



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

GISELLY BATISTA ALVES

**ANÁLISES DE GENOMAS DE *Bacillus thuringiensis* subsp.
israelensis ISOLADOS EM TOCANTINS COM TOXICIDADE PARA
MOSQUITOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA**

**GURUPI-TO
2017**



Universidade Federal do Tocantins
Campus Universitário de Gurupi
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

GISELLY BATISTA ALVES

**ANÁLISES DE GENOMAS DE *Bacillus thuringiensis* subsp.
israelensis ISOLADOS EM TOCANTINS COM TOXICIDADE PARA
MOSQUITOS DE INTERESSE EM SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar

Coorientador: Dr. Fernando Lucas de Melo

**GURUPI-TO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

A474a Alves, Giselly Batista .

Análises de genomas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* isolados em Tocantins com toxicidade para mosquitos de interesse em saúde pública . / Giselly Batista Alves. – Gurupi, TO, 2017.

100 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2017.

Orientador: Raimundo Wagner De Souza Aguiar

Coorientador: Fernando Lucas De Melo

1. δ -endotoxinas. 2. Genômica comparativa. 3. PBtoxis. 4. Fatores de virulência. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Rua Badejós, Chácaras 69 e 72 - CEP: 77402-970 - Caixa Postal 66 | Gurupi/TO
(63) 3311-3549 | www.uft.edu.br/biotecnologia | ppgbiotec@uft.edu.br



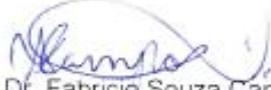
Ata de Defesa nº 35/2017

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GISELLY BATISTA ALVES DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS.

Aos 14 dias do mês de agosto do ano de 2017, às 09 horas, na sala de reuniões do prédio da produção Vegetal, campus de Gurupi, da Universidade Federal do Tocantins, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Orientador Dr. RAIMUNDO WAGNER DE SOUZA AGUIAR da Universidade Federal do Tocantins, Prof. Dr. FERNANDO LUCAS DE MELO da Universidade de Brasília, Prof Dr FABRICIO SOUZA CAMPOS da Universidade de Brasília, Prof Dr ROBERTO FRANCO TEIXEIRA CORRÊA da Universidade de Brasília e Prof Dr ELISEU JOSE GUEDES PEREIRA da Universidade Federal de Viçosa, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GISELLY BATISTA ALVES, intitulada "**Análise de genomas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* isolados em Tocantins com toxicidade para mosquitos de interesse em saúde pública**". Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo parecer favorável à aprovação, com as devidas correções apontadas pela banca, habilitando-a ao título de Mestre em Biotecnologia. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. Raimundo Wagner de Souza Aguiar
Universidade Federal do Tocantins
Orientador


Prof. Dr. Fernando Lucas de Melo
Universidade de Brasília
Coorientador


Prof. Dr. Fabricio Souza Campos
Universidade de Brasília
1º Examinador


Prof. Dr. Roberto Franco Teixeira Corrêa
Universidade de Brasília
2º Examinador


Prof. Dr. Eliseu Jose Guedes Pereira
Universidade Federal de Viçosa
3º Examinador

Gurupi, 14 de agosto de 2017.


Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTO

Dedico este trabalho a minha amada mãe e irmã, Maria Lucivânia Batista Alves e Tayane Batista Alves, e ao meu companheiro Rafael Socbzak pelo apoio ao longo desse trajeto.

Ao meu orientador Raimundo Wagner de Souza Aguiar pela confiança depositada para a realização deste trabalho, e ao professor Bergmann Morais Ribeiro por abrir espaço em seu Laboratório de Baculovírus- UNB para o desenvolvimento da pesquisa. Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Agradeço imensamente ao meu coorientador, Doutor Fernando Lucas de Melo, por me ensinar tudo o que foi necessário para que essa pesquisa fosse realizada. A ele agradeço a paciência e abdicção de seu curto tempo para me ajudar. Aos pesquisadores, Leonardo de Assis e Fabrício Morgado por me ajudarem também com a pesquisa. Agradeço também a minha amiga Patrícia Verdugo Pascoal por compartilhar comigo conhecimentos que foram essências para o entendimento de diferentes assuntos relacionados a pesquisa.

Por fim não poderia deixar de agradecer ainda aos membros da banca examinadora Fabrício Souza Campos, Eliseu José Guedes Pereira e Roberto Franco Teixeira Corrêa.

RESUMO

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* é uma bactéria gram positiva, amplamente utilizada no controle de insetos Diptera, família Culicidae, tais como *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. O sequenciamento de genomas completos de estirpes de *B. thuringiensis* tem permitido a identificação e caracterização de proteínas inseticidas, assim como a realização de estudos de genômica comparativa, permitindo evidenciar diferenças funcionais e filogenéticas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar análises genômicas de quatro isolados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* que apresentam diferentes toxicidades para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. O sequenciamento dos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 foi realizado a partir da plataforma MiSeq-Illumina, e a montagem e anotação foram feitas utilizando ferramentas do programa de bioinformática Geneious. As análises resultaram em cromossomos com tamanhos aproximados de 5.414 Kb, conteúdo G+C de 35,2% e 5.358 regiões codificantes. Com relação ao conteúdo extracromossomal, foram montados três plasmídeos menores de 5,4; 6,8 e 7,6 Kb, e três plasmídeos maiores de 127, 235 e 359 Kb para todos os isolados, e estes foram enumerados de 1 a 6. A anotação revelou que apenas os plasmídeos de número 4, que correspondem ao pBtoxis, possuem proteínas inseticidas, sendo elas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba e Cyt1Ca. A análise comparativa entre os genomas demonstra que os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentam sequências colineares e com 99% de identidade, e seus respectivos plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 compartilham todas as suas regiões codificantes, incluindo aquelas relacionadas a δ -endotoxinas. A comparação de sequências de enterotoxinas, metaloproteases e fosfolipases demonstra que estes também são conservados entre os genomas. Na análise filogenética, os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 agruparam-se juntamente com os genomas dos isolados AM65-52 e HD-789 disponíveis no GenBank, sugerindo uma estreita relação genética entre estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Os isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentam diferentes concentrações letais para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, e a adição de dados proteômicos aos dados genômicos, aqui obtidos, poderão auxiliar na compreensão destas diferenças de toxicidade. Contudo as análises comparativas entre os genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 mostram alto grau de conservação genética a nível de nucleotídeos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Palavras-chave: δ -endotoxinas; genômica comparativa; pBtoxis; fatores de virulência.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* is a gram-positive bacterium widely used to control insects of the order Diptera, such as *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). The sequencing of complete genomes of *B. thuringiensis* strains has allowed the identification and characterization of insecticidal proteins, as well as the comparative genomic studies, allowing the identification of functional and phylogenetic differences. In this context, the present study aimed to perform genomic analysis of four isolates of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* having different toxicities for larvae of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* larvae. Sequencing of genomes of the isolates T0124, T0131, T0137 and T0139 was performed from the MiSeq-Illumina platform, and assembly and annotation were done using tools from the Geneious bioinformatics program. The analyzes resulted in chromosomes with approximate sizes of 5,414 Kb, G + C content of 35.2% and 5,358 coding regions. Regarding extrachromosomal content, three smaller plasmids of 5.4, 6.8 and 7.6 Kb, and three larger plasmids of 127, 235 and 359 Kb were assembled for all the isolates, and these were enumerated from 1 to 6. The annotation revealed that only the plasmids of number 4, corresponding to pBtoxis, possess insecticidal proteins, being Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba and Cyt1Ca. Comparative analysis between the genomes demonstrates that chromosomes T0124, T0131, T0137 and T0139 have collinear sequences and 99% identity, and their respective plasmids 1, 2, 3, 4, 5 and 6 share all of their coding regions, including those related to δ -endotoxins. Comparison of enterotoxin, metalloprotease and phospholipase sequences shows that these are conserved among the genomes. In the phylogenetic analysis, chromosomes T0124, T0131, T0137 and T0139 were grouped together with the genomes of the isolates AM65-52 and HD-789 available in GenBank, suggesting a close genetic relation between strains of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. The isolates T0124, T0131, T0137 and T0139 present different lethal concentrations to larvae of *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus*, and the addition of proteomic data to the genomic data obtained here may help to understand these differences in toxicity. However, the comparative analyzes between the genomes of isolates T0124, T0131, T0137 and T0139 show a high degree of genetic conservation at the nucleotide level of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Keywords: δ -endotoxins; comparative genomics; pBtoxis; factors of virulence.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	<i>Bacillus thuringiensis</i> : Contexto geral.....	15
2.2	Toxinas: estrutura, especificidade e modo de ação.....	16
2.2.1	δ-endotoxinas: Cry e Cyt.....	16
2.2.1.1	Proteínas Cry.....	16
2.2.1.2	Proteínas Cyt.....	22
2.2.2	Outras toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	25
2.2.2.1	Proteínas VIP.....	25
2.2.2.2	Parasporinas.....	26
2.2.2.3	α-exotoxinas e β-exotoxinas.....	28
2.2.2.4	Outros fatores de virulência.....	29
2.3	Utilização como bioinseticida.....	30
2.4	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	31
2.4.1	Estrutura e especificidade de toxinas larvicidas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	31
2.4.2	Interações sinérgicas entre toxinas larvicidas.....	37
2.4.3	Plasmídeos de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	40
2.5	Base de dados e estudos genômicos com <i>B. thuringiensis</i>	41
2.5.1	Base de dados genômicos de <i>B. thuringiensis</i>	43
2.5.2	Estudos genômicos envolvendo a espécie <i>B. thuringiensis</i>	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1	Isolados de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	47
3.2	Extração do DNA e sequenciamento dos genomas.....	48
3.3	Avaliação de qualidade.....	48
3.4	Montagem e anotação dos genomas.....	48
3.4.1	Desenho esquemático da metodologia utilizada para montagem e anotação dos genomas.....	49
3.4.2	Montagem dos cromossomos.....	50
3.4.3	Montagem de plasmídeos.....	50
3.4.4	Anotação dos cromossomos e plasmídeos.....	51
3.5	Análise comparativa.....	51
3.5.1	Comparação entre cromossomos.....	51
3.5.2	Comparação entre plasmídeos.....	52
3.5.3	Determinação e comparação de fatores de virulência.....	51
3.5.4	Análise filogenética e MAUVE utilizando outras 14 sequências cromossomais de <i>B. thuringiensis</i>	52
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Análise dos dados de sequenciamento.....	54
4.2	Montagem dos genomas.....	55
4.2.1	Montagem dos cromossomos.....	55
4.2.2	Montagem dos plasmídeos.....	59
4.3	Anotação dos genomas (cromossomal e plasmidial).....	62
4.4	Análises comparativas.....	66
4.4.1	Comparação entre cromossomos.....	66
4.4.2	Comparação entre plasmídeos.....	68
4.4.3	Determinação e comparação de fatores de virulência.....	70

4.4.4	Análise comparativa filogenética usando outros 14 cromossomos completos.....	71
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8	ANEXO.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características, toxicidade e sinergismo entre as principais toxinas de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	38
Tabela 2. Concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₅) de isolados de <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> contra larvas de <i>A. aegypti</i> e <i>C. quinquefasciatus</i> apresentando diferentes toxicidades.....	47
Tabela 3: Características dos isolados e respectivos dados de sequenciamento.....	54
Tabela 4: Características de montagem com referência (CP003763) dos cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139.....	59
Tabela 5: Características de montagem <i>de novo</i> para os plasmídeos dos isolados T0124, T0131, T0137	60
Tabela 6: características da montagem dos plasmídeos nos isolados T0124, T0131, T0137.....	61
Tabela 7: Características de anotação dos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137	63
Tabela 8: Identificação de fatores de virulência e comparação de sequências entre T0124, T0131, T0137 e T0139.....	70
Tabela 9: Características gerais dos cromossomos de estirpes de <i>B. thuringiensis</i> utilizados na análise filogenética.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão de um <i>B. thuringiensis</i> esporulante..	17
Figura 2: Representação dos três domínios nas estruturas primária e tridimensional de proteínas Cry.....	19
Figura 3: Receptores de membrana para a proteína Cry1A.....	20
Figura 4: Representação de modelos atuais descrevendo o modo de ação de um cristal de <i>B. thuringiensis</i> no intestino médio de um inseto.....	21
Figura 5: Representação da estrutura de Cyt1Aa.....	23
Figura 6: Representação esquemática de dois mecanismos hipotéticos de ação para a toxina Cyt1Aa.....	24
Figura 7: Representação da estrutura da proteína Cry4Ba com seus três domínios, sendo representados pelas cores azul (I), verde (II) e roxo (III).....	33
Figura 8: Representação da estrutura da toxina Cry4Aa.....	34
Figura 9: Representação esquemática da estrutura cristalina de Cyt2Ba.....	37
Figura 10: Modelo de sinergismo entre as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa.....	39
Figura 11: Representação gráfica de base de dados de genomas da espécie <i>B. thuringiensis</i> obtidos a partir do NCBI.....	43
Figura 12: Gráficos de qualidade dos dados de sequenciamento obtidos para os quatro isolados.....	55
Figura 13: Mapa comparativo entre os cromossomos montados e o genoma usado como referência.....	56
Figura 14: Representação de regiões sem cobertura na montagem dos <i>reads</i> com a referência.....	57
Figura 15: Regiões com alta cobertura nos genomas.....	58
Figura 16: Gráficos de cobertura dos plasmídeos montados.....	62
Figura 17: Distribuição global das principais funções moleculares de proteínas anotadas nos cromossomos e plasmídeos maiores.....	64
Figura 18: Mapa representativo do plasmídeo 4.....	65

Figura 19: Mapas representativos dos plasmídeos 1, 2 e 3.....	66
Figura 20. Mapas comparativos entre os genomas T0124, T0131, T0137 e T0139.....	67
Figura 21: Comparação entre plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 a partir da análise de genes órtologos.....	69
Figura 22: Análise filogenética e alinhamento dos cromossomos dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 com outros 14 cromossomos de outras estirpes de <i>B. thuringiensis</i>	73

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, formadora de esporos, e tem como principal característica a produção de cristais proteicos intracelulares durante a fase de esporulação que apresentam atividade inseticida, compreendendo proteínas das famílias Cry e Cyt (FREDERICI, 1999; ARONSON, 2002). Atualmente *B. thuringiensis* é considerada o principal micro-organismo entomopatógeno utilizado no controle de insetos pragas (CASTAGNOLA e STOCK, 2014).

B. thuringiensis possui uma grande variedade de subespécies, classificadas em 79 sorotipos, que apresentam δ -endotoxinas que possuem atividade inseticida específica para uma ampla gama de insetos tais como, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Ortoptera, Mallophaga, e outros organismos como nematoides, ácaros e protozoários (RAMÍREZ-LEPE e RAMÍREZ-SUERO, 2012; SANAHUJA et al, 2011; VILAS-BOAS et al., 2007).

Dentre a grande variedade de subespécies desta bactéria, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* destaca-se por possui alta toxicidade para larvas de insetos da ordem Diptera, família Culicidae, tais como *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (RAMÍREZ-LEPE e RAMÍREZ-SUERO, 2012). Esta bactéria produz sete toxinas formadoras de cristais, sendo elas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba e Cyt1Ca, todas encontradas em um único plasmídeo chamado pBtoxis de 127,923 pb (BERRY, et al., 2002).

O surgimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) significou um marco importante no sequenciamento de genomas completos de bactérias com importância econômica (LOMAN et al., 2012 a). Assim, dada a sua importância no controle biológico, diversos genomas de *B. thuringiensis* têm sido amplamente sequenciados e divulgados, e até o momento existem 193 genomas de *B. thuringiensis* de várias subespécies depositados no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Devido sua grande importância no controle de insetos vetores de doenças, o sequenciamento de genomas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* também têm crescido (ANDERSON et al., 2005; DOGGETT et al., 2012; ZWICK et al., 2012; JEONG et al., 2016; JOHNSON et al., 2015; BOLOTIN et al., 2016).

Dessa forma, o sequenciamento de genomas completos têm permitido diferentes estudos com *B. thuringiensis*, tais como a análise estrutural e funcional de genomas,

a caracterização de proteínas inseticidas, identificação de novas toxinas e de novos plasmídeos (LOEZA-LARA et al., 2005; HUANG et al., 2005 SHEPPARD et al., 2013; ZORZETTI et al., 2015; BARBOSA et al, 2015).

Além disso, a grande disponibilidade de genomas completos de bactérias tem permitido ainda realizar estudos de genômica comparativa, possibilitado analisar espécies estreitamente relacionadas, permitindo encontrar rearranjos cromossomais, identificar proteínas conservadas e proteínas únicas, evidenciando melhor as relações filogenéticas e a diversidade existente entre micro-organismos (RASKO et al., 2005; ALCARAZ et al., 2010; CHU e RAINEY ,2014).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar análises genômicas de quatro isolados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* que apresentam diferentes toxicidades para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, tendo ainda como objetivos específicos: (1) montagem e anotação de cromossomos e conteúdo plasmidial; (2) caracterização de genes inseticidas e outros fatores de virulência; (3) comparação entre cromossomos dos isolados; (4) análise de genes ortólogos entre plasmídeos; (5) comparação entre sequências de fatores de virulência; e (6) análise filogenética.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus thuringiensis*: Contexto geral

Bacillus thuringiensis foi primeiramente isolada em 1901, de larvas doentes do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwata enquanto estudava a causa da doença de sotto neste inseto, nomeando assim a espécie de *Bacillus sotto* (ISHIWATA, 1901). Porém este nome foi declarado inválido mais tarde, e a espécie *B. thuringiensis* somente foi assim chamada em 1915, quando Ernst Berliner isolou uma linhagem de larvas doentes da mariposa da farinha do mediterrâneo (*Anagasta kuehniella*), dando este nome em homenagem a Turíngia, Alemanha, onde havia isolado a larva (BERLINER, 1911; BERLINER, 1915).

B. thuringiensis é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram-positiva, formadora de esporos, e pode ser isolada de diferentes habitats tais como solo, insetos, pó de produtos armazenados e folhas de plantas decíduas e coníferas (FREDERICI, 1999). Essas bactérias têm como principal característica a produção de cristais proteicos intracelulares, também chamadas de δ -endotoxinas, compreendendo proteínas das famílias Cry e Cyt, que são liberadas com o esporo no momento da lise celular durante o processo de esporulação (ARONSON, 2002).

B. thuringiensis é pertencente ao grupo *Bacillus cereus*, e se relacionada geneticamente com outras espécies desse grupo, como por exemplo, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus mycoides*. Curiosamente, acreditava-se que a produção de cristais era o critério utilizado para diferenciar *B. thuringiensis* de *B. cereus* (ARONSON, 2002), entretanto outros estudos mostram que *B. cereus* e *B. thuringiensis* podem ser diferenciados geneticamente a partir de resultados de análise por agrupamento de padrões de rep-PCR (técnica de PCR em sequências palindrômicas extragênicas repetidas) (CHERIF, et al., 2003); composição alélica em locus enzimáticos e atividade hemolítica (VILAS-BOAS et al, 2002). Já estudos recentes, demonstram que a controversa relação genética existente entre *B. thuringiensis* e *B. cereus*, assim como entre outras espécies do grupo *B. cereus*, pode ser resolvida a partir de análise sistemática de sequências genômicas completas, em que os genes *housekeeping pycA* (Piruvato carboxilase) e, quando necessário, *ccpA* (Proteína A de controle de catabólitos) podem ser utilizados para diferenciar estas espécies, assim como fornecer uma identificação rápida. (LIU et al., 2015).

B. thuringiensis possui uma grande variedade de subespécies, e estas podem ser classificadas em variedades ou sorotipos a partir de um sistema descrito por Barjac e Bonnefoi em 1962, baseado na técnica de determinação de antígenos flagelares (H). As estirpes de *B. thuringiensis* são classificadas em 79 sorotipos, e estes apresentam diferentes δ -endotoxinas que possuem atividade inseticida específica para a formulação de bioinseticidas para uma ampla gama de ordens de insetos tais como, Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Himenoptera, Homoptera, Phthiraptera, Ortoptera, Mallophaga, e outros organismos como nematoides, ácaros e protozoários (FEDERICI, 1999; RAMÍREZ-LEPE e RAMÍREZ-SUERO, 2012; SANAHUJA, et al, 2011; VILAS-BOAS et al., 2007).

2.2 Toxinas: estrutura, especificidade e modo de ação

2.2.1 δ -endotoxinas: Cry e Cyt

As toxinas Cry e Cyt pertencem a uma classe de toxinas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros, sendo capazes de sofrer alterações conformacionais para se inserirem ou se translocarem através de membranas celulares de seus hospedeiros (BRAVO, et al., 2007). O primeiro passo para a ação dessas proteínas, na maioria dos casos, envolve a ativação por proteases presentes nos hospedeiros, ligação à receptores, ocorrendo então a formação de uma estrutura oligomérica para que possa ocorrer a inserção na membrana, desencadeada por uma diminuição de pH, induzindo um estado de glóbulo fundido da proteína (PARKER e FIEL, 2005). Apesar de serem toxinas formadoras de poros, Cry e Cyt exibem estruturas tridimensionais e mecanismos de ação diferentes (RODRIGUEZ-ALMAZAN et al., 2010).

2.2.1.1 Proteínas Cry

As proteínas Cry são definidas como proteínas de inclusão para-esporais de *B. thuringiensis* que exibe atividade entomocida, ou algum efeito tóxico para um organismo alvo (CRICKMORE et al., 1998). Estas apresentam um peso molecular entre 40 e 140 kDa (BRAVO, 1997), sendo codificados por genes *cry* que são usualmente encontrados em grandes plasmídeos ou, raramente, no cromossomo (VILAS-BOAS et al., 2007; VARANI et al, 2013). São produzidas como cristais, por isso o nome Cry (do inglês *Crystal*), de forma regular na fase de esporulação da célula ao lado de um esporo, sendo liberados após lise celular (Figura 1, A) (de MAAGD et

al., 2001). Estes cristais podem apresentar diferentes formas dependendo da composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo ser bipiramidais, cubóides, rombóides, ovóides, esféricos ou, ainda, não ter forma definida (HABIB e ANDRADE, 1998; POLANCZYK e ALVES, 2003). Na figura 1 (B) temos a análise ultraestrutural demonstrando cristais cubóides e bipiramidais.

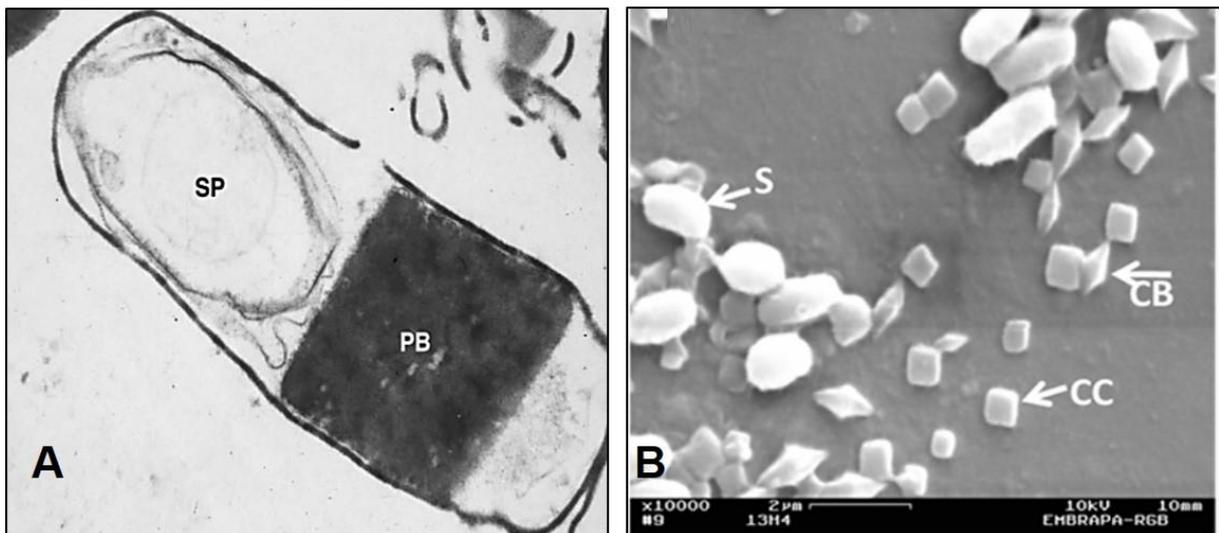


Figura 1. Estrutura celular esporulante e formas de cristais de *B. Thuringiensis*. **A.** Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula esporulante, em que PB representa o corpo proteico, e SP, esporo (de MAAGD et al., 2001). **B.** Análise ultraestrutural das misturas de esporos e cristais, em que S representa esporos; CC, cristais cubóides; e CB, cristais bipiramidais (CERQUEIRA, et al., 2016). A célula mostrada é de aproximadamente 2 μ m de comprimento.

Na tentativa de classificar estas proteínas, Höfte e Whiteley (1989) apresentaram um modelo de classificação, baseado no critério de combinação entre o espectro de ação contra insetos e as sequências de aminoácidos similares, que dividiram as proteínas em quatro classes, sendo elas: classe Cry I, específica contra Lepidópteras; classe Cry II específica contra lepidópteras e dípteras, classe Cry III contra coleópteras; e classe IV contra dípteras. Mais tarde surge uma quinta classe, CytA, que foi assim denominada por não apresentar sequência homóloga ou atividade inseticida parecida com as demais classes (TAILOR et al., 1992).

Entretanto uma nova classificação foi proposta, e o critério se baseia apenas na identidade de sequência de aminoácidos, sendo este mais eficaz que a proposta anterior, pois a medida que novos genes foram caracterizados, a relação entre suas sequências de aminoácidos homólogos com o espectro de ação tornou-se difícil (CRICKMORE et al., 1998). Assim, nesta nova classificação, as toxinas foram classificadas pelo nome Cry (ou Cyt), em quatro hierarquias constituídas por números,

letras maiúsculas, letras minúsculas e números, dependendo da sua posição em uma árvore filogenética (de MAAGD et al., 2001). Atualmente, as proteínas Cry representam uma grande família que consiste em mais de 800 genes *cry* descritos, divididos em 74 classes (CRICKMORE et al., 2016).

Com relação a estrutura tridimensional dessas proteínas, tem-se a presença de três domínios. O domínio I é responsável pela inserção da proteína na membrana intestinal e formação dos poros e compreende a porção N-terminal, consistindo em sete α -hélices, seis das quais são anfipáticas e circundam a sétima hélice hidrofóbica. O domínio II está relacionado com a ligação a receptores de membrana, e é formado por três folhas β -antiparalelas, dobradas simetricamente. Já o domínio III compreende a porção C-terminal, consistindo em duas folhas β - antiparalelas, formando um β -sanduíche, sendo relacionada com a estabilidade estrutural da proteína (de MAAGD et al., 2001; BOONSERM et al., 2006). Acredita-se que a porção C-terminal destas proteínas está envolvida com a formação de cristais, entretanto, não faz parte da toxina ativa pois é clivada por proteases no intestino do inseto, enquanto a porção N-terminal constitui a própria toxina (ADANG e CRICKMORE, 2014).

