



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**Instituto de Biologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Análise da diversidade de genes com atividade entomocida de  
estirpes de *Bacillus thuringiensis* por PCR em tempo real.**

**Marcelo Rodrigues Berçot**

**Orientadora: Cynthia Maria Kyaw**

**Coorientadora: Rose Gomes Monnerat**

**Brasília, 2021**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**Instituto de Biologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana**

**Análise da diversidade de genes com atividade entomocida de  
estirpes de *Bacillus thuringiensis* por PCR em tempo real.**

**Marcelo Rodrigues Berçot**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Biologia microbiana da  
Universidade de Brasília como requisito  
parcial à obtenção do título de Mestre em  
Biologia Microbiana

**Orientadora: Cynthia Maria Kyaw**

**Brasília, 2021**

## AGRADECIMENTOS

O processo de aprendizado no mestrado não é fácil e requer tempo e paciência, ainda mais durante a maior pandemia do século, junto da maior crise sanitária, econômica e social que assola o Brasil. Agradeço aos meus guias espirituais por ter conseguido terminar um processo tão difícil durante tempos tão difíceis.

À minha mãe e minha irmã, as mulheres da minha vida que estão sempre do meu lado, me dando todo o apoio possível, movendo o mundo por mim. Eu não seria nada sem vocês, obrigado por existirem e me guiarem nesse processo sendo meu porto seguro e meu colo, eu amo vocês do fundo do meu coração. E claro, ao meu pai, que apesar de todas as dificuldades que a vida impôs a nós, nunca deixou de ao menos tentar estar presente, sempre me apoiando e cuidando de mim, e eu te amo do fundo do meu coração.

À Dra. Cynthia Kyaw, minha orientadora, por todos os conselhos, aprendizados e pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei, espero um dia ser capaz de retribuir todo carinho, e como eu sempre digo: obrigado por ser quem você é.

À Dra. Rose Monnerat, minha co-orientadora, com quem trabalho há muito tempo e devo minha formação de Biomédico, abrindo as portas do seu laboratório sempre que precisei, me dando suporte quando necessário e enriquecendo meu aprendizado.

Ao Dr. Paulo Queiroz e à Dra. Érica Martins, meu pai e minha mãe na graduação e pós-graduação, pessoas que devo a minha formação, tanto acadêmica quanto ética, moral e profissional. Vocês sempre terão um espaço reservado no meu coração e na minha família. Ao Dr. Paulo, eu não tenho palavras pra descrever todo o tempo que passamos juntos, todo o carinho e companheirismo. Só tenho a dizer: obrigado papi.

Aos meus amigos do LBE: Lilian, Rafael, Ester, Janaína, Amanda, Sandrinho, Aline, Andréa e Mateus. Vocês foram parte fundamental desse processo e eu não poderia ter melhores amigos e colegas de trabalho. Marcel, Camila e Gabi: obrigado por me aguentarem falando o dia todo, suportarem minha surdez diária e angústias, por serem sempre minha base dentro do laboratório e meus “ombros amigos” todas as vezes que precisei, e foram muitas. Vocês tem um pedaço do meu coração.

Aos amigos do LBE que já seguiram outros caminhos: Cris, Bri, Ina e Marcella e o Bt ambulante, obrigado por tudo que aprendi com vocês, por todo carinho e contribuição.

Ao Zezinho, responsável por tocar todas as pesquisas do LBE, meu muito obrigado. Seu trabalho é fundamental no laboratório e sou muito grato.

À minha família, em especial tia Carla, Marcinha, Bruno e Pedro, que sempre estiveram do meu lado durante esse processo difícil e me ajudaram tanto.

Aos meu irmãos e irmãs, que não são de sangue, mas que a vida me deu, Luiz Felipe Nunes, Raphael Ramos, Felipe Fredo, Miguel Barbosa, Xuxu, Nati Ribeiro, Lucas Zardini e Rafael Barroso. Vocês são essenciais na minha vida, não tenho palavras pra descrever a importância de vocês durante todo esse processo. Aos Brothers™ e ao grupo NWO dos stickers, meu obrigado! Sem vocês isso não seria possível.

À duas pessoas que o UniCEUB me deu: Wellington e Lara Lima. Eu amo vocês, obrigado também por estarem sempre do meu lado, compartilhando comigo todas as angústias e desafios, vocês estão no meu coração.

À Dra. Fernanda Vinhaes, uma das pessoas que mais me ajudou em todos os processos e etapas da minha vida, à quem tenho um carinho sem tamanho e uma inspiração de profissional.

À UnB e Embrapa, pelas oportunidades que me foram dadas, e à CAPES pela bolsa de estudos.

*“Everything is everywhere, but the environment selects”*

Frase do botânico Lourens Gerhard Marinus Bass Becking fazendo alusão a capacidade de dispersão dos microorganismos e aos fatores seletivos do meio ambiente.

## 1 RESUMO

O interesse na utilização de *Bacillus thuringiensis* (Bt) como biopesticida, ao invés de produtos químicos, e seu espectro de toxicidade restrito ao alvo contribuíram para o estabelecimento de diversas coleções de estirpes de Bt ao redor do mundo. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva aeróbica, que pode ser isolada de diversos locais tais como água, solo, teias de aranha e insetos mortos, sendo a bactéria entomopatogênica mais utilizada como biopesticida mundialmente. O uso em grande escala se deve aos cristais proteicos citoplasmáticos formados durante a esporulação, denominados  $\delta$ -endotoxinas (Cry e Cyt), além de proteínas secretadas durante a fase vegetativa (Vip e Sip). Para a caracterização de novos isolados de Bt vários métodos são utilizados, incluindo métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR). A qPCR é capaz de monitorar a reação enquanto ela progride (em tempo real) e os dados são coletados ao longo da PCR. Tendo em vista a importância da caracterização das estirpes de Bt para o desenvolvimento de novos bioinseticidas ou eventos transgênicos, para prospecção de novos genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* com potencial entomocida, para identificação de novos genes nas estirpes de Bt e auxílio no entendimento da distribuição e diversidade das estirpes e genes de Bt, esse trabalho teve como objetivo criar um sistema de identificação de genes baseado em reações de qPCR com base nos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip* para caracterização de 257 estirpes de *Bacillus spp.* da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, analisando o grau de correlação entre a distribuição dessas estirpes com a origem do substrato de onde a estirpe foi isolada e entre a sua distribuição e condições geoclimáticas. Foi possível observar que os genes *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* ocorrem de maneira homogênea no território brasileiro e alguns genes são encontrados em regiões específicas. O maior reservatório de variabilidade está dentro das estirpes de Bt em cada região, e sugere-se que tanto as condições geoclimáticas, quanto os cultivos regionais, interferem na diversidade genética que as estirpes de Bt apresentam, e que estirpes de Bt podem trocar constantemente informações genéticas.

**Palavras chave:** *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2*, *sip*; diversidade; Bt; qPCR.

## 2 ABSTRACT

The interest in the use of Bt as a biopesticide, instead of chemicals, and its toxicity spectrum restricted to the target contributed to the establishment of several collections of Bt strains around the world. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a gram-positive aerobic bacterium, which can be isolated from several places, such as water, soil, spider webs and dead insects, being the most used entomopathogenic bacterium as a biopesticide worldwide. The large-scale use is due to the cytoplasmic protein crystals formed during sporulation called  $\delta$ -endotoxins (Cry and Cyt), in addition to proteins secreted during the vegetative phase (Vip and Sip). For the characterization of new Bt isolates several methods are used including molecular methods such as the quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). qPCR is able to monitor the reaction as it progresses and data is collected over the course of the PCR. Owing the importance of the characterization of Bt strains to the development of new bioinsecticides or transgenic events, for the prospection of new *cry*, *cyt*, *vip* and *sip* genes with potential entomocide, for the identification of new genes in the Bt strains and aid in understanding distribution and diversity of Bt strains and genes, this work aimed to create a gene identification system based on qPCR reactions based on the genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* and *sip* for characterization of 257 strains of *Bacillus spp.* of the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, analyzing the degree of correlation between the distribution of these strains and the origin of the substrate from which the strain was isolated and between its distribution and geoclimatic conditions. It was possible to observe that the genes *cry1*, *cry2* and *vip3a/b* occur homogeneously in the Brazilian territory and some genes are found in specific regions. The biggest reservoir of variability is within the Bt strains in each region, and it is suggested that both geoclimatic conditions and regional crops interfere with the genetic diversity that the Bt strains present, and that Bt strains can constantly exchange genetics information.

**Key words:** *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2*, *sip*; diversity; Bt; qPCR.

### 3 LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Diferentes nichos ecológicos de <i>Bacillus thuringiensis</i> ..	15
<b>Figura 2</b> Sistema de nomenclatura utilizado pelo Comitê de Nomenclatura de toxinas de Bt...	17
<b>Figura 3</b> Estrutura tridimensional da toxina Cry.	18
<b>Figura 4</b> Espectro de ordens de insetos hospedeiros alvo das proteínas Cry e Cyt.	21
<b>Figura 5</b> Espectro de hospedeiros das proteínas secretadas Vip e Sip.	22
<b>Figura 6</b> Gráficos obtidos no ensaio de curva padrão para <i>cry1</i> .....	35
<b>Figura 7</b> Abundância dos genes <i>cry1, cry2, cry4, cry6, cry9, cry10, cry11a, cyt1, cyt2, vip1a, vip2a, vip2b, vip3a/b e vip3c</i> encontrados nas estirpes de <i>Bacillus spp.</i> estudadas. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>Figura 8</b> Análise AMOVA de variância.	
<b>Figura 9</b> Climas predominantes nas diferentes regiões brasileiras. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
<b>Figura 10</b> Principais cultivos brasileiros por região.....	50
<b>Figura 11</b> Resultado do teste qui-quadrado de independência entre os genes no grupo <i>Bacillus spp.</i> .....	55
<b>Figura 12</b> Resultado do teste qui-quadrado de independência entre os genes nas estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	56
<b>Figura 13</b> Amplificações dos alvos <i>cry1, cry2, cry4, cry6, cry10, cry11a, cyt1, cyt2 e vip1a, cry9, vip2a, vip2b, vip3a/b e vip3c</i> respectivamente.....	64
<b>Figura 14</b> Curvas de <i>melting</i> pós amplificação dos alvos <i>cry1, cry2, cry4, cry6, cry10, cry11a, cyt1, cyt2 e vip1a, cry9, vip2a, vip2b, vip3a/b e vip3c</i> .....	66
<b>Figura 15</b> Curva padrão dos alvos <i>cry1, cry2, cry4, cry6, cry10, cry11a, cyt1, cyt2 e vip1a, cry9, vip2a, vip2b, vip3a/b e vip3c</i> .....	69
<b>Figura 16</b> Valores de matrizes para os testes p valor e qui-quadrado para todas as estirpes do grupo <i>Bacillus spp</i> .....	72
<b>Figura 17</b> Valores de matrizes para os testes p valor e qui-quadrado para todas as estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	73



#### 4 LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Estirpes utilizadas como controles positivos e seus respectivos genes alvo.....	29
<b>Tabela 2</b> Sequência dos primers, características e gene alvo.....	31
<b>Tabela 3</b> Alvos e parâmetros após construção da curva padrão. ....	34
<b>Tabela 4</b> Genes alvos para desenvolvimento do protocolo de identificação. ....	36
<b>Tabela 5</b> Resultados obtidos por sequenciamento vs qPCR. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Tabela 6</b> Perfil de ocorrência dos genes <i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry4</i> , <i>cry6</i> , <i>cry9</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11a</i> , <i>cyt1</i> , <i>cyt2</i> , <i>vip1a</i> , <i>vip2a</i> , <i>vip2b</i> , <i>vip3a/b</i> e <i>vip3c</i> das estirpes de <i>Bacillus thuringiensis</i> . ....	39
<b>Tabela 7</b> Caracterização molecular por qPCR. ....	43
<b>Tabela 8</b> Abundância dos genes <i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry4</i> , <i>cry6</i> , <i>cry9</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11a</i> , <i>cyt1</i> , <i>cyt2</i> , <i>vip1a</i> , <i>vip2a</i> , <i>vip2b</i> , <i>vip3a/b</i> e <i>vip3c</i> por região.....	43
<b>Tabela 9</b> Frequência dos genes <i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry4</i> , <i>cry6</i> , <i>cry9</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11a</i> , <i>cyt1</i> , <i>cyt2</i> , <i>vip1a</i> , <i>vip2a</i> , <i>vip2b</i> , <i>vip3a/b</i> e <i>vip3c</i> por região e abundância para <i>Bacillus spp.</i> .....	44
<b>Tabela 10</b> Frequência dos genes <i>cry1</i> , <i>cry2</i> , <i>cry4</i> , <i>cry6</i> , <i>cry9</i> , <i>cry10</i> , <i>cry11a</i> , <i>cyt1</i> , <i>cyt2</i> , <i>vip1a</i> , <i>vip2a</i> , <i>vip2b</i> , <i>vip3a/b</i> e <i>vip3c</i> por região e abundância para <i>Bacillus thuringiensis</i> . ....	45
<b>Tabela 11</b> Detecção de genes alvo em estudos de caracterização de coleções de outros países. ....	46
<b>Tabela 12</b> Principais culturas por região e insetos alvos das toxinas de Bt. ....	51
<b>Tabela 13</b> Resultado dos bioensaios realizados pelo Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas .....	53

## LISTA DE ABREVIações

Bt .....	<i>Bacillus thuringiensis</i>
qPCR .....	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
PCR .....	Reação em cadeia da polimerase
dH <sub>2</sub> O.....	Água destilada
dNTP.....	Deoxinucleotídeos
pb .....	Pares de base
T <sub>m</sub> .....	<i>Melting temperature</i>
CXR .....	<i>Carboxy-X-Rhodamine</i>

## SUMÁRIO

1	RESUMO .....	6
2	ABSTRACT .....	7
3	LISTA DE FIGURAS .....	8
4	LISTA DE TABELAS.....	9
5	INTRODUÇÃO .....	13
6	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
6.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> .....	15
6.1.1	Classificação e definição de toxinas Cry, Cyt, Vip e Sip .....	16
6.1.2	Estrutura das proteínas Cry, Cyt, Vip e Sip .....	17
6.1.3	Modo de ação das toxinas Cry, Cyt, Vip e Sip.....	19
6.2	Caracterização dos isolados de Bt e diversidade.....	22
6.3	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	24
7	JUSTIFICATIVA .....	27
8	OBJETIVOS .....	28
8.1	Objetivo geral .....	28
8.2	Objetivos específicos.....	28
9	MATERIAIS E MÉTODOS .....	29
9.1	Seleção das estirpes .....	29
9.2	Seleção dos genes de interesse.....	29
9.3	Desenho e análise dos <i>primers</i> .....	30
9.4	Extração e quantificação de DNA das estirpes.....	31
9.5	Otimização, curva padrão e eficiência dos ensaios de qPCR.....	32
9.6	Análise primária dos dados obtidos por qPCR .....	35
9.7	Validação dos ensaios com qPCR .....	36
9.8	Testes estatísticos .....	37

	12
9.8.1	Teste de hipótese .....37
9.8.2	P-valor .....37
9.8.3	Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) via simulações de Monte Carlo .....37
9.8.4	Análise de variância (AMOVA).....38
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....39
10.1	Perfil, frequência e abundância dos genes de toxinas nas estirpes analisadas.....39
10.1.1	Perfil e frequência dos genes nas estirpes analisadas.....39
10.1.2	Abundância dos genes nas estirpes analisadas .....40
10.2	Caracterização molecular, distribuição, abundância, frequência dos genes por região geográfica e comparação com caracterizações de coleções de outros países .....41
10.2.1	Caracterização molecular das estirpes e abundância dos genes por região .....41
10.2.2	Frequência dos genes por região e comparação com caracterizações de coleções de outros países .....43
10.3	Análise dos perfis genéticos e frequência das amostras em relação aos principais cultivos brasileiros.....49
10.4	Resultados obtidos nas qPCR e comparação com bioensaios.....51
10.5	Correlação entre os genes e teste de hipótese .....54
11	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....58
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....59
13	ANEXO A .....64
14	ANEXO B .....71

## 5 INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* é composto por bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas e exibe grande importância econômica por apresentar espécies de interesse industrial, como o *Bacillus thuringiensis* (Bt), biopesticida amplamente utilizado, e outras espécies que podem ser patogênicas e são de interesse médico, como o *Bacillus anthracis*, agente etiológico do antraz (RASKO et al., 2005).

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva aeróbica que pode ser isolada de diversos substratos como água, solo, teias de aranha e insetos mortos, sendo a bactéria entomopatogênica mais utilizada mundialmente como biopesticida (BOUKEDI et al., 2016). Inúmeras estirpes já foram isoladas, sendo a maioria ativa contra larvas de pragas de cultivos de milho, algodão, soja e cana-de-açúcar, além de serem ativas contra insetos vetores de doenças, a exemplo dos mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*, vetores de dengue e malária, respectivamente (ANGELO et al., 2010). Oferecem ainda vantagens em comparação com inseticidas químicos por não produzirem poluentes, além da alta especificidade aos insetos alvo e por consequência segurança a organismos que não são alvos, diminuindo o efeito residual (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

O uso em grande escala se deve aos cristais proteicos citoplasmáticos formados durante a esporulação, denominados  $\delta$ -endotoxinas (Cry e Cyt), além de proteínas secretadas durante a fase vegetativa (Vip e Sip) (MAAGD, DE; BRAVO; CRICKMORE, 2001; PALMA, et al., 2014). Atualmente estão descritos 818 genes *cry*, agrupados em 78 famílias de proteínas Cry, 41 genes *cyt* e 109 genes *vip* (CRICKMORE et al., 2020). O isolamento de novas estirpes, bem como a identificação, preservação e conservação das mesmas, ocupa lugar de destaque no campo da pesquisa e criação de novos produtos biotecnológicos (RABINOVICTH; OLIVEIRA 2015).

A presença de genes codificadores das toxinas se relaciona com a atividade larvicida das estirpes de Bt e a detecção de genes específicos, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), já foi utilizada em estudos de triagem para caracterizar estirpes de Bt com potencial atividade entomocida em diferentes regiões do mundo (URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003; SAUKA; BENINTENDE, 2017; JAIN et al., 2017; YILMAZ; AYVAZ; AZIZOGLU, 2017; BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019). Para complementar a PCR convencional, foi

desenvolvida a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), capaz de quantificar a amplificação do DNA concomitantemente ao progresso da reação (em tempo real), sendo os dados coletados ao longo do processo. (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

O interesse na utilização do Bt como biopesticida, ao invés de produtos químicos, bem como seu espectro de toxicidade restrito ao alvo, contribuíram para o estabelecimento de diversas coleções de estirpes de Bt ao redor do mundo. A caracterização dessas coleções vem mostrando a variabilidade das estirpes de Bt em relação à sua diversidade e distribuição na natureza, indicando grau de correlação entre a distribuição dessas estirpes com a origem do substrato de onde a estirpe foi isolada e entre a sua distribuição e condições geoclimáticas (SAUKA; BENINTENDE, 2017).

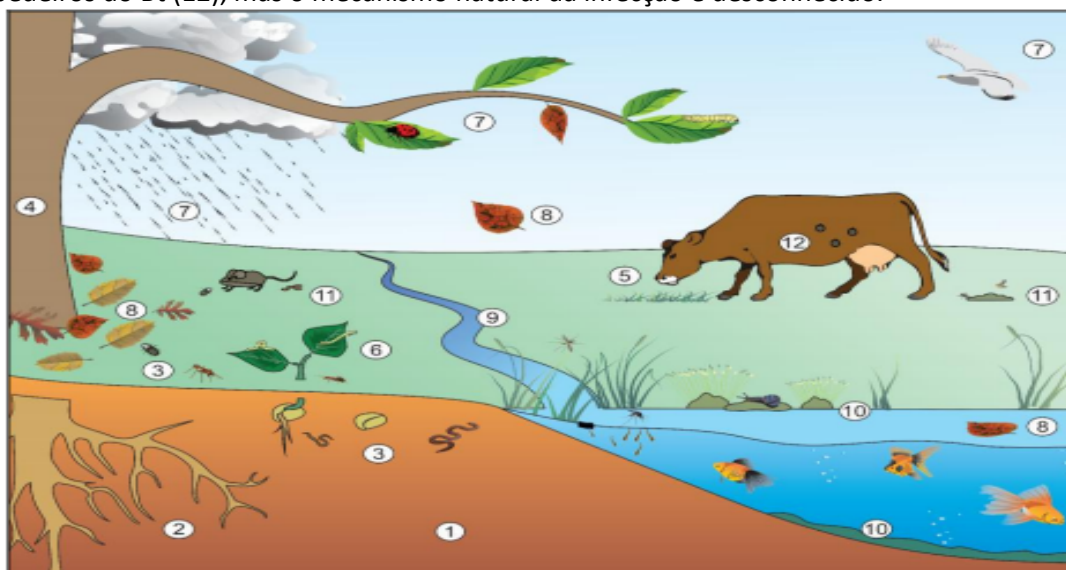
A Embrapa Recursos Genéticos realiza testes para detectar e caracterizar novas estirpes de Bt com maior potencial entomocida, procurando novas toxinas que possam ser utilizadas na produção de novos bioinseticidas (EMBRAPA, 2005). Tendo em vista a importância da caracterização das estirpes de Bt para desenvolvimento de novos bioinseticidas ou eventos transgênicos, para prospecção de novos genes cry, cyt, vip e sip com potencial entomocida, para identificação de novos genes nas estirpes de Bt e auxílio no entendimento da distribuição e diversidade das estirpes e genes de Bt, esse trabalho teve como objetivo criar um sistema de identificação de genes baseado em reações de qPCR para caracterização de estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 6 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 6.1 *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria gram-positiva, esporulante, produtora de um cristal parasporal com potencial entomocida, sintetizado durante a esporulação. É uma bactéria que possui ampla distribuição podendo ser encontrada nos mais diversos ambientes (Figura 1). O conhecimento dos cristais parasporais levou ao desenvolvimento de bioinseticidas baseados em cepas de Bt para controle de insetos das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e Mallophaga, além de nematoides, ácaros e protozoários (SCHNEPF, *et al.*, 1998). Apesar do potencial do Bt e dos grandes avanços no seu uso para controle de insetos, seu papel no meio ambiente ainda não é bem definido (MELO, *et al.*, 2016).

