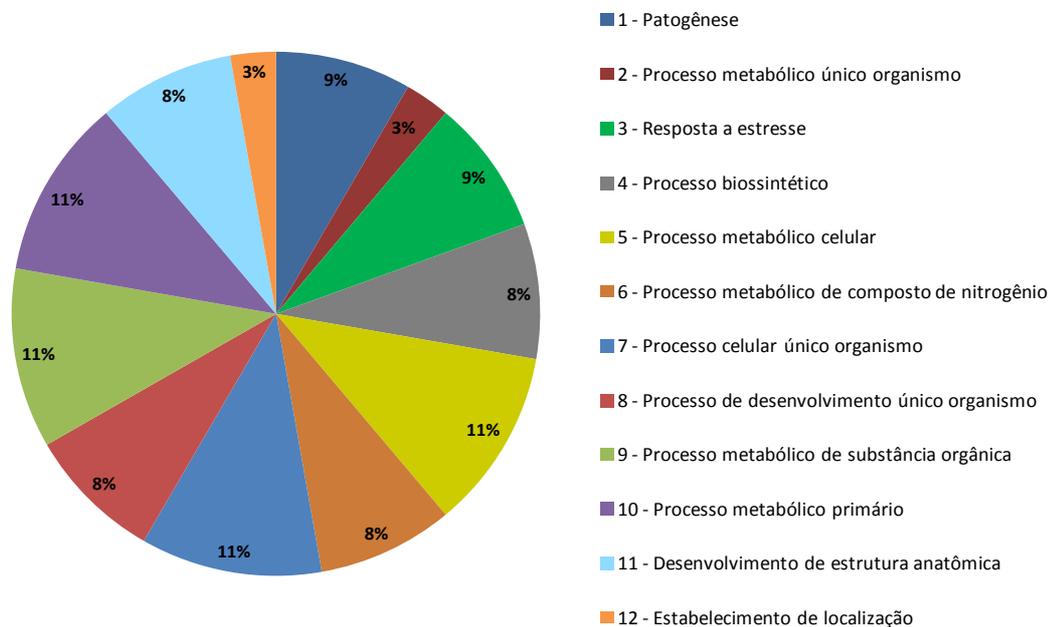


**Figura 1:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de processo biológico assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.3; **B:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.11.