Apesar da vasta diversidade de sequências de aminoácidos, o alinhamento de algumas proteínas Cry revela que a maioria apresenta cinco blocos de sequências conservadas, quando presentes (Figura 2, A), e três domínios semelhantes (Figura 2, B) (SCHNEPF et al., 1998; PARDO-LÓPEZ et al., 2013). O primeiro bloco conservado é localizado na hélice central do domínio I, o segundo, na interface dos domínios I-II, o terceiro na fronteira entre os domínios II e III, o quarto é localizado na cadeia central do domínio III e o quinto bloco está no final do domínio III (MAAGD et al., 2001) (Figura 2).

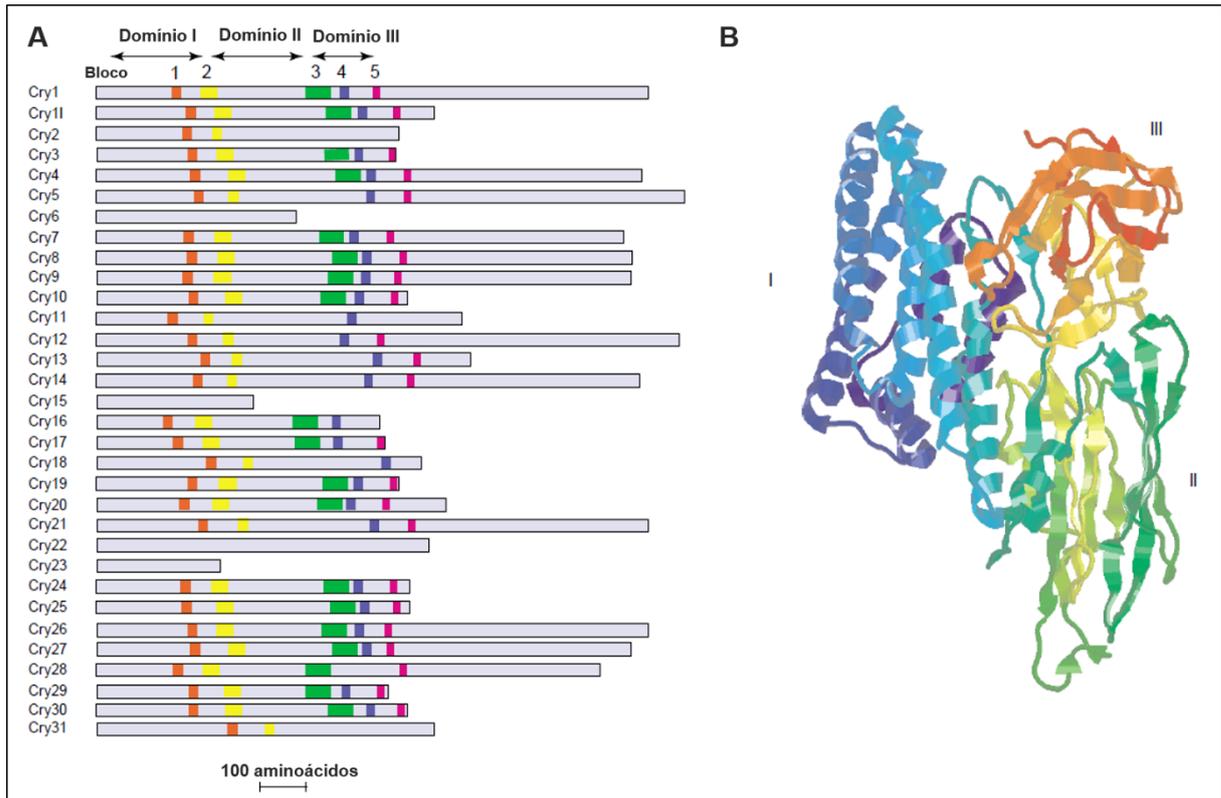


Figura 2. Representação dos três domínios nas estruturas primárias e tridimensionais de proteínas Cry. **A.** Estrutura primária, demonstrando os comprimentos relativos de toxinas Cry e, quando presentes, a posição dos cinco blocos conservados. **B.** Estrutura terciária conservada, mostrando as posições dos três domínios (de MAAGD et al., 2001).

O mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolve vários passos: ingestão, solubilização do cristal no intestino médio do inseto, ativação através do processamento das toxinas por proteases, ligação aos receptores do intestino, inserção na membrana apical, formação do poro e citólise (PRAÇA, et al., 2007; ADANG e CRICKMORE, 2014; de MAAGD, 2015).

As proteínas Cry, dentro do cristal, são ingeridas pelo inseto suscetível e então solubilizadas em pH alcalino do intestino das larvas e liberadas como pró-toxinas. Muitas pró-toxinas devem então ser processadas por proteases de intestino médio do inseto para se tornarem toxinas ativadas (SCHNEPF, et al., 1998; BRAVO, et al., 2007). Diferentes ordens de insetos podem apresentar proteases distintas em resposta às diferenças que existem na fisiologia intestinal destes, acarretando em atividades proteolíticas variadas, o que pode estar relacionado a especificidade das toxinas (de MAAGD et al., 2001). Por exemplo, as principais proteases presentes em insetos das ordens Lepidoptera e Diptera pertencem a classe das serino-proteases,

enquanto que para a ordem Coleoptera se destacam as cisteíno e aspárticos-proteases (de MAAGD et al., 2001).

Após a formação de toxinas ativas o núcleo destas atravessam a matriz peritrófica, que por sua vez é capaz de reter parte da toxina. Uma vez atingida a vesícula de membrana das microvilosidades apicais (VMMA) (*brush border membrane vesicles*- BBMV) do intestino médio, a toxina Cry está pronta para se ligar a proteínas de superfície, chamadas de receptores (ADANG e CRICKMORE, 2014). Em estudos realizados com insetos lepidópteros, os receptores de Cry foram identificadas como proteínas semelhantes à caderina (CADR), aminopeptidase N (APN), ligada à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), fosfatase alcalina (ALP), também ancorada uma âncora de GPI, um glicoconjugado de 270 kDa (GCR) (Figura 3) e uma proteína de 250 kDa chamada P252 (BRAVO, et al., 2011). A maioria dos estudos se concentram nas proteínas caderina, APN e ALP (ADANG e CRICKMORE, 2014).

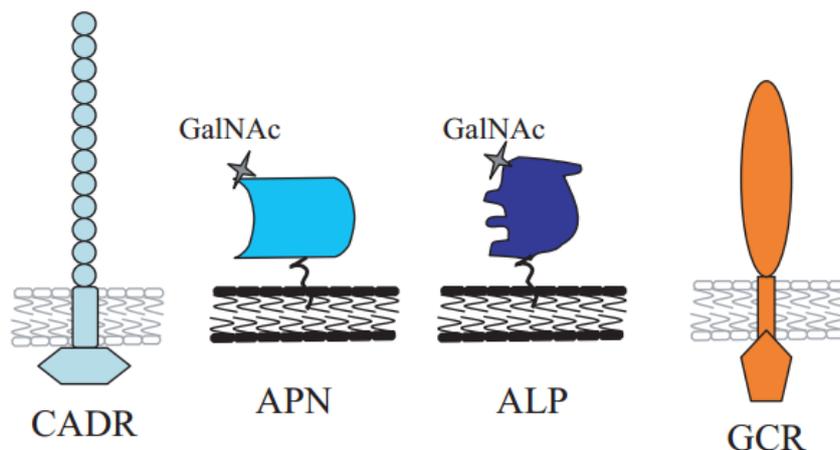


Figura 3: Receptores de membrana para a proteína Cry1A. GalNAc- N-acetilgalactosamina (sítio de reconhecimento e ligação da toxina Cry); CADR- receptor caderina; APN- receptor aminopeptidase-N; ALP- receptor fosfatase alcalina, GCR, receptor glicoconjugado de 270 kDa (BRAVO, et al., 2007).

As toxinas Cry após interagirem com receptores específicos, sofrem ação proteolíticas, resultando na formação de uma estrutura oligomérica pré-poro, que pode então ser inserida na membrana (ADANG e CRICKMORE, 2014). A figura 4 apresenta em detalhes os modelos atuais de ação de toxinas Cry que destacam a caderina, APN e ALP.

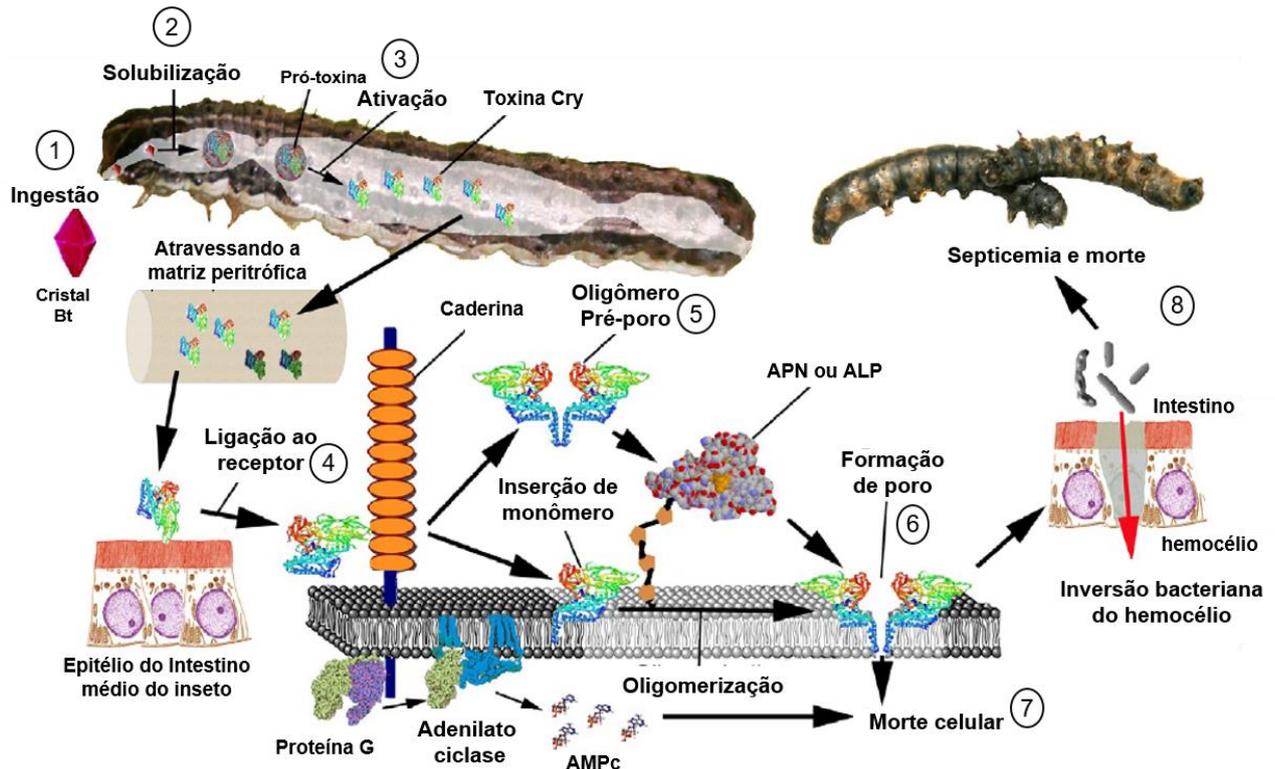


Figura 4. Representação de modelos atuais descrevendo o modo de ação de um cristal de *B. thuringiensis* no intestino médio de um inseto. 1- Ingestão do cristal por uma larva suscetível; 2- solubilização dos cristais de toxina nos fluidos do intestino médio, produzindo a pró-toxina Cry, 3- processamento da pró-toxina para a forma de toxina Cry ativa; 4- ligação da toxina Cry ao receptor caderina, o que resulta na ativação das vias de morte intracelular (proteína G, adenilato ciclase e AMPc [adenosina monofosfato cíclica]), e / ou de acordo com o modelo de "ligação sequencial", 5- proteólise adicional do monômero de toxina para resultar na formação de um oligômero pré-poro. Este oligômero pré-poro é proposto para se ligar a fosfatase alcalina (ALP) ou aminopeptidase (APN) para 6- inserir na membrana formando um poro que 7- leva à morte de células osmóticas a partir da formação de um poro. A inserção de monômero de toxina e a formação de um poro por oligomerização de monômeros inseridos é também apresentada como uma etapa alternativa. A interrupção da barreira do epitélio do intestino médio permite 8- a germinação de esporos e invasão bacteriana do hemocélio pelo crescimento vegetativo celular, levando a septicemia e morte do inseto (ADANG e CRICKMORE, 2014).

Estudos realizados sobre o mecanismo de ação da proteína Cry1A em lepidópteros, revela que esta toxina liga-se às proteínas do tipo caderina com alta afinidade na região extracelular, mais próxima da membrana (JIMÉNEZ-JUAREZ et al., 2008; PIGOTT e ELLAR, 2007), o que resulta na ativação das vias de morte intracelular denominadas proteína G e adenilato ciclase, promovendo a produção de AMPc, aumentando seus níveis, ativando então uma outra proteína, a quinase A, que causa então a morte celular (BRAVO et al., 2007; JIMÉNEZ-JUAREZ et al., 2008). Pardo-López et al. (2013), em estudos com a toxina Cry1A, descreve um modelo de

"ligação sequencial" em que a ligação à caderina resulta na ativação das vias de morte celular e / ou em facilitar uma clivagem proteolítica e remoção da α -1 hélice, resultando na formação de um oligômero denominado pré-poro, que apresenta afinidade elevada para APN e ALP (ZHUANG et al., 2002; ADANG e CRICKMORE, 2014). Dessa forma, ao se ligar ao segundo receptor, APN ou ALP, a inserção do oligômero na membrana lipídica para a formação de poro é facilitada. Contudo, apenas a ligação da forma monomérica da toxina Cry a caderina pode ser responsável pela toxicidade. Após a ligação, as toxinas se inserem na membrana formando poros que geram um desequilíbrio osmótico e iônico levando a morte do inseto (BRAVO et al., 2007, de MAAGD et al., 2001, SCHNEPF et al., 1998)

A intoxicação com a proteína Cry resulta em condições fisiológicas intestinais alteradas que, juntamente com a interação com vesícula de membrana das microvilosidades apicais (VMMA), favorecem a germinação do esporo de *B. thuringiensis* (DU e NICKERSON, 1996). Contudo, na fase terminal da infecção, as células vegetais de *B. thuringiensis* crescem e multiplicam-se na hemolinfa, resultando em septicemia e morte de insetos (ADANG e CRICKMORE, 2014).

2.2.1.2 Proteínas Cyt

A família de δ -endotoxinas Cyt consiste em proteínas relativamente pequenas, com massas moleculares entre 25 e 28 kDa, e são expressas durante a esporulação de várias subespécies de *B. thuringiensis*, tais como *B. thuringiensis subsp. israelensis*, *kyushuensis*, *medellin* e *jegatesan* (MANASHEROB, et al., 2006). Estas proteínas apresentam, principalmente, uma atividade inseticida específica para insetos da ordem Diptera *in vivo*, e uma ampla gama de atividade citolítica contra células de insetos e mamíferos *in vitro* (THOMAS e ELLAR, 1983; XU, et al., 2014 a).

Estas proteínas possuem baixa identidade de sequência de aminoácidos com as proteínas Cry, e atualmente, apresentam uma família de três classes de proteínas Cyt (Cyt1, Cyt2, e Cyt3), com cerca de 38 genes *cyt* descritos, apresentando um alto nível de identidade (CRICKMORE, et al., 2016).

A estrutura tridimensional destas proteínas é apresentada a partir da toxina Cyt1Aa, a primeira toxina citolítica descrita detalhadamente (BOURGOUIN, et al., 1986). Assim, estas proteínas apresentam um único domínio α - β conservado, compreendendo duas alças α -hélices, compostas por α 1 e α 2 em um lado e α 3 a α 5 por outro, flanqueando um núcleo de folhas β , que consiste em seis cadeias β

antiparalelas (LI et al., 1996; COHEN et al., 2008; COHEN et al., 2011). A região N-terminal acomoda os locais de clivagem proteolítica, e a região C-terminal compreende as três cadeias principais ($\beta 5$, $\beta 6$ e $\beta 7$) que são protegidas contra a proteólise durante a inserção na membrana (XU et al., 2014 a) (Figura 5).

As hélices têm um carácter anfifílico, do qual os resíduos hidrofóbicos são responsáveis pelo empacotando das folhas β . As hélices $\alpha 1$ e $\alpha 3$ são propostas não apenas para serem envolvidas na interação da membrana mas também como um determinante de especificidade (PROMDONKOY, et al., 2008).

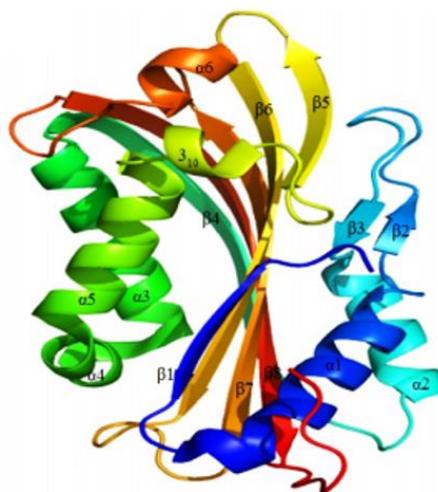


Figura 5: Representação da estrutura de Cyt1Aa. A estrutura global da proteína consiste de um único domínio α - β com uma folha β central, consistindo em seis cadeias β antiparalelas, rodeada por duas camadas α -helicoidal, com duas de um lado e três no outro (XU, et al., 2014 a).

Ao contrário das proteínas Cry, que mostram um complexo mecanismo de ação envolvendo interações de ligação múltiplas e sequenciais com proteínas específicas, as toxinas Cyt não se ligam a receptores, interagindo diretamente com lipídeos de membrana do intestino médio, tais como, a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina e a esfingomiéline (RODRIGUEZ-ALMAZAN et al., 2010), inserindo-se na membrana por meio de formação de poros (PROMDONKOY e ELLAR, 2000; PROMDONKOY e ELLAR, 2003) ou destruindo a membrana por uma interação do tipo detergente (BUTKO, 2003; CRICKMORE et al., 2010).

No modelo proposto para a formação de poros, a toxina Cyt liga-se à membrana como um monômero por meio da região C-terminal, e então sofre uma alteração conformacional na região N-terminal que desencadeia a oligomerização, conduzindo as folhas β ao longo da bicamada lipídica, o que resulta na permeabilização da

membrana, e conseqüente formação de poro e lise osmótica (RODRIGUEZ-ALMAZAN et al., 2010) (Figura 6, A).

De maneira mais detalhada, é sugerido que as duas alças α -hélices externas distanciam-se das folhas β , expondo assim as três últimas folhas β , e a partir daí estas inserem-se na membrana (COHEN, et al., 2008). Já com relação ao modelo de ação do tipo detergente, a toxina Cyt se agrega e fixa na superfície da membrana destruindo a bicamada lipídica (BUTKO, 2003). Neste modelo sugere-se que a porção hidrofílica das α -hélices interajam com resíduos de outros monômeros para formar um oligômero, resultando em uma agregação não específica de toxinas Cyt na superfície da bicamada lipídica (MANCEVA et al., 2005) (Figura 6, B).

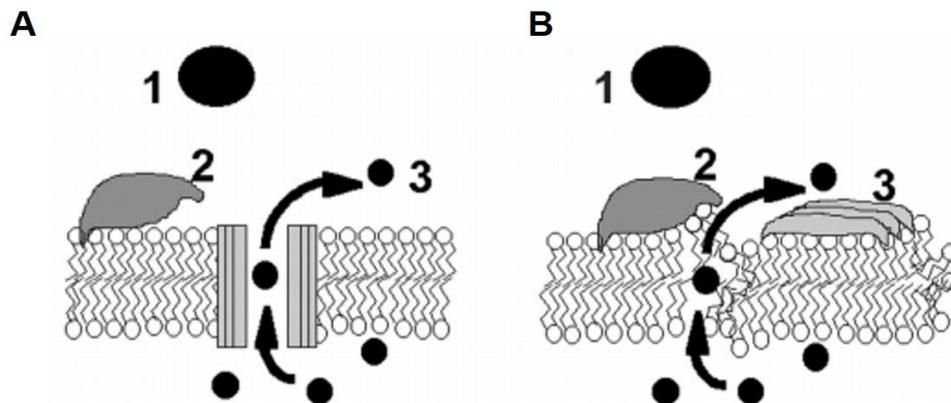


Figura 6: Representação esquemática de dois mecanismos hipotéticos de ação para a toxina Cyt1Aa. **A.** Modelo de formação de poros: 1- Solubilização da proteína; 2- Ligação e inserção na membrana plasmática; e 3- formação de poro e difusão osmótica. **B.** Modelo de ação como um detergente: 1- Solubilização da proteína; 2- Ligação na superfície da membrana; e 3- Formação de agregados toxina-lipídeos e destruição da membrana plasmática (BUTKO, 2003).

Estudos apontam que os dois modelos podem ser considerados, dependendo da concentração e tempo de exposição à esta toxina. Assim a oligomerização de Cyt poderia ocorrer com baixa concentração ou curta exposição, ocorrendo a perfuração específica, e em altas concentrações ou longos períodos de exposição entre toxina e lipídeo seria aumentada para um nível crítico, e como a membrana não pode se adaptar a um grande número de moléculas montadas, a consequência seria então o seu rompimento por complexos proteína-lipídeos (XU et al., 2014 a; BEN-DOV, 2014). Entretanto outros estudos com a toxina Cyt1A, relatam que com uma estrutura tridimensional típica de citolisina e um padrão hemolítico específico, que difere de

detergentes iônicos e não iônicos, o mecanismo de formação de poros é o melhor aceito (COHEN, et al., 2011).

Estudos indicam ainda que as toxinas Cyt podem interagir sinergicamente com as proteínas Cry, agindo como receptores de membrana para essas toxinas (PÉREZ, et al., 2005; CANTÓN, et al., 2011).

2.2.2 Outras toxinas de *B. thuringiensis*

Além das δ -endotoxinas, existem outras toxinas que são importantes alvos de estudos: as proteínas VIPs (do inglês *Vegetative Insecticidal Proteins*) (ADANG e CRICKMORE, 2014) e as parasporinas (OHBA et al., 2009). Entretanto, *B. thuringiensis* pode produzir ainda outros fatores de virulência, tais como α -exotoxinas, β -exotoxinas, fosfolipases, enterotoxinas, quitinases e proteases que aumentam sua patogenicidade e propagação no inseto hospedeiro (PINTO et al., 2010; ARORA et al., 2013).

2.2.2.1 VIP

Descritas pela primeira vez na década de 90, as proteínas VIP são produzidas por algumas cepas de *B. thuringiensis* e recebem essa denominação por serem produzidas na fase vegetativa de crescimento (ESTRUCH et al., 1996). Estas toxinas não formam inclusões cristalinas e são segregadas no meio de cultura (SCHNEPF, et al., 1998). Assim como as proteínas Cry, as Vips são codificadas por genes que também são encontrados em grandes plasmídeos (ESTRUCH et al., 1996).

Devido ao aumento de toxinas VIPs descobertas, recentemente foi proposta um sistema de nomenclatura semelhante à usada para as toxinas Cry e Cyt. Atualmente existem quatro classes de proteínas Vip, dos quais foram identificados e catalogados mais de 15 proteínas Vip1, sendo 20 para a Vip2, 105 para Vip3 e uma para Vip4 (CRICKMORE, et al., 2016).

A estrutura dessas proteínas foram elucidadas a partir de análises cristalográficas de Vip2, revelando uma estrutura com um domínio constituído de um núcleo formado principalmente pelo empacotamento perpendicular de uma folha β mista de cinco cadeias, flanqueada por uma α -hélice adicional, com uma folha β antiparalela de três cadeias, sendo esta, por sua vez, flanqueada por quatro hélices consecutivas (HAN et al., 1999).

Com relação ao espectro de ação dessas proteínas, Vip1 e Vip2 atuam para alguns insetos da ordem Coleoptera e Hemiptera e a proteína Vip3 atua contra uma

ampla gama de espécies da ordem Lepidoptera (CHAKROUN et al., 2016). Além disso, as proteínas Vip3A são ativas contra espécies de insetos que apresentam tolerância ou baixa suscetibilidade às proteínas Cry, o que as tornam alvos de bastantes estudos (DONOVAN et al., 2001). Ainda não existem relatos insetos alvos para Vip4.

De acordo com os modelos de ação descritos para as proteínas Vips, as proteínas Vip1 e Vip2 atuam como toxinas binárias, em que Vip1 se ligaria a receptores na membrana do intestino médio do inseto, e em seguida, Vip2 entraria na célula, exibindo sua atividade de ribosiltransferase (ADP), impedindo a formação de microfilamentos (WARREN, 1997; LEUBER et al., 2006; SHI et al., 2007). Já o modo de ação de Vip3 mostra-se semelhante ao das proteínas Cry, havendo ativação proteolítica, ligação à membrana do intestino médio e formação de poros (YU et al., 1997; LEE et al., 2003).

Apesar de apresentarem um mecanismo de ação semelhante as proteínas Cry, Vip3A não competem pelos mesmos locais de ligação que as proteínas Cry, o que possibilitou pesquisas combinando estas duas proteínas. Neste contexto, estudos demonstram que a interação de Cry1 e Vip3A, por exemplo, pode aumentar a toxicidade contra pragas agrícolas (LEE et al., 2003; CRIALESI-LEGORI, et al., 2014). Isso trouxe ao mercado variedades de plantas transgênicas de algodão e milho carregando o gene *vip3Aa*, e outras plantas contendo *vip3Aa* combinados com genes *cry*, com o intuito de conferir uma proteção mais elevada e diminuir a resistência de insetos (CHAKROUN, et al., 2016).

2.2.2.2 Parasporinas

Existem isolados de *B. thuringiensis* que produzem proteínas Cry que não possuem atividade inseticida, apresentando especificamente atividade contra células cancerosas. Estas proteínas são chamadas de Parasporinas, uma recente categoria de toxinas definidas como proteínas bacterianas paraesporais, não hemolíticas, e preferencialmente tóxicas para células cancerosas (MIZUKI et al., 2000).

A nomenclatura destas proteínas é estabelecida pelo Comitê de Classificação e Nomenclatura de Parasporinas (OKUMURA et al., 2010). Assim, de acordo com a identidade de sequências de aminoácidos, existem atualmente seis classes de parasporinas: PS1, PS2, PS3, PS4, PS5 e PS6. Até o momento já foram identificadas 19 proteínas parasporais, das quais 11 pertencente à classe PS1, 3 à classe PS2, 2

à classe PS3, 1 para cada classe PS4, PS5 e PS6 (<http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/list.html>).

Estudos realizados com as proteínas PS1Aa1, PS3Aa1 e PS6, indicam que estas possuem uma estrutura terciária com três domínios, cujas sequências de aminoácidos contém cinco blocos de regiões conservadas, assim como observado nas proteínas inseticidas Cry (OHBA et al., 2009). Já PS2Aa1 e PS4 não possuem estrutura baseada em três domínios (COHAN, et al., 2008).