**Figura 1** Diferentes nichos ecológicos de *Bacillus thuringiensis*. O solo (1) é considerado um dos principais reservatórios de esporos de Bt, já que recebe a maior quantidade de propágulos advindos de outros ambientes. A partir do solo o Bt pode colonizar as raízes das plantas (2), nutrindo-se dos exsudatos radiculares. Também podem ser ingeridos por vermes e insetos presentes no solo (3). A colonização da rizosfera favorece a colonização endofítica (4), podendo se proliferar nos tecidos das plantas e infectar os herbívoros de maneira paratênica (5) ou patogênica (6). O Bt pode atingir a superfície das plantas a partir do solo devido ao processo de germinação, por ação da água da chuva e pelas fezes dos animais que o transportam, como insetos e aves (7). Pode ser reintroduzido no solo ou na água a partir das folhas contaminadas que caem das plantas, (8) ou ainda, os esporos podem ser transportados pela água da chuva (9). Na água, Bt pode infectar e proliferar em vertebrados ou invertebrados e persistir nesse ambiente, associando-se a substratos como plantas aquáticas e sedimentos (10). As fezes de animais que se alimentam de plantas ou insetos contaminados também podem servir como fonte de nutrientes para o crescimento de Bt (11). Sabe-se que carrapatos e ácaros também são hospedeiros do Bt (12), mas o mecanismo natural da infecção é desconhecido.



**Fonte:** Adaptado de ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014.

O ciclo de vida do Bt é caracterizado por duas fases: divisão celular vegetativa e formação de esporo (ou esporulação). A célula vegetativa possui forma de bacilo que ao se dividir origina duas células filhas idênticas, enquanto a esporulação se caracteriza pela divisão celular assimétrica (SALEEM, et al., 2010). Durante a esporulação, a bactéria produz as proteínas sob a forma de cristais parasporais que podem consistir em uma ou mais proteínas conhecidas como  $\delta$ -endotoxinas (BRAVO; GIL; SOBERÓN, 2007). As toxinas presentes nos cristais são classificadas em duas grandes famílias denominadas Cry e Cyt. A proteína Cry (do inglês *crystal*) representa a maior parcela das toxinas, contando atualmente com mais de 800 genes caracterizados, agrupados em 78 famílias. As proteínas Cyt (do inglês *cytotoxic*) são caracterizadas por possuírem atividade citolítica *in vitro*, porém vem mostrando atividade específica contra dípteros (ADANG, et al., 2014). Durante seu crescimento vegetativo o Bt também produz duas outras proteínas que são secretadas no meio externo, denominadas Vip (*Vegetative insecticidal protein*) e Sip (*Secreted insecticidal protein*), que possuem atividade inseticida contra insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera (PALMA; BERRY, 2016).

#### **6.1.1 Classificação e definição de toxinas Cry, Cyt, Vip e Sip**

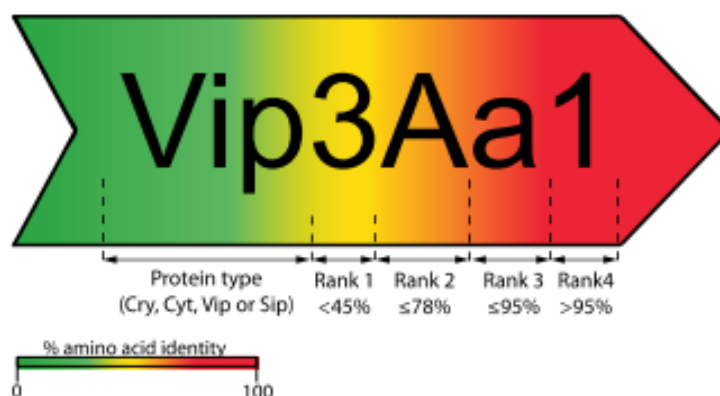
As toxinas Cry são definidas como proteínas que possuem alta identidade em suas sequências de aminoácidos quando comparadas entre si ou com outras proteínas cry previamente caracterizadas. As toxinas também são descritas como inclusões proteicas parasporais de Bt que possuem atividade entomocida ou diferentes graus de toxicidade comprovada experimentalmente em um alvo ou organismo (ADANG, et al. 2014). A nomenclatura das toxinas leva em consideração somente a identidade entre os aminoácidos da proteína, desconsiderando a toxicidade a alvos semelhantes, e proteínas com alvos semelhantes podem não compartilhar o mesmo nome (PALMA, et al., 2014).

O sistema de nomenclatura foi gerado a partir do alinhamento de múltiplas sequências, adotando um sistema de nomenclatura de quatro níveis em que proteínas que possuem pelo menos 45% de identidade foram colocadas no mesmo grupo primário (Cry1 e Cry2, por exemplo). O grupo primário foi dividido em proteínas que possuem pelo menos 78% de identidade nas suas sequências e alocados no segundo nível (Cry1A e Cry1B, por exemplo). O terceiro nível foi criado para proteínas que possuem até 95%



de identidade (Cry1Aa e Cry1Ab, por exemplo) e o quarto nível criado para proteínas que possuem mais de 95% de identidade entre as suas sequências (Cry1Aa1 e Cry1Aa2, por exemplo). O sistema de quatro níveis também se aplica às outras toxinas, e o sistema pode ser visto na Figura 2 (CRICKMORE et al., 2020).

**Figura 2** Sistema de nomenclatura utilizado pelo Comitê de Nomenclatura de toxinas de Bt para Cry, Cyt, Vip e Sip. A imagem ilustra como é feita a nomenclatura das toxinas e como o nome varia de acordo com o nível de identidade das sequências de aminoácidos das toxinas.



**Fonte:** Adaptado de PALMA, et al., 2014.

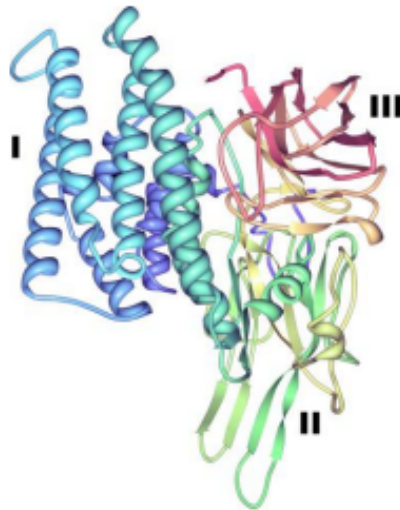
### 6.1.2 Estrutura das proteínas Cry, Cyt, Vip e Sip

A maioria das toxinas Cry possui o mesmo modelo de três domínios (I, II e III, como ilustrado na Figura 3) apesar da diferença entre alguns aminoácidos de suas sequências e de seus tamanhos. A estrutura do domínio I contém sete ou oito  $\alpha$ -hélices e, considerando que possuem tamanho suficiente para alcançar a membrana hidrofóbica celular e que o domínio I se assemelha a domínios de outras toxinas bacterianas que formam poros em membranas, foi sugerido e posteriormente demonstrado que o domínio I é responsável por se inserir na membrana, formando poros (LI; CARROL; ELLAR, 1991).

O domínio II, que consiste em uma estrutura de três folhas- $\beta$ , está envolvido na oligomerização, inserção na membrana e ligação ao receptor, exibindo estrutura similar a várias proteínas receptoras de carboidratos. O domínio III também apresenta identidade com outras proteínas que se ligam a carboidratos, participando na ligação ao receptor e possivelmente da inserção na membrana. Isso sugere que os carboidratos possuem uma importante relação com o modo de ação das proteínas de três domínios (BRAVO; GIL; SOBERÓN, 2007; ADANG, et al, 2014).

Enquanto os domínios I e II coevoluiram, análises de sequências de aminoácidos do domínio III revelaram diferentes conformações devido à ocorrência de rearranjos nesta porção da molécula. Toxinas com dupla especificidade são exemplos de toxinas que podem sofrer mudanças, sugerindo que uma reorganização do domínio III está envolvida na criação de novas especificidades. A evolução independente do domínio III, que se reorganiza em diferentes toxinas, gerou proteínas com modo de ação similares, mas com especificidades diferentes (BRAVO, et al., 2007).

**Figura 3** Estrutura tridimensional da toxina Cry. Os numerais romanos indicam os domínios da proteína: I - domínio perfurador; II - domínio central envolvido na interação ao receptor; III - domínio de ligação envolvido na ligação ao receptor e formação de poros.



**Fonte:** Adaptado de PALMA *et al.*, 2014.

A estrutura tridimensional conservada da maioria das proteínas Cry sugere um modo de ação comum, com as estruturas primárias e secundárias sendo responsáveis pela especificidade. É sabido que as proteínas Cry possuem como alvo os enterócitos dentro do intestino médio do hospedeiro comprometendo a barreira epitelial, fazendo com que ocorra um colapso da barreira celular intestinal durante a intoxicação por toxinas Cry (CRICKMORE, et al., 2014).

As proteínas Cyt possuem apenas um domínio  $\alpha$ - $\beta$ , com duas camadas exteriores de  $\alpha$ -hélice que formam um grampo ao redor da folha  $\beta$ . As  $\alpha$ -hélices possuem caráter anfipático, enquanto os resíduos hidrofóbicos estão posicionados contra as folhas  $\beta$  (SOBERÓN; LÓPEZ-DIAZ; BRAVO, 2013).

As proteínas Vip1, Vip2 e Sip possuem sequências conservadas de peptídeos sinal que são clivados antes ou depois do processo de secreção ser completado. Vip1 e Vip2 constituem uma toxina binária com alta atividade inseticida contra coleópteros e hemípteros. Já a toxina Vip3 é uma proteína de cadeia simples. As proteínas Vip1 e Vip2 possuem peptídeos-sinal na porção N-terminal. A homologia das proteínas Vip1 e Vip2 com toxinas binárias do tipo A/B de outras bactérias sugere que essas toxinas formam uma proteína binária do tipo A/B. Porém, enquanto Vip2 é uma citotoxina, Vip1 é uma proteína de ligação ao receptor, responsável pela translocação da Vip2 para o interior das células hospedeiras. Por ser a proteína mais recentemente descoberta, a estrutura da proteína Sip ainda não foi bem descrita, possuindo baixa identidade, porém significativa, com proteínas do tipo MTX3 (PALMA *et al.*, 2014).

### **6.1.3 Modo de ação das toxinas Cry, Cyt, Vip e Sip**

#### **6.1.3.1 Toxinas Cry**

Proteínas citolíticas são produzidas por diversos organismos incluindo bactérias, alguns insetos e répteis venenosos, sendo secretadas como proteínas solúveis e, quando em contato com o epitélio intestinal, se ligam à membrana citoplasmática dos enterócitos, eventualmente se translocando para o citoplasma da célula. Muitas das proteínas citolíticas caracterizadas até hoje, incluindo as proteínas Cry, parecem atuar por meio da formação de poros na membrana celular, destruindo a barreira osmótica e levando o hospedeiro à morte. Tais tipos de proteínas são muitas vezes denominadas toxinas formadoras de poros (*Pore-forming toxins*) (PARKER; FEIL, 2005).

Apesar de inseticidas baseados em toxinas de Bt serem comercializados mundialmente, o mecanismo que induz à citotoxicidade ainda não foi completamente elucidado, e estudos que buscam esclarecer os eventos responsáveis pela morte celular não acontecem com a mesma velocidade de isolamento de novas estirpes. Atualmente é sabido que uma estirpe de Bt pode ser utilizada para combater um tipo específico de inseto (Figura 4), porém vários mecanismos de ação foram reportados, indicando que não há um único mecanismo padrão. Esses mecanismos complexos podem ocorrer de maneira simultânea, mostrando que há muito a ser estudado em relação aos mecanismos associados à morte do organismo (MELO, *et al.*, 2016).

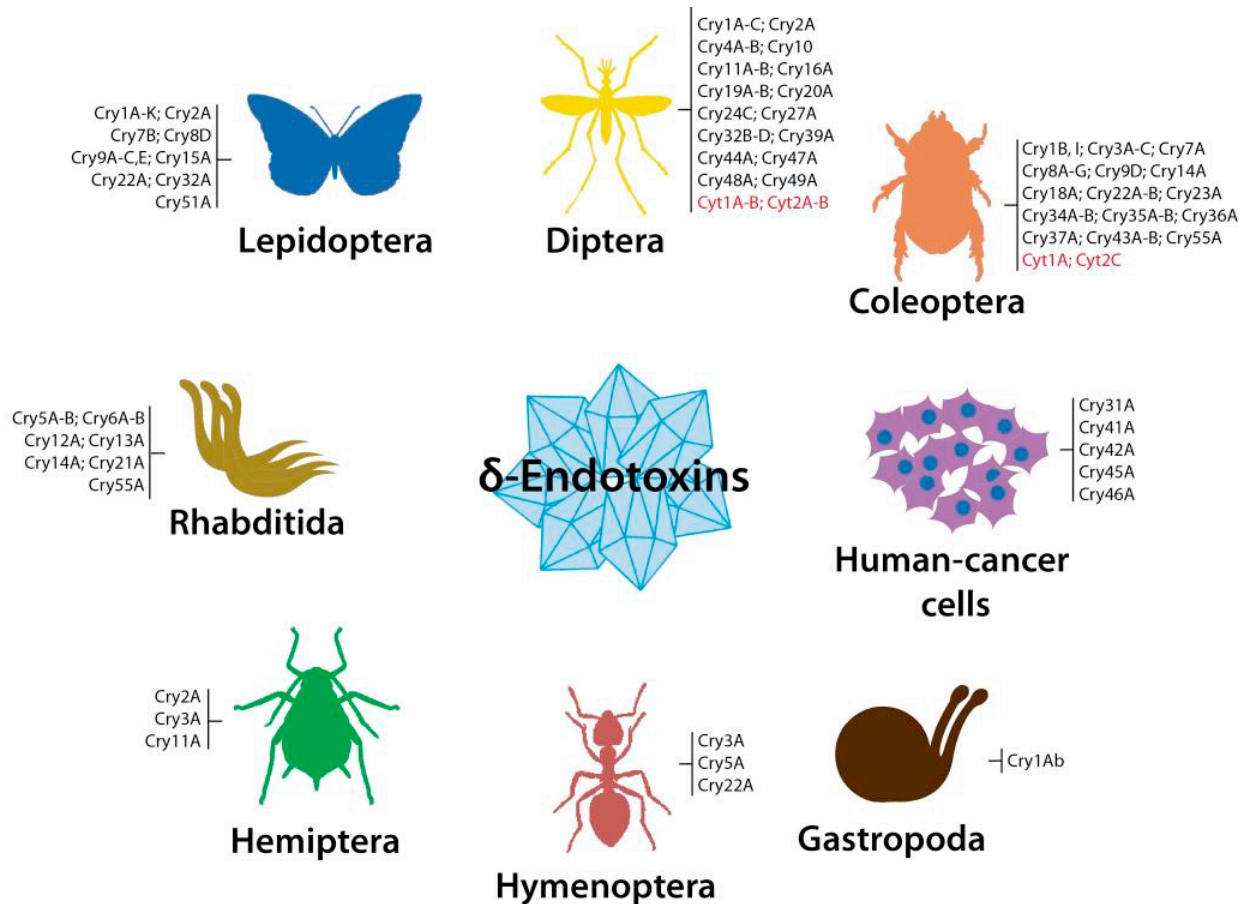
A ação primária das toxinas consiste na lise das células epiteliais do intestino médio dos hospedeiros com a formação de poros na membrana apical das microvilosidades. Em 2006, Zhang *et al.*, sugeriram que a toxicidade poderia estar associada também à uma proteína G mediadora de apoptose. As toxinas Cry passam de protoxina a inclusões de oligômeros inseridos na membrana causando extravazamento de íons e morte celular. Os cristais ingeridos por insetos susceptíveis se solubilizam no pH básico do seu intestino médio e as protoxinas inativas são clivadas por proteases intestinais, formando proteínas resistentes à ação de proteases. A ativação da toxina envolve a remoção de um peptídeo N-terminal e aproximadamente metade da porção proteica C-terminal. A toxina ativa se liga a receptores de membrana nas células colunares do epitélio intestinal, antes de se inserirem na membrana (BRAVO, et al., 2007).

De acordo com o modelo clássico descrito acima a protoxina necessita ser convertida em toxina para matar os hospedeiros, ao passo que qualquer perturbação nesse processo causa maior resistência às toxinas e protoxinas. Contudo, estudos *in vitro* mostraram que tanto a protoxina quanto a toxina se ligam a receptores de membrana, levantando a possibilidade de que a ligação de protoxinas a receptores do intestino médio podem matar os hospedeiros por vias tóxicas diferentes das primeiras vias iniciadas pela ligação de toxinas ativas (TABASHNIK, et al., 2015).

#### **6.1.3.2 Toxinas Cyt**

As proteínas Cyt são produzidas como protoxinas que são solubilizadas no intestino de insetos susceptíveis e são ativadas por proteases, produzindo toxinas ativas com ação citolítica. As toxinas Cyt, ao contrário das toxinas Cry, não necessitam de um receptor específico, interagindo com lípidios não saturados da membrana. Foram levantadas duas hipóteses para explicar o mecanismo de ação das toxinas Cyt: i) formação de poros, criando canais seletivos de cátions, levando à lise por desregulação da pressão coloidosmótica; ii) efeito detergente que propõe uma agregação não específica da toxina na bicamada lipídica da membrana, levando à desmontagem da membrana e morte celular. Os dois modelos não são exclusivos podendo ocorrer em diferentes concentrações de toxinas ou em tempos diferentes (SOBERÓN; LÓPEZ-DÍAZ; BRAVO, 2013).

**Figura 4** Espectro de ordens de insetos hospedeiros-alvo das proteínas Cry e Cyt.



Fonte: Adaptado de PALMA, et al., 2014.

### 6.1.3.3 Toxinas Vip

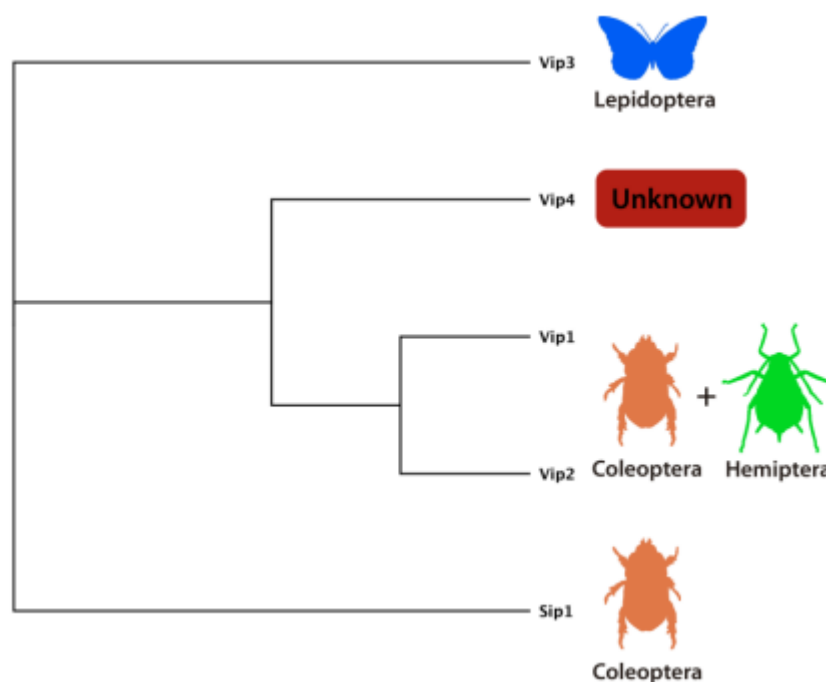
As proteínas Vip1 e Vip2 agem como proteínas binárias com toxicidade a alguns coleópteros e hemípteros; a toxina Vip3 é ativa contra lepidópteros e, até o momento, ainda não há um alvo definido para Vip4. O gênero *Bacillus* produz toxinas que agem de forma sinérgica e binária do tipo A/B, não formando agregados antes de se ligarem à membrana celular, sendo a Vip2 o componente A e a Vip1 o componente B. Portanto, a Vip1 age como um componente de ligação e formação de canal enquanto Vip2 entra na célula e exerce sua toxicidade. As toxinas Vip são solubilizadas no intestino do hospedeiro por proteases do tipo tripsina. O monômero ativo reconhece receptores específicos na membrana celular, onde a toxina é então inserida, provavelmente via endocitose. Uma vez dentro da célula, o sítio catalítico da toxina Vip2 previne a polimerização da actina, inibindo a formação das redes de microfilamentos (SALEEM, et al., 2010).