A

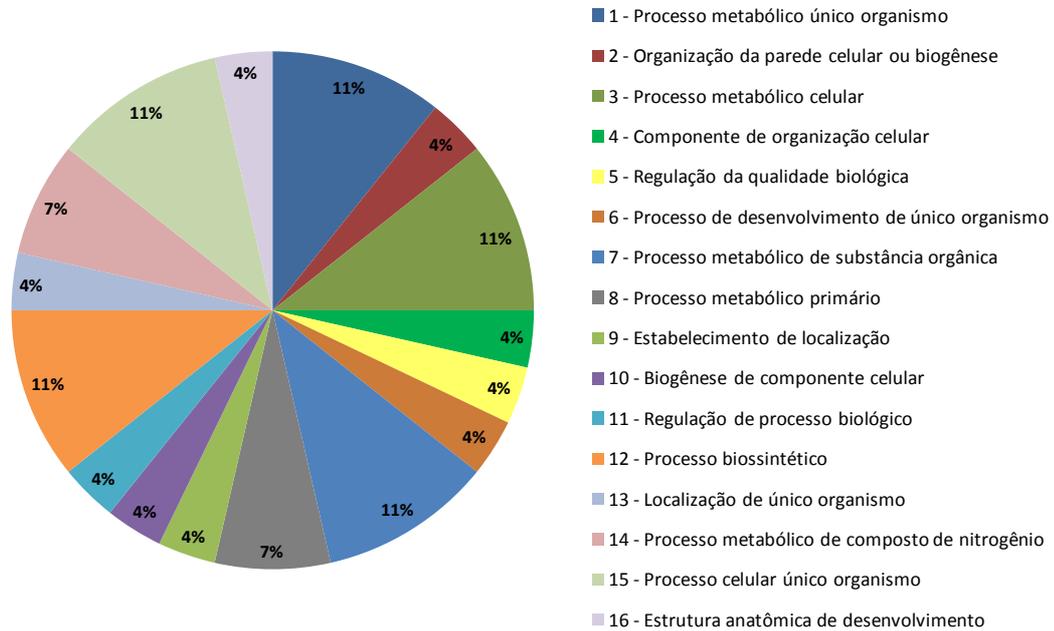


B

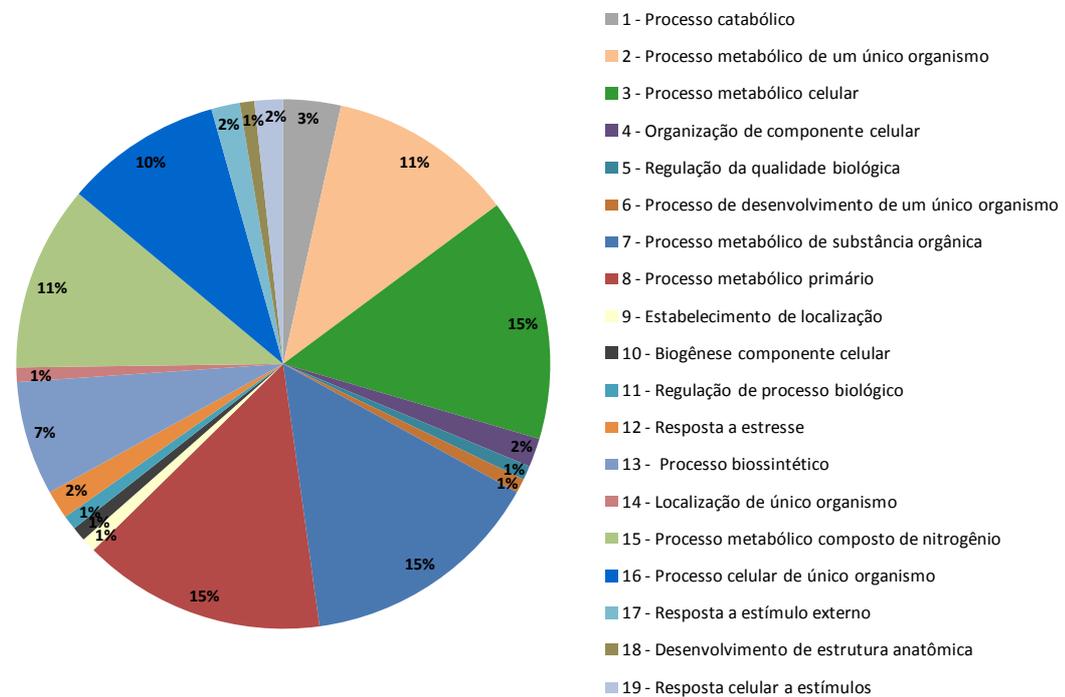


**Figura 2:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de processo biológico assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas na *estirpe* HD-1.

A



B

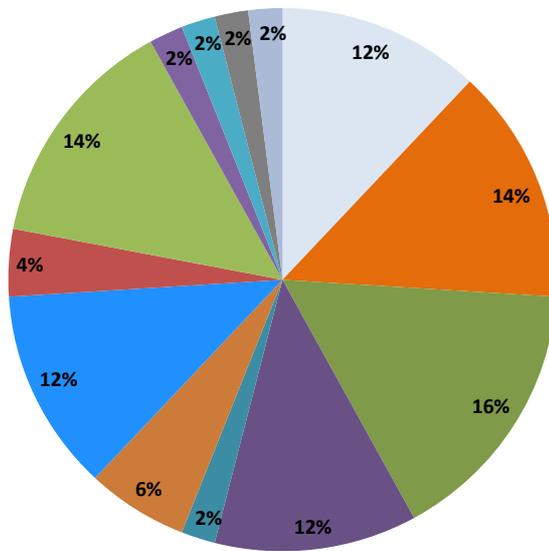


**Figura 3:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de processo biológico assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Ontologia gênica para processo biológico das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.29.