Assim como as proteínas Cry, o mecanismo de ação das Parasporinas também depende da ativação de pró-toxinas em toxinas a partir de proteases (OHBA et al., 2009). Estudos apontam que ao invés de formar poros na membrana, PS1 causa morte celular através da indução, preferindo uma via apoptótica com um mecanismo citotóxico única (KATAYAMA et al., 2007).

Um modelo de mecanismo de ação de PS2 é proposto para acontecer em vários passos, do qual primeiramente esta parasporina ligaria-se a receptores de membrana, e depois seria concentrada e oligomerizada, formando poros transmembranares, causando danos à membrana (KITADA et al., 2009). É sugerido que as demais parasporinas sigam um modelo similar de ligação a receptores específicos e formação de poros na membrana celular (YAMASHITA et al., 2005; WU, et al., 2014; EKINO et al., 2014).

Com relação a atividade tóxica dessas proteínas, estudos revelam alta toxicidade e especificidade de PS1Aa1 contra células de câncer de colo do útero- HeLa e células T leucêmicas- MOLT-4 (KATAYAMA et al., 2005; XU et al, 2014 a), enquanto a proteína PS2Aa1 apresenta toxicidade contra as células T leucêmicas MOLT-4 e Jurkat e contra células de câncer de colo do útero Sawano e câncer hepático HepG2 (XU, et al, 2014 a). Estudos realizados com as proteínas PS3Aa1 e PS3Ab1 revelam toxicidade e especificidade destas contra células de câncer de fígado HepG2 e células T leucêmicas HL-60 (YAMASHITA et al., 2005). Já a proteína PS4 é tóxica contra as células T leucêmicas MOLT- 4 e HL-60, células de câncer de cólon de útero CACO-2 e células de câncer do colo do útero Sawano e TCS (OHBA et al., 2009). PS6 possui citotoxicidade contra as linhagens de câncer de fígado (HepG2) e câncer do cólo do útero (HeLa) (NAGAMATSU et al., 2010).

2.2.2.3 α -exotoxinas e β -exotoxinas

As α -exotoxinas, também conhecidas como fosfolipases-C, são proteínas termoláteis produzidas durante a fase de crescimento de *B. thuringiensis*, e sua toxicidade pode ser explicada pela hidrólise de vários fosfolipídeos nas membranas celulares (HERGENROTHER e MARTIN, 1997).

As α -exotoxinas são classificadas de acordo com a classe de fosfolipídeos que atuam. Assim tem-se a fosfolipase-C específica para fosfatidilcolina (PC-PLC) e a fosfolipase-C específica para fosfatidinositol (PI-PLC) (ARGÔLO-FILHO e LOGUERCIO, 2013). Esta toxina apresenta alta toxicidade contra vários insetos e também é tóxica para camundongos por injeção intravenosa (KRIEG 1971; ALDEEWAN, et al., 2014).

As β -exotoxinas, também chamadas de Thuringiensin (Thu), representam um metabólito secundário termoestável e são sintetizadas por certas estirpes de *B. thuringiensis*, sendo produzidas e secretadas no sobrenadante durante a fase de crescimento vegetativo (PALMA, et al., 2014 a). Thu não é uma proteína, mas um oligossacarídeo de molécula pequena (LIU et al, 2010 a)

Estas toxinas podem ser classificadas em dois tipos, β -exotoxina do tipo I e β -exotoxina do tipo II. A β -exotoxina do tipo I, é composta pelos precursores adenosina, glicose, um grupo fosfato e di-ácido glucônico (LIU et al, 2010). A β -exotoxina do tipo I é considerada um análogo de ATP, e essa similaridade o torna um inibidor da ação de RNA polimerases, pois compete pelos mesmos locais de ligação que essas enzimas, impedindo assim a síntese de RNA e afetando os estágios de crescimento de insetos (LIU et al, 2010; LIU et al., 2014 a).

β -exotoxina I é tóxica para várias ordens de insetos e para ácaros, nematoides e alguns vertebrados (LIU et al., 2014 a). Devido a sua toxicidade para vertebrados, a maioria das preparações comerciais de *B. thuringiensis* são formulados a partir de isolados que não têm a capacidade de produzir β -exotoxinas (HERNÁNDEZ et al., 2003). Entretanto alguns países ainda utilizam produtos baseados em β -exotoxinas, principalmente em programas de controle contra insetos da ordem Diptera que são resistentes a outros inseticidas (ARGÔLO-FILHO e LOGUERCIO, 2013).

Já a β -exotoxina do tipo II, é descrita como um análogo de UTP, e são produzidas próximo e durante a fase de esporulação (PALMA, et al., 2014 a). Estas apresentam

atividade tóxica superior ao tipo I, sendo particularmente eficaz contra insetos da ordem Coleoptera (ARGÔLO-FILHO e LOGUERCIO, 2013).

2.2.2.4 Outros fatores de virulência

Para alguns insetos apenas a ação de δ -endotoxinas é suficiente para a causar sua mortalidade, entretanto para outros o esporo também deve estar presente (RAYMOND et al., 2010). No segundo caso, as δ -endotoxinas agem causando a destruição das células epiteliais que revestem o intestino médio induzindo a lise celular, criando assim condições favoráveis para a germinação do esporo, causando a morte do inseto por meio de septicemia (ADANG e CRICKMORE, 2014).

Neste contexto, a germinação do esporo permite a expressão e produção de outros fatores de virulência que possibilitam o acesso a hemolinfa do inseto hospedeiro, e conseqüente multiplicação de suas células vegetativas (VILAS-BÔAS et al., 2012). Esses fatores são representados principalmente por fosfolipases, enterotoxinas, hemolisinas, proteases (DUBOIS et al., 2012) e quitinases (SAMPSON e GOODAY et al., 1998).

Durante o processo infeccioso, *B. thuringiensis* precisa atravessar a matriz peritrófica, que é rica em quitina. Dessa forma, as quitinases produzidas por estas bactérias facilitam esse processo, permitindo alcançar o hemocélio (SAMPSON e GOODAY, et al., 1998). Assim, quando *B. thuringiensis* alcança o hemocélio, este produz metaloproteases chamadas de InhA, representadas pelos três tipos InhA1, InhA2 e InhA3, que permitem a neutralização do sistema imune do hospedeiro (GUILLEMET et al., 2010).

Durante o crescimento de células vegetativas *B. thuringiensis* produz ainda enterotoxinas que potencializam sua atividade entomopatogênica, e se destacam como os principais fatores de virulência produzidos, do qual são conhecidos: citotoxina K (CytK), enterotoxina Fm (EntFm), enterotoxina T (Bcet), hemolítica BL (HBL) e enterotoxina não-hemolítica (NHE) (VILAS-BÔAS, et al., 2007). Estudos recentes detectaram a presença destas enterotoxinas em diferentes estirpes de *B. thuringiensis*, incluindo algumas cepas comerciais (KIM et al., 2015).

Outras duas classes de fatores de virulência que também são importantes para o processo infeccioso de *B. thuringiensis* são as fosfolipases e hemolisinas. Com relação as fosfolipases, as fosfolipases C são as mais estudadas, sendo conhecidas também como α -exotoxinas, atuando na hidrólise de vários fosfolipídeos das

membranas celulares (seção 2.2.2.3) (HERGENROTHER e MARTIN, 1997). Dentro desta classe, é importante citar também as esfingomielinases (SMase), uma vez que a presença de esfingomielina em membranas celulares inibem a atividade de outras fosfolipases C, fazendo com que SMase seja importante para a ação destas (VILAS-BÔAS, et al., 2012). Já com relação as hemolisinas, estas apresentam atividade hemolítica, e as toxinas thuringiolisina O (Tlo) e hemolisina II (HlyII) são os principais exemplos de hemolisinas presentes em *B. thuringiensis*.

2.3 Utilização como bioinseticida

B. thuringiensis é a bactéria mais estudada no controle de pragas, e atualmente é considerada como o principal entomopatógeno utilizado na gestão de pragas de insetos (CASTAGNOLA e STOCK, 2014).

A primeira formulação à base dessa bactéria, a Sporeíne, foi produzida na França em 1938. Entretanto foi na década de 50 que bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* passaram a ser fabricados em outros países, tais como Rússia, Checoslováquia, Alemanha e Estados Unidos (SANAHUJA, et al., 2011). Inicialmente, o produto, foi utilizado somente para o controle de lepidópteros, e mais tarde, principalmente a partir da década de 70, ao passo que novas subespécies da bactéria foram descobertas com alta toxicidade, produtos contra insetos da ordem Diptera, Coleoptera (WEISER, 1986; EDWARDS et al., 1988), Himenoptera, Homoptera e Ortoptera (FEILTEISON, 1994) foram introduzidos.

Neste contexto, os produtos de pulverização, à base de *B. thuringiensis* se apresentam como mais vantajosos em termos de segurança, especificidade e potência quando comparados com produtos químicos, sendo também biodegradáveis, o que os torna competitivos no mercado de inseticidas (SANAHUJA, et al, 2011). Atualmente existem vários produtos formulados a partir de *B. thuringiensis* no mercado, dos quais podemos citar os produtos Able, Bactospeina, Condor, Costar, Crymax, Cutlass, Futura, Lepinox, Thuricide, Steward, Florbac, Agree, Design, Xentari, Foil, Raven, Thuricide, Biobit, Dipel, Foray, Javelin e Vault (SANAHUJA, et al, 2011).

Apesar de suas vantagens, biopesticidas à base de *B. thuringiensis* possuem algumas características que limitam seu uso no controle de insetos. Os biopesticidas devem ser ingeridos pelo inseto alvo; devem ser aplicados quando as larvas se encontram no estágio inicial, pois ao passo que crescem ficam mais tolerantes ao

produto; a luz solar contribui para a degradação das proteínas cristalinas; e no uso tópico em plantas, os esporos acabam sendo levados para o solo (KIM, et al., 2015). Contudo, a fim de aumentar a eficácia de formulados de *B. thuringiensis*, pesquisas são realizadas para reverter principalmente efeitos ambientais, assim como estudos de encapsulamento de toxinas e fotoproteção do complexo esporo-proteína por adição de melanina (RAMÍREZ-LEPE e RAMIRÉZ-SUERO, 2012).

2.4 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* foi primeiramente isolado em 1976 de larvas mortas de *Culex sp.* no deserto de Negev, em Israel, mostrando ser eficaz contra larvas da ordem Diptera (GOLDBERG e MARGALIT, 1977). Posteriormente esta subespécie foi identificada como *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, sorotipo H14 (de BARJAC, 1978).

B. thuringiensis subsp. *israelensis* é uma bactéria esporulante capaz de produzir inclusões cristalinas altamente tóxicas (WIRTH et al., 2010), destacando-se como a primeira subespécie de *B. thuringiensis* com toxicidade elevada contra larvas de espécies de mosquitos artrópodes, da subordem *Nematocera*, que inclui mosquitos e a mosca negra, sendo utilizado como bioinseticida comercial em programas de controle de insetos em várias partes do mundo (FEDERICI et al., 2010; RAMÍREZ-LEPE e RAMÍREZ-SUERO, 2012; ZHANG et al., 2016).

Atualmente existem vários produtos disponíveis no mercado à base de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, dos quais podemos citar Vectobac, Teknar, Bactimos, Skeetal e Mosquito Attack são disponíveis atualmente para o controle de mosquitos como *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e algumas espécies de *Anopheles*, como *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), que são vetores da filariose de dengue e malária, respectivamente, ou contra *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae), uma mosca negra que é um vetor de oncocearciose (RODRIGUEZ-ALMAZAN, et al., 2010; ZEQUI et al., 2011).

2.4.1 Estrutura e especificidade de toxinas larvicidas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

B. thuringiensis subsp. *israelensis* produz sete toxinas durante a esporulação, sendo quatro proteínas Cry (Cry4A, Cry4B, Cry10A, Cry11A) e três Cyt (Cyt1A, Cyt2Ba e Cyt1Ca), todas encontradas em um único plasmídeo chamado pBtoxis de 127,923 pb (FAUST, et al., 1982; BERRY, et al., 2002). Entretanto, suas propriedades

inseticidas são conferidas principalmente pelas proteínas Cyt1A, Cry4Aa, Cry4Ba e Cry11Aa (SCHNEPF et al., 1998; BEN-DOV, 2014).

De maneira geral, assim como outras δ -endotoxinas, estas proteínas são solubilizadas no intestino de larvas de insetos susceptíveis e ativados por proteases no intestino médio, se ligando a receptores, no caso das proteínas Cry, e formando poros na membrana, levando à sua ruptura e citólise das células epiteliais (RAMÍREZ-LEPE e RAMÍREZ-SUERO, 2012). Posteriormente ocorre a germinação e multiplicação de esporos ingeridos, causando então septicemia (BRAVO, et al., 2007).

Com relação aos receptores de membrana, estas toxinas se ligam a mesma classe de receptores estudados para insetos da ordem Lepidoptera, e vem sendo descritos em diferentes estudos. Assim, uma fosfatase alcalina (ALP) de 65 KDa associada a uma glicosilfosfatidilinositol (GPI) de *A. aegypti* foi caracterizada como um receptor funcional de Cry11Aa (FERNANDEZ et al., 2006), enquanto uma caderina de 250 KDa de *A. aegypti* é relatada como um possível receptor de Cry11Aa, podendo ser competido por Cry4Aa (CHEN et al., 2009). Uma proteína AgCad1, semelhante a uma caderina, formada por 1735 resíduos de aminoácidos foi identificada em *Aedes gambiae* (Diptera: Culicidae) como um receptor para Cry4Ba (HUA et al., 2008), enquanto uma α -amilase de 70 kDa ancorada a uma glicosilfosfatidilinositol (GPI) é um receptor para ambas as toxinas Cry4Ba e Cry11Aa em *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) (FERNANDEZ-LUNA et al., 2010).

As maiores proteínas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* são representadas pelas toxinas Cry4Aa e Cry4Ba, com 134 e 128 KDa, respectivamente. Cry4Aa é codificada por uma sequência de 3543 pb, enquanto Cry4Ba é codificado por uma sequência de 3408pb (BEN-DOV, 2014). Quando ativadas, *in vitro* e *in vivo*, estas toxinas apresentam aproximadamente 65 KDa, sendo produzido fragmentos de 45 e 20 KDa para Cry4Aa, e fragmentos de 45 e 18 KDa para Cry4Ba (BELTRÃO e SILVA-FILHA e SILVA-FILHA, 2007).

Com relação a estrutura tridimensional destas proteínas, Cry4Aa e Cry4Ba têm suas estruturas bem estudadas dentre as toxinas Cry de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. O modelo estrutural de Cry4Aa e Cry4Ba é bem elucidado por Boonserm et al., (2005) e Boonserm et al., (2006) respectivamente, descrevendo um modelo estrutural semelhante para estas proteínas, do qual são formadas por três domínios, sendo o primeiro constituído de α -hélices, o segundo por três β -folhas antiparalelas, e o terceiro é formado por uma estrutura do tipo β -sanduíche (Figuras 7 e 8).

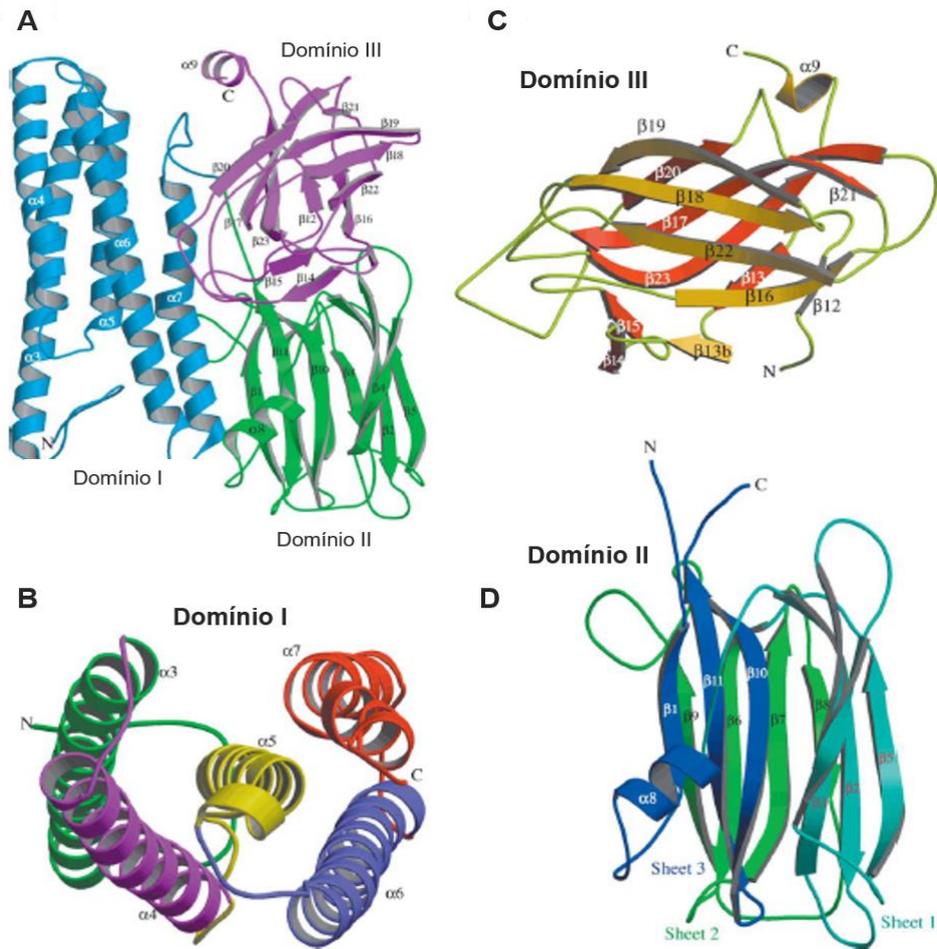


Figura 7: Representação da estrutura da proteína Cry4Ba. A. Visão geral da toxina. **B.** Domínio I, formado por α -hélices ($\alpha 3$ - $\alpha 7$). **C.** Domínio II, formado por três β -folhas antiparalelas ($\beta 1$ - $\beta 11$). **D.** Domínio III, formado por uma estrutura β -sanduíche de duas β -folhas antiparalelas (BOONSERM et al., 2005).

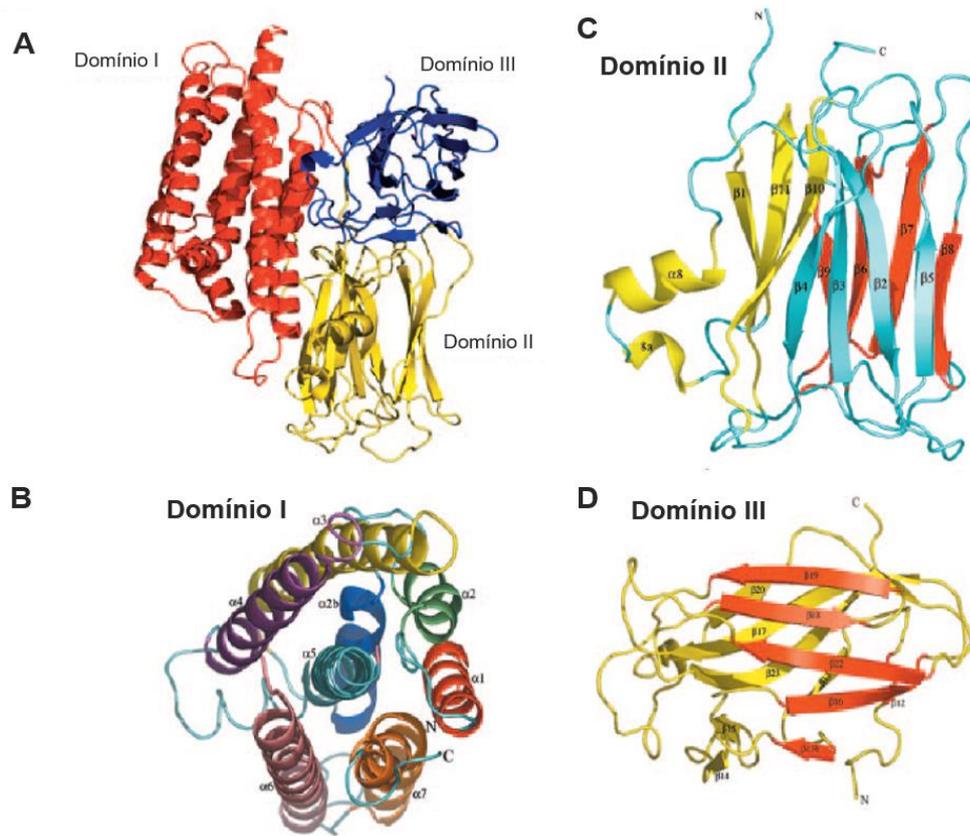


Figura 8: Representação da estrutura da toxina Cry4Aa. A. Visão geral da toxina. **B.** Representação do domínio I, composta por sete hélices. **C.** Representação do domínio II, formado por três β -folhas antiparalelas. **D.** Domínio III, que consiste em duas β -folhas que adotam uma dobra de sanduíche (BOONSERM et al., 2006).

Metade da região C-terminal é conservada nestas proteínas e participam na formação espontânea de cristais através de ligações dissulfeto inter e intramoleculares (BEN-DOV, 2014). Diferenças estruturais encontradas no domínio II, assim como locais distintos que se ligam a receptores, podem explicar os diferentes insetos alvos envolvidos na atividade larvicida destas toxinas ativas (ANGSUTHANASOMBAT, et al, 2004).

Neste contexto, estas proteínas diferem quanto ao espectro de toxicidade, pois enquanto Cry4Aa é altamente tóxico contra o gênero *Culex*, podendo ser representado pela espécie *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Cry4Ba tem uma atividade muito baixa para este gênero de mosquito (OTIENO-AYAYO et al., 2008; ABDULLAH et al., 2003). Já com relação aos gêneros *Anopheles* e *Aedes*, Cry4Ba apresenta maior atividade larvicida quando comparada com Cry4Aa, mostrando altamente tóxico para *Anopheles quadrimaculatu* (Diptera: Culicidae) e *A. aegypti* (OTIENO-AYAYO et al., 2008).

O domínio II Cry4Aa e Cry4Ba consiste de três folhas anti-paralelas envolvidas por um núcleo central hidrofóbico e três alças expostas na superfície que podem estar envolvidas com a ligação a receptores (BOONSERM, et al., 2006). Em Cry4Aa, estudos mostram que as alças 2 e 3 são cruciais para a toxicidade específica contra as espécies *A. aegypti*, *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) e *C. pipiens* (HOWLADER et al., 2009; BOONSERM, et al., 2006). Já para Cry4Ba, as alças 1 e 2 especificam a toxicidade para *A. quadrimaculatu* e *A. aegypti* (BOONSERM, 2005, ABDULLAH et al., 2003).

A proteína Cry11Aa possui 72Da e é codificada por uma sequência de 1929 pb (BEN-DOV, 2014). A ativação proteolítica desta proteína produz dois fragmentos de 38 e 30KDa (BELTRÃO e SILVA-FILHA et al., 2007). Esta proteína exibe alta atividade contra larvas de *Aedes* e *Culex* e menor atividade contra *Anopheles* (OTIENO-AYAYO et al., 2008).

Já a proteína Cry10 Aa é codificado por uma sequência de 2025 pb (675 aa) e está presente em pequenas quantidades em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BEM-DOV, 2014). Ao contrário das outras toxinas, Cry10Aa é descrita como tóxica para outras ordens de insetos, como para a broca de bagaço de cafeeiro (*Hypothenemus hampei*) (MÉNDEZ-LÓPEZ et al., 2003), para bicudo de algodão (*Anthonomus grandis*), um inseto da ordem Coleóptera, mostrando ser altamente tóxico numa demonstração *in vitro* (AGUIAR et al., 2012). Além disso, o atual desenvolvimento de um novo algodão geneticamente modificada para expressar Cry10Aa mostra alta resistência ao inseto-praga bicudo de algodão, conferida por essa toxina (RIBEIRO et al., 2017).

Já com relação as δ -endotoxinas citolítica, a toxina Cyt1Aa foi a primeira a ser descrita detalhadamente. Cyt1Aa possui atividade citolítica e hemolítica, e é produzida como uma protoxina de 27 KDa e possui uma sequência de 248 aminoácidos, codificados por 744 pb (BOURGOUIN, et al., 1986; CHOW, et al., 1989). Dentre os cristais produzidos por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, o mais abundante é o cristal composto pela proteína Cyt1Aa, correspondendo de 45% a 50% (BEN-DOV, 2014). Sua ativação gera uma redução da massa molecular de 27 kDa para cerca de 22-25 KDa, que por sua vez, possui uma atividade três vezes maior (CAHAN, et al., 2008).

A estrutura da proteína Cyt1Aa é composto por uma folha β envolvido por duas camadas adjacentes de α -helicoidal. A folha β central consiste em seis cadeias β

antiparalelas, flanqueadas por uma camada de α -hélice composta por α -1 e α -2 por um lado e α 3- α 5 por outro (BUTKO, 2003; XU, et al., 2014 a).

Rodriguez-Almazan et al (2010) analisou os dois domínios de Cyt1Aa separadamente, e concluiu que estes possuem papéis diferentes na ação da toxina, sendo a região N-terminal envolvida com a inserção da toxina Cyt1Aa em solução, e a C-terminal com a interação da toxina com a membrana lipídica.

Outro fator importante na toxicidade desta proteína é a capacidade de sofrer alterações em sua conformação, uma vez que isso está inteiramente relacionada com a atividade de Cyt1Aa, sendo necessárias antes da inserção e perfuração da membrana da célula do hospedeiro. Isto pode ser afirmado a partir de uma dobra de citolisina que permite que as camadas α -helicoidais se afastem, expondo a β -folha a inserir na membrana (COHEN et al., 2011).

Com relação a sua especificidade, além de possuir toxicidade para espécies de mosquitos *in vivo*, testes *in vitro* revelam a atividade citolítica de Cyt1Aa contra células de insetos e de mamíferos, tais como eritrócitos, linfócitos e fibroblastos (THOMAS e ELLAR, 1983; KNOWLES e ELLAR, 1987; THIERY et al., 1997). Outra característica importante de Cyt1Aa é o seu envolvimento no retardo da resistência de larvas de insetos às proteínas Cry de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (WIRTH, et al., 2005).

A toxina Cyt2 Ba é a menor dentro do complexo de toxinas expressas por *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, sendo composta de 263 aminoácidos, possuindo cerca de 41% de identidade com Cyt1Aa, e 67% de similaridade com Cyt2Aa (GUERCHICOFF, 1997; GUERCHICOFF, 2001; NISNEVITCH et al., 2006). Assim como Cyt1Aa, Cyt2Ba também possui toxicidade para células de mamíferos (CORRÊA, et al., 2012). Sua estrutura é composta de uma folha que consiste em seis cadeias β antiparalelas (β 1- β 6) flanqueadas por uma camada de α -hélice composta por α 1 e α 2 num lado, e por uma segunda camada de α -hélice composta por α 3- α 5 no outro (Figura 9) (COHEN et al., 2008).