Assim como as  $\delta$ -endotoxinas, os mecanismos associados à toxicidade de Vip3 são complexos, envolvendo vários passos. Apesar de não possuírem elevado grau de homologia em suas sequências de aminoácidos, o mecanismo de toxicidade da Vip3 é parecido com o mecanismo descrito para as toxinas Cry (LEE, et al., 2003; SALEEM, et al., 2010).

#### 6.1.3.4 Toxinas Sip

A toxina Sip é processada na parte N-terminal por proteases ativas no meio. Apesar da baixa homologia, mas significativa, com as proteínas MTX3, é sugerido que a toxina atua de maneira similar às proteínas formadoras de poros, mas o modo de ação ainda não foi totalmente descrito. Atualmente possuem atividade tóxica descrita para coleopteros, como observado na Figura 5 (PALMA, et al., 2014).

**Figura 5** Espectro de hospedeiros das proteínas secretadas Vip e Sip.



**Fonte:** Adaptado de PALMA, et al., 2014.

## 6.2 Caracterização dos isolados de Bt e diversidade

Diferentes espécies presentes no grupo *Bacillus cereus* produzem bacteriocinas (*Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus*), proteínas formadoras de poros, como proteínas MTX produzidas por *L. sphaericus*, e até mesmo quitinases. Contudo, até o presente momento, apenas *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* são

conhecidos produtores de proteínas Cry, sendo que *Lysinibacillus sphaericus* produz apenas as proteínas Cry48 e Cry49 (BERRY, 2012).

A classificação e taxonomia para separação das espécies do grupo *Bacillus cereus* há muitos anos é causa de controvérsia na comunidade científica. Para que um organismo seja caracterizado como *Bacillus thuringiensis* era necessário que a estirpe apresentasse cristais durante a esporulação e fosse resistente à penicilina, o que não se mostra adequado pois diferentes espécies de *Bacillus spp.* já demonstraram algum tipo de resistência não só à penicilina, mas a diversos antibióticos, e a diferenciação entre espécies se mostra difícil mesmo com as técnicas avançadas de biologia molecular. A relação entre os diferentes membros do grupo foi feita por técnicas de hibridização de DNA e pela comparação de sequências nucleotídicas dos genes codificadores dos rRNAs 16S e 23S, porém os métodos não possuem poder de resolução suficiente para diferenciar os membros desse grupo (RASKO *et al.*, 2005).

A utilização de genes codificadores de proteínas entomocidas se mostra um bom marcador para análises de triagem e prospecção de estirpes de Bt pelo fato de nenhuma outra bactéria conhecida até o presente momento produzir esse tipo de proteína e por alguns desses genes já terem sido utilizados em outros estudos de caracterização de isolados de diferentes regiões (URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003; SAUKA; BENINTENDE, 2017; JAIN *et al.*, 2017; YILMAZ; AYVAZ; AZIZOGLU, 2017; BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019).

O Bt possui alta diversidade genética com diferentes potenciais tóxicos, e diferentes habitats podem conter novas estirpes de Bt tóxicas a diferentes ordens de insetos. Estudos de triagem, utilizando técnicas bioquímicas, sorológicas e moleculares, levaram à criação de diferentes coleções de isolados de Bt em diversas regiões do mundo para avaliar o potencial tóxico de estirpes de Bt e sua diversidade (ZOTHANSANGA; SENTHILKUMAR; GURUSUBRAMANIAN, 2016).

O entendimento da ecologia do Bt e seus isolados é complexa uma vez que a maioria desses genes são expressos em plasmídeos que podem ser transferidos intra- e interespecificamente, de forma completa ou parcial. Diferentes nichos ecológicos

podem conter diferentes estirpes de Bt com combinações genéticas únicas, levando à busca constante desses novos isolados (NAIR et al., 2018).

As razões da existência de alta diversidade de genes produtores de toxinas ainda não são bem entendidas, porém alguns fatores que variam entre as espécies de insetos parecem ser importantes: pH intestinal, as proteases presentes e os receptores expressos pelos insetos. Esses fatores podem exercer certa pressão de seleção nas estirpes de diferentes ambientes, forçando à adaptação genética (PALMA et al., 2014). É possível que características geoclimáticas possam interferir no conteúdo genético dos isolados de Bt (URIBE; MARTÍNEZ; CERON 2003), e o tipo de cultivo predominante da região possa influenciar na diversidade genética exercendo pressão de seleção, uma vez que as estirpes estão em contato com diferentes insetos praga em diferentes cultivos.

### **6.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das ferramentas mais poderosas da biologia molecular e tem sido utilizada com bastante frequência em diversos estudos de caracterização de estirpes de Bt (URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003; SAUKA; BENINTENDE, 2017; JAIN et al., 2017; YILMAZ; AYVAZ; AZIZOGLU, 2017; BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019).

Utilizando a PCR, sequências específicas de DNA, DNA complementar (cDNA) e até mesmo fragmentos de RNA podem ser amplificados (copiados) em milhares ou até milhões de vezes, utilizando oligonucleotídeos específicos a essas sequências, uma DNA polimerase termoestável e um termociclador. Enquanto na reação de PCR comum a detecção da sequência alvo é feita após o último ciclo da PCR (*endpoint*), por meio de eletroforese em gel de agarose e análise de imagens, na reação de qPCR a análise é feita em tempo real (*real time*), ciclo após ciclo, descartando análises pós ensaio.

Com a qPCR, a quantidade de DNA é mensurada a cada ciclo por via de corantes fluorescentes que aumentam a fluorescência a cada ciclo da reação, teoricamente duplicando a quantidade inicial do alvo, de forma proporcional à quantidade de amplicons gerados. Os reporteres fluorescentes podem ser tanto um corante que se liga ao DNA dupla fita (dsDNA) ou corantes anexados aos *primers* que se hibridizam durante a amplificação. A mudança de fluorescência ao longo do ensaio é medida por um



aparelho que tem a capacidade tanto de termociclagem quanto de detecção de fluorescência, e, a partir de um gráfico de fluorescência *versus* número de ciclos é possível verificar o acúmulo do produto durante todo o ensaio (THERMOFISHER, 2016).

Tanto a PCR convencional quanto a qPCR possuem três passos principais: i) desnaturação, quando a dupla fita de DNA é desnaturada, expondo as bases do DNA, o que ocorre a 95°C; ii) anelamento, quando os *primers* se ligam às fitas simples de DNA à uma temperatura ideal utilizada de acordo com cada ensaio; iii) extensão, entre 70°C e 72°C, quando a DNA polimerase termoestável promove a síntese da fita complementar à sequência alvo. A cada ciclo, teoricamente, a quantidade de produto inicial dobra e ao final do ensaio, o produto inicial é multiplicado em milhões de vezes (MULLIS, et al., 1986).

Diferentemente da PCR convencional, a qPCR utiliza fluoróforos que são mensurados ciclo após ciclo, e que podem ser de dois diferentes tipos: corantes ligante ao dsDNA ou uma sonda fluorescente que se hibridiza à fita simples de DNA (ssDNA) (ARYA, et al., 2005).

Ensaio que utilizam sondas de hidrólise possuem maior especificidade em relação aos que utilizam químicas como o SYBR Green, porém são ensaios mais caros devido à sua construção. Experimentos com sonda de hidrólise consistem em um *primer*, uma sonda e um atenuador (*quencher*). O primeiro elemento chave de ensaios que utilizam sonda é a capacidade exonuclease 5' da DNA polimerase. O domínio 5' tem a capacidade de degradar o DNA ligado ao produto inicial, antes da extensão ocorrer. Um segundo elemento chave para reações com Sonda de hidrólise é denominado FRET (*fluorescent resonance energy transfer*) que permite que a fluorescência do fluoróforo seja fortemente reduzida na presença do atenuador. Durante a qPCR, os *primers* e as sondas se anelam ao alvo. Caso a sonda esteja ligada ao alvo correto, a atividade nucleasa da DNA polimerase cliva a sonda, liberando fragmentos que contém o fluoróforo que, ao ser separado do atenuador, emite uma fluorescência que o aparelho pode detectar (BIOSYSTEMS TECHNOLOGIES, 2011).

O corante SYBR Green é um corante fluorescente que se liga ao dsDNA e, quando ligado, emite uma fluorescência muito maior se comparado ao corante não ligado. Um

ensaio com corantes que se ligam ao dsDNA normalmente possui apenas dois *primers*. Em condições ideais, experimentos com corantes do tipo SYBR Green seguem um padrão de amplificação idêntico aos ensaios com sonda de hidrólise. No início da reação há apenas um ruído (*baseline*) e, a medida que o alvo é multiplicado, ocorre um aumento de fluorescência e o sinal de amplificação torna-se visível (APPLIED BIOSYSTEMS, 2013) (THERMOFISHER, 2016).

A especificidade do ensaio é um dos pontos chave para que a qPCR ocorra de maneira adequada e deve sempre ser levada em consideração. Experimentos que utilizam SYBR Green ou químicas parecidas devem ser contruídos com maior cuidado, uma vez que não possuem a alta especificidade que as sondas de hidrólise possuem. Corantes que se ligam ao dsDNA podem se ligar a qualquer amplicon, mesmo que esse não seja o alvo do experimento, podendo produzir resultados falso-positivos. A especificidade de um ensaio que utiliza SYBR Green não pode ser avaliada pela curva de amplificação e, por isso, ao final de cada experimento, é feita uma rampa de temperatura, conhecida como curva de *melting*.

A curva de *melting* consiste em uma dissociação gradual dos produtos de PCR após o término dos ciclos, por meio de uma rampa de temperatura. É uma alternativa extremamente viável para análise de especificidade, uma vez que não adiciona custos ao ensaio e é feita logo após o término da reação. Contudo, aumenta o tempo do experimento e requer uma análise após o ensaio que pode ser subjetiva. O conceito da dissociação vem de que se o alvo é uma sequência genética específica, ele deve ter uma temperatura de *melting* ( $T_m$ ) específica e, portanto, amplificações inespecíficas possuem temperaturas de *melting* diferentes.

## 7 JUSTIFICATIVA

Genes e estirpes de Bt possuem grande interesse industrial pela possibilidade de controle de insetos praga de diferentes cultivos sem a utilização de produtos químicos, de forma sustentável e financeiramente acessível, sem riscos a espécies que não são alvo da ação das toxinas, sendo amplamente empregados na agricultura para controle de insetos praga, além do potencial emprego na saúde pública para controle de vetores de doenças e possibilidade de pesquisas com toxinas ativas contra células tumorais.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui a Coleção de Bactérias de Invertebrados composto por mais de 2600 estirpes de *Bacillus spp.* (FIUZA; POLANCZYK; CRICKMORE, 2017; MONNERAT, et al., 2015). A caracterização genética dessas estirpes é importante para formulação de novos produtos, criação de novos eventos transgênicos, para identificação e prospecção de novos genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* em estirpes de Bt com potencial entomocida e combate à resistência de insetos praga no campo.

As estirpes de Bt da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram coletadas de diferentes regiões brasileiras criando uma Coleção com estirpes de variadas regiões geográficas e climáticas, possibilitando uma análise ampla da influência dessas condições na abundância, ocorrência, frequência e correlação dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip*.

O trabalho visa criar um sistema de caracterização molecular para estirpes de *Bacillus thuringiensis* utilizando os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip* como marcadores, por ensaios de PCR em tempo real (qPCR). Para aumentar a cobertura da caracterização foram escolhidas as principais famílias que constituem os genes *cry* e todas as famílias de genes *cyt*, *vip* e *sip* foram incluídas.

A criação de um sistema de caracterização de estirpes de Bt de maneira ágil e reprodutível permitirá sua replicação em estudos e pesquisas afins. A caracterização de uma Coleção é fundamental para o conhecimento da diversidade genética que a Coleção possui, contribuindo para a formulação de novos produtos e eventos transgênicos, além

de permitir melhor aproveitamento do conteúdo gênico. As análises e resultados ainda podem contribuir no entendimento dos diferentes ecótipos que o Bt pode apresentar dependendo da região que foi isolado e do tipo de estirpe coletada.

Portanto, caracterizar a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos é importante considerando a amplitude do material preservado, a possibilidade de ampliação do conhecimento acerca do Bt, seu papel ecológico e distribuição geográfica e, além disso, a possibilidade de extensão da técnica para outros laboratórios, ampliando os estudos de biodiversidade de Bt para ajudar a elucidar seu papel ecológico, distribuição geográfica e biodiversidade.

## **8 OBJETIVOS**

### **8.1 Objetivo geral**

Fazer um levantamento da ocorrência de genes de toxinas presentes em estirpes de *Bacillus thuringiensis* da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e aplicar teste p-valor, qui-quadrado e AMOVA para entender o mecanismo de distribuição dos genes produtores de proteínas entomocidas estudados.

### **8.2 Objetivos específicos**

#### **8.2.1 Desenvolver o protocolo de identificação de potenciais genes produtores de proteínas com atividade entomocida:**

- a) Desenhar *primers* específicos para os genes codificadores de toxinas com base em sequências de DNA disponíveis em bancos de dados;
- b) Estabelecer o protocolo de qPCR utilizando sistema SYBR Green.

#### **8.2.2 Analisar o conteúdo genético e a diversidade dos genes das estirpes selecionadas da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos:**

- c) Detectar a presença de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip* em 300 isolados que compõem a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos;  
Analisar a diversidade e distribuição dos genes codificadores de proteínas entomocidas presentes nas diferentes estirpes.

## 9 MATERIAIS E MÉTODOS

### 9.1 Seleção das estirpes

A proposta inicial era trabalhar com a seleção de 300 estirpes, porém, durante a execução dos trabalhos instaurou-se a pandemia pelo novo coronavírus SARS-CoV-2 que restringiu o acesso ao laboratório, prejudicando a rotina de pesquisa. Considerando o horário reduzido de trabalho, o esquema de revezamento laboratorial e as dificuldades impostas pelo novo cenário, optou-se por uma redução da quantidade de estirpes sem prejuízo dos resultados. Assim, foram selecionadas 258 estirpes de forma randômica pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As primeiras estirpes selecionadas foram estirpes utilizadas como controles para definir a curva padrão de cada reação a ser montada, de acordo com a Tabela 1.

Amostra	Referência
<b>A1</b>	<i>vip2b</i>
<b>A2</b>	<i>vip1a</i>
	<i>vip2a</i>
	<i>vip3a/b</i>
<b>A3</b>	<i>cry1</i>
	<i>cry2</i>
	<i>cry6</i>
<b>A4</b>	<i>cry4</i>
	<i>cry10</i>
	<i>cry11</i>
	<i>cyt1</i>
	<i>cyt2</i>
<b>A5</b>	<i>cry9</i>
<b>A6</b>	<i>vip3c</i>

**Tabela 1** Estirpes utilizadas como controles positivos e seus respectivos genes alvo.

### 9.2 Seleção dos genes de interesse

Os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip* foram selecionados devido à sua grande diversidade em Bt, sendo que possuem atividade entomocida descrita para pelo menos uma ordem de insetos. Foram escolhidos os genes de maior representatividade da família *cry* e, para os genes *cyt*, *vip* e *sip*, todos foram incluídos.

### 9.3 Desenho e análise dos *primers*

As sequências dos genes de interesse foram buscadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) em conjunto com o banco genético específico para *Bt* (CRICKMORE, 2020). As sequências foram alinhadas utilizando o software *Geneious* (BIOMATTERS, 2019) e, após o alinhamento, foram escolhidas regiões mais conservadas para a síntese de sequências consenso de DNA para os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip*. Para construção dos *primers* foi utilizado o programa *Primer Quest Tool* (INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, 2019). Os *primers* foram desenhados a fim de se obter sequências gerais para cada gene de interesse que gerassem produtos amplificados de até 150pb, com temperatura de anelamento entre 60°C e 64°C e que pudessem ser utilizados com corante intercalante de DNA.

Após o desenho dos *primers* suas sequências foram analisadas pelo *Primer Stats* (STOTHARD, 2000) a fim de evitar o desenho de oligonucleotídeos defeituosos, que sofressem efeito de grampo, por exemplo, ou com temperaturas de anelamento muito altas. Os *primers* foram também comparados a outras sequências de DNA por meio da ferramenta *Nucleotide Blast* (NCBI, 2019), para confirmar suas especificidades e da sequência consenso utilizada.

Após o desenho e teste dos *primers* para os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry5*, *cry6*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry10*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt2* e *sip*, suas sequências foram sintetizadas pela Integrated DNA Technologies® na concentração de 100µM.

Os ensaios de qPCR foram preparados utilizando-se o kit *GoTaq qPCR Master Mix* (PROMEGA CORPORATION, 2014), o qual possui um corante similar ao SYBR Green®, chamado BRYT Green®, de acordo com o manual da fabricante. Os *primers* foram diluídos para uma concentração padrão de 10µM.

No ensaio, foi utilizada primeiramente uma concentração de 600nM dos *primers* na reação. Para análise da funcionalidade dos *primers* foram feitos testes de controles positivos e negativos, sem limite de concentração dos *primers*. Para os genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* seus *primers* mostraram-se adequados, sem a formação de dímeros e com positividade das

reações. Suas características são mostradas na tabela 2. Os *primers* para os genes *cry8*, *vip1c* e *sip* não se mostraram satisfatórios pois não resultaram em amplificação de qualquer estirpe utilizada como controle positivo para esses genes, sendo por essa razão excluídos do estudo.

Gene Alvo	Sequência (5'- 3')	Tamanho (pb)	%GC	Tm(°C)
<i>cry1</i>	D – GGTGCTGGATTTGTGTTAGGA	D - 21	D - 47,6	61
	R- GTTCCTAGCGAATTCTTCTATTCT	R - 25	R - 40	
<i>cry2</i>	D- CCCAGTTCCAGATGCAAGGATA	D - 22	D - 50	64
	R- AGAAAGATGTAAATTGGCTGCCT	R - 24	R - 37,5	
<i>cry4</i>	D- ACTTCTGATATGTTGTATTCATGCC	D - 26	D - 38,5	61
	R-AAACTAAATTGATGGGAATCCTGAC	R - 26	R - 38,5	
<i>cry6</i>	D-GTTCAAGATTCTGATGATGCTGATG	D - 25	D - 40	61
	R-TCCTGGTATTTCTGGGAACAT	R - 21	R - 47,6	
<i>cry9</i>	D-GGATTACAGGTAAATGTGACAGA	D - 23	D – 39,6	61
	R-ATCATGCCCATATTGTTTCATCT	R - 22	R – 36,4	
<i>cry10</i>	D-TCAATGCTCCATCCAATGGT	D - 20	D - 45	61
	R-TCAGTGGTTGATTTGGCTTATTTG	R - 24	R - 37,5	
<i>cry11a</i>	D- CACACAGTGGTTTCAGTCTACTC	D - 23	D - 47,8	61
	R- GGTGGTATTGTTCCGGTTCTAC	R - 22	R - 50	
<i>cyt1</i>	D- GGGCAAGGAAACTGCTAATC	D - 20	D - 50	61
	R- ATACATAACGCCACCAGTTTG	R - 21	R - 42,9	
<i>cyt2</i>	D- GGATTGTTTGGCGTAATTTATCAG	D - 24	D - 37,5	61
	R-TTGCCATAAATCTACCTGTATCTTC	R - 25	R - 36	
<i>vip1a</i>	D-AAAGCAGCGAGAGATTTAGATTTG	D - 24	D - 37,5	61
	R-CATACTAACATTACGCTTGGA	R - 24	R - 37,5	
<i>vip2a</i>	D- TCTGATGTAATGGCGCAGTTTA	D - 22	D - 40,9	61
	R- CTCGGCACTGTAACCTTCAA	R - 20	R - 50	
<i>vip2b</i>	D-ACAGGAATGTTTACAAGTTGAAGG	D - 25	D - 40	61
	R-ATCTCCCTTACCGTCACTATCA	R - 22	R – 45,5	
<i>vip3a/b</i>	D- CATTTATGGATTTGCCACTGGTATC	D - 25	D - 40	61
	R- AAATTACCACCACCTGTATCCG	R - 22	R – 45,5	
<i>vip3c</i>	D-AGACAAGTGGAAAGTGAGATTGG	D - 22	D – 45,5	61
	R- GTGAGAAAGGCTTTAGCTTGTA	R – 23	R – 39,1	

**Tabela 2** Sequência dos *primers* e suas respectivas características e gene alvo. As letras "D" e "R" representam os *primers* diretos e reversos.

#### 9.4 Extração e quantificação de DNA das estirpes.

As estirpes selecionadas foram cultivadas em meio EMBRAPA-ágar por 16h à 28°C (MONNERAT, et al., 2007). Com auxílio de uma alça bacteriológica descartável estéril de 10µL as colônias foram coletadas e ressuspensas em 200µL de água deionizada estéril em tubos de polipropileno de 1,5 mL e, em seguida, as estirpes foram incubadas com

2µL de lisozima (25mg/mL) a 37°C por 2 horas. Após a incubação, o DNA das estirpes foi extraído no extrator automatizado Maxwell® 16, utilizando o kit *Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit* (PROMEGA, 2007). Para algumas estirpes foi utilizado o kit *Magazorb® DNA Mini-Prep Kit* (PROMEGA, 2011) de acordo com o manual da fabricante.