## 1.2 Função Molecular

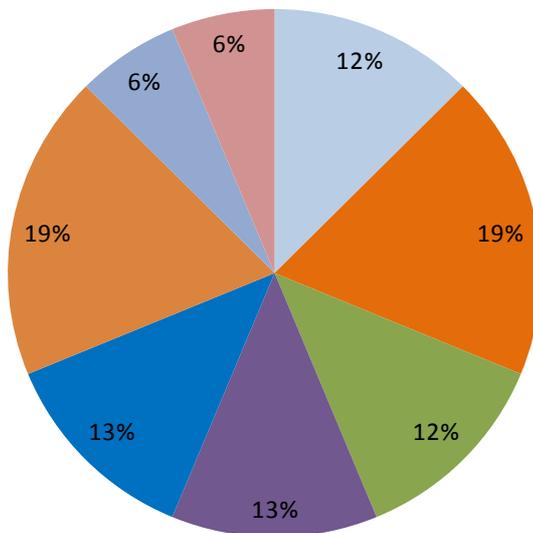
Os termos de GO para função molecular identificou proteínas envolvidas em diversas funções biológicas e com distribuição variada em cada um dos isolados analisados e também na estirpe HD-1. Entre as funções de maior distribuição estão as de íons de ligação, ligação a proteínas, atividade de transferase, entre outras. As funções moleculares reveladas pelos termos GO dos isolados Bt.Pri 4.7, Bt. Pri 4.29, Bt.CDi 1.3, Bt.CDi 1.11 e da estirpe HD-1 podem ser observadas com maior detalhe de distribuição nas Figuras 4, 5 e 6.

A



- 1 - Molécula pequena de ligação
- 2 - Composto orgânico cíclico obrigatório
- 3 - Íons de ligação
- 4 - Derivado de carboidratos obrigatórios
- 5 - Atividade de transportador transmembranar
- 6 - Composto heterocíclico obrigatório
- 7 - Atividade de hidrolase
- 8 - Atividade de liase
- 9 - Composto heterocíclico obrigatório
- 10 - Atividade de isomerase
- 11 - Atividade específica de transportador de substrato
- 12 - Atividade de oxidoreductase
- 13 - Ligação à proteína

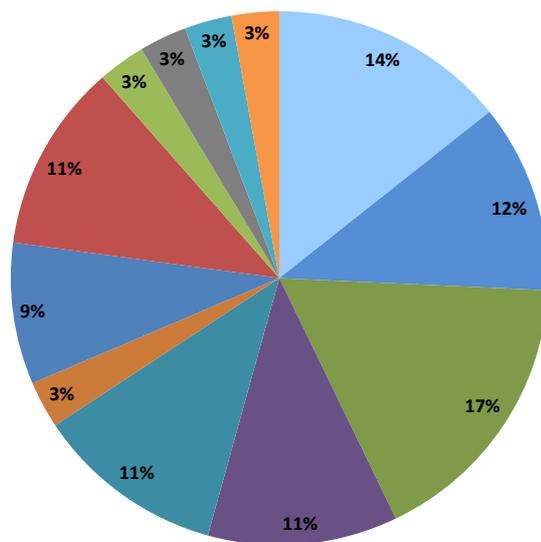
B



- 1 - Molécula pequena de ligação
- 2 - Composto orgânico de cíclico obrigatório
- 3 - Íons de ligação
- 4 - Derivado de carboidratos obrigatórios
- 5 - Atividade de hidrolase
- 6 - Composto heterocíclico obrigatório
- 7 - Atividade de isomerase
- 8 - Componente estrutural de ribossomo