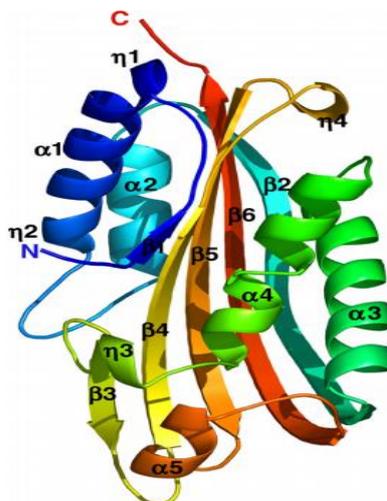


Figura 9: Representação esquemática da estrutura cristalina de Cyt2Ba. Cyt2Ba é composta por um único domínio α - β , com uma folha β envolvida por duas camadas α -helicoidais que representam uma dobra de citolisina. Elementos secundários e terminais N e C são rotulados (COHEN, et al., 2008).

A toxina Cyt1Ca é a mais recentemente relatada, e possui um tamanho de aproximadamente 60 kDa, do qual metade da sua região N-terminal possui uma homologia de 72% com a Cyt1Aa (BERRY, et al., 2002). Enquanto Cyt1Aa compõe até 50% do cristal e Cyt2Ba está presente em quantidades muito baixas, Cyt1Ca é indetectável, embora a transcrição do gene *cyt1Ca* tenha sido constatada (STEIN et al., 2006).

Sua estrutura se assemelha a de uma proteína de fusão de dois domínios, em que a parte N-terminal equipara-se às toxinas comuns de Cyt e a parte C-terminal contém um domínio extra, que parece ser um motivo de ligação de carboidrato β -trevo (*β -trefoil*), encontrado em várias toxinas semelhantes a ricinas (MANASHEROB et al., 2006). Com relação a sua toxicidade, estudos relatam que ao contrário de Cyt2Ba, Cyt1Ca não é capaz de aumentar a toxicidade de Cry4Aa, e nem possui atividade citolítica para eritrócitos quanto comparado a Cyt1Aa (MANASHEROB, et al., 2006).

2.4.2 Interações sinérgicas entre toxinas larvicidas

As δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* apresentam diferentes níveis de toxicidade e especificidade contra diferentes gêneros de mosquitos, e além disso, suas proteínas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba interagem sinérgicamente, característica essa que está relacionada com a alta toxicidade desta bactéria (Tabela 1) (BEM-DOV, 2014). Assim, a atividade inseticida

individual dessas proteínas é menos eficaz quando comparada a mistura de todas as toxinas.

Tabela 1: Características, toxicidade e sinergismo entre as principais toxinas de *B. thuringiensis subsp. israelensis*.

Toxina	Tamanho (kDa)	Forma ativada (kDa)	Toxicidade	Sinergismo com
Cry4Aa	134	20 e 45	Cx > An ≥ Ae	Cry4Ba, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba
Cry4Ba	128	18 e 45	An ≥ Ae > Cx	Cry4Aa, Cry11Aa, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt2Aa
Cry11Aa	72	30-33 e 34-38	Ae ≥ Cx > An	Cry4Aa, Cry4Ba, Cyt1Aa, Cyt2Ba
Cry10Aa	78	58-68	Ae > Cx	Cyt1Aa, Cry4Ba
Cyt1Aa	27	22-25	Cx ≥ Ae > An	Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa, Cry10Aa
Cyt2Ba	29	22,5	Cx ≥ Ae > An	Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa
Cyt1Ca	57	Nd	Nd	Nd

Fonte: (BEM-DOV, 2014).

*Cx= *Culex spp.*; An= *Anopheles spp.*; Ae= *Aedes spp.*

O efeito sinérgico é atribuído principalmente a toxina Cyt1Aa que é capaz de aumentar a atividade de Cry4Aa, Cry4Ba, Cry11Aa ou Cry10Aa (CANTÓN, et al., 2011).

Isso se deve ao fato de Cyt1Aa agir como um receptor de membrana para as toxinas Cry, sendo então capazes de suprimir a resistência de insetos devido a mutações ocorridas em receptores para estas proteínas. Isso é relatado em estudos que mostram que Cyt1Aa suprime a resistência de populações de *C. quinquefasciatus* frente a Cry11Aa, Cry4Aa ou Cry4Ba (KHASDAN et al., 1987; WIRTH et al., 1997).

Um modelo de sinergismo entre as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa é proposto e ilustrado na figura 10. A proteína Cyt1Aa sinergiza a toxicidade de Cry11Aa funcionando como uma molécula receptora, suprimindo assim a resistência de insetos devido a mutações no receptor de Cry, representado por uma fosfatase alcalina (ALP) associada a uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (SOBERÓN et al., 2007) (Figura 10). Já a toxina Cry11Aa se liga à Cyt1Aa por meio do laço α-8 localizado no domínio II desta proteína, que está envolvido com a interação a receptores da membrana (PÉREZ et al., 2005).

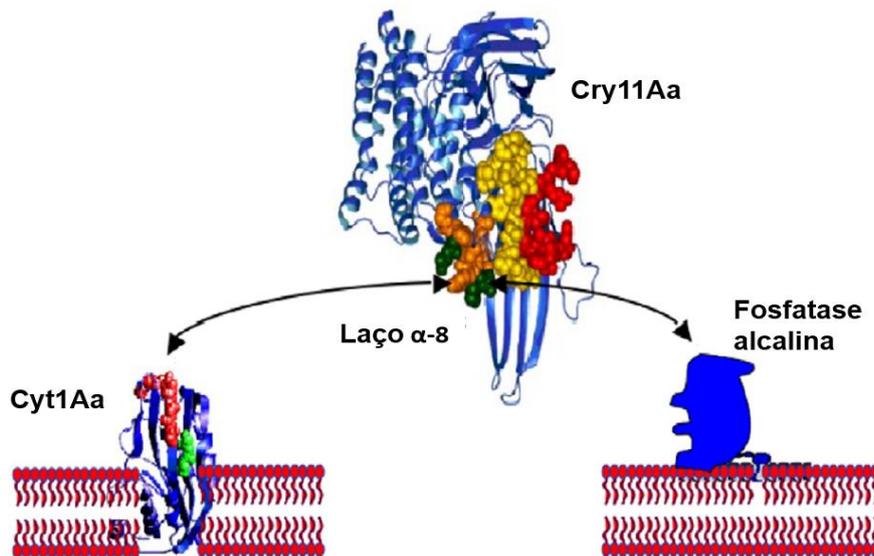


Figura 10: Modelo de sinergismo entre as toxinas Cyt1Aa e Cry11Aa. Cyt1Aa sinergiza Cry11Aa funcionando como um receptor ligado à membrana (SOBERÓN, et al., 2007).

O mecanismo de sinergismo descrito entre as toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa, também pode ser aplicada a interação entre Cyt1Aa e Cry4Ba, em que da mesma forma, Cyt1Aa funciona como um receptor (CANTÓN, et al., 2011). Assim, Cyt1Aa pode aumentar a atividade larvívora de Cry4Ba contra *A. aegypti*, atuando como um receptor ligado as vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) de *A. aegypti*, fixando Cry4Ba e promovendo a sua oligomerização (ELLEUCH et al., 2015).

Outros estudos mostram o efeito sinérgico entre toxinas Cry. Assim, experimentos combinando Cry4Aa e Cry11A *in vitro*, após ativação destas com tripsina, podem produzir níveis elevados de citotoxicidade para células de *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) (CÔRREA, et al., 2012). Com relação a proteína Cry10Aa, estudos relatam sua ação sinérgica com Cyt1Aa contra larvas de *A. aegypti* (HERNÁNDEZ-SOTO, et al., 2009) e com Cry4Ba contra larvas de *C. pipiens* (DELÉCLUSE et al., 1988). Em estudos realizados com larvas de espécies de *Simulium* spp. (Diptera: Simuliidae), relatam que Cry10Aa e Cyt1Aa não eram tóxicos quando administrados isoladamente, mas capazes de sinergizar a atividade das toxinas Cry4B e Cry11Aa, e em adição, Cyt1Aa seria ainda capaz de aumentar a atividade de Cry4Aa (MONNERAT et al., 2014).

A toxicidade de Cyt1Ca, Cyt2Ba e Cyt1Aa, expressos em *E. coli*, contra larvas de *A. aegypti* e a capacidade destes de aumentar a atividade de Cry4Aa são descritas, mostrando que nenhuma atividade foi exibida por qualquer uma dessas três proteínas

quando testadas individualmente, com exceção de Cyt1Ca não é capaz de aumentar a toxicidade de Cry4Aa (MANASHEROB, et al., 2006). A falta de toxicidade de Cyt1Ca, e conseqüente incapacidade de sinergismo com proteínas Cry, é possivelmente relacionada a presença de um domínio adicional β -trevo (β -*trefoil*) na sua região C-terminal, sendo este domínio semelhante a uma β -ricina que pode interferir na inserção e organização de Cyt1Ca na membrana da célula do hospedeiro (MANASHEROB et al., 2006). A proteína Cyt2Ba também pode interagir com Cry11Aa, apresentando uma maior atividade tóxica para *A. albopictus* quando comparado ao uso individual dessas toxinas (CÔRREA, et al., 2012).

Apesar dos vários relatos de que Cyt1Aa possui baixa toxicidade quando utilizada sozinha, estudos recentes relatam que esta toxina apresenta toxicidade contra a mosca da fruta do Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Diptera:Tephritidae), fornecendo, pela primeira vez, evidências da atividade inseticida de uma estirpe de *B. thuringiensis* contra *C. capitata*, identificando esta δ -endotoxina como a única com potencial para controlar este inseto-praga (VIDAL-QUIST, et al., 2010).

2.4.3 Plasmídeos de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

Como dito anteriormente, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* produz sete toxinas formadoras de cristais, sendo elas Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa, Cyt2Ba e Cyt1Ca, que são encontradas em um único plasmídeo chamado pBtoxis (BERRY, et al., 2002). O plasmídeo pBtoxis possui uma sequência completa de 127.923 pb e além de abrigar genes que codificam as proteínas Cry e Cyt, possui também outras 125 sequências que codificam proteínas que podem estar envolvidas com funções relacionadas a regulação de genes e processos fisiológicos, assim como a esporulação e germinação (STEIN et al., 2005).

Sequências que codificam duas proteínas regulatórias, P19 e P20, também foram observadas no plasmídeo pBtoxis e podem estar relacionadas com a formação de cristal e aumento da viabilidade celular, atuando como chaperonas (GALVÃO et al., 2009).

B. thuringiensis subsp. *israelensis* possui também três pequenos plasmídeos menores denominados de pTX14-1, pTX14-2 e pTX14-3. O plasmídeo pTX14-1 possui um tamanho de 5.2 Kb, o plasmídeo pTX14-2 possui 6.8 Kb e a sequência de pTX14-3 possui 7.6 Kb (GALVÃO et al., 2009). Estes plasmídeos possuem genes que codificam proteínas relacionadas com a replicação (REP), mobilização (MOB) e uma

região que codifica um polipeptídeo contendo um domínio central com elementos repetitivos semelhantes ao colágeno eucariótico, denominada como proteínas do tipo colágeno para *Bacillus* (BCOL) (ANDRUP et al., 1991; ANDRUP, et al., 1994; ANDRUP et al., 2003).

Recentemente, o sequenciamento do genoma do isolado *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* AM65-52 revelou um novo plasmídeo de 360 kb, sendo nomeado de pAM65-52-1-360K. O plasmídeo pAM65-52-1-360K codifica vários transportadores de metabólitos, e carrega também genes que codificam a proteína DNA translocase FtsK necessária para a replicação, recombinação e mobilização, o que poderia permitir sua transferência entre isolados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BOLOTIN, et al., 2016). Outro grande plasmídeo, denominado pBTHD789-2, com um tamanho igual a 235 kb, é descrito como um plasmídeo conjugativo e está presente em todos os genomas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* sequenciados até o momento (BOLOTIN, et al., 2016).

2.5 Base de dados e estudos genômicos com *B. thuringiensis*

2.5.1 Base de dados genômicos de *B. thuringiensis*

A busca por tecnologias que fornecem informações genômicas de maneira rápida, precisa e de baixo custo levou ao desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*- NGS) (METZKER, 2010). Assim, ao contrário dos métodos convencionais, as tecnologias NGS se destacam principalmente pela capacidade de produzir uma grande quantidade de dados de sequências em um tempo relativamente curto (XU, 2014 b).

Desde a sua introdução, as tecnologias de NGS permitiram uma grande variedade de aplicações que vão além de apenas um sequenciamento genômico, possibilitando também análises metagenômicas, estudos comparativos e evolutivos em grande escala, estudos epigenéticos, possibilitando a descoberta de novos sítios de ligação de proteínas, a detecção de polimorfismo, pesquisas com sequências de RNA, sequenciamento de exoma (conjunto de exons), estudos para melhoramento de plantas e estudos sobre o microbioma humano (METZKER, 2010; MACLEAN, et al., 2009; XU, 2014 b).

O surgimento de tecnologias de NGS também significou um marco importante no sequenciamento de genomas de bactérias com importância econômica, permitindo a aquisição de um grande número de sequências em apenas algumas horas ou dias

(LOMAN et al., 2012 a), proporcionando assim uma oportunidade para a realização de estudos abordando diferenças filogenéticas e funcionais (ALCARAZ, et al., 2010).

Neste contexto, dada a sua grande importância no controle biológico de insetos, diversos genomas de *B. thuringiensis* têm sido amplamente sequenciado e divulgado em banco de dados, permitindo o acesso a informações sobre a organização cromossômica de diferentes estirpes desta espécie. Até o momento existem 255 genomas completos de *B. thuringiensis* de várias subespécies depositados no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Com relação a distribuição dos dados genômicos de *B. thuringiensis* no banco de dados de sequências referências - RefSeq (*NCBI Reference Sequence Database*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>), há 193 depósitos que apresentam sequências genômicas tendo como principais características um tamanho médio de 6,1 Mb, quantidade média de proteínas de 6132 e uma porcentagem média de G+C igual a 35. Esses dados ainda são distribuídos em 21% de genomas completos (cromossomo e plasmídeos) e 9% de cromossomos, e em diferentes níveis de montagens, do qual 32% dos genomas estão disponíveis a nível de *scaffolds* e 38% a nível de *contigs*, sendo estes dois últimos comumente denominados de *drafts* (Figura 11, A). Já com relação a nomeação, 68% dos genomas são descritos apenas como *B. thuringiensis*, 29% como genomas de 41 subespécies diferentes, e 3% como *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, do qual são representados pelos genomas das estirpes 4Q7 (NZ_JEOC00000000), ATCC35646 (AAJM00000000) (ANDERSON, et al., 2005), HD-789 (DOGGETT et al., 2013), IBL 4222 (ACNK00000000), IBL 422 (ACNL00000000) (ZWICK et al., 2012), HD 1002 (JOHNSON et al., 2015) e uma estirpe acristalífero utilizado para transformação (JEONG et al, 2014) (Figura 11, B).

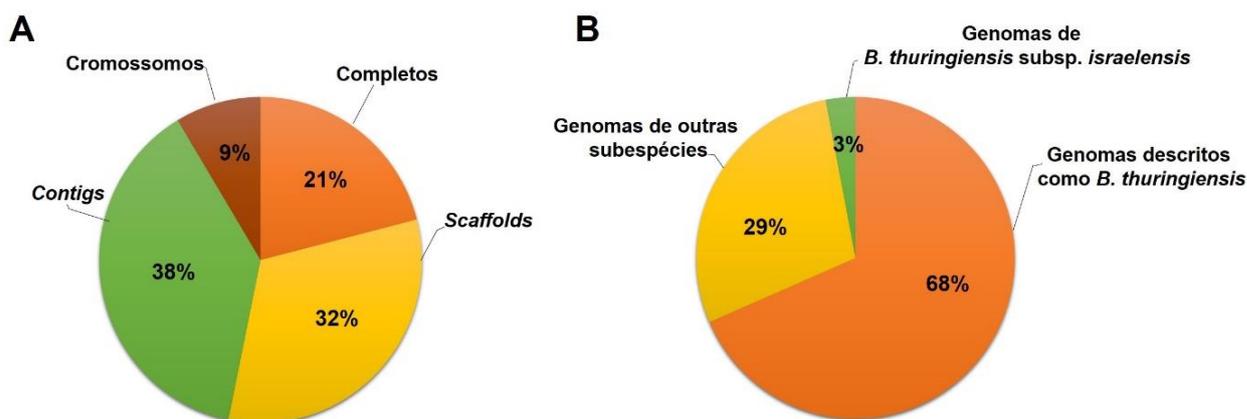


Figura 11: Representação gráfica de base de dados de genomas da espécie *B. thuringiensis* obtidos a partir do banco RefSeq. A. Porcentagem de genomas distribuídos em nível de montagem. **B.** Porcentagem de genomas descritos apenas como *B. thuringiensis*, de genomas de *B. thuringiensis subsp. israelensis* e de outros genomas relatado como outras subespécies.

Vários destes genomas sequenciados de *B. thuringiensis* têm sido divulgados em forma de artigos científicos, descrevendo principalmente o tamanho do genoma, conteúdo G+C, tRNAs, rRNAs, plasmídeos e proteínas inseticidas presentes (CHALLACOMBE et al., 2007; JOHNSON, et al., 2015, KANDA et al., 2015).

Esses artigos podem ainda ser divididos com relação a gama de hospedeiros, trazendo descrições de genomas de estirpes de *B. thuringiensis* com toxicidade para ambas as ordens Lepidoptera e Diptera (ZHU et al, 2011; HE et al., 2011; PALMA et al., 2014b; GUAN et al., 2012; BARBOSA et al., 2015), somente para Lepidoptera (PALMA et al., 2014c; LIU et al., 2013; MURAWSKA et al., 2013), para Coleoptera (RUSCONI et al., 2015; ZORZETTI et al., 2015), com atividade nematocida (IATSENKO et al., 2014; WANG et al., 2014; LIU et al., 2014 a), com atividade moluscicida (WANG et al., 2013), estipe antagonista contra fitopatógenos (JEONG et al., 2016) e com atividade quitinolítica (MARCON et al., 2014).

Além disso, há também anúncios científicos de sequenciamentos genômicos de estirpes de *B. thuringiensis* acristalíferas consideradas modelos genéticos, utilizadas para transformação, que podem contribuir para estudos estruturais e funcionais de genomas desta espécie, possibilitando análises de expressão e regulação de genes (SHEPPARD et al., 2013; HE et al., 2010).

Com relação as sequências de plasmídeos disponibilizadas em banco de dados, até o momento existem 290 depósitos de plasmídeos de *B. thuringiensis* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/plasmids/486>). O sequenciamento de

plasmídeos desta espécie têm permitindo diversos estudos descrevendo o padrão de organização plasmidial (WANG et al., 2013b), identificando o tipo de processo replicativo (LI et al., 2009; LOEZA-LARA, et al., 2005), permitindo a descoberta e caracterização de novos plasmídeos (HUANG et al., 2007) e de novas proteínas inseticidas presentes (LOEZA-LARA et al., 2005).

2.5.2 Estudos genômicos envolvendo a espécie *B. thuringiensis*

O aumento crescente de dados de sequências genômicas completas após o advento das novas tecnologias de sequenciamento, criaram a possibilidade de se realizar estudos pangenômicos de espécies bacterianas, que ao contrário do uso de marcadores moleculares tradicionais, como o gene ribossomal 16S, podem evidenciar melhor as relações filogenéticas e a diversidade existente entre micro-organismos (CHUN e RAINEY, 2014).

Um pangenoma pode ser definido como o conjunto completo de genes de todas as cepas de uma espécie ou grupo, sendo composto de um genoma central, contendo genes presentes em todas as cepas, um genoma acessório, contendo genes presentes em duas ou mais cepas e genes únicos para cepas individuais (MEDINI, et al., 2005).

À medida que mais sequências de genomas inteiros de uma espécie ou grupo se tornam disponíveis, o tamanho do pangenoma dessa espécie ou grupo pode aumentar, devido ao aumento do número de genes acessórios (LAING et al., 2010). Neste contexto, um pangenoma pode ainda ser classificado em aberto ou fechado. Um pangenoma aberto indica a possibilidade de aumento de novos genes a medida que uma nova sequência genômica é adicionada à análise, enquanto um pangenoma fechado é caracterizado por apresentar aquisição limitada de novos genes (MEDINI, et al., 2005).

Dessa forma, a disponibilidade de sequências completas de genomas tem possibilitado estudos de genômica comparativa com importantes micro-organismos, utilizando uma abordagem pangenômica. Neste sentido, a comparação de genomas de bactérias do ácido láctico, por exemplo, tem possibilitado uma melhor compreensão da diversidade do sistema proteolítico dessas bactérias que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia (LIU et al., 2010 b). Já estudos com genomas da espécie *Escherichia coli*, uma bactéria considerada como modelo para estudos de processos envolvidos com evolução do genoma bacteriano, tem evidenciado a

diversidade dentro dessa espécie (LUKJANCENKO et al., 2010). De maneira semelhante, o sequenciamento de genomas da bactéria *Salmonella entérica*, uma importante bactéria patogênica zoonótica, permitiu a análise comparativa entre diferentes sorotipos desta espécie (JACOBSEN, et al., 2011).

Neste contexto, uma grande quantidade de genomas de espécies do grupo *B. cereus* tem sido sequenciados e publicados (VAN DER AUWERA et al., 2013), sendo representado principalmente pelas espécies de maior interesse econômico, incluindo assim, além de *B. thuringiensis*, as espécies *B. cereus*, um agente patológico oportunista que causa intoxicação alimentar (NARANJO et al., 2011) e *B. anthracis*, bactéria que causa a doença Anthrax (BAILLIE e READ, 2001).

Assim, estudos comparativos envolvendo genomas completos de *B. thuringiensis* estão frequentemente associados às espécies *B. cereus* e *B. anthracis*. Estas espécies são geneticamente relacionadas, e a aplicação da genômica comparativa têm buscado descrever diferenças funcionais, assim como um melhor entendimento das relações evolutivas entre elas (ALCARAZ, et al., 2010).

A comparação entre cromossomos das espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis* mostra escassez de genes específicos e alto grau de sintenia e identidade de proteínas (ZWICK et al., 2012; RASKO et al., 2005). Entretanto, apesar disso, algumas diferenças são evidenciadas na ordem de genes, rearranjos cromossômicos, variações de nucleotídeos e a presença de fagos em algumas espécies (RASKO et al., 2005).

Ao contrário de *B. anthracis*, estudos pangenômicos de *B. thuringiensis* demonstra que essa espécie possui pangenoma aberto, assim como o de *B. cereus*, sugerindo que essas duas últimas espécies podem facilmente trocar ou adquirir material genético com outras bactérias que se encontram no mesmo nicho colonizado por estas (FANG et al., 2011). Além disso, análises filogenéticas sugerem que *B. anthracis* representa uma linhagem genética distinta, do qual divergiu recentemente de *B. cereus* e *B. thuringiensis* (RASKO et al., 2005).

Em um estudo pangenômico em nível de gênero *Bacilli*, do qual o grupo *B. cereus* pertence, incluindo assim *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*, foi demonstrado que existe variabilidade em genes que acreditava-se ser altamente conservados entre espécies pertencentes à *Bacilli*. Assim são evidenciadas diferenças no conteúdo gênico envolvido com processo de esporulação, tais como genes codificantes de sensores de quinases, proteínas de revestimento de esporos e

pequenas proteínas solúveis em ácidos envolvidas na dessecação e resistência a UV dos esporos (ALCARAZ, et al., 2010). Neste contexto, Alcaraz et al. (2010) sugere que esses genes evoluíram para responder a sinais específicos para diferentes ambientes, e a variação é então necessária para responder a diferentes estímulos ambientais, sugerindo que *Bacilli* se especializou geneticamente para permitir a ocupação de diversos habitats e nichos.

De maneira semelhante, a análise comparativa entre as espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis* e *Bacillus subtilis*, mostram que apesar das categorias funcionais de proteínas serem semelhantes em todos os genomas, são identificadas diferenças nas vias de transdução de sinal, transportadores de membrana, estruturas da parede celular e proteínas da camada S (ANDERSON, et al., 2005).

A identificação e as relações filogenéticas das bactérias do grupo *B. cereus* apresentam bastante controvérsia, e devido a isto, Liu et al. (2015), com o intuito de melhorar a taxonomia dessas bactérias, realizou um estudo filogenético utilizando 224 genomas completos de bactérias do grupo *B. cereus*. Assim, de acordo com seus resultados, de 224 genomas utilizados, 149 estão identificados erroneamente ao nível de espécie, em que espécies classificadas como *B. cereus* ou *B. thuringiensis*, por exemplo, deveriam ser reclassificadas como *B. anthracis*, e outras 19 estirpes anteriormente identificadas como *B. cereus* e uma como *Bacillus weihenstephanensis* deveriam ser reclassificadas como *Bacillus mycoides*.

Além disso, Liu et al., 2015, mostrou que devido a sua alta conservação, a sequência de RNA ribossomal 16S não é suficiente para diferenciar bactérias dentro do grupo *B. cereus*, propondo uma identificação rápida de isolados dentro deste grupo a partir do gene *pycA* (Piruvato carboxilase) e, quando necessário, do gene *ccpA* (Proteína A de controle de catabólitos).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*

Os isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, que apresentam diferentes toxicidades para larvas de *A. Aegypti* e *C. quinquefasciatus* (Tabela 2), foram obtidos a partir da bacterioteca do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Fundação Universidade Federal do Tocantins (UFT).

Tabela 2. Concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₅) de isolados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* contra larvas de *A. Aegypti* e *C. quinquefasciatus* apresentando diferentes toxicidades.

Isolados	<i>A. aegypti</i>				<i>C. quinquefasciatus</i>			
	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₉₅ (µg/ml)	SLOPE	x ²	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₉₅ (µg/ml)	SLOPE	x ²
T0124	0,068	0,243	2.983	1,680	0,198	0,505	4,048	0,457
T0131	0,0017	0,0038	4,557	6,144	0,0035	0,0074	5,096	5,702
T0137	0,170	0,507	3.477	3,525	0,239	0,538	4,661	2,357
T0139	0,133	0,302	4.601	2,344	0,254	0,535	5,087	4,564

Fonte:(DIAS e AGUIAR, 2016).

Os isolados, preservados em tiras de papel dessecado, foram cultivados primeiramente em placas de Petri contendo meio LB sólido (Lurian Bertani) (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 10 g/l, Ágar 20 g/l, pH 7,0), sendo posteriormente incubados em estufa bacteriológica à 28°C por 16 horas. Após o período de incubação, uma colônia de cada isolado foi inoculada com o auxílio de uma alça de platina esterilizada em 50 mL de meio LB líquido (triptona 10 g/l, extrato de levedura 5g/l, NaCl 1,5 g/l, pH 7,0) e colocadas sob agitação a 200 rpm, por 16 horas à 28°C e, para posterior extração de DNA.