O DNA obtido foi quantificado utilizando o aparelho Quantus™ Fluorometer com o kit *QuantiFluor® ONE dsDNA System* (PROMEGA CORPORATION, 2015), de acordo com o manual do fabricante. Depois de quantificadas, foi verificado o grau de pureza de cada estirpe com o espectrofotometro PicoDrop, por meio da análise das razões A260/280 e A260/230. A primeira é uma avaliação primária de pureza, onde o intervalo desejado para estirpes de DNA é 1,8 - 2,0, com razões menores que 1,7 indicando contaminação de proteínas e/ou fenol; a segunda é uma avaliação secundária de pureza, com intervalo desejado entre 1,8 – 2,2, com razões menores que 1,7 indicando contaminação com sal e/ou anéis de guadinidina (BUSTIN, *et al.*, 2009).

Após a verificação da qualidade, o DNA extraído foi quantificado utilizando o aparelho Quantus™ Fluorometer com o kit *QuantiFluor® ONE dsDNA System* (PROMEGA CORPORATION, 2015) de acordo com o manual do fabricante. Os DNAs foram então diluídos para um valor padrão de 10ng/µL para que as curvas padrões fossem construídas.

### **9.5 Otimização, curva padrão e eficiência dos ensaios de qPCR**

Após o teste de especificidade dos *primers*, estes foram submetidos a ensaios de otimização, por meio de sua titulação e posterior verificação da eficiência da reação.

Para a titulação foram construídas seis reações em duplicata, variando a concentração final dos *primers*, tanto direto quanto reverso. Após o término do ensaio, a concentração ideal foi determinada para cada *primer*.

Para as amplificações foi utilizado o equipamento Step OnePlus™ System da Applied Biosystems (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010), programado para o modo fast de acordo com o manual do kit GoTaq qPCR Master Mix (PROMEGA CORPORATION, 2019) e definida a condição de ciclagem, sendo 1 ciclo inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 61±3°C por 30 segundos, dependendo do *primer*



utilizado, e ao final uma rampa de temperatura começando em 60°C, em modo *step and hold*, até 95°C.

Ao final de cada ensaio foi feito um gradiente de temperatura, ou curva de *melting*, a fim de identificar se houve alguma contaminação do ensaio ou amplificação inespecífica dos *primers*. A faixa de temperaturas foi programada de 60°C a 95°C, em método de *step and hold*.

A curva padrão de qPCR para cada gene foi feita a fim de determinar a quantidade inicial de DNA que deveria ser utilizada para cada *primer*, a eficiência da reação e o limite de detecção (LoD).

A partir de uma quantidade inicial de 10ng/μL de DNA, foi feita uma diluição seriada com fator de diluição 1:5 obtendo-se cinco pontos na curva, com concentrações variando de 10 ng/μL a 0,01 ng/μL, sendo os ensaios feitos sempre em triplicata.

Após os ensaios para a confecção da curva padrão, a eficiência de cada reação para cada gene foi determinada. O aparelho utilizado calcula, após o ensaio da curva padrão, a eficiência da reação, que constitui em uma regressão linear do valor das diferenças do ciclo de quantificação (Cq) *obtido* em cada um dos pontos da curva padrão. Como a regressão influencia a inclinação da curva padrão, a seguinte equação foi definida por *Bustin et al., 2009*, para o cálculo da eficiência dos ensaios, sendo o *slope* (a inclinação) da curva padrão:

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1.$$

Os dados obtidos em cada ponto foram então analisados para gerar a curva padrão de cada gene, além de verificar a eficiência do ensaio, definir o *threshold* e analisar a confiabilidade dos resultados.

Para a construção da curva padrão foram utilizados os DNAs extraídos e padronizados em 10ng/μL. Foram feitas diluições seriadas dos DNAs com fator de diluição 1:5, para se obter 5 pontos na curva. Com a construção da curva padrão foi possível determinar os parâmetros de cada reação, de acordo com a tabela 3.

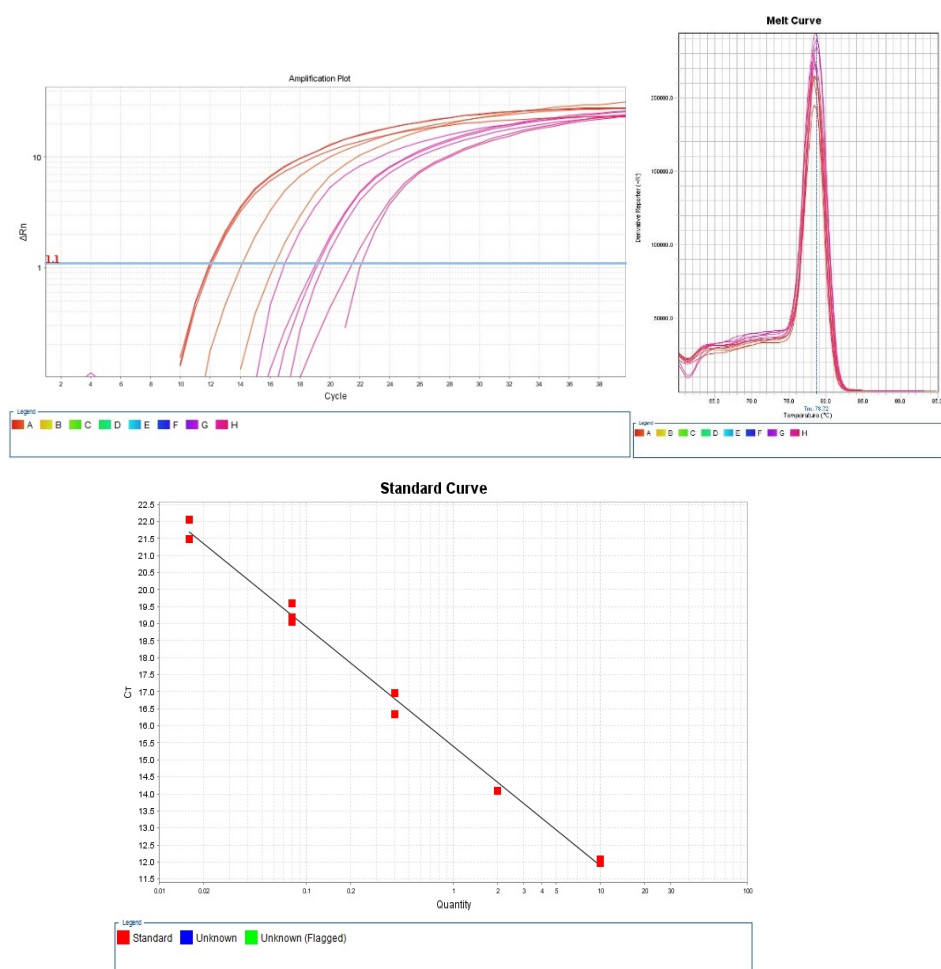
A eficiência de cada reação estava dentro do recomendado pelo MIQE (BUSTIN et al., 2009), entre 90% e 110%. Os valores de inclinação das retas também estavam dentro do recomendado de -3,58 a -3,10. A linearidade da curva é dada pelo valor de  $R^2$ , estabelecido acima de 0,98, onde valores abaixo de 0,95 podem indicar erros no ensaio. A linearidade das reações também ficou dentro do estipulado pelo MIQE (BUSTIN, S. A, et al., 2009).

O *threshold* foi definido, pois é esse parâmetro que permite afirmar quais estirpes são positivas e quais são negativas. Não há uma regra para definição do *threshold*, porém deve ser definido após o *baseline*, na fase exponencial da reação. Portanto, para cada ensaio, o *threshold* foi definido.

Alvo	R <sup>2</sup>	Eficiência(%)	Slope	Threshold	Tm (°C)
<i>cry1</i>	0,996	92,9	-3,505	1,1	78,72
<i>cry2</i>	0,995	96,072	-3,42	1	77,34
<i>cry4</i>	0,996	90,238	-3,58	0,25	76,62
<i>cry6</i>	0,998	91,99	-3,53	0,31	79,46
<i>cry9</i>	0,996	100,55	-3,309	1,25	79,31
<i>cry10</i>	0,993	97,046	-3,395	0,45	76,33
<i>cry11a</i>	0,990	103,211	-3,247	0,5	78,27
<i>cyt1</i>	0,998	100,311	-3,314	0,6	79,15
<i>cyt2</i>	0,994	106,666	-3,172	0,4	74,84
<i>vip1a</i>	0,994	96,409	-3,411	0,8	79,17
<i>vip2a</i>	0,990	108,561	-3,132	0,3	78,3
<i>vip2b</i>	0,998	90,092	-3,585	0,7	76,46
<i>vip3a/b</i>	0,992	105,807	-3,19	1,35	75,73
<i>vip3c</i>	0,995	90,74	-3,566	0,5	76,18

**Tabela 3** Alvos e seus respectivos parâmetros após construção da curva padrão.

A curva padrão *obtida* nos ensaios para os genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c*, bem como a curva de amplificação e a curva de *melting* podem ser verificadas no anexo A. A Figura 6 representa os parâmetros *obtidos* para *cry1*.



**Figura 6** Gráficos obtidos no ensaio de curva padrão para cry1. Observa-se no gráfico de amplificação a fase inicial, exponencial e platô. Na curva de *melting* observa-se ausência de duplo pico, indicando a não ocorrência de dímeros ou contaminações.

## 9.6 Análise primária dos dados obtidos por qPCR

Após a otimização dos ensaios e definição das eficiências, foi feita a análise primária dos dados obtidos, para a determinação de todos os *thresholds*, verificação das curvas de amplificação e controle de qualidade dos ensaios.

As curvas de amplificação foram analisadas a fim de verificar erros que o programa possa ter cometido como a definição errada dos valores da linha de base, que podem gerar curvas de amplificação errôneas.

Após a análise da linha de base, os gráficos de *Multicomponent Plot* foram avaliados com o intuito de verificar se houve evaporação das estirpes durante o ensaio, presença de bolhas nas estirpes e se o aparelho estava apresentando algum problema na detecção da fluorescência.

### 9.7 Validação dos ensaios com qPCR

A validação do sistema proposto para identificação de genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* foi feita utilizando-se sequências de DNA previamente obtidas relativas a isolados da Coleção de Bactérias de Invertebrados. Assim, os resultados dos ensaios de qPCR foram comparados aos resultados obtidos por sequenciamento, além de bioensaios que foram realizados previamente no laboratório. Os ensaios foram realizados utilizando-se o kit GoTaq qPCR Master Mix (PROMEGA CORPORATION, 2019) e as concentrações dos reagentes foram definidas de acordo com o manual da fabricante. O volume final de cada sistema de reação foi definido em 20µL, sendo constituído pelos reagentes descritos na tabela 3.

Alvo	Mix
<i>cry1, cry4, cry6, cry9, cry10, cry11a, cyt1, cyt2, vip1a, vip2a, vip2b, vip3a/b, vip3c</i>	dH2O 8,2 uL, <i>Primer1</i> – 0,3uL, <i>Primer2</i> – 0,3uL, Mix qPCR – 10uL, CXR- 0,2 uL, DNA – 1uL. Total = 20uL
<i>cry2</i>	dH2O 8,4 uL, <i>Primer1</i> – 0,2uL, <i>Primer2</i> – 0,2uL, Mix qPCR – 10uL, CXR- 0,2 uL, DNA – 1uL. Total = 20uL

**Tabela 4** Genes escolhidos como alvos para desenvolvimento do protocolo de identificação e seus respectivos sistemas de reação. As concentrações utilizadas foram *primer1* 10 mM, *primer2* 10 mM, Mix qPCR 2x, CXR 30uM e DNA 10ng/uL.

Os resultados obtidos por qPCR foram comparados com resultados de sequenciamento realizados previamente nas estirpes que foram utilizadas como controle positivo das reações (Tabela 5). Pode-se observar que, por se tratarem de *primers* gerais, os resultados com ensaios de qPCR não discriminam genes da mesma família (é possível observar apenas *cry1* no resultado por qPCR para A1, e não *cry1ba*, conforme o sequenciamento), porém o resultado é satisfatório uma vez que os mesmos genes são encontrados no sequenciamento e nos ensaios de qPCR.

Amostra	Sequenciamento	Identificação por qPCR
A1	<i>cry1ba, sip1a, vip2b, vip1ba, vip1bb</i>	<i>cry1, vip2b</i>
A2	<i>cry1ab, cry1bi, cry1bb, cry1c, cry1bb, cry1c, cry1d, cry1f, cry1hb, cry1id, cry1d, cry1f, cry1hb, cry1id, cry1ja, cry1ka, cry1nb, vip1a, vip2aa, vip3ag</i>	<i>cry1, vip1a, vip3a/b</i>
A4	<i>cry4aa, cry4ba, cry10aa, cry11aa, cyt1aa, cyt2ba, cyt1ca</i>	<i>cry4, cry10, cry11, cyt1, cyt2</i>

<b>A5</b>	<i>cry1aa, cry1ab, cry1ad, cry1ca, cry1da, cry1fa, cry1ia, cry2aa, cry2ab, cry9ca, vip3c</i>	<i>cry1, cry2, cry9, vip3c</i>
<b>A6</b>	<i>cry1aa, cry1ab, cryac, cry1ba, cry1bd, cry1ea, cry1ia, cry8kb, cry2ae, cry2ab, vip3aa</i>	<i>cry1, cry2, vip3a/b</i>

**Tabela 5** Resultados obtidos por sequenciamento realizados previamente ao presente estudo em comparação com resultados obtidos por qPCR.

## 9.8 Testes estatísticos

### 9.8.1 Teste de hipótese

Em estatística, o teste de hipóteses é o método utilizado para verificar se os dados são compatíveis com alguma hipótese, podendo muitas vezes sugerir a não-validade de uma hipótese. Ele é baseado na análise de uma amostra, através da teoria de probabilidades, usado para avaliar determinados parâmetros que são desconhecidos numa população. Na maioria das vezes é constituído por duas hipóteses:

$$\begin{cases} \text{Hipótese nula } (H_0): \text{Hipótese a ser testada} \\ \text{Hipótese alternativa } (H_1): \text{Hipótese aceitável caso a nula seja rejeitada} \end{cases}$$

### 9.8.2 P-valor

Na estatística clássica, o valor-p, *p-value* ou nível descritivo, é uma estatística utilizada para sintetizar o resultado de um teste de hipóteses. Formalmente, o valor-p é definido como a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual ou mais extrema que aquela observada em uma estirpe, assumindo verdadeira a hipótese nula. Se o p-valor for menor do que o nível de significância estabelecido, rejeita-se a hipótese nula. Caso contrário, conclui-se que não há evidência estatística suficiente para rejeitar  $H_0$ .

### 9.8.3 Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) via simulações de Monte Carlo

O teste Qui-quadrado de independência é usado para avaliar se há associação entre duas variáveis de uma tabela de contingência (tabela cruzada de variáveis qualitativas) construída a partir dos dados de uma amostra.

Hipóteses do teste:

$$\begin{cases} H_0: \text{As variáveis são independentes} \\ H_1: \text{As variáveis são dependentes} \end{cases}$$

Onde  $H_0$  é a hipótese nula e  $H_a$  é a hipótese alternativa.

Para que esse teste possa ser usado deve-se cumprir os requisitos: a) todas as frequências esperadas são maiores ou iguais a 1; b) no máximo 20% das frequências esperadas podem ser inferiores a 5.

Nos casos em que essas exigências não são atendidas, existem métodos que corrigem o  $\chi^2$  tornando-o exato, assim como existem métodos de reamostragem (Monte Carlo) que também tornam a estatística exata, possibilitando o uso do teste Qui-quadrado de independência.

Ao aplicar a simulação de Monte Carlo, simula-se os dados de acordo com a hipótese nula e verifica-se com que frequência ocorrem resultados tão extremos quanto ou mais extremos do que o obtido na amostra original. As simulações são geradas simulando tabelas “aleatórias” com totais marginais iguais aos da tabela original. Nesse caso, os graus de liberdade não entram na equação em nenhum estágio da computação.

#### **9.8.4 Análise de variância (AMOVA)**

A análise de variância foi feita utilizando-se o programa Arlequin 3.5 (WEIR; COCKERHAM, 1984; EXCOFFIER, et al., 1996) para analisar a diversidade genética das estirpes de Bt dentro da população e entre as regiões abordadas no presente estudo.

## 10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 10.1 Perfil, frequência e abundância dos genes de toxinas nas estirpes analisadas

#### 10.1.1 Perfil e frequência dos genes nas estirpes analisadas

Na Tabela 6 é possível observar as combinações de genes que ocorreram entre as estirpes de *Bacillus thuringiensis*. Das 257 estirpes analisadas, 58 apresentaram amplificação para pelo menos um gene alvo. A não detecção de pelo menos um gene alvo nas outras 200 estirpes da Coleção está possivelmente relacionada à antiga metodologia de isolamento de estirpes de Bt, baseada apenas na presença de cristais nas estirpes e resistência à penicilina. A combinação que ocorreu com maior frequência foi *cry1-cry2-vip3a/b* (34,48%), seguida por *cry1-cry2-cry9-vip3a/b* (8,62%), *cry1* (6,90%) e *vip1a* (5,17%). Todas as demais combinações apareceram apenas 1 ou 2 vezes.

Perfil	Frequência	%
<i>cry10</i>	1	1,72%
<i>cry9</i>	1	1,72%
<i>cry6</i>	1	1,72%
<i>cry2-cry9</i>	1	1,72%
<i>cry2-cry9-vip2B-vip3A.B</i>	1	1,72%
<i>cry1-vip3A.B</i>	1	1,72%
<i>cry1-vip2B</i>	1	1,72%
<i>cry1-vip1A-vip2B-vip3A.B</i>	1	1,72%
<i>cry1-vip1A-vip2A-vip3A.B</i>	1	1,72%
<i>cry1-cry9</i>	1	1,72%
<i>cry1-cry2-cry10-vip3A.B</i>	1	1,72%
<i>cry1-cry2-cry9-vip2B-vip3A.B</i>	1	1,72%
<i>vip1A-vip2B</i>	2	3,45%
<i>cry4-cry10-cry11a-cyt1-cyt2</i>	2	3,45%
<i>cry2-vip3A.B</i>	2	3,45%
<i>cry2-cry9-vip3A.B</i>	2	3,45%
<i>cry1-vip1A-vip2B</i>	2	3,45%
<i>cry1-cry2</i>	2	3,45%
<i>cry1-cry2-vip2B-vip3A.B</i>	2	3,45%
<i>vip1A</i>	3	5,17%
<i>cry1</i>	4	6,90%
<i>cry1-cry2-cry9-vip3A.B</i>	5	8,62%
<i>cry1-cry2-vip3A.B</i>	20	34,48%
Total	58	100%

**Tabela 6** Perfil de ocorrência dos genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* analisados das estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

O perfil de maior ocorrência (*cry1-cry2-vip3a/b* - 34,48%) é equivalente a perfis descritos previamente (NAIR et al., 2018; SAUKA; BENINTENDE, 2017) e pode ser

explicado pela presença da ilha de patogenicidade descrita por Zhu e colaboradores (2015), presente em um plasmídeo contendo os genes *cry1-cry2-vip3a/b*. A maior ocorrência do perfil *cry1-cry2-cry9-vip3a/b*, que contém o gene *cry9*, difere dos resultados encontrados na caracterização de estirpes argentinas (1,2%), porém possui grande similaridade com a frequência do perfil *cry1-cry2-cry9-vip3a/b* encontrado nas estirpes da Tailândia (12,66%). (SAUKA; BENINTENDE, 2017; BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019).

Boonmee, Thammassittirong e Thammassittirong (2019) caracterizaram 482 estirpes de Bt, descrevendo 118 estirpes com perfil *cry1-cry2-vip3a/b* (24,48%) e 61 estirpes com perfil *cry1-cry2-cry9-vip3a/b* (12,65%), resultados que se aproximam dos valores encontrados nesse estudo. Foi sugerido que isolados de Bt reflitam as características geográficas e climáticas de onde foram retirados, possuindo diferentes atividades inseticidas e diversidade genética (ARMENGOL *et al.*, 2007).

A diferença entre a combinação de genes em cada estudo pode, provavelmente, ser atribuída à diferença do número de isolados de Bt de cada coleção, dos genes alvos que foram escolhidos em cada estudo e da diversidade das amostras de Bt de cada coleção (BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019).

A maioria das estirpes possui mais de um gene *cry*. Como os genes estão localizados em plasmídeos, a existência de mais de um gene *cry* em estirpes de Bt corrobora a hipótese de que as estirpes trocam, com alta frequência, informações genéticas (YILMAZ; AYVAZ; AZIZOGLU, 2017).

### **10.1.2 Abundância dos genes nas estirpes analisadas**

O gráfico da Figura 7 mostra a abundância dos genes analisados. Os genes *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* são os de maior ocorrência nas estirpes de *Bacillus spp.* estudadas, seguidos dos genes *cry9*, *vip2b* e *vip1a*. Os resultados obtidos para *cry1* eram esperados uma vez que a família do gene *cry1* é a maior entre os genes *cry* descritos atualmente, possuindo maior probabilidade estatística de ocorrência (CRICKMORE, 2020), e resultados parecidos já foram encontrados em outros estudos de caracterização de coleções de Bt (URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003; SAUKA; BENINTENDE, 2017; JAIN *et al.*,







**Tabela 7** Caracterização molecular das estirpes de Bt por qPCR. 0 = não; 1 = sim.

Os isolados obtidos na região Centro-Oeste apresentaram maior diversidade de genes, com ocorrência de 12 dentre os 17 analisados. As regiões Norte e Nordeste, Sul e Sudeste apresentaram a mesma abundância (7 dos 17 genes analisados). Por fim, observa-se que a abundância geral foi igual a 13, mostrando que 4 genes (*cry8*, *cry11b*, *vip3c* e *sip*) não foram detectados em qualquer uma das estirpes, prejudicando possíveis análises sobre esses genes.