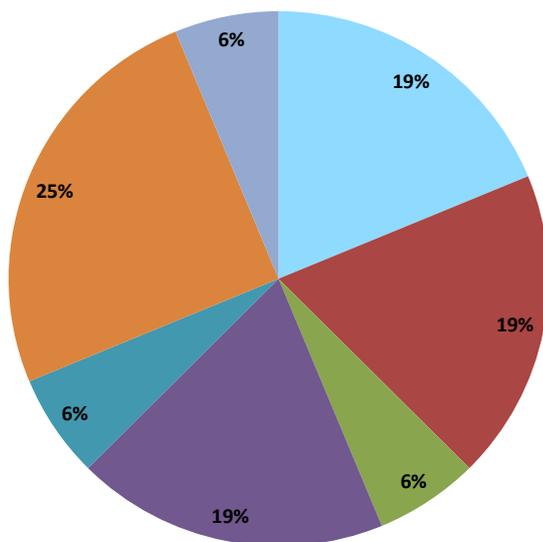
**Figura 4:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) para função molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de função molecular assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.3; **B:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 1.11.

A



- 1 - Pequena molécula de ligação
- 2 - Composto cíclico de ligação orgânica
- 3 - Ions de ligação
- 4 - Atividade de transferase
- 5 - Derivado de hidratos de carbono de ligação
- 6 - Atividade de transporte transmembranar
- 7 - Atividade de hidrolase
- 8 - Composto heterocíclico de ligação
- 9 - Atividade de ligase
- 10 - Atividade específica de transportador de substrato
- 11 - Atividade de oxidoreductase
- 12 - Aglomerado de ligação a metal

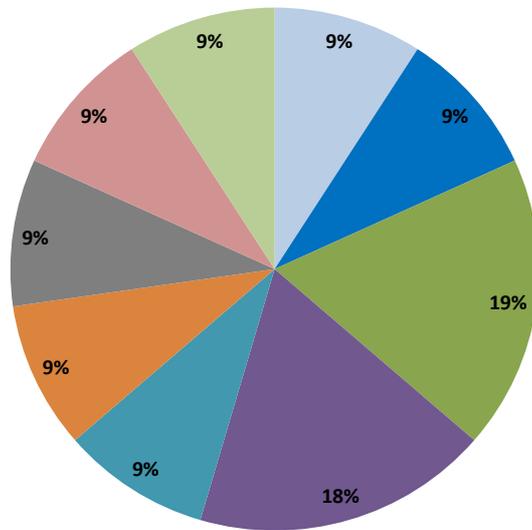
B



- 1 - Pequena molécula de ligação
- 2 - Íons de ligação
- 3 - Atividade de transportador transmembranar
- 4 - Atividade de hidrolase
- 5 - Atividade específica de transportador de substrato
- 6 - Proteínas de ligação
- 7 - Componente estrutural do ribossomo

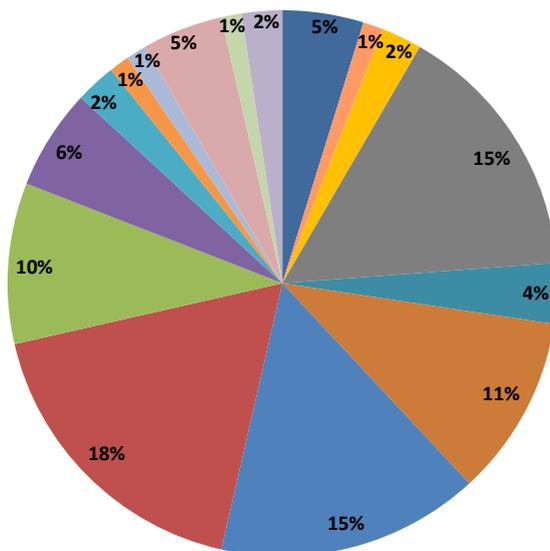
**Figura 5:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) para função molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de função molecular assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.CDi 4.7; **B:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas na estirpe HD-1.