3.2 Extração do DNA e sequenciamento dos genomas

Para o sequenciamento do genoma, o DNA total (cromossômico e plasmidial) foi extraído das culturas crescidas por 16 horas utilizando o kit *Wizard genomic DNA Purification* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total purificado foi então sequenciado a partir da plataforma MiSeq (Illumina, EUA), localizada no Centro Genômico de Alto Desempenho do Distrito Federal (Brasília-Brasil), no modo *paired-end*, que se caracteriza pelo sequenciamento dos fragmentos a partir de ambas as extremidades (ILLUMINA, 2016).

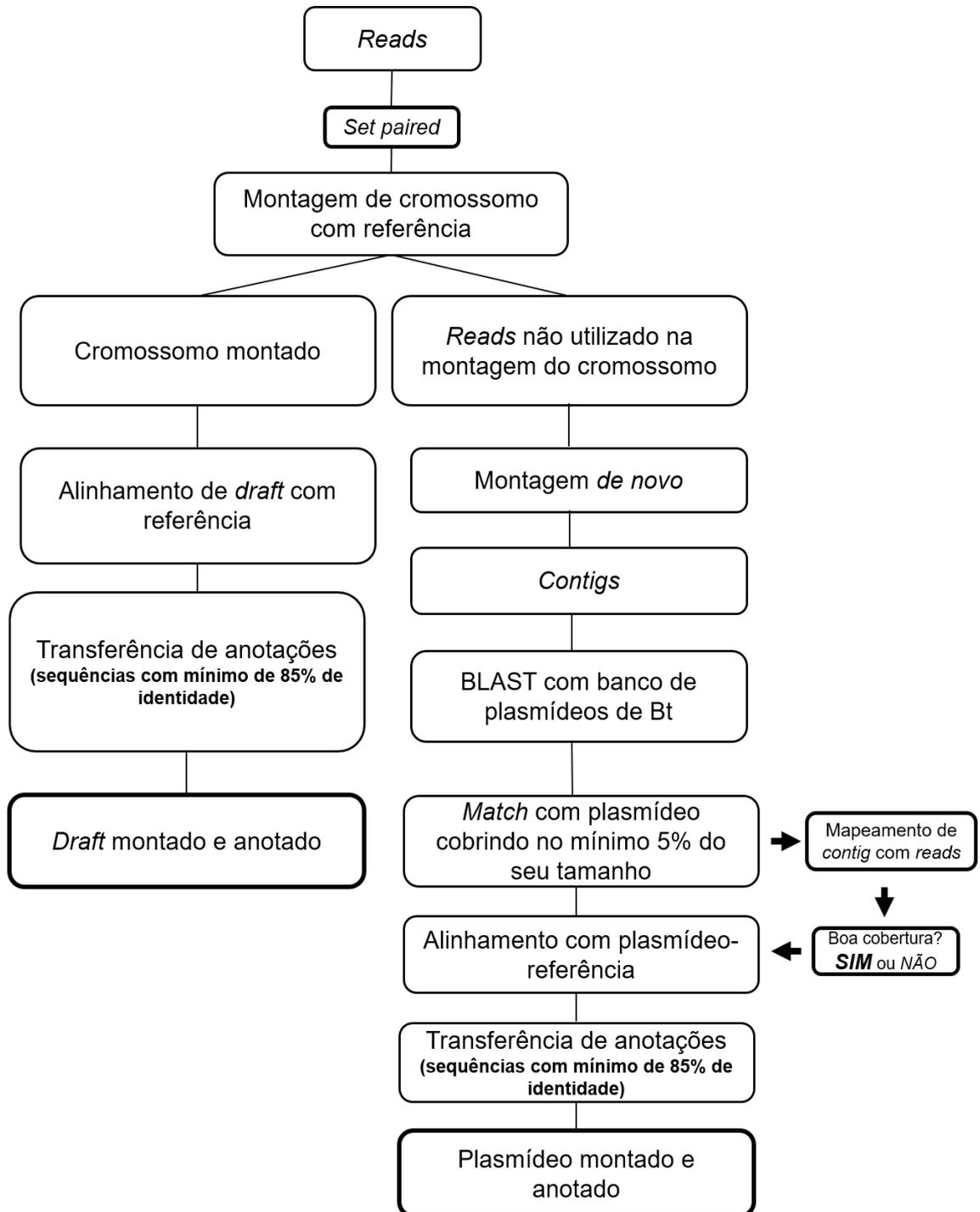
3.3 Avaliação de qualidade

Após obtenção dos dados de sequenciamento, as bibliotecas de *reads* foram então analisadas quanto à qualidade a partir do *software* FastQC v 0.11.3, que permite monitorar graficamente o valor da qualidade em cada base dos *reads* (ANDREWS, 2015).

3.4 Montagem e anotação dos genomas

As etapas de montagem e anotação dos cromossomos e plasmídeos dos isolados T0124, T0131, T0137 foram realizadas no Laboratório de Baculovírus-UNB, a partir de ferramentas do programa Geneious v.10.0.5 (DRUMMAND, et al., 2012), conforme o desenho esquemático abaixo.

3.4.1 Desenho esquemático da metodologia utilizada para montagem e anotação dos genomas:



3.4.2 Montagem dos cromossomos

Antes de realizar as montagens, foi necessário realizar o pareamento de *reads* correspondentes de uma mesma sequência a partir da opção *Set paired* (Geneious R10), com as configurações para a tecnologia Illumina utilizada para sequenciamento dos genomas. A montagem dos cromossomos foi realizada utilizando o cromossomo completo de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* HD-789 (NCBI n°: CP003763) (DOGGETT, et al., 2013) como referência através da ferramenta *Map to Reference* (Geneious R10), utilizando a configuração de identidade mínima de sobreposição de *reads* de 80%.

Após mapeamento dos *reads* com a referência, esta foi excluída e a sequência consenso (localizada acima da montagem) foi calculada, utilizando um limite correspondente de pelo menos 25% das sequências de bases para serem representadas no consenso. A sequência consenso foi então extraída e utilizada para ser mapeada contra os *reads*, aumentando o parâmetro de identidade mínima de sobreposição de *reads* para 90%.

Ao final da montagem os cromossomos foram ainda comparados com a referência a partir do programa BRIG (*Blast Ring Image Generator*) (ALIKHAN, et al., 2011), uma ferramenta que permite a comparação e visualização de genomas procariotas usando BLAST.

3.4.3 Montagem de plasmídeos

A montagem de plasmídeos foi feita a partir do método “*de novo*”, utilizando *reads* filtrados da montagem do genoma, ou seja, que não foram utilizados nesta etapa. O montador Geneious (Geneious R10) foi utilizado, a partir de configurações de sensibilidade médio-baixa e permitindo que contigs com extremidades correspondentes circularizassem. A partir do *NCBI Taxonomy Browser* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1428>) foram obtidas sequências completas de plasmídeos encontrados na espécie *B. thuringiensis*, e então criado um banco de dados, a partir da ferramenta *BLAST> Add/Remove Databases* (Geneious R10).

Os *contigs* montados foram então mapeados contra o banco de plasmídeos a partir da ferramenta *Custom BLAST*. O mapeamento entre um *contig* e um plasmídeo do banco de dados que cobrisse no mínimo 5% do tamanho deste plasmídeo foi o critério utilizado para selecionar *contigs* para seguir com a próxima etapa de

montagem (FANG, et al., 2011). Assim, os *contigs* que atenderam ao critério de escolha, foram mapeados com os *reads* a partir da ferramenta *Map to Reference*, utilizando configurações de sensibilidade customizadas com identidade mínima de sobreposição de *reads* de 90%. Utilizando como critério uma cobertura mínima de 10x, o *contig* foi então alinhado com o plasmídeo referência, e ao apresentar uma identidade mínima de 85% de pareamento de bases, a montagem foi então considerada finalizada.

Após as montagens, os *contigs* não circulares, foram submetidos a circularização mediante análise de erros derivados de regiões duplicadas, verificadas a partir da ferramenta *Dotplot (Self)* e retirada dos mesmos.

3.4.4 Anotação dos cromossomos e plasmídeos

A anotação dos cromossomos e plasmídeos foi feita a partir de referências, do qual foram utilizados o cromossomo HD-789 (NCBI n°: CP003763) e os plasmídeos pTX14-1 (NCBI n°: NC_002091), pTX14-2 (NCBI n°: NC_004334), pTX14-3 (NCBI n°: X56204), pBTHD789-2 (NCBI n°: NC_018509), pBtoxis (NCBI n°: NC_010076), e o pHD1002-1 (NCBI n°: NZ_CP009349). Essas referências foram mapeadas contra as sequências cromossomais e extracromossomais montadas utilizando a ferramenta *Map to Reference*, seguida da ferramenta *Transfer Annotations (Geneious R10)*, com uma configuração de transferência de anotação $\geq 85\%$ de identidade. Regiões que não tiveram o mínimo de similaridade exigida para a transferência de anotação, foram anotadas por meio do NCBI-Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A classificação funcional das proteínas anotadas dos cromossomos e grandes plasmídeos foi realizada partir do programa *on-line* OrthoVenn, a partir de GO (*Genes Orthologous*) compartilhados por todos os isolados, permitindo uma visualização gráfica das principais funções moleculares relacionadas (WANG et al., 2015).

3.5 Análise comparativa

3.5.1 Comparação entre cromossomos

As comparações entre os cromossomos deste estudo foram realizadas a partir da ferramenta CGView (GRANT e STOTHARD, 2008), uma ferramenta própria para genômica comparativa de cromossomos circulares. O CGView usa a ferramenta BLAST para comparar uma sequência primária com até outras três sequências, gerando como resultado um mapa gráfico. Neste mapa, regiões divergentes entre uma

porção da sequência primária e qualquer parte de uma sequência de comparação destacam-se como regiões de cor clara, enquanto regiões bem conservadas dão origem a arcos de cor escura.

3.5.2 Comparação de plasmídeos

A comparação entre os respectivos plasmídeos dos isolados foi feita por meio da análise de *clusters* de genes ortólogos e únicos, identificados e visualizados a partir do programa OrthoVenn (WANG, et al., 2015), com base em sequências de aminoácidos anotadas. Para a execução do programa foram adotados os parâmetros de *e-value* 10^{-5} e *inflation value* de 1,5. Os resultados são gerados em forma de Diagrama de Venn, sendo ainda possível a visualização de dados estatísticos, assim como a análise de sequências de cópias únicas (*singletons*) e anotação de clusters.

3.5.3 Determinação e comparação de fatores de virulência

Para a identificação de outros genes virulentos encontrados na espécie *B. thuringiensis*, um banco de dados foi criado com dez importantes fatores de virulência obtidos a partir do NCBI, sendo representadas por duas metaloproteases (*inha1* e *inha2*), três fosfolipases (*pi-plc*, *pc-plc* e *smase-c*) e cinco enterotoxinas (*cytk*, *entfm*, *bcet*, *hbl* e *nhe*), com os respectivos números de acesso: AFQ25046, AAL16094, CAB69804 ACX71486Y, OFD01732, YP_035346, AY789084, D17312, AB099298, AB099298. O banco foi criado a partir da ferramenta *Custom Data-base* (Geneious v 10.0.5).

Para identificar os fatores de virulência foi utilizado a opção *Custom BLAST* (Geneious v 10.0.5), onde os cromossomos foram mapeados contra o banco de dados, identificando os fatores presentes. A comparação dos fatores de virulência de cada cromossomo foi realizada a partir de alinhamento, utilizando o plugin MAFFT v 7.222 (KATO et al., 2002).

3.5.4 Análise filogenética e MAUVE utilizando outras 14 sequências cromossomais de *B. thuringiensis*

A análise filogenética e alinhamento MAUVE foram feitos a partir dos *drafts* dos cromossomos dos isolados T0124, T0131, T0137 e de outros 14 cromossomos completos de *B. thuringiensis*, obtidas a partir do NCBI, com os respectivos números de acesso: CP012099.1, CP015350.1, CP013055.1, CP015150.1, CP016588.1,

CP014282.1, CP009335.1, CP009720.1, CP010088.1, CP009600.1, CP013274.1, CP003763.1 e CP013275.1 e CP015350.1.

A análise filogenética foi feita a partir de sequências de aminoácidos utilizando o programa CVTree3 v.3 (*Composition Vector Tree*) (GUANGHONG et al., 2015), utilizando os parâmetros k=6 e tipo= aa (aminoácidos), e o método de neighbor-joining (NJ) (SAITOU e NEI, 1987) para a construção da árvore. A árvore filogenética foi editada utilizando o programa FigTree v1.4.3 (RAMBAUT, 2012).

O programa MAUVE (Multiple Genome Alignment) foi utilizado para fazer o alinhamento múltiplo em Blocos Localmente Colineares (BLCs) dos cromossomos, utilizados na construção da árvore filogenética, com a finalidade de verificar rearranjos gênicos, assim como inversões, inserções, deleções ou duplicação entre as sequências. Nesta análise foram utilizados os parâmetros de peso mínimo de BLC igual a 69 (DARLING, et al., 2004), e o alinhador MUSCLE. Nesta análise, os genomas foram organizados com o mesmo início, para que inversões que aparecerem pudessem ser consideradas reais.

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos dados de sequenciamento

Um total de 2.231.604 *reads* foram obtidos para o isolado T0124, 2.150.084 de *reads* para T0131, 1.896.648 *reads* para T0137 e 1.933.790 *reads* para T0139 (Tabela 3). Esses *reads* possuem um tamanho médio que varia de 148 à 146 pb, proporcionando uma cobertura média variando de 46 à 54 X para o genoma dos isolados.

Tabela 3: Características dos isolados e seus respectivos dados de sequenciamento.

Características gerais	Isolados			
	T0124	T0131	T0137	T0139
Fonte de Isolamento	Solo	Solo	Solo	Solo
Origem geográfica	Gurupi-TO	Gurupi-TO	Gurupi-TO	Gurupi-TO
Paired ends <i>reads</i> (n°)	2.231.604	2.150.084	1.896.648	1.933.790
Tamanho médio de <i>reads</i> (pb)	148,3	146,8	148,7	146,2
Cobertura (n° de <i>reads</i>)	54	51,3	46	46

Na análise de qualidade dos dados iniciais, representada pela figura 12, é possível notar que a maioria das sequências dos isolados apresentam qualidade *Phred* superior a 28, correspondendo a uma acurácia de leitura de bases maior que 99%. Portanto, não foi necessário fazer filtragem de qualidade e de bases N (bases não sequenciadas).

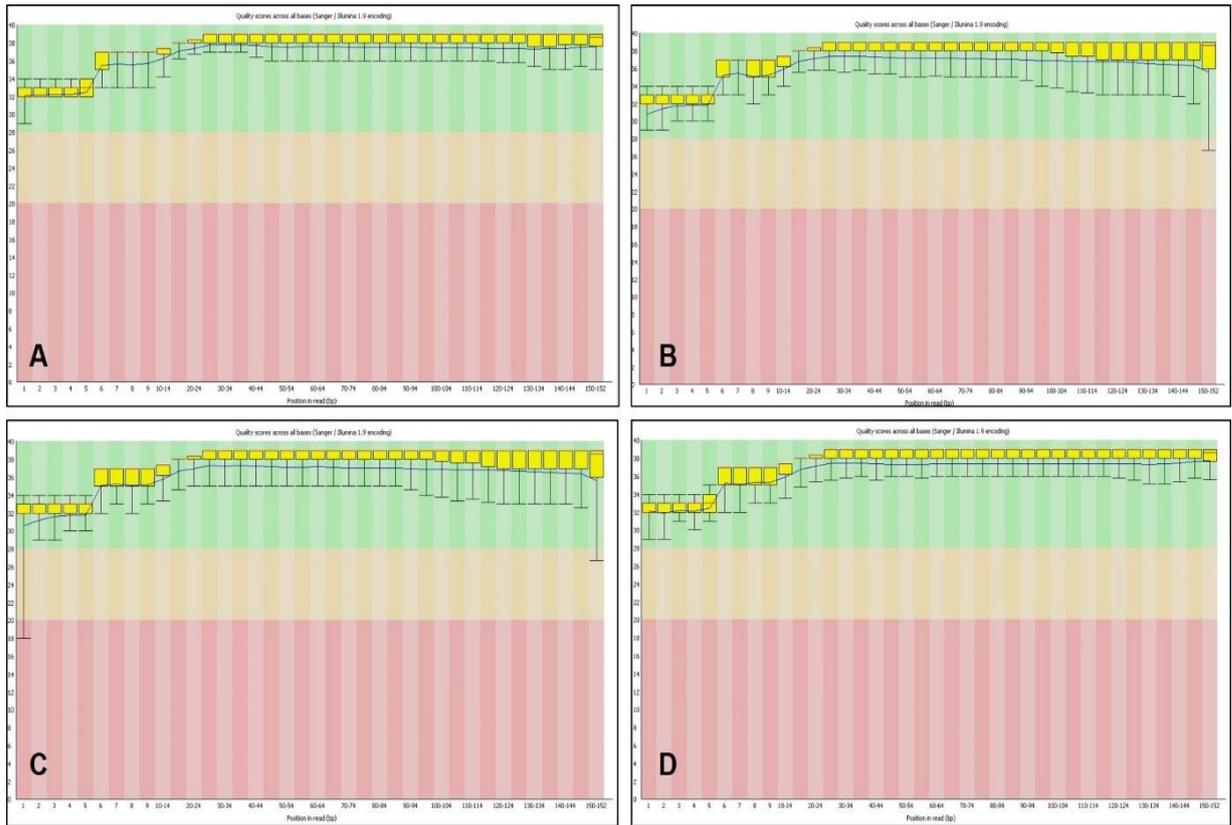


Figura 12: Gráficos de qualidade dos dados de sequenciamento obtidos para os quatro isolados. Análise das sequências de T0124 (A); T0131 (B); T0137 (C) e T0139 (D). Na linha vertical estão representados os valores de *Phred score* e na horizontal a posição em nucleotídeos das sequências de *reads*. Qualidades consideradas boas se encontram na porção verde, intermediárias na porção amarela e ruins na porção vermelha.

4.2 Montagem dos genomas

4.2.1 Montagem dos cromossomos

A montagem do DNA cromossomal dos isolados T0124, T0131, T0137 foi realizada utilizando-se como referência o cromossomo completo da bactéria *B. thuringiensis subsp. israelensis* HD-789 (NCBI nº CP003763). Os cromossomos montados foram nomeados de acordo com seus respectivos isolados: T0124, T0131, T0137 e T0139.

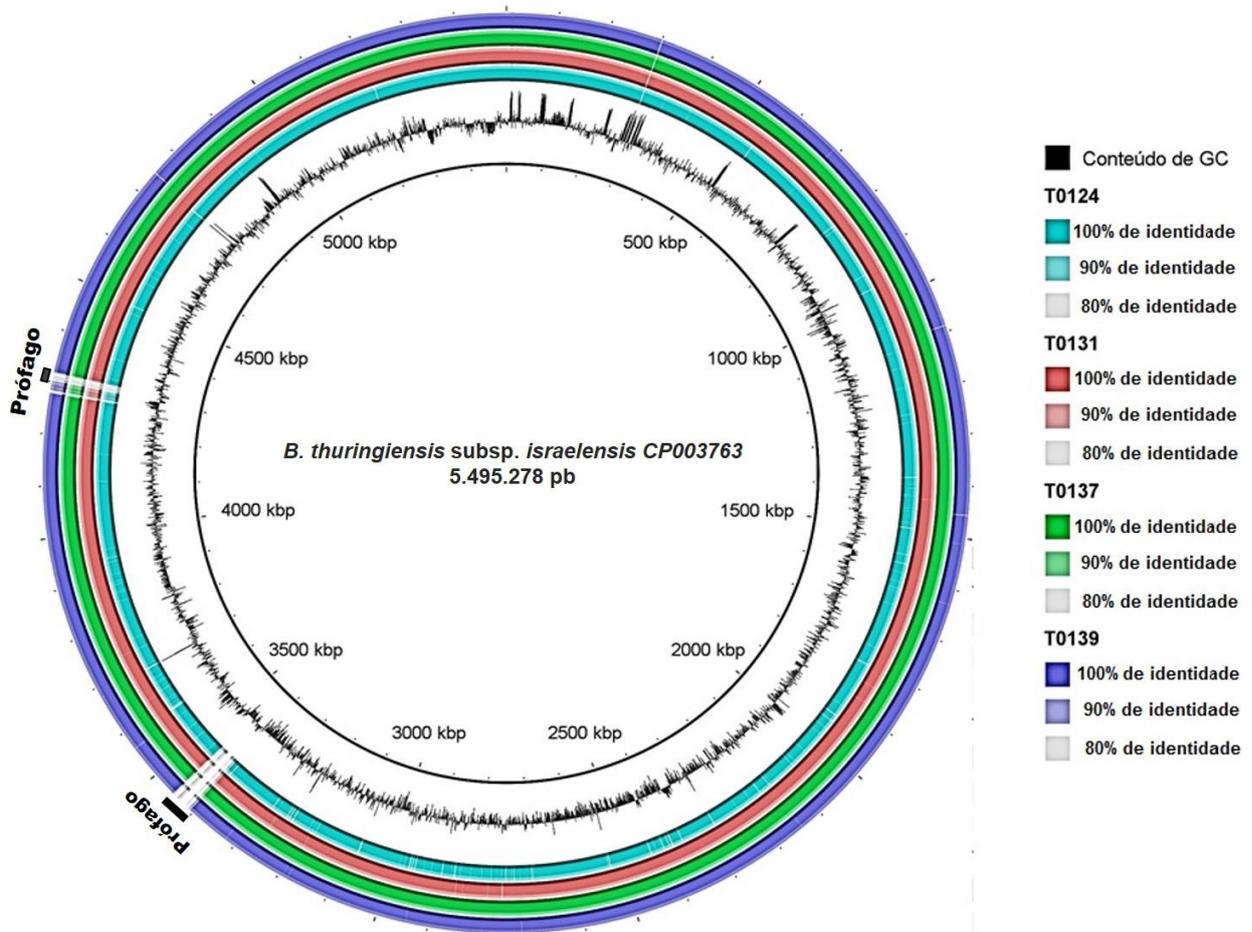


Figura 13: Mapa comparativo entre os cromossomos montados e o genoma usado como referência. Os anéis externos representam T0124, T0131, T0137 e T0139 e o anel interno o genoma CP003763 usado como referência. As medidas de identidade, entre 80% e 100%, são feitas a partir da tonalidade clara à mais escura de acordo com a legenda. O percentual de conteúdo G+C é demonstrado no gráfico interno preto.

O mapeamento dos *reads* possibilitou a cobertura de 98% do tamanho do genoma do isolado HD-789 em todas as montagens, recuperando a grande maioria das sequências codificantes, mostrando que esta referência pode proporcionar uma boa ordenação das bibliotecas de *reads*.

A figura 13 mostra uma representação gráfica do alinhamento entre os cromossomos já montados, representados pelos anéis coloridos externos, e a referência, representado pelo círculo interno. A partir do gradiente de cor é possível notar que as montagens possuem, em sua maior parte, identidade de 100% com a sequência de HD-789. Regiões com menos de 80% de identidade aparecem como espaços em branco em cada anel. Além de indicarem baixa identidade, essas regiões indicam também a falta de cobertura, sendo claramente representada por duas sequências de prófagos, localizados no cromossomo de referência entre os intervalos

3.407.568 - 3.4051.845 pb e 4.278.610 – 4.319.513 pb, que por sua vez, estão ausentes em T0124, T0131, T0137 e T0139 (Figura 13).

Isso pode ser melhor visualizado no mapeamento dos *reads* contra a referência HD-789 na figura 14 A, mostrando uma grande região sem cobertura correspondente a uma das sequências de prófago. As extremidades de sequências de *reads* nesta região mostram-se vinculados, ou seja, apresentam indícios de que são contíguos após a região sem cobertura, provando que essas sequências de prófagos não se encontram nos cromossomos deste estudo (Figura 14, A).

Apesar de não serem evidenciadas na figura 13, outras regiões sem cobertura são representadas por regiões ribossomais 16S e 23S, ocasionadas por erro de mapeamento (Figura 14, B)

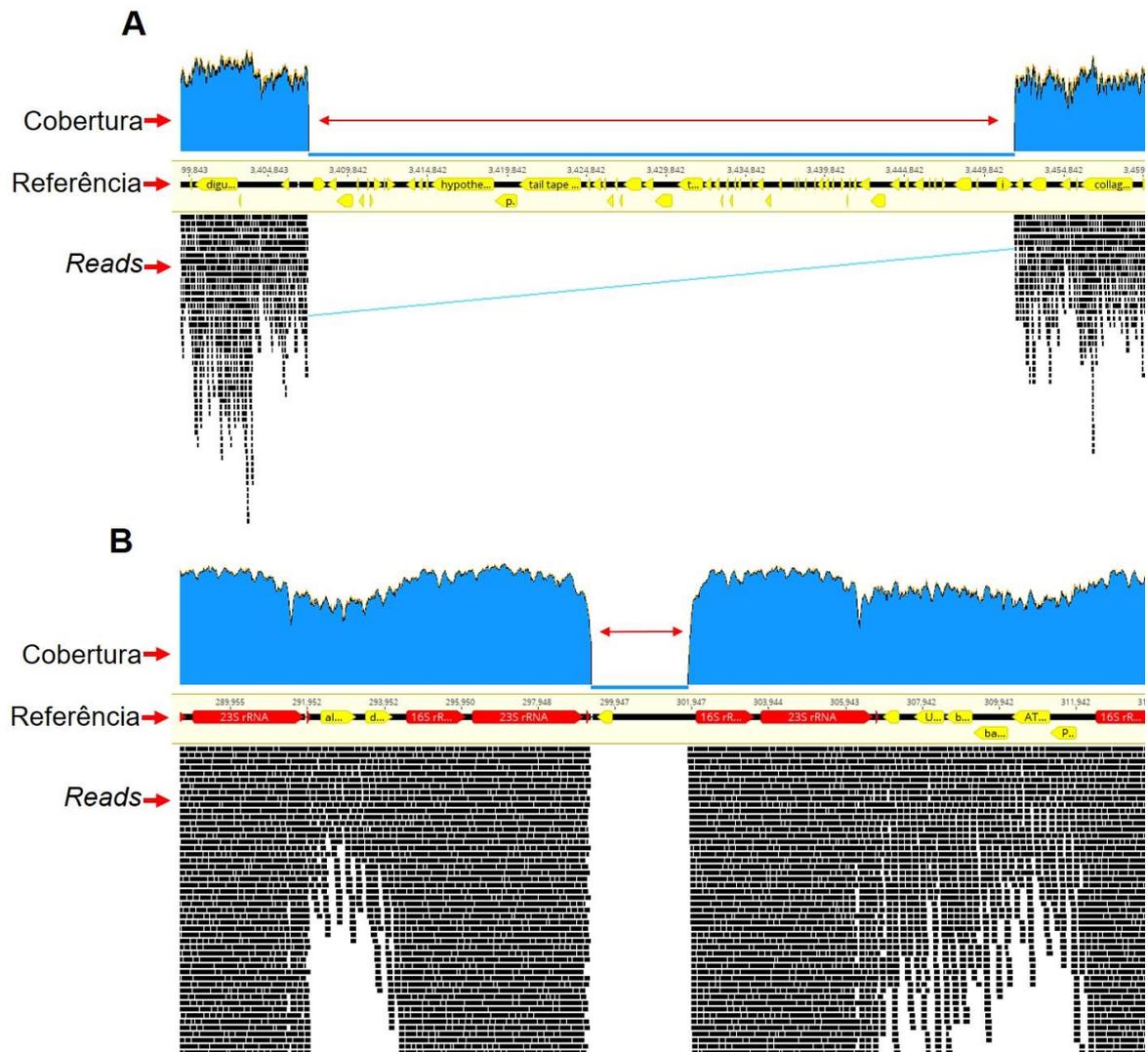


Figura 14: Representação de regiões sem cobertura na montagem dos *reads* com a referência. A. Extensa região sem cobertura, caracterizada por um dos prófago presente no

genoma de referência e ausente no genoma montado. Linha azul indica *reads* contíguos. **B.** Região sem cobertura nas extremidades de genes 23S e 16S no genoma montado. Setas duplas indicam regiões sem cobertura. Imagens são representadas pela montagem do cromossomo T0137.