Localização	Abundância
Centro Oeste	12
Norte e Nordeste	7
Sul e Sudeste	7
Abundância geral	13

**Tabela 8** Abundância dos genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* por região.

Uribe, Martinez e Cerón, 2003, sugerem que as estirpes de Bt podem variar geneticamente dependendo do local que foram isoladas. A maior abundância dos genes, como observado na Tabela 8, está na região Centro-Oeste, com ocorrência de 12 genes. Os genes *cry11* e *cyt* apenas ocorreram na região Centro-Oeste. Bravo *et al.*, 1998, relataram a maior ocorrência desses genes em regiões tropicais e chuvosas em comparação com regiões semiáridas; contudo foi inesperado não encontrar esses genes nas regiões Sudeste - Sul, pois o Brasil é um país que possui clima majoritariamente tropical com estações bem definidas, sendo a região Sudeste também, predominantemente, tropical. É interessante notar que alguns genes ocorrem somente em algumas regiões, como os genes *cry6*, *cry11* e *cyt* na região Centro-Oeste e *vip2a* na região Sul-Sudeste.

### 10.2.2 Frequência dos genes por região e comparação com caracterizações de coleções de outros países

A Tabela 9 apresenta a porcentagem de ocorrência de cada gene em relação ao tamanho total da estirpe de cada região em relação as estirpes de *Bacillus spp.* (por exemplo: 14,29% de *cry1* no Centro-Oeste significa que 14,29% das estirpes analisadas dessa região apresentaram *cry1*).

Gene	Região
------	--------

	Centro Oeste	Norte e Nordeste	Sul e Sudeste
<i>cry1</i>	14,29%	16,00%	19,72%
<i>cry2</i>	13,39%	14,67%	15,49%
<i>cry4</i>	1,79%	0,00%	0,00%
<i>cry6</i>	0,89%	0,00%	0,00%
<i>cry8</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>cry9</i>	6,25%	4,00%	2,82%
<i>cry10</i>	2,68%	1,33%	0,00%
<i>cry11a</i>	1,79%	0,00%	0,00%
<i>cry11b</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>cyt1</i>	1,79%	0,00%	0,00%
<i>cyt2</i>	1,79%	0,00%	0,00%
<i>vip1A</i>	0,89%	8,00%	2,82%
<i>vip2A</i>	0,00%	0,00%	1,41%
<i>vip2B</i>	3,57%	5,33%	2,82%
<i>vip3A.B</i>	12,50%	14,67%	16,90%
<i>vip3C</i>	0,00%	0,00%	0,00%

**Tabela 9** Frequência dos genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* por região e abundância. A tabela representa os eventos em porcentagem em relação a todas as estirpes analisadas de *Bacillus spp.*

Como observado na Tabela 9 os genes *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* são os que possuem maior ocorrência em todas as regiões analisadas. As estirpes das regiões Sul e Sudeste revelaram maior ocorrência de *cry1* (19,72%) seguidas pelas regiões Norte e Nordeste (16,00%) e pela Centro-Oeste (14,29%). Esse mesmo padrão ocorre para os genes *cry2* e *vip3a/b*, variando apenas suas porcentagens. A região Centro-Oeste foi a única com ocorrência dos genes *cry4*, *cry6*, *cry11a*, *cyt1* e *cyt2*, enquanto apenas as regiões Sul e Sudeste apresentaram o gene *vip2a*. Por fim nota-se que as regiões Norte e Nordeste obtiveram maior ocorrência do gene *vip1a*. Esses resultados são observados quando todas as estirpes de *Bacillus spp.* são incluídas na análise.

A Tabela 10 apresenta a porcentagem de ocorrência de cada gene em relação às estirpes de *Bacillus thuringiensis* que obtiveram, pelo menos uma amplificação de pelo menos um alvo, em cada região (por exemplo: 69,57% de *cry1* no centro-oeste significa que 69,57% das estirpes analisadas dessa região apresentaram *cry1* dentro das estirpes que obtiveram pelo menos uma amplificação).

Gene	Região		
	Centro Oeste	Norte e Nordeste	Sul e Sudeste
<i>cry1</i>	69,57%	60,00%	93,33%
<i>cry2</i>	65,22%	55,00%	73,33%

<i>cry4</i>	8,70%	0,00%	0,00%
<i>cry6</i>	4,35%	0,00%	0,00%
<i>cry8</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>cry9</i>	30,43%	15,00%	13,33%
<i>cry10</i>	13,04%	5,00%	0,00%
<i>cry11a</i>	8,70%	0,00%	0,00%
<i>cry11b</i>	0,00%	0,00%	0,00%
<i>cyt1</i>	8,70%	0,00%	0,00%
<i>cyt2</i>	8,70%	0,00%	0,00%
<i>vip1A</i>	4,35%	30,00%	13,33%
<i>vip2A</i>	0,00%	0,00%	6,67%
<i>vip2B</i>	17,39%	20,00%	13,33%
<i>vip3A.B</i>	60,87%	55,00%	80,00%
<i>vip3C</i>	0,00%	0,00%	0,00%

**Tabela 10** Frequência dos genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* por região e abundância. A tabela representa os eventos em porcentagem em relação a todas as estirpes analisadas de *Bacillus thuringiensis*.

É possível observar, comparando as Tabelas 9 e 10, como a ocorrência e frequência dos genes mudam quando são analisados na família *Bacillus spp.* e na espécie *Bacillus thuringiensis*, com frequência extremamente menor quando todas as espécies são consideradas. Além de Bt, apenas a bactéria *Lysinibacillus sphaericus* (Ls) é capaz de produzir toxinas Cry (BERRY, 2012), porém, como o presente estudo não inclui a análise da presença dos genes codificadores das proteínas produzidas por Ls, é de se esperar essa diluição causada entre os grupos analisados.

A frequência genética por região foi analisada. É possível observar na Tabela 10 que genes como *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* estão distribuídos de forma uniforme entre as regiões Centro-Oeste e Norte e Nordeste com frequência média (*cry1* 69,57% e 60,00%, *cry2* 65,22% e 55,00% e *vip3a/b* 60,87% e 55,00%, respectivamente), e possuem alta frequência (*cry1* 93,33%, *cry2* 73,33% e *vip3a/b* 80,00%) na região Sul e Sudeste.

O gene *cry2* foi detectado com média frequência nas regiões Centro-Oeste e Norte e Nordeste, como em estirpes da China, Tailândia e Irã, mas encontrado com alta frequência na região Sul e Sudeste, assim como em estirpes da Argentina. Em contrapartida, assim como na Argentina e China, o gene *cry9* foi encontrado com baixa frequência nas regiões Sul e Sudeste e Norte e Nordeste, contrastando com a frequência média de estirpes do Centro-Oeste, onde a frequência é parecida com a observada na Tailândia. O gene *vip3a/b* foi encontrado em frequências parecidas com os genes *cry1* e

*cry2* nas três regiões analisadas. As regiões Centro-Oeste e Norte e Nordeste possuem frequência dos genes *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* semelhante às frequências observadas nas estirpes da Tailândia, China e Índia, enquanto na região Sul e Sudeste a frequência observada foi parecida com a frequência das estirpes da Argentina e Irã. Os resultados dos estudos estão descritos na Tabela 11 (SEIGINEJAD *et al.*, 2008; ZOTHAZANGA; SENTHILKUMAR; GURUSUBRAMANIAN, 2016; LOLNE; MALIK, 2016; JAIN *et al.*, 2017; SAUKA; BENINTENDE, 2017; YILMAZ; AYVAZ; AZIZOGLU, 2017).

Lone e Malik (2016) encontraram valores diferentes em estudos de triagem na Índia em relação a outro estudo feito por Jain e colaboradores (2017). Enquanto o primeiro encontrou uma frequência de 43,18% de *vip3a* no estudo, o segundo obteve frequência de apenas 25% para o mesmo gene. A hipótese de que a região e suas características geográficas de onde os isolados foram coletados impacta diretamente na ocorrência genética observada nas estirpes de Bt, se mostra muito forte uma vez que regiões que possuem características geográficas parecidas, apresentam frequências genéticas de Bt parecidas. É possível observar na região Sul e Sudeste que as frequências dos genes encontrados nesse estudo e no estudo de Benintende e Sauka, 2017, são muito parecidas (Sul-Sudeste: *cry1* 93,33%, *cry2* 73,33% e *vip3a/b* 80,00%, Argentina: *cry1* 92,50%, *cry2* 92,50% e *vip3a/b* 91,30% ), além das frequências parecidas da região Centro-Oeste (*cry1* 69,57%, *cry2* 62,22%, *cry9* 30,43% e *vip3a/b* 60,87%) com as estirpes do Irã e Norte e Nordeste (*cry1* 60,00%, *cry2* 55,00%, *cry9* 15,00% e *vip3a/b* 55,00%) com estirpes da China, como observado na Tabela 11.

**Tabela 11** Detecção de genes alvo em estudos de caracterização de coleções de outros países.

País	Frequência do gene (%)				
	<i>cry1A</i>	<i>cry1B</i>	<i>cry2A</i>	<i>cry9</i>	<i>vip3A</i>
Tailândia	90.61	89.63	76.32	40.70	48.18
Argentina	92.5	0	92.5	2.5	91.3
Irã	44.29	0	54.29	25.71	82.6
Índia	N/A	N/A	N/A	N/A	43.18
China	N/A	N/A	N/A	N/A	67.4
China	67.7	12.9	70.0	15.5	N/A

**Fonte:** Adaptado de BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019.

Vale notar também a ocorrência de *cry6* apenas na região Centro-Oeste. A proteína Cry6 possui ação contra nematoides de interesse agrícola que causam danos em plantações de soja, por exemplo, e as principais áreas produtoras brasileiras pertencem à região Centro-Oeste (ASMUS; INOMOTO, 2013).

Ao analisar as frequências dos genes por região e compará-las com as frequências encontradas em outros estudos de triagem (SEIGINEJAD *et al.*, 2008; ZOTHAZANGA; SENTHILKUMAR; GURUSUBRAMANIAN, 2016; LOLNE; MALIK, 2016; JAIN *et al.*, 2017; SAUKA; BENINTENDE, 2017; YILMAZ; AYVAZ; AZIZOGLU, 2017) é possível perceber como o clima e a região geográfica interferem na diversidade genética do Bt.

Observa-se que na região Sul e Sudeste as frequências dos genes *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* (93,33%, 73,33% e 80,00%, respectivamente) são muito parecidas com as frequências encontradas por Benintende e Sauka, 2017, em estirpes da Argentina (*cry1* 92,50%, *cry2* 92,50% e *vip3a/b* 91,30%), locais que possuem climas relativamente parecidos, com temperatura tropical, subtropical e temperada. Em contrapartida a frequência dos genes encontrados na região Norte e Nordeste (*cry1* 60,00%, *cry2* 55,00%, *cry9* 15,00% e *vip3a/b* 55,00%) é parecida com as frequências encontradas por Yu *et al.*, 2011, e Wang *et al.*, 2003, em estirpes chinesas (*cry1* 67,7%, *cry2* 70,00%, *cry9* 15,50% e *vip3a/b* 67,40%). Ao analisar o clima da região Norte e Nordeste com o clima chinês é possível observar algumas semelhanças climáticas com predominância de climas tropicais, subtropicais e tropical de altitude.

A Figura 8 mostra a análise de variância feita para os genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c*, considerando a população como as regiões geográficas consideradas no presente trabalho e os grupos como os genes estudados.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	3	4.971	0.02431 Va	1.79
Within populations	53	70.608	1.33223 Vb	98.21
Total	56	75.579	1.35654	

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	2	3.165	-0.03112 Va	-2.30
Among populations within groups	1	1.806	0.05325 Vb	3.93
Within populations	53	70.608	1.33223 Vc	98.37
Total	56	75.579	1.35436	

**Figura 8** Análise de variância (AMOVA) descrevendo a variabilidade genética entre os grupos (Centro-Oeste, Norte e Nordeste, Sul e Sudeste), entre a população dentro do grupo e entre a população.

A maior variabilidade está dentro das populações, ou seja, entre as estirpes de Bt (98,21%) localizadas em uma determinada região. Quando a análise leva em consideração os grupos (Centro-Oeste, Norte e Nordeste, Sul e Sudeste) observa-se novamente maior variabilidade dentro da população (98,37%). Esses resultados mostram que a maior variabilidade genética está dentro das estirpes de Bt em cada região, o que é possível observar, também, na Tabela 10: a frequência de distribuição dos genes é diferente em cada região, o que mostra que o maior reservatório de variabilidade está dentro das estirpes de Bt em cada região.

A hipótese de que a região e característica geográfica de onde os isolados foram coletados impacta diretamente na ocorrência genética observada nas estirpes de Bt se mostra muito forte, uma vez que, regiões que possuem características geográficas parecidas apresentam frequências genéticas de Bt parecidas.



**Figura 9** Climas presentes nas diferentes regiões brasileiras.

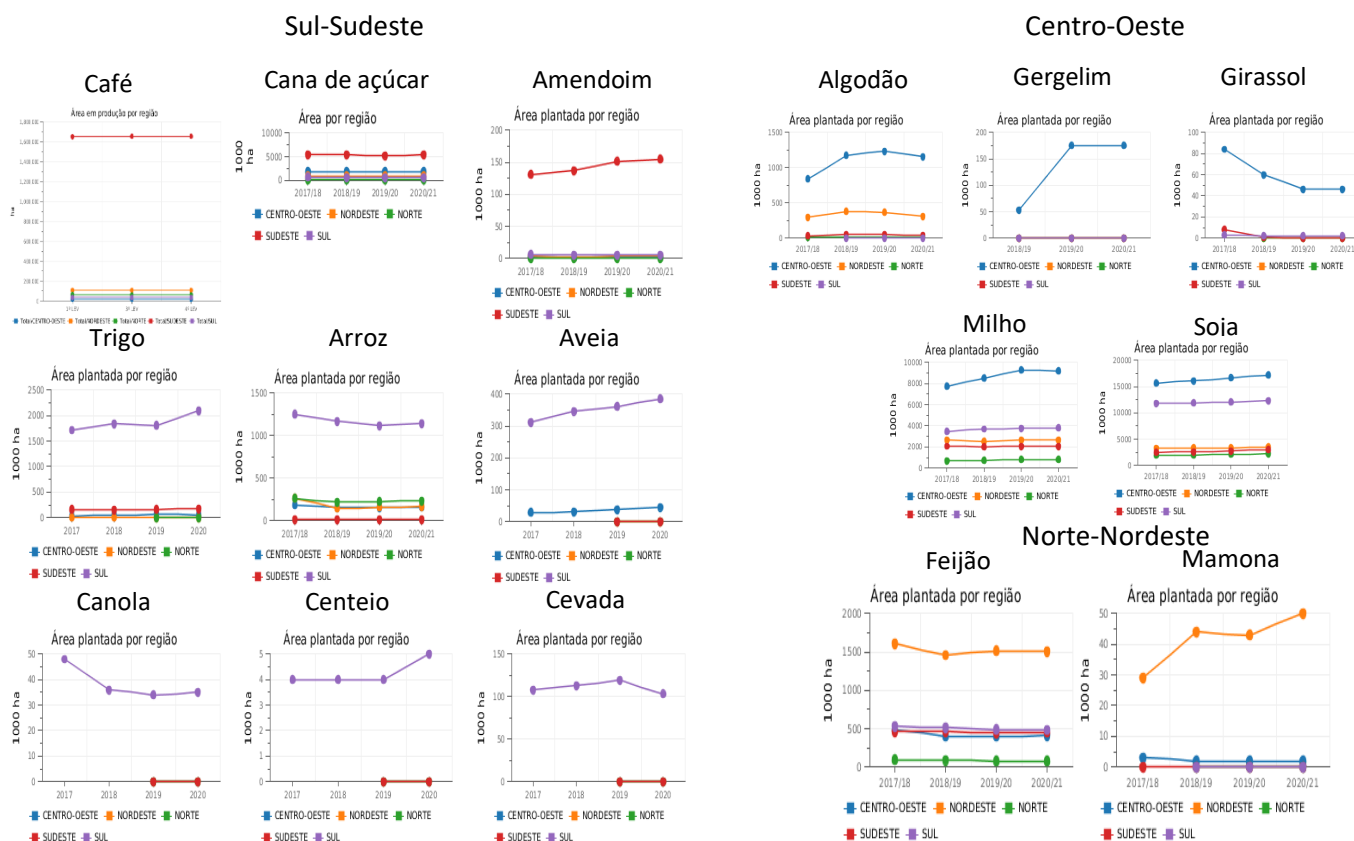


**Fonte:** adaptado de IBGE. Disponível em <[clima.ccCompleted.pdf \(ibge.gov.br\)](http://clima.ibge.gov.br)>

Esses achados corroboram as hipóteses propostas em outros estudos de que o conteúdo genético das estirpes de Bt podem ter variações no conteúdo genético de acordo com a região e o clima que as estirpes foram isoladas. (BRAVO *et al.*, 1998; ARANGO; ROMERO; ORDUZ, 2002; URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003; ARMENGOL *et al.*, 2007; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; SAUKA; BENINTENDE, 2017; NAIR *et al.*, 2018;).

### 10.3 Análise dos perfis genéticos e frequência das amostras em relação aos principais cultivos brasileiros

Os principais cultivos brasileiros por região e suas respectivas pragas, consideradas para o presente estudo alvos de Bt, foram analisadas. Na Figura 10 pode-se observar as culturas brasileiras em cada região, por área plantada: a região Sul-Sudeste possui maior área plantada dos cultivos de café, cana de açúcar, amendoim, trigo, arroz, aveia, canola, centeio e cevada; já a região Centro-Oeste possui maior área plantada de algodão, gergelim, girassol, milho e soja; a região Norte-Nordeste possui maior área plantada de feijão e mamona (Sistemas de Produção Embrapa, disponível em <Página Inicial - Sistemas de Produção Embrapa>).



**Figura 10** Principais cultivos brasileiros por região. Os gráficos apresentam o cultivo por área plantada em cada região. Gráficos gerados pelo sistema da Conab.

As pragas suscetíveis a Bt que ocorrem nesses cultivos são, em sua maioria, coleópteros, lepidópteros, hemípteros e himenópteros, como pode ser observado na Tabela 10. As proteínas de Bt que possuem toxicidade descrita a essas ordens são Cry1 e Cry2 (coleóptero e lepidóptero), Cry9 (coleóptero), Vip1 e Vip2 (coleóptero e hemíptero) e Vip3 (lepidóptero). As proteínas tóxicas a himenópteros (Cry3, Cry5 e Cry22) não foram incluídas nesse estudo, e suas análises não foram abordadas.

Cultura	Região principal	Insetos alvos de Bt
Café	Sul-Sudeste	Coleóptero, lepidóptero, hemíptero
Cana de açúcar		
Amendoim		
Trigo		
Arroz		
Canola	Centro-Oeste	Coleóptero, lepidóptero, hemíptero, himenóptero
Centeio		
Cevada		
Algodão		
Gergelim		
Milho	Centro-Oeste	Coleóptero, lepidóptero, hemíptero
Soja		

Feijão Mamona	Norte-Nordeste	Lepidóptero, coleóptero, hemíptero, díptero Lepidóptero, hemíptero, díptero
------------------	----------------	--

**Tabela 12** Principais culturas por região e seus respectivos insetos que são alvos das toxinas de Bt.

É possível observar na Tabela 6 o perfil mais dominante (*cry1-cry2-vip3a/b*) encontrado na maioria das estirpes analisadas. Observando-se o perfil dos genes que codificam as proteínas tóxicas aos seus alvos, sua frequência região (Tabela 10) e a distribuição dos alvos pelos cultivos brasileiros (Figura 10), pode-se sugerir que a dominância do perfil *cry1-cry2-vip3a/b* tenha sido causada por uma possível troca de informação genética entre as estirpes de Bt do Brasil, provavelmente decorrente da predominância de coleópteros, lepidópteros, hemípteros e himenópteros nos cultivos brasileiros. A ilha de patogenicidade contendo esses genes foi descrita por Zhu e colaboradores em 2015 e abordada no presente estudo. Esta ilha está inserida em um grande plasmídeo que pode ser transferido entre estirpes de Bt, ocasionando o fenômeno observado, pois são os genes que codificam as proteínas tóxicas a esses insetos. Os achados corroboram as hipóteses de outros estudos (BRAVO *et al.*, 1998; ARANGO; ROMERO; ORDUZ, 2002; URIBE; MARTINEZ; CERÓN, 2003; ARMENGOL *et al.*, 2007; ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014; SAUKA; BENINTENDE, 2017; NAIR *et al.*, 2018) que sugerem que o cultivo da região interfere no conteúdo genético das estirpes de Bt (SAUKA; BENINTENDE, 2017).

Nair e colaboradores (2018) constataram a baixa frequência de estirpes de Bt produtoras de proteínas tóxicas a lepidópteros, sugerindo que a recente agricultura do Catar ainda não viabilizou estirpes de Bt produtoras dessas proteínas. Em contrapartida, no Brasil, país economicamente dependente de *commodities*, a agricultura está estabelecida há bastante tempo, tendo aumento exponencial de produtividade nos últimos 40 anos (BOLFE *et al.*, 2018). Além disso, a variedade de cultivos e insetos praga, principalmente coleópteros e lepidópteros, poderiam explicar a maior ocorrência do perfil *cry1-cry2-vip3a/b*.