A



- 1 - Molécula pequena de ligação
- 2 - Composto cíclico orgânico de ligação
- 3 - Íons de ligação
- 4 - Atividade de transferase
- 5 - Derivado de hidratos de carbono de ligação
- 6 - Atividade de transportador transmembranar
- 7 - Atividade de hidrolase
- 8 - Composto heterocíclico de ligação
- 9 - Atividade de transportador de substrato específico

B



- 1 - Atividade de transferase
- 2 - Atividade de transportador transmembranar
- 3 - Cofator vinculativo
- 4 - Composto heterocíclico de ligação
- 5 - Ligação à proteínas
- 6 - Pequena molécula de ligação
- 7 - Composto orgânico cíclico obrigatório
- 8 - Íons de ligação
- 9 - Derivado de hidratos de carbono de ligação
- 10 - Atividade de hidrolase
- 11 - Atividade de lyase
- 12 - Atividade de ligase
- 13 - Atividade específica do substrato transportador
- 14 - Atividade de oxidoreductase
- 15 - Aglomerado de ligação a metal
- 16 - Componente estrutural de ribossomo

**Figura 6:** Distribuição das categorias de ontologia gênica (GO) para função molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* após 48 horas de crescimento em meio TY. Os números observados nos setores dos gráficos são identificadores das categorias de função molecular assim como a legenda de cores disponível para cada categoria de GO. **A:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.7; **B:** Ontologia gênica para função molecular das proteínas identificadas no isolado Bt.Pri 4.29.

## **Curriculum vitae (Lattes)**

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6866155877274129>

### **Paulo Geovani Silva Martins**

Possui graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual da Paraíba (2008) e mestrado em Agronomia (Melhoramento Genético de Plantas) pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (2011). cursou Doutorado em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Genética Molecular e de Microrganismos, atuando principalmente nos seguintes temas: controle biológico, algodão, cana-de-açúcar, genes e toxinas Cry, rizóbio, diversidade e fixação biológica de nitrogênio.

### **Artigos completos publicados em periódicos**

**MARTINS, P. G. S.**; JUNIOR, M. A. L.; FRACETTO, G. G. M.; DA SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P.; LYRA, M. C. C. P. *Mimosa caesalpiniiifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. Archives of Microbiology, v. 197, p. 1-10, 2015.

SILVA, F. A. C.; OLIVEIRA, M. S.; SOUZA, J. M.; MARTINS, P. G. S.; **CALSA JR, T.** Plant proteomics and peptidomics in host-pathogen interactions: the guns used by each army. Current Protein and Peptide Science, 2015.

### **Capítulo de livros**

SILVA, M. L. R. B.; FREITAS, N. S. A.; PORTELA, R.; **MARTINS, P. G. S.**; MERGULHAO, A. C. E. S.; LYRA, M. C. C. P.; LIRA NETO, A. C.. Inferência filogenética a partir de sequências de DNA. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo; et al.. (Org.). Manual de práticas laboratoriais: um guia para pesquisa. 1ed.Camaragibe: Grafica e Editora Comercio e Representação, 2013, v. 1, p. 1015.

### Outras produções bibliográficas

MILANI, M.; DANTAS, F. V.; MARTINS, W. F. S.; **MARTINS, P. G. S.** Uso de Marcadores RAPD para Avaliar a Divergência Genética em Mamoneira. Campina Grande: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2010 (Comunicado Técnico).

### Resumos expandidos publicados em anais de congressos

**MARTINS, P. G. S.**; LYRA, M. C. C. P.; SILVA, M. L. R. B.; VINCENTIN, R. P.; LIRA JUNIOR, M. A. ESTUDO FILOGENÉTICO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ATRAVÉS DA ANÁLISE POLIFÁSICA USANDO COMO PLANTA-ISCA A CULTURA DO SABIÁ (*Mimosa caesalpiniiifolia* Benth). In: XXXIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2011, Uberlândia. Anais. Uberlândia: SBCS, 2011. v. CDROM. 2011.