Os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentam ainda outras pequenas regiões sem cobertura distribuídas ao longo de suas sequências, que podem ser explicadas pelo uso de *short reads*, resultantes do sequenciamento Mi-seq Illumina. O mapeamento dos *reads* também apresentou regiões com alta cobertura, que por sua vez, são representadas por sequências repetitivas. Essas regiões correspondem a genes codificantes de subunidades ribossomais 16S e 23S (Figura 15, A) e por transposases (Figura 15, B).

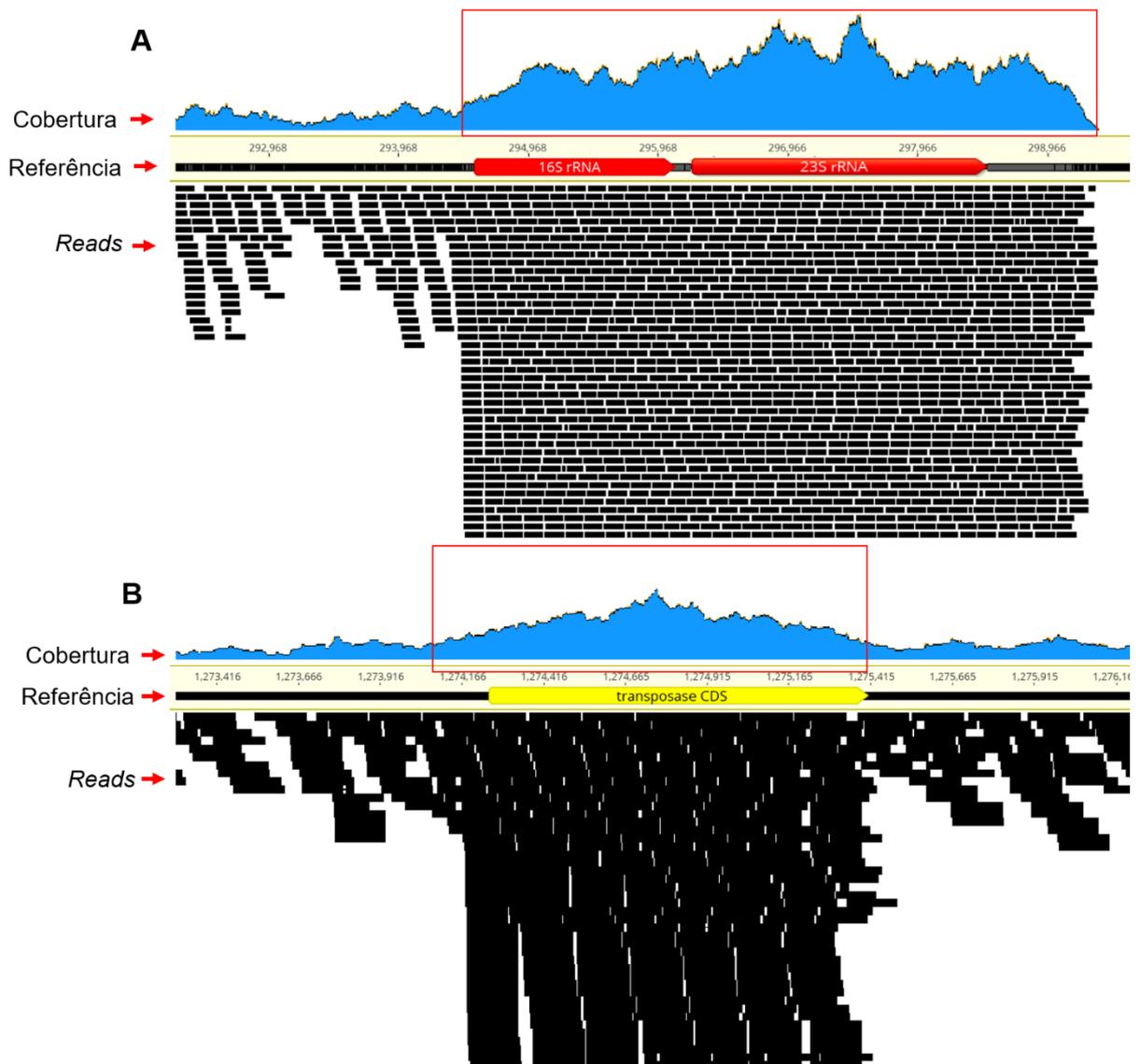


Figura 15: Regiões com alta cobertura nos genomas. Alta cobertura em sequência codificante para as subunidades ribossomal 16S e 23S (**A**) e para uma transposase (**B**).

Destaque vermelho é colocado nas regiões de alta cobertura. Imagens são representadas pela montagem do cromossomo T0137.

A tabela 4 mostra as características gerais das montagens de T0124, T0131, T0137 e T0139, dos quais apresentam um tamanho médio estimado de 5.414 kb, com uma porcentagem equivalente a 35% de G+C. Apesar de conter regiões sem coberturas (representados por bases N), estes representam menos de 1% do tamanho destes cromossomos. Foi ainda possível notar que a montagem de T0137 apresentou a maior quantidade de *reads* mapeados, apresentando 636.458 *reads*, resultando assim na maior cobertura média entre as montagens (17X), e na menor porcentagem de bases N (0,06%) (Tabela 4).

Tabela 4: Características de montagem com referência (CP003763) dos cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139.

Características gerais	Cromossomos			
	T0124	T0131	T0137	T0139
<i>Reads</i> mapeados (n°)	375.124	377,310	636.458	405.008
Cobertura média (n° de <i>reads</i>)	10,2	10,3	17,5	11,0
Desvio padrão de cobertura	7,9	5,3	10,5	6,8
Tamanho do genoma (pb)	5.414.363	5.414.369	5.414.369	5.414.367
Bases N (%)	0,5	0,1	0,06	0,1
Conteúdo G+C (%)	35,2	35,3	35,3	35,3

*Cálculo da cobertura média foi feita utilizando a fórmula apresentada no Anexo.

4.2.2 Montagem de plasmídeos

A montagem de plasmídeos foi realizada a partir de *reads* não mapeados nos cromossomos, e suas características são apresentadas na tabela 5.

Foram montados quatro *contigs* circulares com tamanhos de 5,4, 6,8, 7,6 e 235 Kb para o isolado T0124. Já para os demais isolados foram montados três *contigs* circulares com tamanhos de 5,4, 7,6 e 235 Kb para o isolado T0131, com tamanhos de 5,4, 6,8 e 7,6 para o isolado T0137 e de 5,4, 6,8 e 235 Kb para o isolado T0139 (Tabela 5). Estes *contigs* apresentaram uma identidade superior a 99% com os elementos extracromossomais pTX14-1 (NC_002091), pTX14-2 (NC_004334), pTX14-3 (X56204), pBTHD789-2 (NC_018509).

Tabela 5: Características de montagem *de novo* para plasmídeos dos isolados 1 T0124, T0131, T0137 e T0139.

Características	Isolados			
	T0124	T0131	T0137	T0139
<i>Reads</i> não mapeados no cromossomo (n°)	1.856.451	1.772.775	1.260.191	1.528.783
<i>Contigs</i> (n°)	9.765	7.735	5.460	6.474
<i>Contigs</i> >= 100 pb (n°)	9.749	7.720	5.455	6.445
N50	271	282	295	299
<i>Contigs</i> >= 1000 pb (n°)	40	41	35	40
N50	36.657	30.658	79.344	44.345
<i>Contigs</i> circulares	4	3	3	3

Outros plasmídeos foram montados a partir do mapeamento de *contigs* lineares que apresentaram *match* com os plasmídeos pBtoxis (NC_010076), pHD1002-1 (NZ_CP009349), com tamanhos de 127 e 359 kb, respectivamente cobrindo mais de 10% destes. Esses *contigs* foram mapeados contra os *reads*, e uma vez que tiveram boa cobertura, tiveram seu tamanho estendido até que se alcançasse o tamanho do plasmídeo referência.

A montagem final contabilizou seis plasmídeos para cada um dos isolados, sendo estes nomeados de plasmídeo 1, 2, 3, 4, 5 e 6. O mapeamento dos *reads* nos plasmídeos demonstrou boa cobertura em toda a extensão das montagens, resultando em altas coberturas médias para os plasmídeos 1, 2 e 3, variando de 4.000 à 14.000, e coberturas médias variando entre 20 e 109 para os plasmídeos 4, 5 e 6 (Tabela 6, Figura 16).

Tabela 6: Características finais de montagem dos plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139.

	Plasmídeos	Cobertura média	Desvio padrão	Tamanho (pb)	G+C (%)	Reads mapeados (n°)
T0124	1	14.326	3.312	5.415	36,3	527.149
	2	15.310	3.005	6.824	36	701.899
	3	5.897	982	7.697	35,3	303.988
	4	109	58,6	127.922	32,4	93.097
	5	41,5	10	235.425	36,6	65.573
	6	23,8	14	359.439	32,3	52.504
T0131	1	14.244	2.742	5.415	36,3	530.978
	2	14.870	2.408	6.824	36	683.857
	3	5.429	794,6	7.697	35,3	281.377
	4	76,9	41,5	127.923	32,4	66.097
	5	44,5	8,9	235.427	36,6	70.453
	6	20,2	11	359.440	32,3	35.945
T0137	1	8.118	2.540	5.415	36,3	297.908
	2	8.409	2.676	6.824	36	385.132
	3	3.704	832	7.697	35,3	191.143
	4	124,7	64,4	127.923	32,4	106.772
	5	55,9	15,4	235.425	36,6	88.255
	6	33,5	19,5	359.440	32,3	80.702
T0139	1	4.585	48,6	5.418	36,3	297.908
	2	12.014	3.013	6.827	36	385.132
	3	4.423	874,9	7.697	35,3	191.143
	4	106	55,6	127.930	32,3	106.772
	5	44	12,1	235.425	36,6	88.255
	6	28	18,2	359.438	32,3	68.506

*Cálculo da cobertura média foi feita utilizando a fórmula apresentada no Anexo.

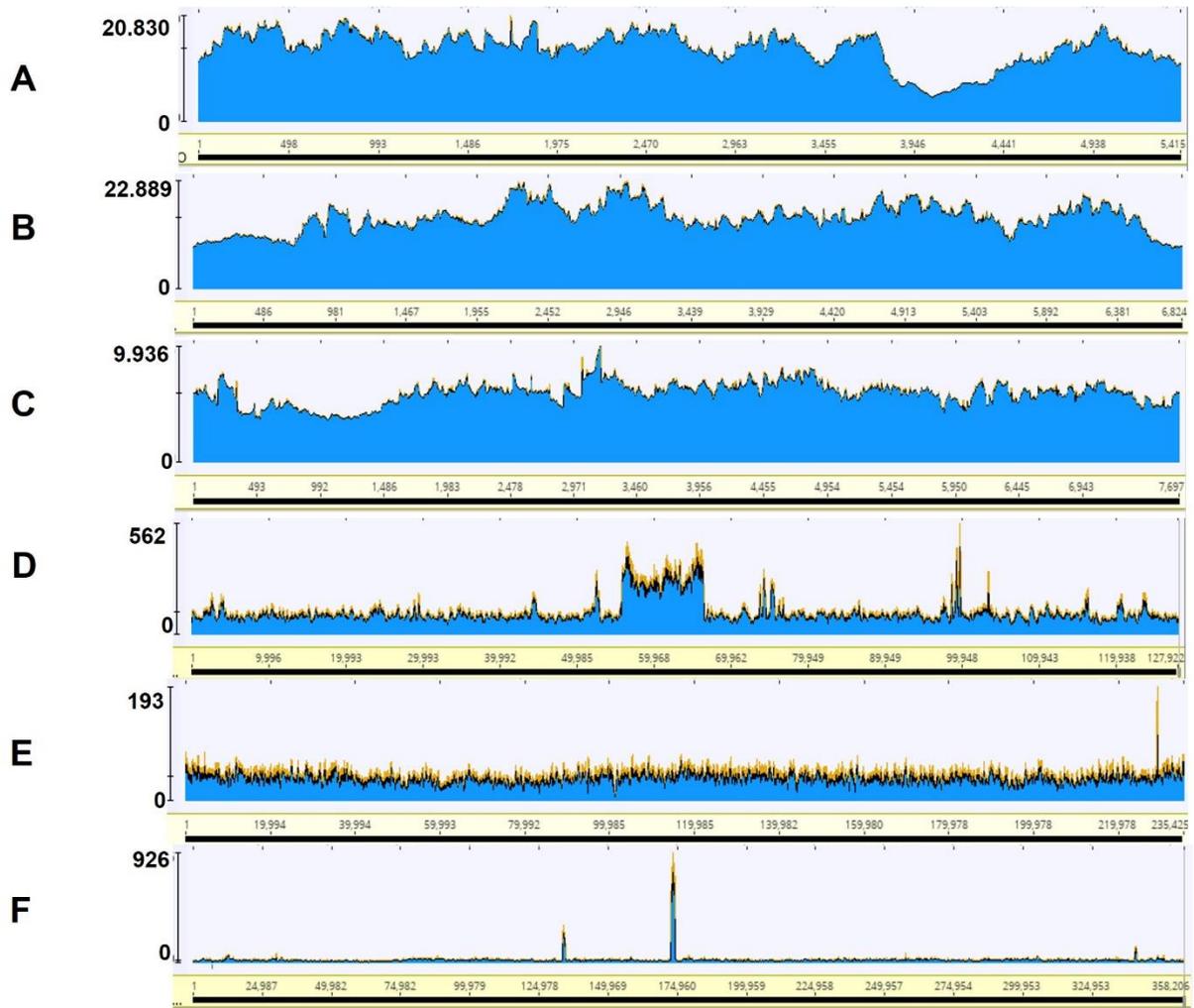


Figura 16: Gráficos de cobertura dos plasmídeos montados. (A) Cobertura do plasmídeo 1; **(B)** plasmídeo 2; **(C)** plasmídeo 3; **(D)** plasmídeo 4; **(E)** plasmídeo 5 e **(F)** plasmídeo 6. O eixo x representa a sequência de *contigs* montados, enquanto o eixo y representa cobertura, variando de 0 até a maior cobertura, representando o pico mais alto na montagem ao longo da sequência. Imagens são representadas pelas montagens de plasmídeos do isolado T0124.

4.3. Anotação dos genomas (cromossomal e plasmidial)

Para aplicar as informações obtidas dos genomas montados, a anotação foi realizada. Neste estudo, devido os cromossomos e plasmídeos possuírem um alto grau de identidade com as sequências utilizadas como referência nas montagens, a anotação também foi realizada a partir destas referências por meio de transferência de anotação.

As características de anotação dos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentam parâmetros similares, sendo então descritas em uma única tabela (Tabela 7). No total, foram anotadas 5.358 sequências codificadoras de proteínas (*coding sequence*- CDS), 112 tRNA e 41 rRNA nos cromossomos dos

isolados. Já com relação aos plasmídeos, sequências CDS variaram de 3 a 313 proteínas anotadas (Tabela 7).

Tabela 7: Características de anotação dos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139.

Características	Cromossomo*	P1	P2	P3	P4	P5	P6
CDS	5.358	3	3	9	113	245	313
RNAs total (n°)	153	-	-	-	-	-	-
tRNA (n°)	112	-	-	-	-	-	-
rRNA (n°)	41	-	-	-	-	-	-

* Dados representam todos os quatro cromossomos montados, T0124, T0131, T0137 e T0139. P-1: plasmídeo-1; P-2: plasmídeo-2; P-3: plasmídeo-3; P-4: plasmídeo-4; P-5: plasmídeo-5; P-6: plasmídeo-6;

Uma vez que o número de regiões codificantes dos cromossomos e plasmídeos 4, 5 e 6 são superiores a 100 kb, a caracterização global funcional de suas sequências foi feita a partir da análise de genes ortólogos. Sequências CDS conservadas entre os cromossomos, entre os plasmídeos 4, entre os plasmídeos 5 e entre os plasmídeo 6 foram caracterizada quanto a sua função molecular (Figura 17). Enquanto a caracterização das funções de proteínas dos plasmídeos 4, 5 e 6 representa 100% de suas proteínas, a caracterização dos cromossomos representa apenas 97%, pois devido a erros de montagem, algumas proteínas foram identificadas erroneamente como conservadas apenas para alguns cromossomos, ou seja, como genes acessórios ou únicos, sendo então desconsideradas.

A maior parte das sequências codificantes comuns a todos os cromossomos são representadas por proteínas de ligação iônica (16,3%), transferases (10,2%) e Oxirredutases (9,3%) (Figura 17, A). Já o conteúdo de CDSs extracromossomais conservados são representados principalmente por genes codificantes de proteínas ligantes (18,5%) e de ligação iônica (18,4%) nos plasmídeos 4 (Figura 17, B); proteínas de ligação iônicas (13,6%) e de ligação à nucleotídeos (13,6%) nos plasmídeos 5 (Figura 17, C); e proteínas de ligação iônicas e proteínas (17%) e ligantes (13,3%) para os plasmídeos 6 (Figura 17, D).

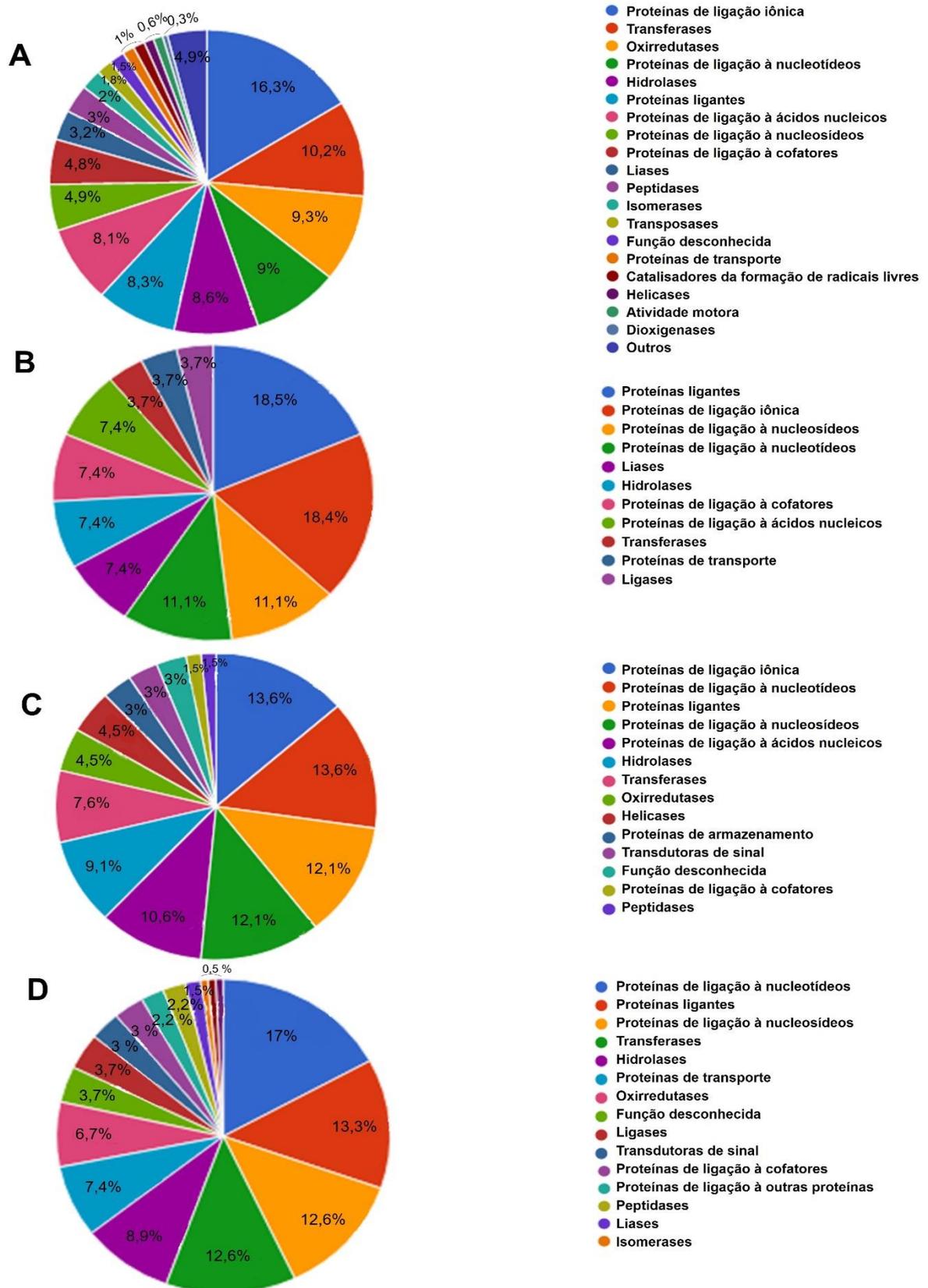


Figura 17: Descrição das principais funções moleculares de seqüências de aminoácidos conservadas nos cromossomos e plasmídeos 4, 5 e 6. Descrição de proteínas conservadas nos cromossomos (A), nos plasmídeos 4 (B), nos plasmídeos 5 (C) e nos plasmídeos 6 (D).

O plasmídeo 4 apresenta uma identidade de sequência superior a 98% com o plasmídeo pBtoxis (NC_010076), e dentre todos os plasmídeos, apenas este abriga genes que codificam proteínas tóxicas para Diptera. As proteínas encontradas foram: Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt1Ca, Cyt2Ba (Figura 18).

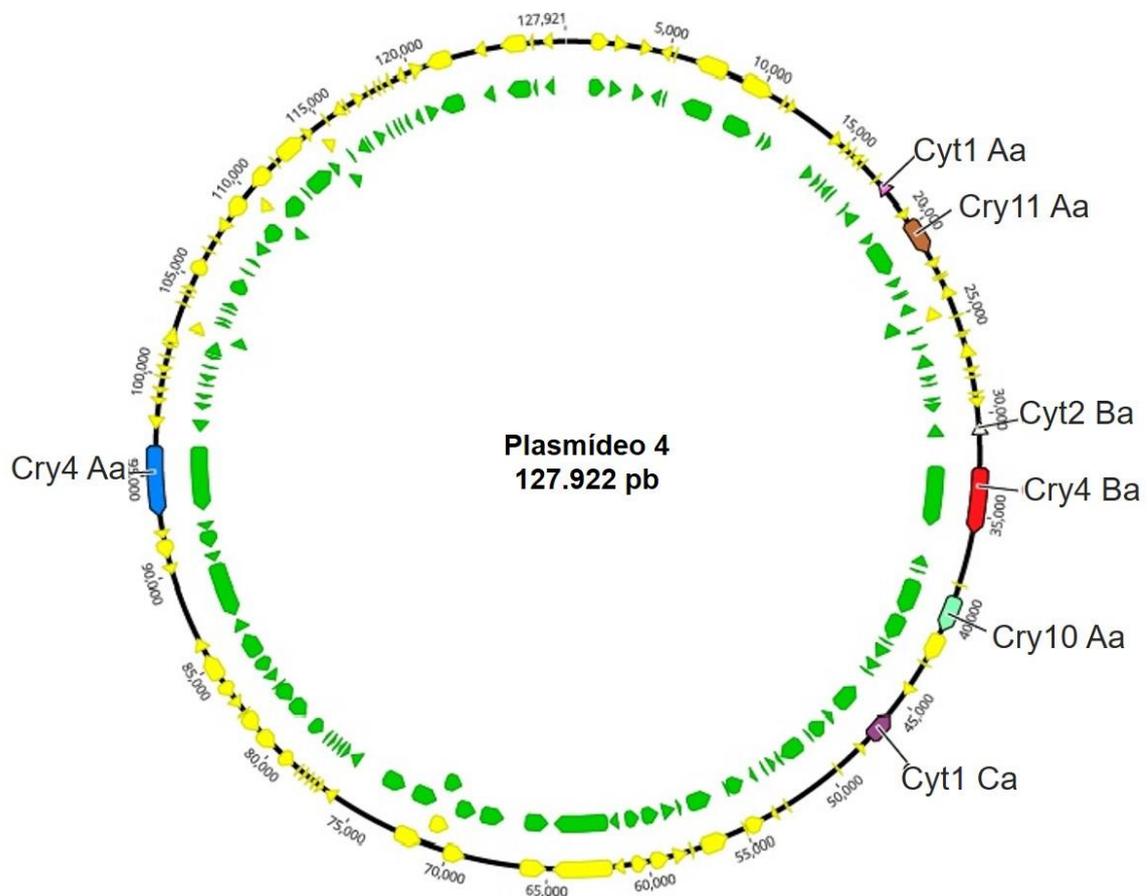


Figura 18: Mapa representativo do plasmídeo 4. Regiões codificantes para as toxinas Cry11 Aa, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cyt1Aa, Cyt1Ca e Cyt2Ba são destacadas. Imagem é representada pelo plasmídeo 4 do isolado T0124.

Já com relação aos plasmídeos 1, 2 e 3, todos apresentam regiões codificantes homologas a proteínas relacionadas às funções de replicação (REP), mobilização (MOB) e uma região que codifica um polipeptídeo contendo um domínio central com elementos repetitivos semelhantes ao colágeno eucariótico, sendo então denominada como proteínas do tipo colágeno para *Bacillus* (BCOL) (Figura 19) (ANDRUP, et al., 1994).