#### 10.4 Resultados obtidos nas qPCR e comparação com bioensaios

Previamente às análises por qPCR bioensaios seletivos empregando suspensões dos esporos/cristais de várias estirpes foram realizados (Monnerat *et al.*, 2007) para verificar a toxicidade às pragas alvos das estirpes de Bt. Os resultados para as estirpes

positivas para pelo menos um gene alvo são apresentados na Tabela 13. É possível observar que todas as estirpes que tiveram amplificação para pelo menos um gene exibiram mortalidade para pelo menos um alvo no bioensaio previamente realizado.

Estirpe	Região	Bioensaio (% de mortalidade)									
		<i>S.f</i>	<i>A.ge</i>	<i>C.i</i>	<i>P.x</i>	<i>A.g</i>	<i>H.a</i>	<i>C.q</i>	<i>A.a</i>	<i>D.s</i>	<i>S.s</i>
1	CO					85		100	100		100
2	CO					60					
3	CO			100		60					
4	SE		40	100	70	60					
5	NO		60	100	60	100	50				
6	CO	100	100	100	100		70				
7	CO	40	65	100	100		40				
8	NO	100	100	100	60						
9	NO	100	100	100	50						
10	NO	100	100	100	70	40	100				
11	NO	100	100	100	100	45	100				
12	NO				70	65	65				
13	NE	100	100	80	55	45					
14	NE	100	100	80	100	45					
15	NO				100						
16	NO	100	100		100						
17	NO	100	100		100	95	100				
18	NO	100	100	100	100	90	65				
19	NE					80					
20	CO	70		40		40	100				
21	CO	100	100			55	100	85	50		
22	NE			100		55	100				
23	NE			85		30	95				
24	NE	100		100		70	100				
25	NE	100		95		50	50				
26	SE	100	100	100		30	100	100		45	
27	SE		100	100			100		30	70	
28	SE	100	100	75	100		100				
29	SE		100	100		75	100	100	100	45	
30	SE	100	100	100		50	100			70	
31	SE	100	100	100		100	100	100	100	40	
32	SE	40	40			50	40			40	
33	SE	100	100	100		55	100			80	
34	SE	100	100	100		95	100			50	
35	SE	100	100	100		95	100			60	
36	CO	100		100		60	100		10		
37	CO	60		70		50	70	65			
38	CO	100		100			100				
39	CO	60		40			100				
40	SE	100		100					65		
41	SE	70		80					10		
42	SE	100		100					50		

43	SE	95	100			45	
44	CO	90					
45	CO	70					
46	CO	95					
47	CO	100	100	100	60	100	100
48	CO	100	100		55	100	100
49	CO	100	100	100	100	25	
50	CO	100	100	100		100	70
51	CO	100	100	100	100	100	
52	CO	100	100	100	100	100	
53	NE	45				65	55
54	CO		50				28

**Tabela 13** Resultado dos bioensaios realizados previamente pelo Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas para as estirpes que amplificaram para pelo menos um gene nos ensaios de qPCR. *S.f, A.ge, C.i, P.x, A.g, H.a, C.q, A.a, D.s e S.s: Spodoptera frugiperda, Anticarsia gematalis, Chrysodeixis includens, Plutella xylostella, Anthonomus grandis, Helicoverpa armígera, Culex quinquefasciatus, Aedes aegypti, Diatrea saccharalis e Simulidium spp.*

Contudo, não foi possível observar diferenças entre a mortalidade dos insetos e o conteúdo genético das estirpes de Bt. As estirpes 1 e 2, por exemplo, possuem o mesmo conteúdo genético (*cry4, cry10, cry11a, cyt1 e cyt2*) que, em teoria, produziram proteínas tóxicas a dípteros, hemípteros e coleópteros, mas apresentaram toxicidades completamente diferentes: enquanto a estirpe 1 exibiu letalidade de 100% para *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*, a estirpe 2 não manifestou atividade contra esses insetos. O mesmo pode ser observado com as estirpes 8, 9 e 10, que possuem o mesmo conteúdo genético (*cry1, cry2 e vip3a/b*) porém revelaram resultados diferentes de mortalidade no bioensaio: enquanto as estirpes 8 e 9 tiveram pouca diferença nos bioensaios (letalidade de 50% para *Plutella xylostella* e 100% para *Anticarsia gematalis, Spodoptera frugiperda* e *Chrysodeixis includens*) a estirpe 10 exibiu letalidade de 70% para *Plutella xylostella* e 100% para *Anticarsia gematalis, Spodoptera frugiperda, Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armígera*, e 40% para *Anthonomus grandis*. As estirpes que não apresentaram amplificação para pelo menos um gene alvo não possuíam toxicidade constatada aos alvos nos bioensaios previamente realizados no laboratório.

É possível observar que as amostras 1 e 2 possuem os genes característicos produtores de toxinas a dípteros (*cry4, cry10, cry11, cyt1 e cyt2*). É sabido que os genes *cry10* e *cyt1* estão localizados no mesmo plasmídeo (pBtoxin) e Nair e colaboradores (2018) não observaram a amplificação por PCR desses genes nas estirpes analisadas,

propondo algum tipo de instabilidade estrutural dos plasmídeos na região do Catar. Contudo, o presente estudo obteve sucesso na identificação dos genes *cry10* e *cyt1* em conjunto com os genes *cry4*, *cry11* e *cyt2*. Sugere-se, portanto, que as estirpes de Bt trocam com alta frequência conteúdo genético e os plasmídeos encontrados nas estirpes brasileiras podem possuir diferenças estruturais de outros plasmídeos de outras regiões. Além disso, essa troca genética poderia explicar a adaptação das estirpes de Bt à pressão de seleção imposta pela agricultura extensiva de monocultivo.

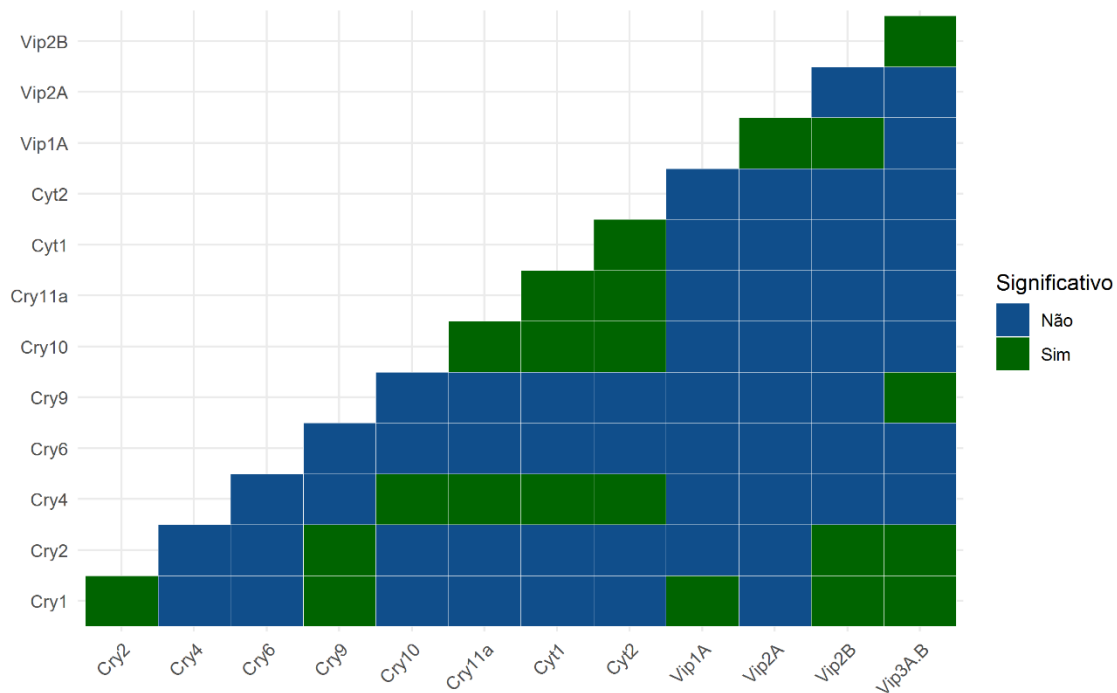
Sugere-se que os genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2*, *vip1a*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* sejam bons marcadores para prospecção e estudos de diversidade de Bt e que possam ser utilizados como marcadores do espectro de atividade inseticida das estirpes isoladas (SAUKA; BENINTENDE, 2017).

Contudo, os resultados sugerem que estirpes que possuem o mesmo perfil genético possuem níveis de toxicidade diferentes aos alvos, e fatores como os níveis de expressão dos genes, possíveis promotores fracos dos genes, inatividade dos genes, baixo nível de expressão, possibilidade de sinergismo entre algumas toxinas e outros fatores de virulência que ainda não são completamente entendidos possam influenciar esses resultados (SEIFINEJAD, et al., 2007; SAUKA; BENINTENDE, 2017).

É interessante notar que das 58 estirpes analisadas, 33 que foram positivas para a amplificação de pelo menos um gene alvo possuíam os genes *cry1* ou *cry2*, sendo que os resultados de bioensaio para essas amostras demonstram alta toxicidade para insetos da ordem Lepidoptera. É provável que a combinação dessas toxinas contribua para um efeito de maior toxicidade contra esses insetos, conforme observado em um estudo (BOONMEE; THAMMASITTIRONG; THAMMASITTIRONG, 2019).

### **10.5 Correlação entre os genes e teste de hipótese**

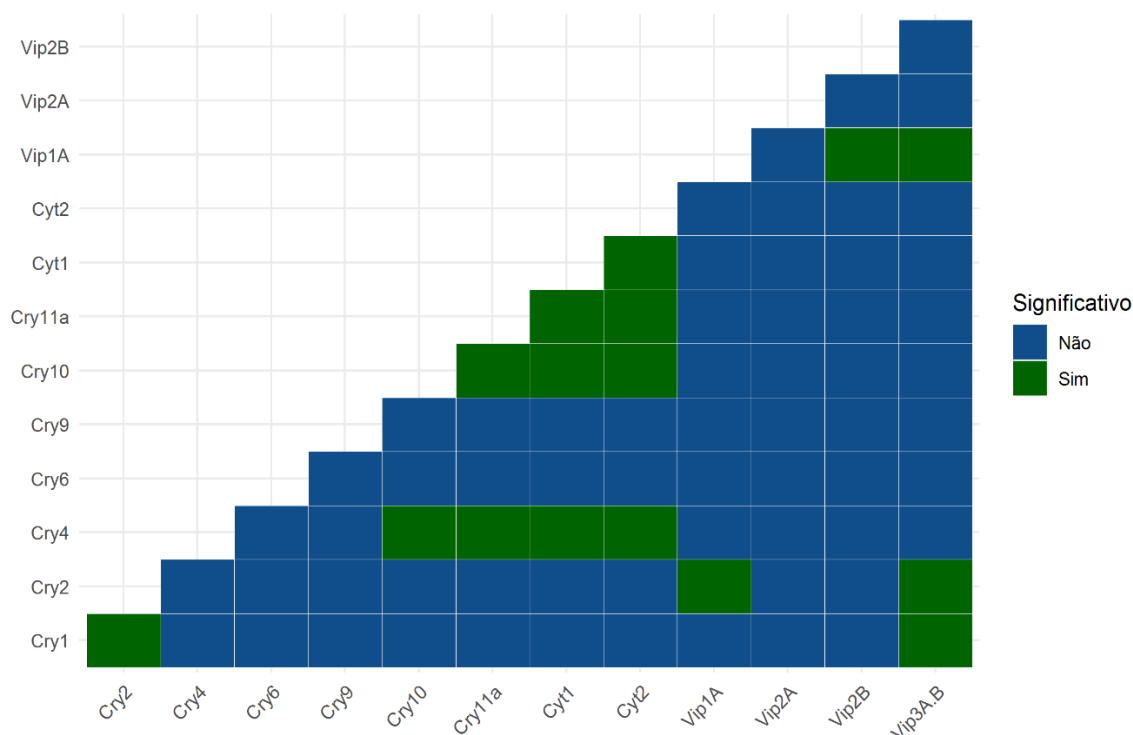
Na Figura 11 é possível observar os resultados do teste de correlação entre os genes estudados para o grupo *Bacillus spp.* Vale ressaltar que o resultado do teste foi categorizado entre significativo (região verde do gráfico,  $p$ -valor  $< 0,05$ ), e não significativo (região azul do gráfico). Nos casos em que o resultado não foi significativo ( $p$ -valor  $\geq 0,05$ ) conclui-se que não há evidências estatísticas suficientes para rejeitar a hipótese de independência entre os genes usados no teste, pois o  $p$ -valor obtido foi maior do que o nível de significância do teste ( $\alpha = 0,05$ )



**Figura 91** Matriz apresentando o resultado do teste qui-quadrado de independência entre os genes encontrados nas estirpes analisadas. Correlações não relevantes estão plotadas em azul. Matriz feita para analisar a correlação entre os genes no grupo *Bacillus spp.*

Todos os pares de genes que apresentaram valores significativos no teste de correlação (região verde) possuem uma correlação direta (válido para as Figuras 11 e 12), ou seja, a ocorrência de um gene resulta na ocorrência do outro gene e vice-versa (por exemplo: a ocorrência de *cry1* está relacionada com a ocorrência de *cry2*, assim como a não ocorrência de *cry1* está associada com a não ocorrência de *cry2*). Os pares de genes que resultaram em p valor < 0,05 foram: *cry1* e *cry2*, *cry1* e *cry9*, *cry2* e *cry9*, *cry10* e *cry4*, *cry11a* e *cry4*, *cry11a* e *cry10*, *cyt1* e *cry4*, *cyt1* e *cry10*, *cyt1* e *cry11a*, *cyt2* e *cry4*, *cyt2* e *cry10*, *cyt2* e *cry11a*, *cyt2* e *cyt1*, *cry1* e *vip1a*, *vip2a* e *vip1a*, *cry1* e *vip2b*, *cry2* e *vip2b*, *vip2b* e *vip1a*, *cry1* e *vip3a/b*, *cry2* e *vip3a/b*, *cry9* e *vip3a/b*, *vip2b* e *vip3a/b*.

A Figura 12 mostra o teste de correlação entre os genes estudados para as estirpes de *Bacillus thuringiensis*. A região em azul mostra correlações não significativas, ou seja, aquelas nas quais não há evidência estatística suficiente para rejeitar a hipótese de independência da ocorrência desses genes, pois o p valor obtido foi maior do que o nível de significância do teste ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 102** Matriz apresentando o resultado do teste qui-quadrado de independência entre os genes encontrados nas estirpes analisadas. Correlações não relevantes estão plotadas em azul. Matriz feita para analisar a correlação entre os genes nas estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

Os pares de genes que resultaram em p valor < 0,05 foram: *cry1* e *cry2*, *cry10* e *cry4*, *cry11a* e *cry4*, *cry11a* e *cry10*, *cyt1* e *cry4*, *cyt1* e *cry10*, *cyt1* e *cry11a*, *cyt2* e *cry4*, *cyt2* e *cry10*, *cyt2* e *cry11a*, *cyt2* e *cyt1*, *vip1a* e *cry2*, *vip2b* e *vip1a*, *vip3a/b* e *cry1*, *vip3a/b* e *cry2*, *vip3a/b* e *vip1a*.

Os pares descritos acima possuem evidência estatística suficiente para rejeitar a hipótese nula e, dessa forma, concluir que a ocorrência de, por exemplo, *cry1* está relacionada com a ocorrência de *cry2* nas estirpes de Bt. As estirpes podem ou não possuir os pares genéticos apresentados *in vivo*. Os pares *cry1* e *cry2*, *cry1* e *vip3a/b*, *cry2* e *vip3a/b* possuem correlação, como pode ser constatado Figura 12, e foram os genes mais abundantes nas estirpes estudadas.

Estudos de caracterização de estirpes da Tailândia, China, Argentina e Irã, previamente abordados no presente trabalho, descreveram a ocorrência e abundância desses mesmos genes durante a caracterização de estirpes de Bt, reiterando a hipótese



de que os genes não ocorrem de maneira randômica, e os genes *cry1*, *cry2* e *vip3a* tendem a ser encontrados juntos.

## 11 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Foi possível observar que os genes *cry1*, *cry2* e *vip3a/b* ocorrem de maneira homogênea no território brasileiro;
- Alguns genes são encontrados em regiões específicas (como por exemplo *cry6*, *cry11* e *cyt* na região Centro-Oeste);
- O maior reservatório de variabilidade está dentro das estirpes de Bt em cada região;
- Sugere-se que tanto as condições geoclimáticas quanto os cultivos regionais interferem na diversidade genética que as estirpes de Bt podem apresentar, com os genes variando em frequência e ocorrência nas diferentes regiões brasileiras;
- É possível que os pares *cry1* e *cry2*, *cry10* e *cry4*, *cry11a* e *cry4*, *cry11a* e *cry10*, *cyt1* e *cry4*, *cyt1* e *cry10*, *cyt1* e *cry11a*, *cyt2* e *cry4*, *cyt2* e *cry10*, *cyt2* e *cry11a*, *cyt2* e *cyt1*, *vip1a* e *cry2*, *vip2b* e *vip1a*, *vip3a/b* e *cry1*, *vip3a/b* e *cry2*, *vip3a/b* e *vip1a* ocorram juntos na Coleção de Bactérias de Invertebrados;
- Estirpes de Bt podem trocar constantemente informações genéticas e se adaptarem à pressão de seleção imposta pelos cultivos regionais e suas pragas predominantes;
- Com esses resultados sugere-se como perspectivas futuras a caracterização de toda a Coleção de Bactérias de Invertebrados a fim de conhecer o conteúdo genético da Coleção e possivelmente compreender a distribuição genética das estirpes de Bt de cada região brasileira de maneira mais precisa, além da possibilidade de promover a formulação de novos produtos ou eventos transgênicos em casos de resistência de insetos praga. Ainda, os *primers* e ensaios podem ser utilizados em outras coleções para ajudar a elucidar a diversidade genética de cada região das estirpes de Bt.

## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. v. 47

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

ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. 3, p. 466–474, 2002.

ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. **Insects**, v. 5, n. 1, p. 62–91, 2014.

ARMENGOL, G. *et al.* Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 77–88, 2007.

ARYA, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 1, p. 1–10, 2012.

BIOSYSTEMS, A. Fast SYBR® Green. **Design**, [s.d.].

BOLFE, É. L. *et al.* Futuro da Agricultura Brasileira. **Embrapa**, p. 212, 2018.

BOONMEE, K.; THAMMASITTIRONG, S. N. R.; THAMMASITTIRONG, A. Molecular characterization of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains

from Thailand. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2019.

BOUKEDI, H. *et al.* Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. **Microbiological Research**, v. 186–187, p. 9–15, 2016.

BRAVO, A. *et al.* Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965–4972, 1998.

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

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CORPORATION, P. GoTaq qPCR Master Mix Technical Manual TM318. p. 608–277, 2014.

CRICKMORE, N. *et al.* A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. July, p. 107438, 2020.

EMBRAPA. Propescção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a Spodoptera frugiperda. **Embrapa**, p. 1–19, 2005.

EXCOFFIER, L; H.E. L. LISCHER. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. 10: 564-567, (2010).

FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol. *In: Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus Sphaericus: Characterization and use in the Field of Biocontrol*. [s.l: s.n.]. p. 1–288.

GUIDELINES, G. SYBR<sup>®</sup> Select Master Mix. v. 2013, n. 4473368, 2013.

GUILHERME LAFOURCADE ASMUS, C. M. M. I. Nematoides em cultivos Integrados. *In:*

**Nematoides em cultivos integrados.** Brasília: [s.n.]. p. 145–164.

JAIN, D. *et al.* Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.

LEE, M. K. *et al.* The Mode of Action of the. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 4648–4657, 2003.

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

MAAGD, R. A. DE; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193–199, 2001.

MELO, A. L. D. A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus thuringiensis*: Mechanism of action, resistance, and new applications: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 317–326, 2016.

MONNERAT, R. G. *et al.* Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291–295, 2007.

MULLIS, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 24, n. Table 1, p. 17–27, 1992.

NAIR, K. *et al.* Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology,  $\delta$ -Endotoxins and Cry gene content. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. APR, p. 1–10, 2018.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. Apostila Pcr em Tempo Real. p. 1–52, 2004.

PALMA, L. *et al.* *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296–3325, 2014.

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

- PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: From structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91–142, 2005.
- PROMEGA. Technical Manual Maxwell® 16 DNA Purification Kits. 2007.
- MagaZorb(R) DNA Mini-Prep Kit Technical Bulletin, TB376. 2011.
- QuantiFluor® dsDNA System QuantiFluor® dsDNA System. **Technical Manual**, 2015.
- RABINOVICTH, L.; OLIVEIRA, E. J. DE. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de**. [s.l.: s.n.].
- RASKO, D. A. *et al.* Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 303–329, 2005.
- SALEEM, F. *et al.* Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins ( Vip ) from. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–11, 2010.
- SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 273–281, 2017.
- SCHNEPF, E. *et al.* *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.
- SHOWKAT AHMAD LONE, R. Y.; ABDUL MALIK, J. C. P. Molecular and insecticidal characterization of Vip3A protein producing *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Canadian journal of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 179–190, 2016.
- SOBERÓN, M.; LÓPEZ-DÍAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, v. 41, p. 87–93, 2013.
- STEPONE; STEPONEPLUS. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. Real-Time PCR Systems SITE PREPARATION GUIDE Publication Number 4376768 Revision E Limited Use Label License No. 474: Real-Time PCR System for Research Use Only. **Catalog Number**, v. 4376357, n. 4376357, p. 4376782, [s.d.].