ANTONIO JUNIOR; SONA Jain; GOUVEIA, Carla Angelica; **MARTINS, P. G. S.**; AYRES, C. F. J.; Lucena W. A. IDENTIFICAÇÃO DE DOIS GENES cry8 EM CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* AUTÓCTONES DO ESTADO DA PARAÍBA. In: II WORKSHOP INTERAÇÃO PLANTA/PRAÇA, 2007, Brasília. Anais do II Workshop Interação Planta/Praga. Brasília: Embrapa, 2007.

### Resumos publicados em anais de congressos

SOUZA, A. E. R.; **MARTINS, P. G. S.**; SOUZA, J. M.; BARBOSA NETO, A. G.; CALSA JUNIOR, T. Identificação de proteínas de parede celular e processos biológicos envolvidos na cana-de-açúcar submetida a estresse de radiação ultravioleta B e seca. In: XX ENGENE ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 2014, Campina Grande. XX ENGENE ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 2014.

**MARTINS, P. G. S.**; CASTELLETTI, C. H. M.; SILVA, F. A. C.; LIRA NETO, A. C.; CALSA JUNIOR, T. Prospeção de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle biológico da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. In: XX ENGENE ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 2014, Campina Grande. XX ENGENE ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 2014.

LIMA, F.F.D.O; JUNIOR, F.P.C.; MARTINS, W. F. S.; **MARTINS, P. G. S.**; ALMEIDA, R. P.; BESERRA, E. B. Análise da diversidade genética de populações de *Aedes aegypti* (Díptera: Comicidade) do semiárido paraibano através de marcadores RAPD-PCR. In: Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2010. p. 329-329.

MARTINS, W. F. S.; JUNIOR, F.P.C.; **MARTINS, P. G. S.**; ALMEIDA, R. P.; BESERRA, E. B. Estrutura genética de populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) do semi-árido da Paraíba. In: XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, Natal. XXIII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2010, 2010.

NOIA, N.P.; LEITE, I. P.; MARTINS, W. F. S.; ARRIEL, N.H.; **MARTINS, P. G. S.** Caracterização molecular de populações de *Planococcus minor* (Hemiptera: Pseudococcidae) em algodoeiro. In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá. 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, 2010.

**MARTINS, P. G. S.**; SONA Jain ; Lucena W. A. Caracterização de genes entomotóxicos de *Bacillus thuringiensis* de interesse agrícola. In: 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador. 54 Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

**MARTINS, P. G. S.** Caracterização e Clonagem de Genes *cry8* de *Bacillus thuringiensis* de Interesse Agrícola. In: II Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Algodão, 2007, Campina Grande. II Encontro de Iniciação Científica da Embrapa Algodão, 2007.

SOUZA JUNIOR, J. D. A.; SONA Jain; **MARTINS, P. G. S.**; GOUVEIA, Carla Angélica; AYRES, C. F. J.; Lucena W. A. Isolamento e caracterização de cepas de *Bacillus* spp. coletadas em solos da Paraíba, com enfoque aos genes *cry* para controle de pragas do algodoeiro. In: XXI Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006, Recife. Anais do XXII Congresso Brasileiro de Entomologia, 2006.

**MARTINS, P. G. S.** Isolamento e Caracterização de Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* de Interesse Agrícola. In: Encontro de Produção Científica da Embrapa Algodão - 2006, 2006, Campina Grande. I Encontro de Produção Científica - EPC 2006, 2006.

## **Orientações**

### **Trabalho de conclusão de curso de graduação**

Augusto Ferraz da Silva Rosa. Prospecção de genes *cry*, *cyt* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* da coleção do instituto Agrônomo de Pernambuco IPA. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade de Pernambuco. Orientador: Paulo Geovani Silva Martins.