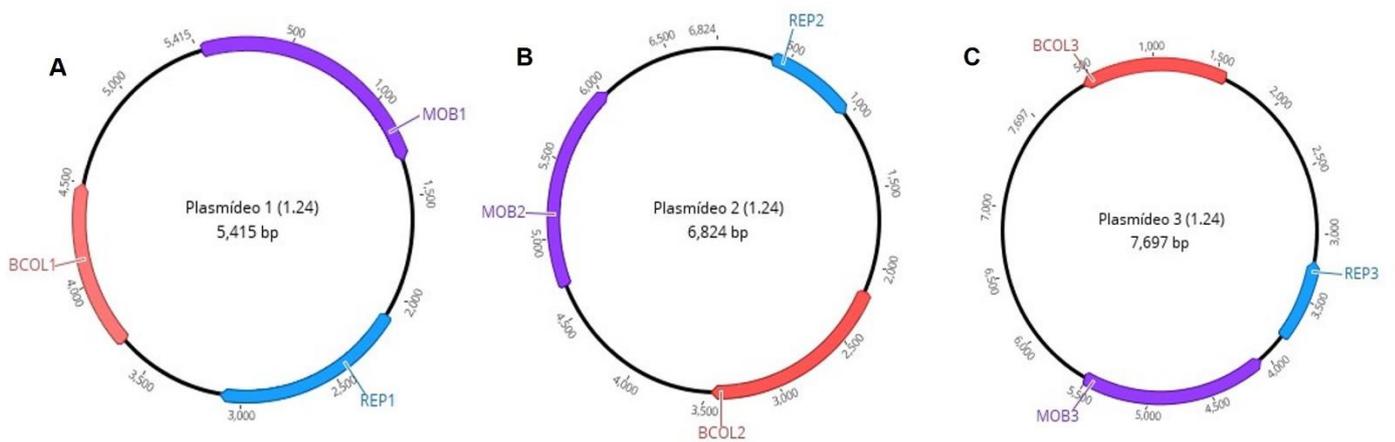


Figura 19: Mapas representativos dos plasmídeos 1, 2 e 3. (A) plasmídeo 1, com regiões codificantes para MOB1, REP1 e BCOL1; **(B)** plasmídeo 2 regiões codificantes para MOB2, REP2 e BCOL2 e **(C)** plasmídeo 3 com regiões codificantes para MOB3, REP3 e BCOL3, em que MOB é uma proteína envolvida com mobilização, REP é envolvida com replicação, e BCOL é uma proteína do tipo colágeno. Apenas ORFs com função identificada são mostradas. Imagens são representadas pelos plasmídeos 1, 2 e 3 do isolado T0124.

4.4 Análises comparativas

4.4.1 Comparação entre cromossomos

Na comparação dos genomas é possível notar um alto grau de identidade de seqüências entre os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139, correspondendo a 99%, a partir de blocos contínuos de sintonia, representada pelas regiões coloridas, (Figura 20).

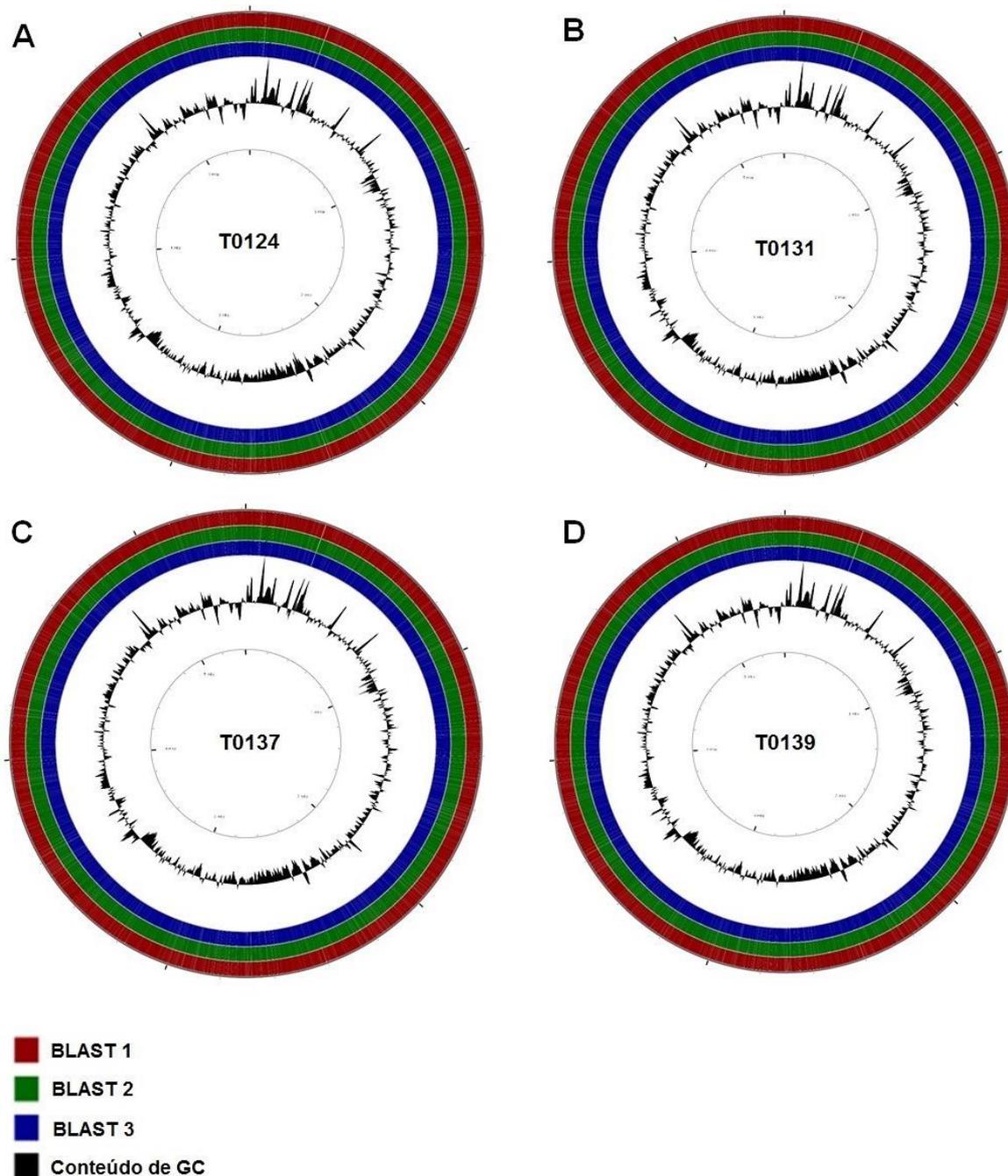


Figura 20. Mapas comparativos entre os genomas T0124, T0131, T0137 e T0139. Cada um destaca um dos genomas como a referência e os demais como genomas de comparação. **A.** Genoma T0124 comparado com o T0131 (BLAST 1), T0137 (BLAST 2) e T0139 (BLAST 3). **B.** Genoma T0131 comparado com o T0124 (BLAST 1), T0137 (BLAST 2) e T0139 (BLAST 3). **C.** Genoma T0137 comparado com o T0124 (BLAST 1), T0131 (BLAST 2) e T0139 (BLAST 3). **D.** Genoma T0139 comparado com o T0124 (BLAST 1), T0131 (BLAST 2) e T0137 (BLAST 3). A partir do anél mais interno, o primeiro representa a referência, o segundo o conteúdo de GC e os demais representam regiões de similaridade detectadas a partir de BLAST.

4.4.2 Comparação entre plasmídeos

A segunda análise comparativa foi realizada entre todos seis plasmídeos de cada isolado, a partir da análise de compartilhamento de genes ortólogos demonstrada a partir de Diagrama de Venn (Figura 21).

As análises entre os plasmídeos 1 e entre os plasmídeos 2 indicam a presença de 3 e 4 *clusters* de genes ortólogos, respectivamente, enquanto a análise entre os plasmídeos 3 revela 9 *clusters* de genes ortólogos (Figura 21, A, B e C). A comparação entre os plasmídeos 4 formam 109 *clusters* ortólogos, dos quais 103 *clusters* são formados por genes que só possuem uma cópia para cada plasmídeo de um isolado, e 3 *clusters* formados por 2 cópias de genes presentes em cada isolado, totalizando assim 113 CDS anotados anteriormente. Essas cópias são altamente similares com sequências de transposases da família IS4, IS231F e da família IS6) (Figura 21, D).

Já os plasmídeos 5 formam 245 *clusters* de genes ortólogos e os plasmídeos 6, formam 312 *clusters*, dos quais 1 *cluster* é formado por um gene que tem duas cópias para cada isolado, apresentando alta identidade de sequência com um regulador transcricional (Figura 21, E, F).

Assim, essas análises mostram que as regiões codificantes de todos os plasmídeos comparados são conservadas para todos os isolados.

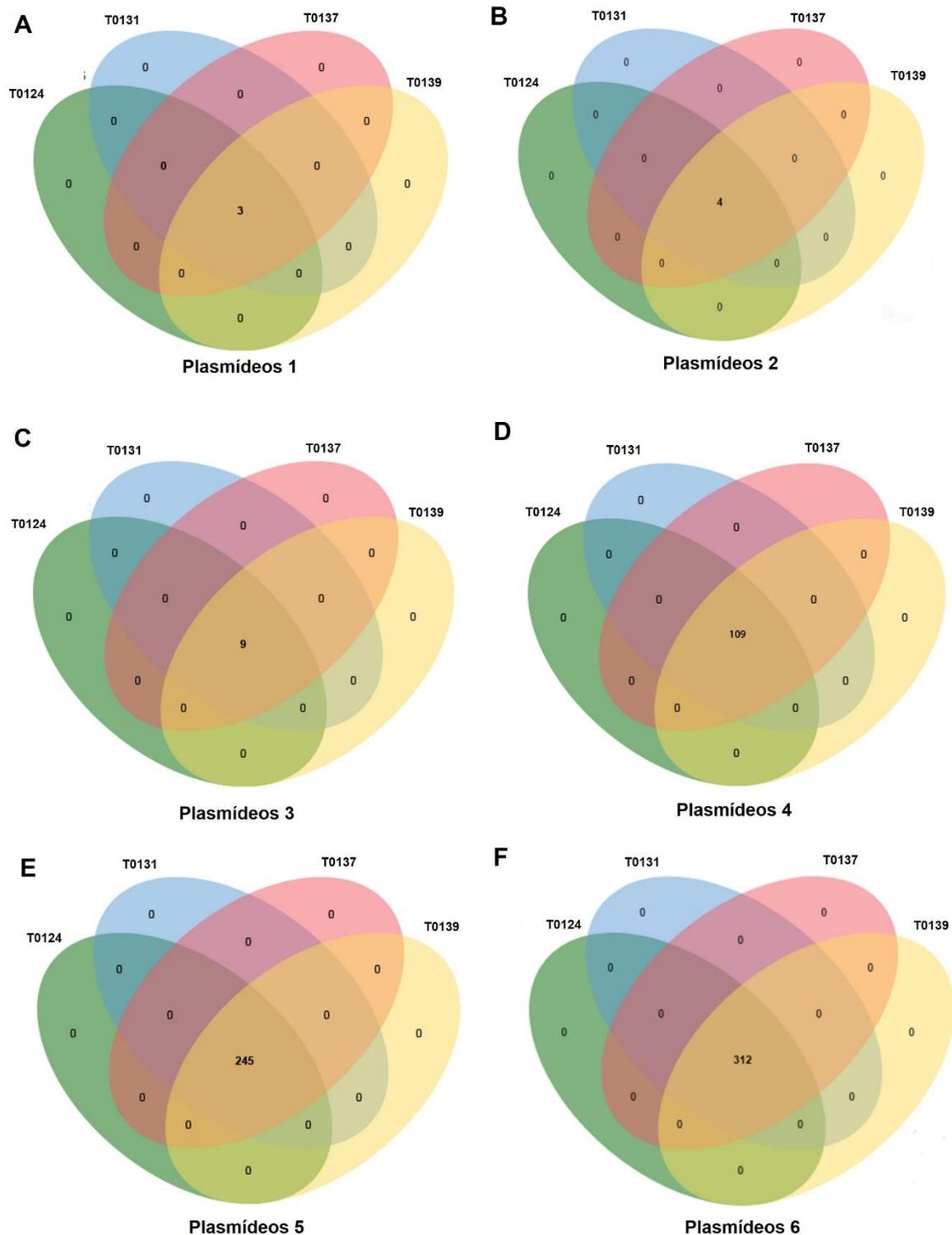


Figura 21: Comparação entre plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 a partir da análise de genes órtologos. Diagrama de Venn de regiões codificantes (CDS) compartilhadas entre os plasmídeos 1 (A), plasmídeos 2 (B), plasmídeos 3 (C), plasmídeos 4 (D), plasmídeos 4 (E) e plasmídeos 6 (F) encontrados nos isolados T0124 (verde), T0131 (azul), T0137 (rosa) e T0139 (amarelo). O número central em regiões sobrepostas representa CDSs presentes em todos os plasmídeos. Já outros números representam CDSs presentes em mais de um plasmídeo ou genes de cópias únicas, ambos destacados por círculos vermelhos.

4.4.3 Determinação e comparação de fatores de virulência

Além da comparação entre cromossomos e plasmídeos, a identificação de outros genes relacionados com a patogenicidade de *B. thuringiensis*, obtidos a partir de banco de dados, permitiu a comparação entre sequências de metaloproteases (*inha1* e *inha2*), fosfolipases (*pi-plc*, *pc-plc* e *smase-c*) e de enterotoxinas (*cytk*, *entfm*, *bcet*, *hbl* e *nhe*) presentes nos cromossomos (Tabela 8).

Como resultado, todos os fatores de virulência presentes na espécie *B. thuringiensis* analisados neste estudo foram encontrados nos cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139, e quando comparados entre eles mostram uma identidade de 100% (Tabela 8).

Tabela 8: Identificação de fatores de virulência e comparação de sequências entre T0124, T0131, T0137 e T0139.

Fator	Descrição	N° de Acesso	Cromossomos				Identidade (%)
			T0124	T0131	T0137	T0139	
InHA1	Inibidor de metaloproteases antibacterianas	AFQ25046	+	+	+	+	100
InHA2	Inibidor de metaloproteases antibacterianas	AAL16094	+	+	+	+	100
PI-PLC	Fosfatidilinositol	CAB69804	+	+	+	+	100
PC-PLC	Fosfatidilcolina	ACX71486	+	+	+	+	100
CytK	Citotoxina K	YP_035346	+	+	+	+	100
EntFM	Enterotoxina FM	AY789084	+	+	+	+	100
Bcet	Enterotoxina T	D17312	+	+	+	+	100
HBL	Hemolisina BL	AB099298	+	+	+	+	100
NHE	Enterotoxinas não-hemolítica	AB099298	+	+	+	+	100
SMase-C	Esfingomielinase C	OFD01732	+	+	+	+	100

+ presença - ausência

4.4.4 Análise comparativa filogenética usando outros 14 cromossomos completos

Os *drafts* dos cromossomos deste estudo foram ainda comparados com outros 14 cromossomos completos de *B. thuringiensis* (Tabela 8) a partir de análise filogenética e alinhamento Mauve (Figura 22).

A análise filogenética mostra a divisão da árvore em dois grande grupos, em que o primeiro é ainda dividido em outros dois clusters. O agrupamento de T0124, T0131, T0137 e T0139 na árvore e o alinhamento Mauve demonstram a conservação da da colinearidade de genes entre suas sequências, corroborando com as outras análises comparativas mostradas anteriormente.

Além disso, T0124, T0131, T0137 e T0139 agruparam com os cromossomos das estirpes AM65-52 e HD-789, que por sua vez, também representam subespécies *israelensis*, formando 32 Blocos Localmente Colineares (BLC), mostrando que essa espécie é geneticamente relacionada. Contudo AM65-52 e HD-789 parecem ter uma maior relação genética (Figura 22).

Com relação aos outros cromossomos, houve o agrupamento de estirpes com diferentes espectros de ação. As sequências de HS18-1 e MYBT18246, por exemplo, são geneticamente relacionadas, entretanto a primeira estirpe é tóxica para insetos Lepidoptera e Diptera, enquanto a segunda é tóxica para nematóides (Tabela 9).

Os cromossomos YWC2-8, YC-10 e Bc601, que possuem um rearranjo no quinto BLC e uma inversão de sequência formada pelos BLCs 13 a 18 (Figura 22), agruparam juntos, e estão relacionados com a atividade inseticida para lepdópteras e dípteras, nematóides e com a produção de vitamina C, respectivamente (Tabela 9).

Por outro lado HD682, 97-27, HD1011, HD571 e CTC são os cromossomos mais divergentes da análise filogenética, e diferentemente das outras estirpes, estão relacionados com interesse médico. Estes apresentam comprimento de sequência maiores nos BLCs 12 e 23, o que pode indicar elementos de sequência específicos para estas estirpes (Figura 22).

Tabela 9: Características gerais de cromossomos de estirpes de *B. thuringiensis* utilizados na análise filogenética.

Identificação	Status de montagem	Tamanho (pb)	%G+C	Total de CDS	Descrição	Nº de acesso	Referência
HS18-1	Completo	5.292.526	35,43	5.234	Toxicidade para Lepidoptera e Diptera	CP012099.1	LI et al., 2015
MYBT18246	Completo	6.752.490	35,4	6.413	Toxicidade para nematóide	CP015350.1	AUGUST, 2016
YC-10	Completo	5.675.007	34,9	6.028	Toxicidade para nematóide	CP011349.1	CHENG et al., 2015
YWC2-8	Completo	5.674.369	35,29	5.692	Toxicidade para lepidóptera e Diptera	CP013055.1	ZHU et al., 2016
Bc601	Completo	5.627.121	35,30	5.485	Utilizado na fermentação para produção de vitamina C	CP015150.1	JIA et al., 2016
KNU-07	Completo	5.344.151	35,30	5.111	Utilizado na agricultura	CP016588.1	PARK et al., 2016
Bt185	Completo	5.243.635	35,30	4.981	Toxicidade para lepidóptera	CP014282.1	SHU et al., 2016
HD1011	Completo	5.232.696	35,5	5.245	Relevância médica	CP009335.1	JOHNSON et al., 2015
HD682	Completo	5.213.295	35,5	5.201	Relevância médica	CP009720.1	JOHNSON et al., 2015
97-27	Completo	5.235.838	35,4	5.216	Relevância médica	CP010088.1	JOHNSON et al., 2015
HD571	Completo	5.256.240	35,4	5.219	Relevância médica	CP009600.1	JOHNSON et al., 2015
CTC	Completo	5.327.397	35,4	5.268	Alto produtor da proteína de camada S (<i>S-layer</i>)	CP013274.1	DONG et al., 2015
HD-789	Completo	5.495.278	35,3	5.551	Isolado de inseticida comercial	CP003763.1	DOGGETT et al., 2013
AM65-52	Completo	5.499.731	35,0	5.463	Toxicidade para Diptera	-	Deste estudo
T0124	<i>Draft</i>	5.499.363	35,2	5.358	Toxicidade para Diptera	-	Deste estudo
T0131	<i>Draft</i>	5.499.369	35,3	5.358	Toxicidade para Diptera	-	Deste estudo
T0137	<i>Draft</i>	5.499.369	35,3	5.358	Toxicidade para Diptera	-	Deste estudo
T0139	<i>Draft</i>	5.499.367	35,3	5.358	Toxicidade para Diptera	-	Deste estudo

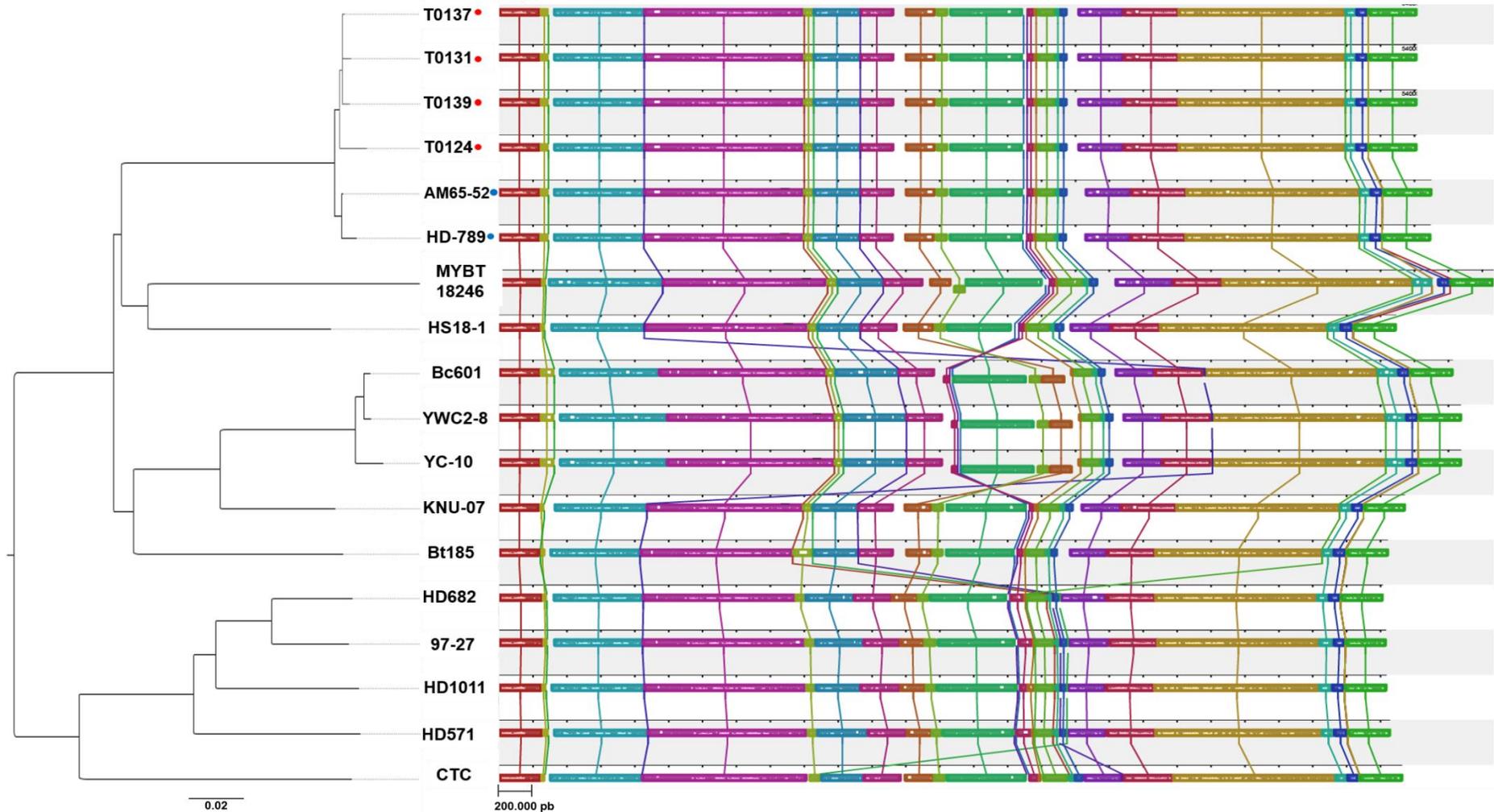


Figura 22: Análise filogenética e alinhamento dos cromossomos dos isolados T0124, T0131, T0137, T0139 com 14 cromossomos de outras estirpes de *B. thuringiensis*. A árvore foi obtida utilizando o CVTree parâmetros $K = 6$ e *Tipo = aa*, e o alinhamento foi feito a partir do programa MAUVE, utilizando um *Peso mínimo* para Blocos Localmente Colineares (BLC) de 69 (DARLING, et al., 2004). As BLCs recíprocas em diferentes genomas são indicadas por cores iguais e são conectadas por linhas. Pontos vermelhos são colocados nos cromossomos deste estudo e pontos azuis em outros genomas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* do banco de dados.

5. DISCUSSÃO

A análise de qualidade de dados iniciais de sequenciamento é caracterizada como o primeiro passo para a montagem, sendo então essencial realizar a trimagem e filtragem de sequências com qualidades ruins (CARNEIRO, et al., 2012). No entanto, o sequenciamento dos genomas mostraram ser de alta qualidade, não havendo necessidade de realizar a trimagem e filtragem de sequências. Isso pode estar relacionado a tecnologia de sequenciamento MiSeq-Illumina utilizado, que produz sequências de leitura com maior qualidade quando comparado com outras plataformas, devido a uma baixa taxa de erro de substituição e a quase ausência de erros indel (erro por inserção ou deleção de uma base) (LOMAN, et al., 2012 b).

A grande disponibilidade de genomas completos de *B. thuringiensis* tem permitido seu uso como genoma de referência para a montagem de sequências de DNA de novos isolados em diversos estudos (FANG et al., 2011; BOLOTIN et al, 2016; RANG et al., 2015). Neste contexto, as montagens dos cromossomos dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 foram realizadas a partir do cromossomo completo de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* CP003763. Os cromossomos montados T0124, T0131, T0137 e T0139 se diferenciaram da referência CP003763, pois não possuem dois prófagos presentes neste genoma. No entanto, Bolotin et al. (2016) em seu estudo, também utilizou o genoma CP003763 como referência, e ao contrário dos nossos resultados, sua montagem continha os dois prófagos (BOLOTIN et al., 2016).

Estudos mostram que um genoma de baixa cobertura também pode fornecer uma grande quantidade de informações biológicas, tornando possível que laboratórios com recursos limitados explorem genomas de diferentes organismos a um baixo custo (STRAUB, et al., 2011). Assim, apesar dos cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentarem baixa cobertura (10X-17X), foi possível obter informações suficientes para utilizar nas análises posteriores.

Uma das limitações da montagem a partir do uso de uma referência é o alinhamento de *reads* dentro de regiões repetitivas, o que pode resultar em regiões sem cobertura (METZKER,2010). Assim, os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentaram regiões sem cobertura em extremidades dos genes ribossomais 16S e 23S. Isso pode ser explicado pelo fato desses genes terem sequências relativamente grandes e existirem em grandes quantidade em genomas bacterianos, fazendo com que *softwares* de montagens não sejam capazes de mapear *reads* contra um genoma de referência de maneira precisa (FANG et al., 2011). Além disso,

os genes 16S e 23S também apresentaram alta cobertura juntamente com outros genes codificantes de transposases, que por sua vez, também representam regiões repetitivas em genomas procariotos (TANG, 2007).

Outras regiões sem coberturas foram constatadas, e provavelmente foram originadas pelo uso de dados MiSeq que possuem comprimentos de *reads* mais curtos, podendo gerar montagens de baixa qualidade (LOMAN et al., 2012b). Devido o comprimento de *reads* obtidos por essa tecnologia ser menor, seu uso na montagem de genomas pode requerer a utilização de coberturas maiores. Contudo essa tecnologia é julgada adequada para o sequenciamento de genomas bacterianos, produzindo montagens que mapeam mais de 95% de um genoma de referência, recuperando assim a maioria das sequências codificantes (LOMAN et al., 2012b), corroborando com os resultados satisfatórios das montagens dos cromossomos obtidas neste estudo.