TABASHNIK, B. E. *et al.* Dual mode of action of Bt proteins: Protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

TECHNOLOGIES, L. Fast SYBR<sup>®</sup> Green Cells-to-C T<sup>™</sup> Kit. n. 4402956, 2011.

URIBE, D.; MARTINEZ, W.; CERÓN, J. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 2, p. 119–127, 2003.

YILMAZ, S.; AYVAZ, A.; AZIZOGLU, U. Diversity and distribution of cry genes in native *Bacillus thuringiensis* strains isolated from wild ecological areas of East-Mediterranean region of Turkey. **Tropical Ecology**, v. 58, n. 3, p. 605–610, 2017.

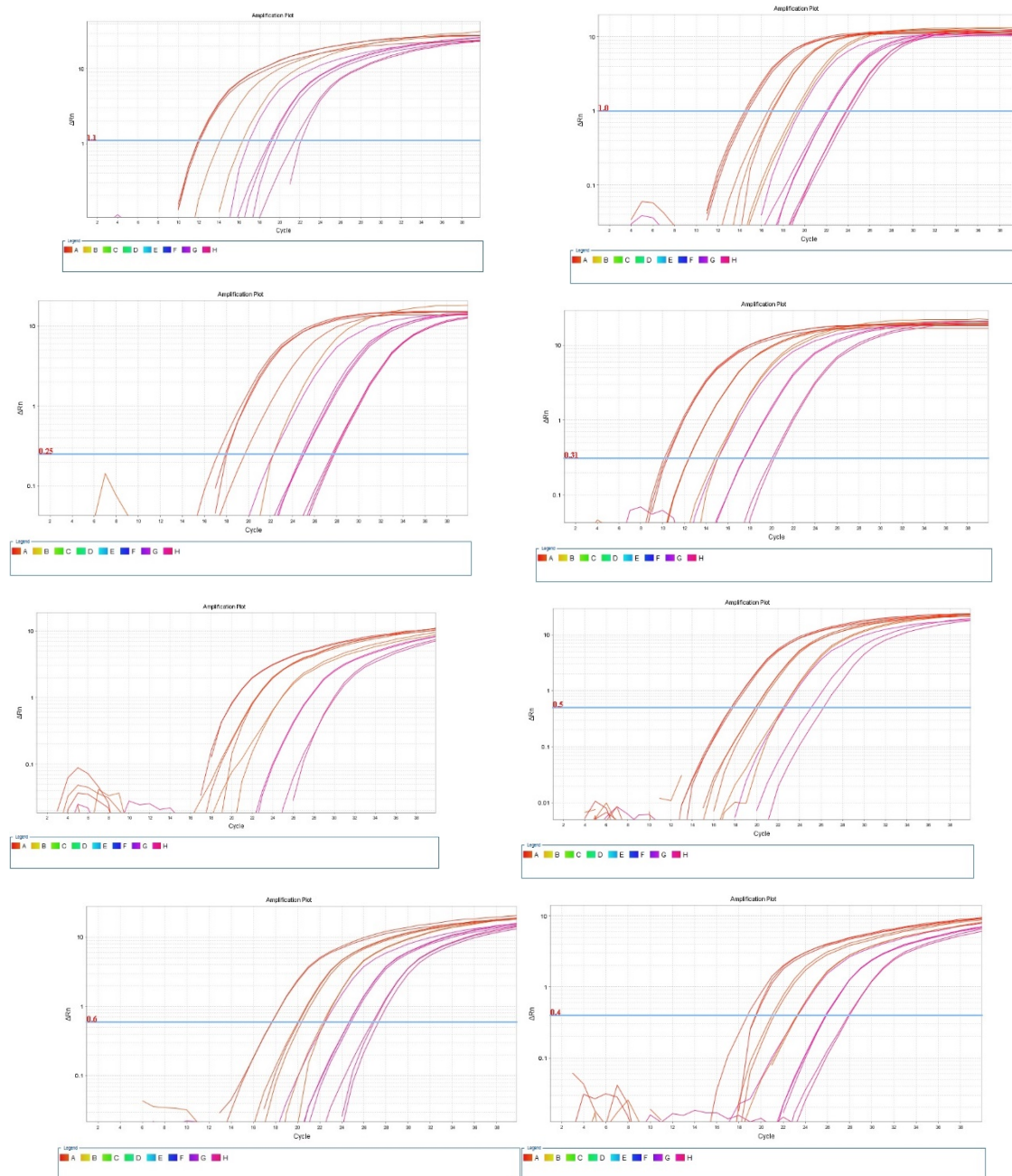
ZHANG, X. *et al.* A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 26, p. 9897–9902, 2006.

ZOTHANSANGA, R.; SENTHILKUMAR, N.; GURUSUBRAMANIAN, G. Diversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from shifting cultivation (Jhum) habitat. **Biocontrol Science**, v. 21, n. 2, p. 99–111, 2016.

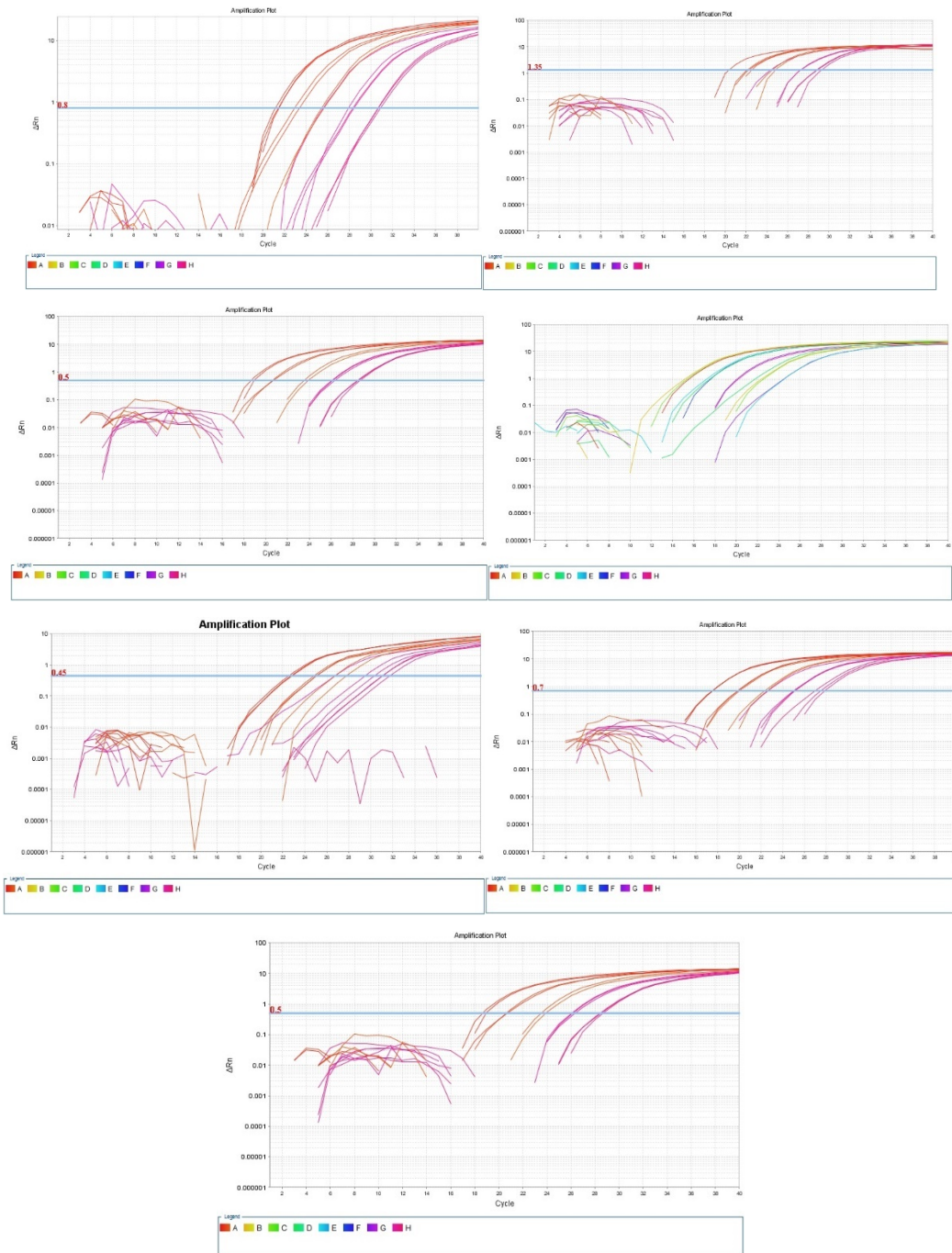
### 13 ANEXO A

Gráfico de amplificação, curva de *melting* e curva padrão de acordo com os ensaios realizados para os genes *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2* e *vip1a*, respectivamente.

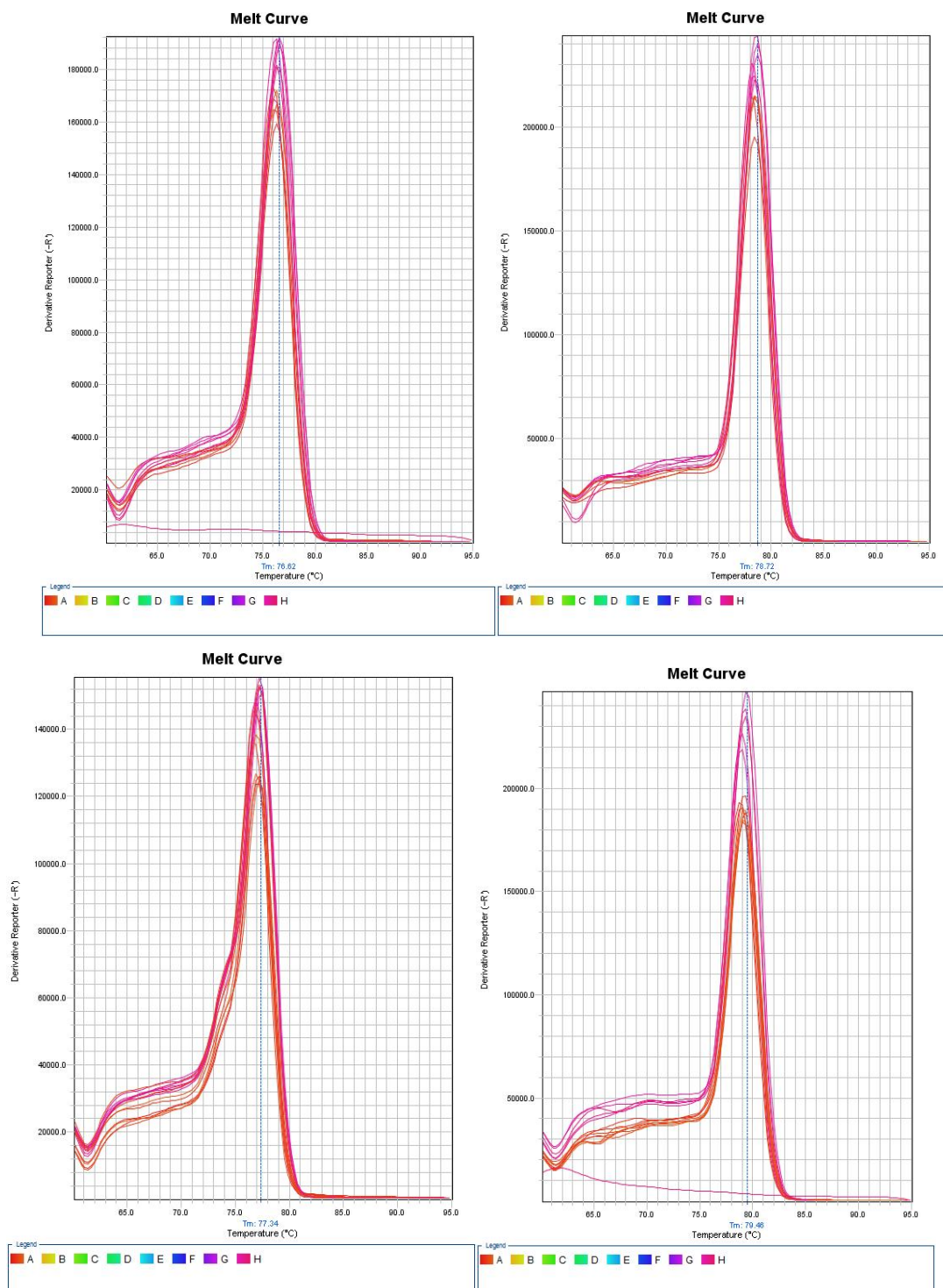
**Figura 13** Gráficos de amplificações dos alvos *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2* e *vip1a*, *cry9*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* respectivamente.

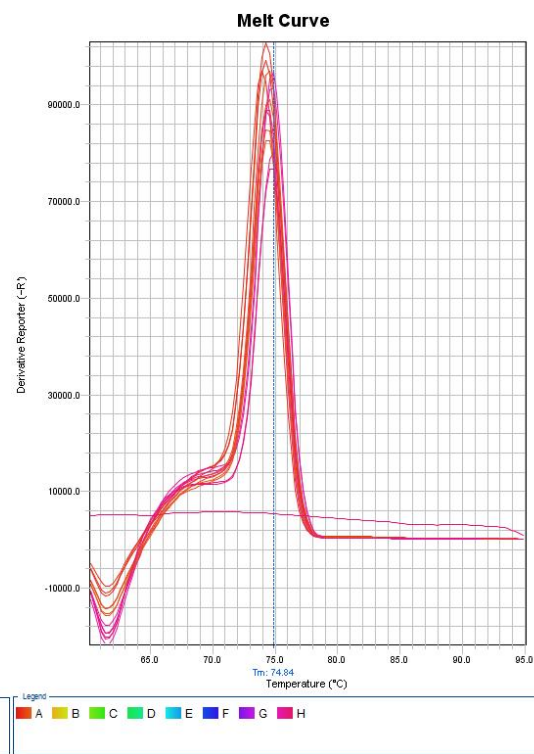
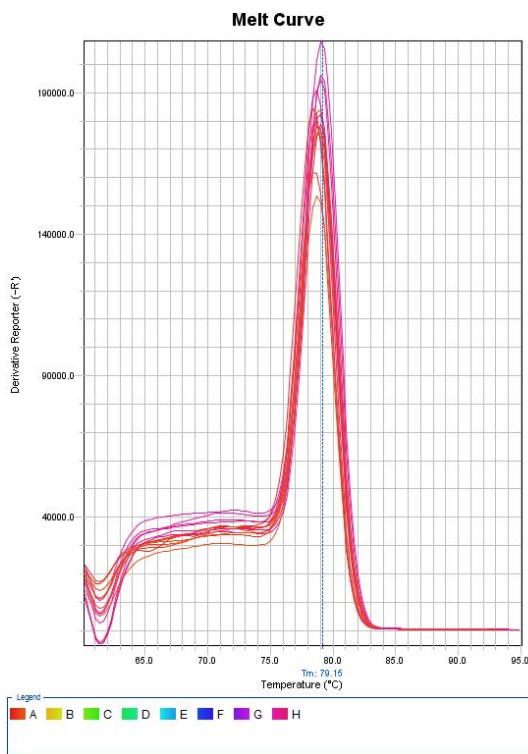
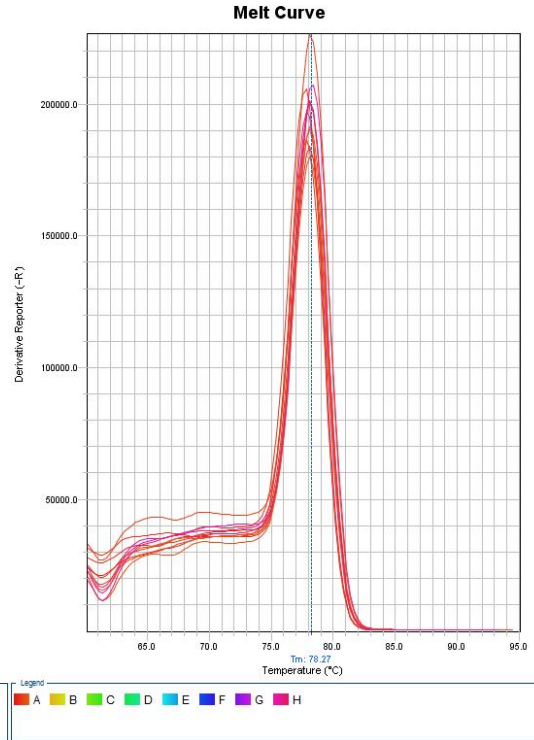
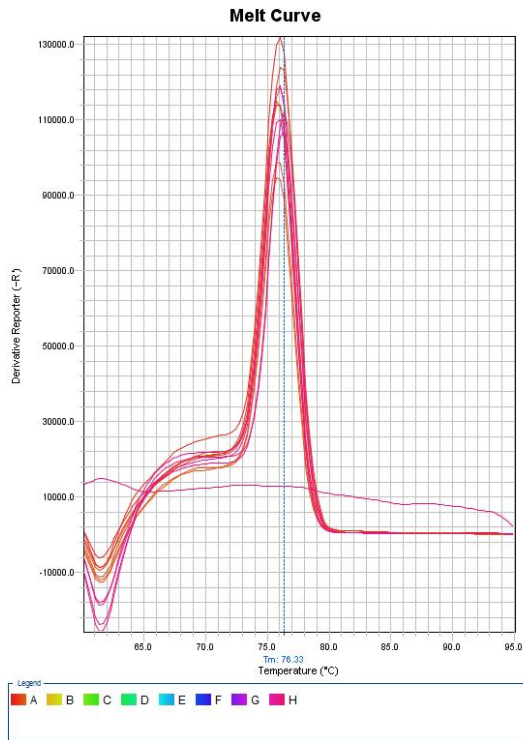


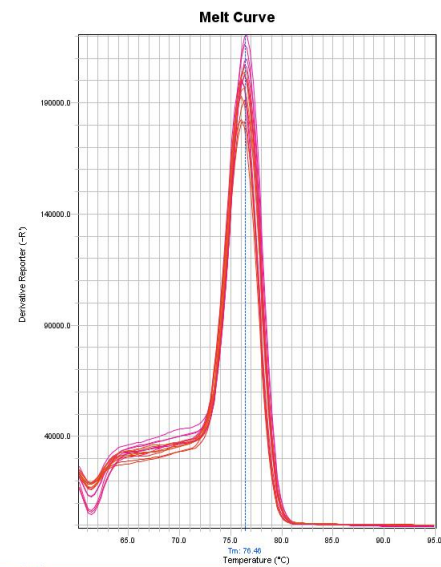
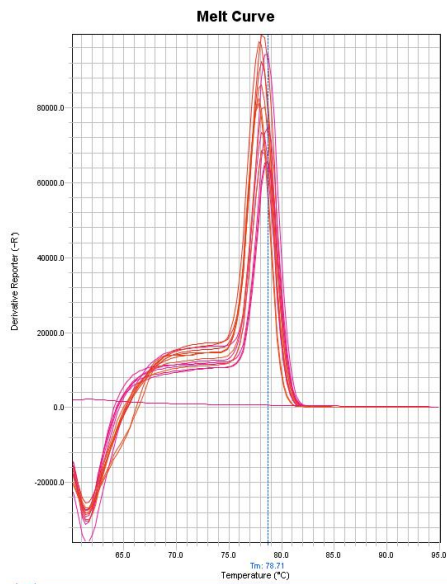
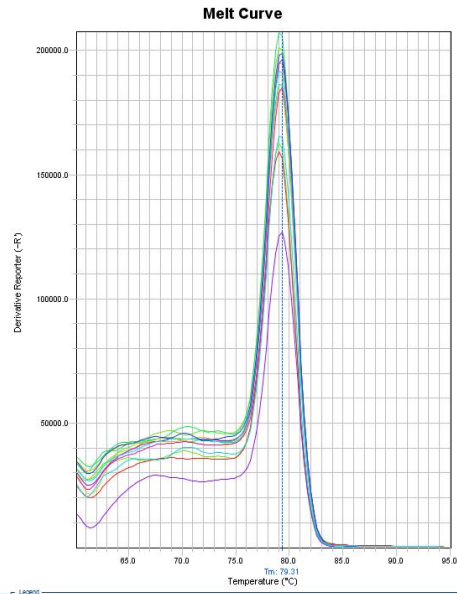
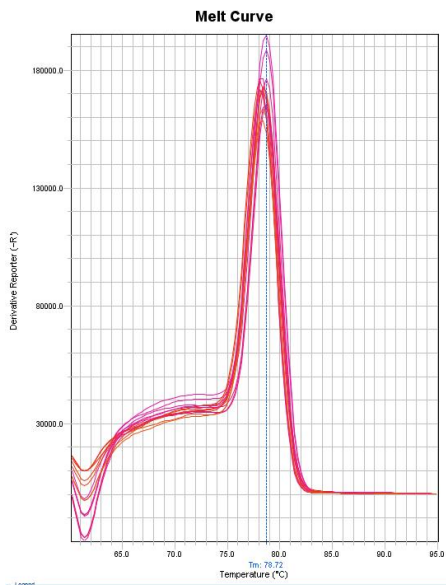




**Figura 114** Curvas de *melting* pós amplificação dos alvos *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2* e *vip1a*, *cry9*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* respectivamente.







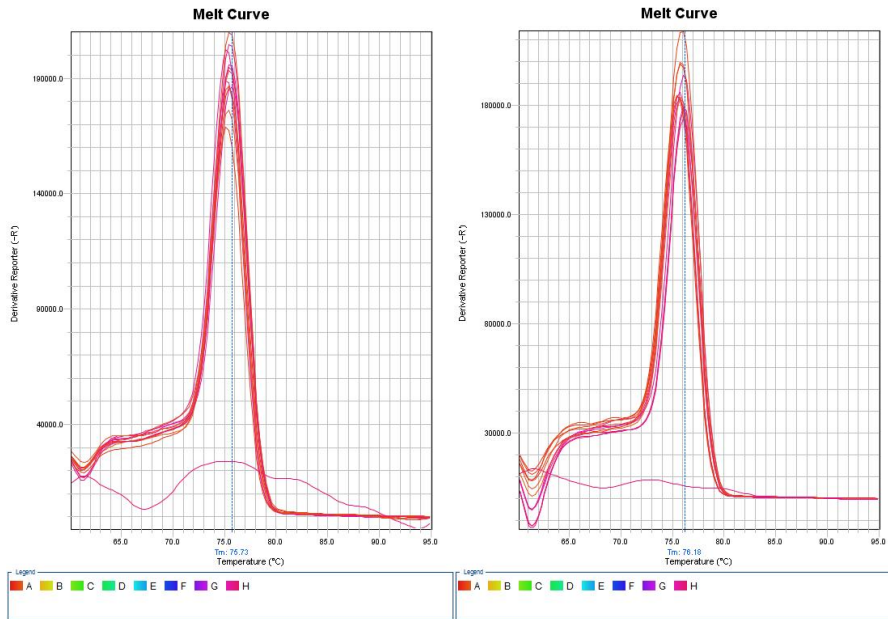
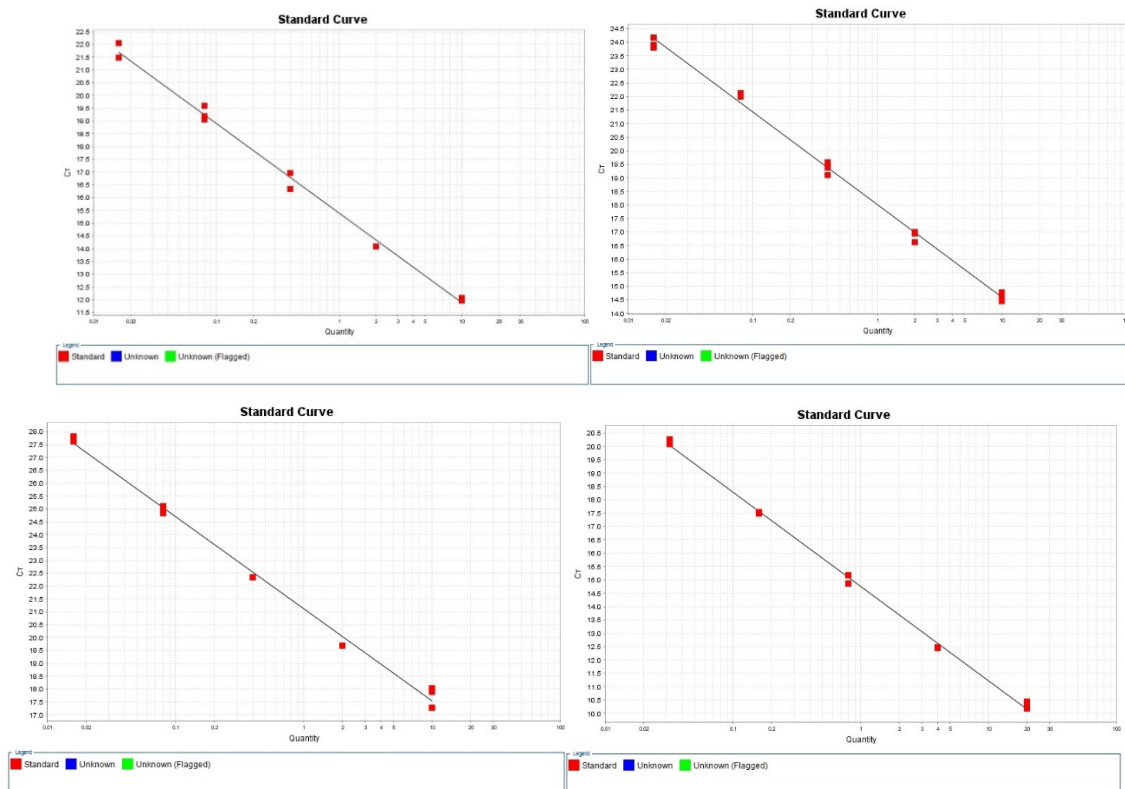
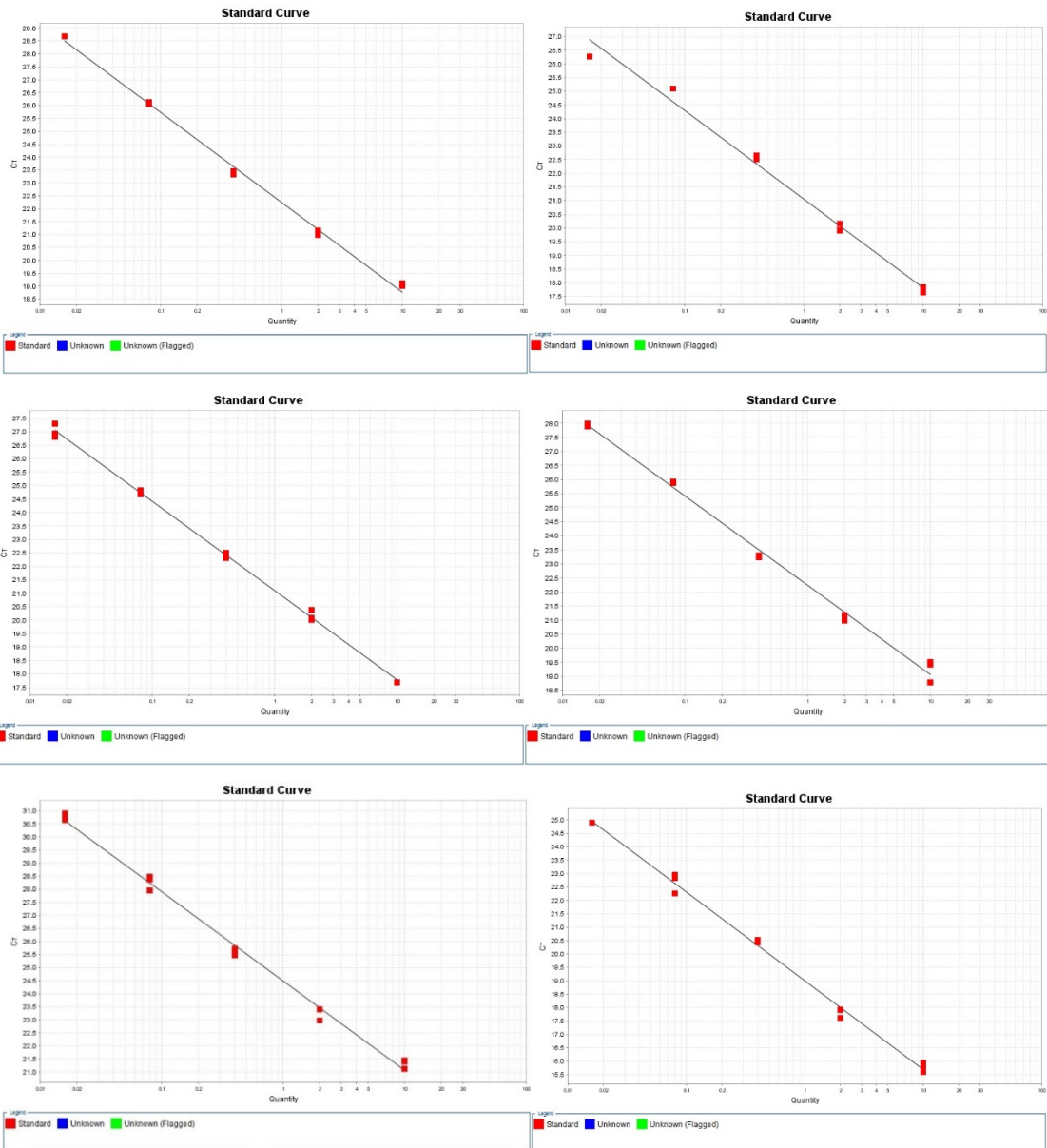
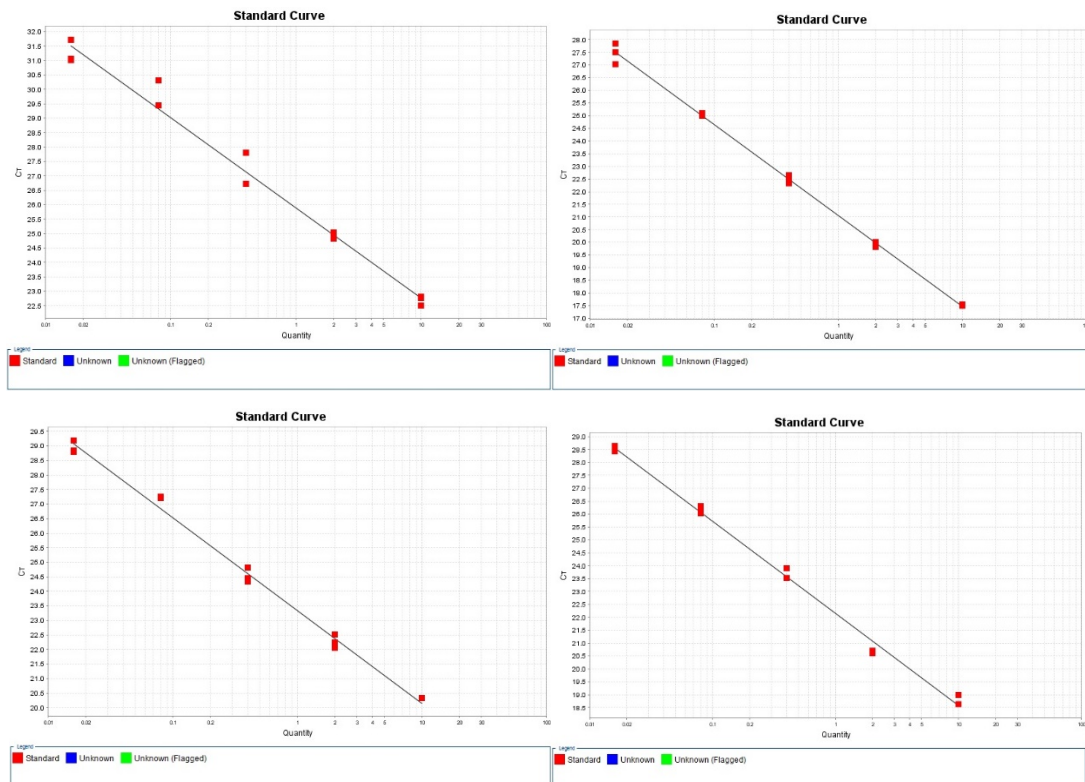


Figura 15 Curva padrão dos alvos *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1*, *cyt2* e *vip1a*, *cry9*, *vip2a*, *vip2b*, *vip3a/b* e *vip3c* respectivamente.







## 14 ANEXO B

Matrizes de p valor e teste qui-quadrado para as estirpes analisadas e formulação das figuras 8 e 9.

	Cry1	Cry2	Cry4	Cry6	Cry9	Cry10	Cry11 a	Cyt1	Cyt2	Vip1A	Vip2A	Vip2B	Vip3A. B
Cry1	0,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	0,001 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,046 5	0,173 4	0,000 5	0,0005
Cry2	0,000 5	0,000 0	1,000 0	1,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,353 3	1,000 0	0,044 0	0,0005
Cry4	1,000 0	1,000 0	0,000 0	1,000 0	1,000 0	0,001 0	0,001 0	0,000 5	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,0000
Cry6	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,0000
Cry9	0,001 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	0,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,075 5	0,0005
Cry10	1,000 0	1,000 0	0,001 0	1,000 0	1,000 0	0,000 0	0,000 5	0,001 0	0,001 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,0000
Cry11a	1,000 0	1,000 0	0,001 0	1,000 0	1,000 0	0,000 5	0,000 0	0,000 5	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,0000
Cyt1	1,000 0	1,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	0,001 0	0,000 5	0,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,0000
Cyt2	1,000 0	1,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	0,001 0	0,000 5	0,000 5	0,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,0000
Vip1A	0,046 5	0,353 3	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,000 0	0,033 0	0,000 5	0,6312
Vip2A	0,173 4	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,033 0	0,000 0	1,000 0	0,1324

	Cry1	Cry2	Cry4	Cry6	Cry9	Cry10	Cry11 a	Cyt1	Cyt2	Vip1A	Vip2A	Vip2B	Vip3A .B
Cry1	258,0 000	144,4 221	0,391 9	0,195 2	16,33 14	0,226 7	0,391 9	0,391 9	0,391 9	5,427 9	5,162 9	22,02 88	156,2 182
Cry2	144,4 221	258,0 000	0,337 5	0,168 1	48,76 54	0,375 8	0,337 5	0,337 5	0,337 5	1,561 2	0,168 1	5,575 6	211,4 692
Cry4	0,391 9	0,337 5	258,0 000	0,007 8	0,098 3	127,9 922	258,0 000	258,0 000	258,0 000	0,072 9	0,007 8	0,081 3	0,337 5
Cry6	0,195 2	0,168 1	0,007 8	258,0 000	0,049 0	0,015 8	0,007 8	0,007 8	0,007 8	0,036 3	0,003 9	0,040 5	0,168 1
Cry9	16,33 14	48,76 54	0,098 3	0,049 0	258,0 000	0,198 2	0,098 3	0,098 3	0,098 3	0,454 9	0,049 0	5,526 4	37,69 65
Cry1 0	0,226 7	0,375 8	127,9 922	0,015 8	0,198 2	258,0 000	127,9 922	127,9 922	127,9 922	0,146 9	0,015 8	0,163 8	0,375 8
Cry1 1a	0,391 9	0,337 5	258,0 000	0,007 8	0,098 3	127,9 922	258,0 000	258,0 000	258,0 000	0,072 9	0,007 8	0,081 3	0,337 5
Cyt1	0,391 9	0,337 5	258,0 000	0,007 8	0,098 3	127,9 922	258,0 000	258,0 000	258,0 000	0,072 9	0,007 8	0,081 3	0,337 5
Cyt2	0,391 9	0,337 5	258,0 000	0,007 8	0,098 3	127,9 922	258,0 000	258,0 000	258,0 000	0,072 9	0,007 8	0,081 3	0,337 5
Vip1 A	5,427 9	1,561 2	0,072 9	0,036 3	0,454 9	0,146 9	0,072 9	0,072 9	0,072 9	258,0 000	27,77 43	66,84 80	0,471 5
Vip2 A	5,162 9	0,168 1	0,007 8	0,003 9	0,049 0	0,015 8	0,007 8	0,007 8	0,007 8	27,77 43	258,0 000	0,040 5	5,996 2
Vip2 B	22,02 88	5,575 6	0,081 3	0,040 5	5,526 4	0,163 8	0,081 3	0,081 3	0,081 3	66,84 80	0,040 5	258,0 000	10,76 84
Vip3 A.B	156,2 182	211,4 692	0,337 5	0,168 1	37,69 65	0,375 8	0,337 5	0,337 5	0,337 5	0,471 5	5,996 2	10,76 84	258,0 000
Vip2B	0,000 5	0,044 0	1,000 0	1,000 0	0,075 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,000 5	1,000 0	0,000 0	0,0055
Vip3A. B	0,000 5	0,000 5	1,000 0	1,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,631 2	0,132 4	0,005 5	0,0000

**Figura 16** As tabelas acima representam os valores de matrizes obtidos para os testes p valor e qui-quadrado, respectivamente, para todas as estirpes do *grupo Bacillus spp*

	Cry1	Cry2	Cry4	Cry6	Cry9	Cry10	Cry11 a	Cyt1	Cyt2	Vip1A	Vip2A	Vip2B	Vip3A. B
Cry1	0,000 0	0,018 5	0,072 5	0,268 4	0,278 4	0,054 5	0,074 5	0,075 0	0,077 0	0,057 5	1,000 0	1,000 0	0,0030
Cry2	0,018 5	0,000 0	0,125 9	0,374 3	0,190 4	0,135 4	0,129 4	0,119 9	0,125 4	0,000 5	0,379 3	0,152 9	0,0005
Cry4	0,072 5	0,125 9	0,000 0	1,000 0	1,000 0	0,005 0	0,001 5	0,002 0	0,001 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,1249
Cry6	0,268 4	0,374 3	1,000 0	0,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,3478
Cry9	0,278 4	0,190 4	1,000 0	1,000 0	0,000 0	0,585 7	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,197 4	1,000 0	1,000 0	0,4968
Cry10	0,054 5	0,135 4	0,005 0	1,000 0	0,585 7	0,000 0	0,004 5	0,005 0	0,003 5	0,598 7	1,000 0	0,602 7	0,1419
Cry11a	0,074 5	0,129 4	0,001 5	1,000 0	1,000 0	0,004 5	0,000 0	0,001 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,1404
Cyt1	0,075 0	0,119 9	0,002 0	1,000 0	1,000 0	0,005 0	0,001 0	0,000 0	0,000 5	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,1254
Cyt2	0,077 0	0,125 4	0,001 5	1,000 0	1,000 0	0,003 5	0,000 5	0,000 5	0,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,1239
Vip1A	0,057 5	0,000 5	1,000 0	1,000 0	0,197 4	0,598 7	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,000 0	0,141 9	0,003 0	0,0130
Vip2A	1,000 0	0,379 3	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,141 9	0,000 0	1,000 0	1,0000
Vip2B	1,000 0	0,152 9	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,602 7	1,000 0	1,000 0	1,000 0	0,003 0	1,000 0	0,000 0	0,4903
Vip3A. B	0,003 0	0,000 5	0,124 9	0,347 8	0,496 8	0,141 9	0,140 4	0,125 4	0,123 9	0,013 0	1,000 0	0,490 3	0,0000



	Cry1	Cry2	Cry4	Cry6	Cry9	Cry10	Cry11 a	Cyt1	Cyt2	Vip1A	Vip2A	Vip2B	Vip3A .B
Cry1	58,00 00	6,613 3	5,437 5	2,671 1	1,501 7	4,834 9	5,437 5	5,437 5	5,437 5	4,171 8	0,387 6	0,035 2	10,13 10
Cry2	6,613 3	58,00 00	3,649 7	1,792 8	2,501 2	2,799 2	3,649 7	3,649 7	3,649 7	18,76 97	1,792 8	2,961 6	34,93 18
Cry4	5,437 5	3,649 7	58,00 00	0,036 3	0,540 4	27,96 43	58,00 00	58,00 00	58,00 00	0,380 5	0,036 3	0,431 5	3,649 7
Cry6	2,671 1	1,792 8	0,036 3	58,00 00	0,265 4	0,075 4	0,036 3	0,036 3	0,036 3	0,186 9	0,017 9	0,212 0	1,792 8
Cry9	1,501 7	2,501 2	0,540 4	0,265 4	58,00 00	1,120 8	0,540 4	0,540 4	0,540 4	2,779 1	0,265 4	0,003 5	0,822 7
Cry10	4,834 9	2,799 2	27,96 43	0,075 4	1,120 8	58,00 00	27,96 43	27,96 43	27,96 43	0,789 1	0,075 4	0,895 1	2,799 2
Cry11 a	5,437 5	3,649 7	58,00 00	0,036 3	0,540 4	27,96 43	58,00 00	58,00 00	58,00 00	0,380 5	0,036 3	0,431 5	3,649 7
Cyt1	5,437 5	3,649 7	58,00 00	0,036 3	0,540 4	27,96 43	58,00 00	58,00 00	58,00 00	0,380 5	0,036 3	0,431 5	3,649 7
Cyt2	5,437 5	3,649 7	58,00 00	0,036 3	0,540 4	27,96 43	58,00 00	58,00 00	58,00 00	0,380 5	0,036 3	0,431 5	3,649 7
Vip1A	4,171 8	18,76 97	0,380 5	0,186 9	2,779 1	0,789 1	0,380 5	0,380 5	0,380 5	58,00 00	5,540 0	10,95 99	7,970 5
Vip2A	0,387 6	1,792 8	0,036 3	0,017 9	0,265 4	0,075 4	0,036 3	0,036 3	0,036 3	5,540 0	58,00 00	0,212 0	0,577 5
Vip2B	0,035 2	2,961 6	0,431 5	0,212 0	0,003 5	0,895 1	0,431 5	0,431 5	0,431 5	10,95 99	0,212 0	58,00 00	0,995 3
Vip3A .B	10,13 10	34,93 18	3,649 7	1,792 8	0,822 7	2,799 2	3,649 7	3,649 7	3,649 7	7,970 5	0,577 5	0,995 3	58,00 00

**Figura 17** As tabelas acima representam os valores de matrizes obtidos para os testes p valor e qui-quadrado, respectivamente, para todas as estirpes de *Bacillus thuringiensis*.