Com relação as montagens dos elementos extracromossomais, a alta cobertura dos plasmídeos 1, 2 e 3 pode ser explicada pelo alto número de cópias presentes por cromossomo (GALVÃO et al., 2009). Este resultado pode ser ainda comprovado pelo estudo feito por Bolotin et al. (2016) que, calculando a estimativa do número de cópias de plasmídeos por cromossomo em quatro genomas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, também revelou altos valores de cobertura média para plasmídeos menores. Assim, os plasmídeos menores de seu estudo, nomeados de pAM65-52-9-5K, pAM65-52-8-7K e pBTHD789-5, que apresentam alta identidade com os plasmídeos 1, 2 e 3 (>90%) deste estudo, apresentam um elevado número de cópias, variando de 24,7 à 48,4; de 19,9 à 38,7 e de 0,2 à 13,6, respectivamente (BOLOTIN, et al., 2016). Já os plasmídeos maiores pAM65-52-4-128K, pAM65-52-3-235K e pAM65-52-1-360K, que apresentam alta identidade com os plasmídeos 4, 5 e 6 (>90%), possuem números de cópias inferiores, variando de 0,1 à 1,2; 0,7 à 0,8; e 0,7 à 1,0 (BOLOTIN, et al., 2016).

A pesar de estudos revelarem a capacidade de estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* abrigarem até nove plasmídeos, a montagem feita neste estudo revelou a presença de seis plasmídeos nos genomas dos isolados, que por sua vez já foram relatados em outros estudos (BOLOTIN, et al., 2016; DOGGETT, et al., 2012). Enquanto o plasmídeo 5 é citado como presente em todos os genomas desta subespécie já sequenciados, o plasmídeo 6 que foi descrito pela primeira vez por

Bolotin et al. (2016), também é encontrado nos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139.

Desde a década de 80, estudos relatam a direta relação de plasmídeos com a patogenicidade de *B. thuringiensis*, uma vez que são responsáveis por carregar os genes que expressam toxinas ativas contra insetos-alvos (GONZÁLEZ et al, 1981). O plasmídeo com tamanho igual a 127 Kb, nomeado de plasmídeo 4 neste estudo, foi encontrado em todos os isolados, e contém todos os genes *cry* e *cyt* envolvidos com a toxicidade para insetos da ordem Diptera. Este plasmídeo é largamente estudado, sendo denominado de pBtoxis e descrito como o único plasmídeo capaz de codificar as toxinas formadoras de cristal dessa bactéria (STEIN et al., 2006).

Este plasmídeo contém várias sequências de inserção e transposições co-integrativos que são comumente associadas a genes de proteínas inseticidas e podem facilitar os eventos de recombinação e a troca de plasmídeos entre estirpes de *B. thuringiensis* (BERRY et al., 2002). Além disso, pBtoxis apresenta também sequências com funções previstas para aumentar a formação de cristais e subsequente viabilidade celular, atuando como chaperonas (RASKO, et al., 2005; STEIN, et al., 2006).

Apesar do pBtoxis ser relatado como o único plasmídeo que abriga genes responsáveis pela toxicidade de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (BERRY, et al., 2002), a montagem de um novo plasmídeo de 225 kb para esta bactéria, descrito como pBTHD789-3, apresenta genes codificantes de toxinas com alta homologia às sequências encontradas no plasmídeo pBtoxis (DOGGETT, et al., 2012). Entretanto, após análise do plasmídeo pBTHD789-3, Bolotin et al. (2016) encontrou indícios de falha de montagem, sugerindo que este pode não existir, propondo uma verificação deste plasmídeo.

Estudos indicam que isolados de bactérias frequentemente possuem pequenos plasmídeos crípticos, compreendendo apenas genes de replicação e outros genes de funções desconhecidas (FROST, et al., 2005). Neste contexto, os plasmídeos pequenos 1, 2 e 3 não apresentam proteínas inseticidas, sendo atribuídos a eles a função de replicação e habilidade de transferência horizontal entre as espécies de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (ANDRUP, et al., 2003; GALVÃO, et al., 2009). Já os grandes plasmídeos 5 e 6 são descritos como plasmídeos conjugativos (BOLOTIN, et al., 2016).

Estudos comparativos envolvendo genomas procarióticos têm permitido um melhor entendimento da estrutura e organização genômica, assim como a compreensão da enorme diversidade genética entre organismos, incluindo isolados de uma mesma espécie (CATANHO, et al., 2007). Assim, neste estudo, uma vez que os resultados preliminares de montagem e anotação foram satisfatórias, seguiu-se com as análises comparativas entre os genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139.

As análises comparativas demonstram alta identidade de sequências (99%) com relação ao conteúdo cromossomal, em que as sequências T0124, T0131, T0137 e T0139 apresentam alto grau de sintonia, e estes estão associadas aos mesmos plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, que por sua vez, também possuem características semelhantes, compartilhando os mesmos genes, incluindo proteínas inseticidas.

A capacidade de bactérias patogênicas em causar doenças em um hospedeiro susceptível é determinada por múltiplos fatores de virulência, agindo individualmente ou em conjunto em diferentes estádios da infecção (WU et al., 2008). Assim, embora as δ -endotoxinas sejam os fatores de virulência inseto-específico mais conhecidos, *B. thuringiensis* apresenta também uma ampla gama de fatores de virulência capazes de ampliar a toxicidade contra insetos-alvos (VILAS-BÔAS et al., 2012). Dessa forma, dada a importância desses fatores de virulência, dez sequências de fosfolipases, metaloproteases e enterotoxinas de cada isolado, foram comparadas, mostrando que, assim como as sequências de proteínas Cry e Cyt, estas também são conservadas entre os genomas dos isolados.

As sequências ribossomais 16S, um marcador tradicional utilizado para análise de diversidade de micro-organismos, não é suficiente para diferenciar bactérias intimamente relacionadas, devido a sua alta conservação (LIU et al., 2015). Atualmente, dada a constante melhoria do custo-benefício das tecnologias de sequenciamento, é possível utilizar sequências completas de genomas para tentar responder a diversidade dentro de espécies estreitamente relacionadas (ALCARAZ et al., 2010).

Assim, a análise filogenética deste estudo foi realizada a partir do conjunto completo de regiões codificantes de 18 cromossomos de estirpes da espécie *B. thuringiensis*, incluindo as estirpes deste estudo. Como resultado, os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 agruparam-se com outras estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, reforçando a alta relação genética existente entre esta subespécie.

A relação mais estreita entre as estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* AM65-52 e HD-789 é observada na árvore filogenética, e pode ser explicada por duas sequências de prófagos que estão presentes apenas nestes dois cromossomos. Essas sequências de fagos, assim como plasmídeos, são ditos como elementos genéticos móveis, que também contribuem para a diversidade genética entre espécies, sendo considerados instrumentos importantes na divergência de estirpes e espécies bacterianas estreitamente relacionadas (FROST, et al., 2005).

Já com relação aos demais cromossomos utilizados na análise filogenética, estirpes se diferenciaram pela presença de rearranjos e inversões de sequências, fato este que também está relacionado com a variabilidade de espécies geneticamente relacionadas (RASKO et al., 2005). Além disso, o agrupamento de estirpes com diferentes espectros de ação foi observado, e pode estar relacionado ao fato de os plasmídeos serem os principais responsáveis pela toxicidade de *B. thuringiensis*, carregando diferentes toxinas, e não as sequências cromossomais (ELLEUCH, et al., 2015).

Estudos sugerem que as bactérias do gênero *Bacilli* se especializaram geneticamente para permitir a ocupação de diferentes habitats e nichos (ALCARAZ et al., 2010). Neste sentido, apesar de espécies do grupo *B. cereus*, do qual *B. thuringiensis* faz parte, serem geneticamente relacionadas, possuem genes exclusivos associados a adaptações metabólicas (RASKO et al., 2005; ANDERSON et al., 2005).

Já a comparação entre estirpes da espécie *B. thuringiensis* revela que 80% dos genes desta espécie são conservados, e a variabilidade existente entre estirpes de *B. thuringiensis* pode ser atribuída a captura de genes, essenciais ou não à sua sobrevivência, de outras bactérias que residem da mesma comunidade microbiana (FANG et al., 2011). Além disso, *B. thuringiensis* possui um pangenoma aberto, uma característica típica de espécies que colonizam diferentes ambientes e possuem diferentes via de troca de material genético (MEDINI et al., 2005).

B. thuringiensis possui diferentes subespécies, e a análise comparativa de uma mesma subespécie pode revelar estirpes genomicamente idênticas ou altamente relacionadas, mesmo que originados de diferentes regiões geográficas. Isso pode ser explicado pelo surgimento de linhagens clonais de patógenos de insetos que colonizaram com sucesso a biosfera, sofrendo uma troca genética limitada, representando assim subespécies homogêneas (RIVERA et al., 2003).

Neste contexto, estudos realizados com RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), comparando isolados de uma mesma subespécie, revelam que algumas subespécies, tais como *alesti*, *darmstadiensis*, *finitimus*, *galleriae*, *kenyae*, *kurstaki*, *morrisoni*, *sotto*, *thompsoni*, *thuringiensis* e *tolworthi* demonstram ser genomicamente homogêneos apresentando padrões estreitamente relacionados ou idênticos (RIVERA et al., 2003).

De maneira semelhante, estudos demonstram que a subespécie *israelensis* também apresenta estirpes genomicamente semelhantes. Assim, resultados de análises realizados com diferentes marcadores genéticos, tais como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (RIVERA et al., 2003; ANKARLOO et al., 2000), MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*), PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), Southern blot (ANKARLOO et al., 2000) e resultados de análises utilizando MLST (*Multilocus sequence typing*) (SOROKIN et al., 2006), indicam a estreita relação entre isolados de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, sugerindo um alto grau de conservação genômica.

Com relação aos plasmídeos, diferentes estirpes de *B. thuringiensis* dentro de um mesmo sorotipo podem apresentar um padrão plasmidial altamente relacionado, e essa relação é mais evidente em diferentes estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, sorotipo H14, que mesmo sendo isolados de origens geográficas, apresentam um mesmo padrão básico de plasmídeos, apresentando ainda por vezes padrões idênticos (REYES-RAMÍREZ e IBARRA, 2008).

Portanto, todos os resultados comparativos entre os genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 são consistente com diferentes estudos que evidenciam o alto grau de conservação genômica, a nível de nucleotídeos, entre estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

Os isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 exibem atividade tóxica para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, apresentando diferentes concentrações letais. Embora a bactéria T0131 seja a mais promissora dentre os isolados, apresentando uma maior toxicidade para ambos os insetos vetores, os resultados das análise comparativas entre os genomas não trouxeram nenhuma evidência que poderia explicar a diferença de atividade larvicida entre essas estirpes.

Segundo Elleuch et al. (2015), dois fatores podem afetar a atividade de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*: o primeiro estaria relacionado a uma dinâmica do genoma, havendo a deleção dos genes *cry4Aa* e *cry10Aa* no plasmídeo pBtoxis, e o

segundo com a estabilidade de proteínas, a partir de substituições de aminoácidos em toxinas Cry causando sua degradação precoce por proteases larvais. Esses fatores poderiam então explicar as diferenças de toxicidades entre isolados desta subespécie, entretanto, observa-se que os plasmídeos de número 4 compartilham de todos as δ -endotoxinas, e suas sequências de proteínas mostram-se igualmente conservadas.

Estudos destacam os benefícios de combinar as abordagens genômica e proteômica em um único estudo (LIU et al., 2004; RASKO, et al., 2005), e neste sentido, análises comparativas entre dados genômicos e proteômicos de isolados de *B. thuringiensis*, com toxicidade para lepdópteros, demonstram a importância desta combinação, indicando que nem todos os produtos deduzidos em um genoma podem ser encontrados entre dados proteômicos.

Rang et al. (2015), em seu estudo, após a anotação do genoma do isolado *B. thuringiensis* 4.0718, detectou a presença de cinco proteínas Cry: Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa e Cry2Ab. Entretanto dados proteômicos de *B. thuringiensis* 4.0718, realizados no meio da fase vegetativa, esporulação precoce e esporulação tardia, revelou a presença apenas das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, e Cry2Aa (HUANG et al., 2012). Assim, a partir da comparação entre os dois conjuntos de dados, foi possível inferir que alguns genes foram silenciados ou foram expressos em níveis muito baixos, em que Cry2Ab não foi expresso por causa de um promotor incompleto, enquanto a expressão de Cry1Ia foi afetada por uma sequência de transposição (RANG et al., 2015). Além das proteínas Cry, outras proteínas patogênicas presentes no genoma anotado não foram identificadas na análise proteômica, sendo elas Cytotoxin K, Bacteriocina, Exoenzima C3 e Alveolisina (RANG et al., 2015).

Com o intuito de compreender melhor a informação genética e o perfil de expressão de proteínas totais, Quan et al. (2016) sequenciou o genoma completo da estirpe *B. thuringiensis* X022, e fez uma análise comparativa com os dados proteômicos realizada na fase de liberação de esporos (LIU et al., 2015b). Dessa forma, enquanto nas sequências genômica foram encontradas as proteínas Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Ab e Vip3A, os dados proteômicos revelaram apenas a expressão de Cry1Ca, Cry1Ac e Cry1Da. Enquanto Cry1Ia e Vip3A não forma detectados na proteômica por serem produzidos na fase vegetativa, a presença das proteínas Cry1Ca e Cry1Da apenas na análise proteômica levou a hipótese de que poderiam estar localizados em regiões com falhas de montagem em plasmídeos, e isso foi confirmado utilizando-se PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Outras proteínas

relacionados com a atividade inseticida, incluindo NHE-A, InhA, quitinase, Hemolisina BL, Hemolisina III, Citotoxina K e uma proteína semelhante a IgE (imunoglobulina E) foram encontradas no genoma, porém apenas NHE-A e a quitinase foram detectados nos dados proteômicos (QUAN, et al., 2016).

Assim o sequenciamento dos genomas de *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* desde estudo permitiu a identificação de importantes toxinas inseticidas e outros genes relacionados com a patogenicidade desta bactéria. Entretanto para obter uma compreensão mais aprofundada sobre o nível de expressão desses genes em diferentes fases de crescimento, a análise dos dados proteômicos dos isolados T0124, T0131, T0137 combinada aos dados genômicos obtidos neste estudo podem ser bastante promissor.

Dessa forma pesquisas futuras utilizando análises proteômicas, poderão adicionar uma interpretação mais precisa das sequências genômicas, proporcionando uma melhor investigação a cerca da diferença de toxicidade apresentada por estes isolados, o que poderia contribuir para o melhoramento ou desenvolvimento de novas estratégias para o controle biológico com esta bactéria.

6. CONCLUSÕES

- A montagem e anotação dos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139 foram satisfatórias, sendo possível realizar todas as análises comparativas;
- A comparação entre os cromossomos T0124, T0131, T0137 e T0139 mostra alta identidade e sintenia entre sequências;
- Os isolados possuem os mesmos plasmídeos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, que quando comparados compartilham dos mesmos genes;
- Apenas os plasmídeos de número 4 contêm genes que codificam toxinas inseticidas;
- Dez sequências de fatores de virulência, assim como proteínas Cry e Cyt, se mostram conservadas nos isolados;
- A análise filogenômica revela a estreita relação entre T0124, T0131, T0137 e T0139 e outros cromossomos da espécie *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*;
- A adição de análises proteômicas, em diferentes fases de crescimento, aos dados genômicos obtidos neste estudo poderão proporcionar uma melhor investigação para a elucidação das diferenças de toxicidade existentes entre os isolados T0124, T0131, T0137.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M. A. F., ALZATE, O., MOHAMMAD, M., MCNALL, R. J., ADANG, M. J., & DEAN, D. H. Introduction of *Culex* toxicity into *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba by protein engineering. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 9, p. 5343-5353, 2003.
- ADANG, M. J.; CRICKMORE, N. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism. *Insect Midgut and Insecticidal Proteins*, v. 47, p. 39, 2014.
- AGUIAR, R. W. MARTINS, E. S., RIBEIRO, B. M., MONNERAT, R. G. Cry10Aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields. *Bt Research*, v. 3, n. 1, 2012.
- ALDEEWAN, A.; ZHANG, Y.; SU, Li. *Bacillus thuringiensis* Parasporins Functions on Cancer Cells. *Int. J. Pure App. Biosci*, v. 2, n. 4, p. 67-74, 2014.
- ALIKHAN, N. F., PETTY, N. K., ZAKOUR, N. L. B., & BEATSON, S. A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC genomics*, v. 12, n. 1, p. 402, 2011.
- ANDERSON, I., SOROKIN, A., KAPATRAL, V., REZNIK, G., BHATTACHARYA, A., MIKHAILOVA, N., ... & D'SOUZA, M. Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology letters*, v. 250, n. 2, p. 175-184, 2005.
- ANDREWS S. 2015. FastQC: a quality-control tool for high-throughput sequence.
- ANDRUP, L.; DAMGAARD, J.; WASSERMANN, K. Identification of a gene (mob 14-3) encoding a mobilization protein from the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid pTX14-3. *Nucleic Acids Research, Oxford*, v. 19, p. 2780, 1991.
- ANDRUP, L., DAMGAARD, J., WASSERMANN, K., BOE, L., MADSEN, S. M., & HANSEN, F. G. Complete nucleotide sequence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid pTX14-3 and its correlation with biological properties. *Plasmid*, v. 31, n. 1, p. 72-88, 1994.
- ANDRUP, L.; JENSEN, G. B.; WICKS, A.; SMIDT, L.; HOFACK, L.; MAHILLON, J. The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes. *Plasmid, San Diego*, v. 49, p. 205-232, 2003.
- ANKARLOO, J., CAUGANT, D. A., HANSEN, B. M., BERG, A., KOLSTØ, A. B., & LÖVGREN, A. Genome stability of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* isolates. *Current microbiology*, v. 40, n. 1, p. 51-56, 2000.
- AOKI, K & CHIGASAKI, Y. Uber des toxin von sog. Sotto-bacillen Mitt. Med. Fak. Kais. Univ. Tokyo. Vol. 14, pp. 59-80, 1915.
- 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, 2013.

ARONSON, A. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, v. 59, n. 3, p. 417-425, 2002.

ARORA, N., SACHDEV, B., GUPTA, R., VIMALA, Y., & BHATNAGAR, R. K. Characterization of a chitin-binding protein from *Bacillus thuringiensis* HD-1. PloS one, v. 8, n. 6, p. e66603, 2013.

BAILLIE, L.; READ, T. D. *Bacillus anthracis*, a bug with attitude!. Current opinion in microbiology, v. 4, n. 1, p. 78-81, 2001.

BARBOSA, L. C. B., FARIAS, D. L., SILVA, I. D. M. G., MELO, F. L., RIBEIRO, B. M., & AGUIAR, R. W. D. S. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* 147, a Brazilian strain with high insecticidal activity. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 110, n. 6, p. 822-823, 2015.

BELTRÃO, H.B.M.; SILVA-FILHA, M.H.N.L. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. FEMS microbiology letters, v. 266, n. 2, p. 163-169, 2006.

BEN-DOV, Eitan. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. Toxins, v. 6, n. 4, p. 1222-1243, 2014.

BERLINER, E. Eber die schlafsucht der Mehlmottenraupe. (Ephesis kuehniella Zell.) undihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Z. ang. Entomology, v. 2, p. 29-56, 1915.

BERLINER, E. Über die schlafsucht der Mehlmottenraupe. Z. Gesante Getreidewesen, v. 3, p. 63-70, 1911

BERRY, C. O'NEIL, S., BEN-DOV, E., JONES, A. F., MURPHY, L., QUAIL, M. A., & PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Applied and environmental microbiology, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.

BOLOTIN, A., GILLIS, A., SANCHIS, V., NIELSEN-LEROUX, C., MAHILLON, J., LERECLUS, D., SOROKIN, A. (). Comparative genomics of extrachromosomal elements in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Research in microbiology, 2016.

BOONSERM, P. Mo, M., Angsuthanasombat, C., & Lescar, J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. Journal of bacteriology, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, 2006.

BOONSERM, P., Davis, P., Ellar, D. J., & Li, J.. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. Journal of molecular biology, v. 348, n. 2, p. 363-382, 2005.

BOURGOUIN, Catherine; KLIER, André; RAPOPORT, Georges. Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Molecular and General Genetics MGG, v. 205, n. 3, p. 390-397, 1986.

- BRAVO, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* d-Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. *Journal of Bacteriology*, v.179, n.9, p. 2793–2801, 1997.
- BRAVO, A., GILL, S. AND SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423–435. 2007.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., e SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.
- BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.
- CAHAN, R.; FRIMAN, H.; NITZAN, Y. Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Microbiology*, 154, 3529–3536, 2008.
- CANTÓN, P. E., REYES, E. Z., DE ESCUDERO, I. R., BRAVO, A., & SOBERÓN, M. Binding of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* Cry4Ba to Cyt1Aa has an important role in synergism. *Peptides*, v. 32, n. 3, p. 595-600, 2011.
- CATANHO, M., DEGRAVE, W. M., MIRANDA, A. B. D., de Miranda, A. B., de Miranda, A. B., Miranda, A. B., ... & de Miranda, A. B. Análise Comparativa de Genomas Procarióticos. *Biocombustíveis: Ciência & Desenvolvimento*, n. 37, p. 20-29, 2007.
- CERQUEIRA, F. B., ALVES, G. B., CORRÊA, R. F. T., MARTINS, É. S., BARBOSA, L. C. B., DO NASCIMENTO, I. R., E DE SOUZA AGUIAR, R. W. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates with a high insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioscience Journal*, v. 32, n. 6, 2016.
- CHAKROUN, M., BANYULS, N., BEL, Y., ESCRICHE, B., & FERRÉ, J.. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 2, p. 329-350, 2016.
- CHALLACOMBE, J. F., ALTHERR, M. R., XIE, G., BHOTIKA, S. S., BROWN, N., BRUCE, D., ... & CLELAND, C. The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* Al Hakam. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 9, p. 3680-3681, 2007.
- CHEN, J., AIMANOVA, K. G., FERNANDEZ, L. E., BRAVO, A., SOBERON, M., & GILL, S. S. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Biochemical Journal*, v. 424, n. 2, p. 191-200, 2009.
- CHENG, F., WANG, J., SONG, Z., CHENG, J. E., ZHANG, D., & LIU, Y. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YC-10, a novel active strain against plant-parasitic nematodes. *Journal of biotechnology*, 210, 17-18, 2015.
- CHERIF, A., BRUSETTI, L., BORIN, S., RIZZI, A., BOUDABOUS, A., KHYAMI-HORANI, H., & DAFFONCHIO, D. Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 6, p. 1108-1119, 2003.

CHOW, E.; SINGH, G. J.; GILL, S. S. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. *Applied and environmental microbiology*, v. 55, n. 11, p. 2779-2788, 1989.

CHUN, J.; RAINEY, F. A. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 64, n. 2, p. 316-324, 2014.

COHEN, S. ALBECK, S., BEN-DOV, E., CAHAN, R., FIRER, M., ZARITSKY, A., & DYM, O. Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. *Journal of molecular biology*, v. 413, n. 4, p. 804-814, 2011.

COHEN, S.; DYM, O., ALBECK, S., BEN-DOV, E., CAHAN, R., FIRER, M., & ZARITSKY, A. High-resolution crystal structure of activated Cyt2Ba monomer from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Journal of molecular biology*, v. 380, n. 5, p. 820-827, 2008.

CORRÊA, R. F. T., ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P., Monnerat, R. G., & Ribeiro, B. Mal. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *PloS one*, v. 7, n. 9, p. e46121, 2012.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B., DAVOLOS, C. C., LEMES, A. R. N., MARUCCI, S. C., LEMOS, M. V. F., FERNANDES, O. A., & DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p. 79-87, 2014.

CRICKMORE, N., BAUM, J., BRAVO, A., LERECLUS, D., NARVA, K., SAMPSON, K., SCHNEPF, E., SUN, M. AND ZEIGLER, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" <http://www.btnomenclature.info/>.2016.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E. S. C. H. E. R. I. C. H. I. A., VAN RIE, J., LERECLUS, D., DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.62, n.3, 807-813, 1998.

DARLING, A. C., B. MAU, F. R. BLATTNER, N. T. Perna. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*, v.14, p.1394-1403, 2004.

DE BARJAC H. AND BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souche de *Bacillus* de type thuringiensis. *Entomophaga* v.7, p.5-31, 1962.

DE BARJAC, H. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* very toxic for mosquitoes; *Bacillus thuringiensis* serotype H-14. *Compte Rendu Académie Sciences Paris Series D*. v. 286, p.797-800,1978.

DE MAAGD, Ruud A. *Bacillus thuringiensis*-based products for insect pest control. In: *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing, p.185-192, 2015.

DE MAAGD, Ruud A.; BRAVO, Alejandra; CRICKMORE, Neil. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DELÉCLUSE, A. Bourgouin, C., Klier, A., & Rapoport, G. Specificity of action on mosquito larvae of *Bacillus thuringiensis israelensis* toxins encoded by two different genes. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 214, n. 1, p. 42-47, 1988.

DOGGETT, N. A., STUBBEN, C. J., CHERTKOV, O., BRUCE, D. C., DETTER, J. C., JOHNSON, S. L., & HAN, C. S. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis strain HD-789. *Genome announcements*, v.1, n.6, p.01023-13. 2013.

DONG, F., ZHANG, S., SHI, R., YI, S., XU, F., & LIU, Z. Ser-substituted mutations of Cys residues in *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa7 exert a negative effect on its insecticidal activity. *Current microbiology*, v. 65, n. 5, p. 583-588, 2012.

DONG, Z., LI, J., ZHENG, J., GENG, C., PENG, D., & SUN, M. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* CTC—A typical strain with high production of S-layer proteins. *Journal of biotechnology*, v.220, p.100-101.2016.

DONOVAN, William P.; DONOVAN, Judith C.; ENGLEMAN, James T. Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *Journal of invertebrate pathology*, v. 78, n. 1, p. 45-51, 2001.

DUBOIS, T., FAEGRI, K., PERCHAT, S., LEMY, C., BUISSON, C., NIELSEN-LEROUX, C., ... & LERECLUS, D. Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS pathogens*, v. 8, n. 4, p. e1002629, 2012.

EKINO, K.; OKUMURA, S.; ISHIKAWA, T.; KITADA, S.; SAITOH, H.; AKAO, T.; OKA, T.; NOMURA, Y.; OHBA, M.; SHIN, T.; MIZUKI, E. Cloning and Characterization of a Unique Cytotoxic Protein Parasporin-5 Produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 Strain. *Toxins*, 2014.

ELLEUCH, J. JAOUA, S., DARRIET, F., CHANDRE, F., TOUNSI, S., & ZGHAL, R. Z. Cry4Ba and Cyt1Aa proteins from *Bacillus thuringiensis israelensis*: interactions and toxicity mechanism against *Aedes aegypti*. *Toxicon*, v. 104, p. 83-90, 2015.

ESTRUCH, J. J., G. W. WARREN, M. A. MULLINS, G. J. NYE, J. A. CRAIG, AND M. G. KOZIEL. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Academic Science*, 93:5389–5394, 1996.

FANG, Y., LI, Z., LIU, J., SHU, C., WANG, X., ZHANG, X., ... & ZHANG, J. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Genetics and Genomics*, v.38, n.12, p.567-576, 2011.

FEDERICI, B.A. (1999). *Bacillus thuringiensis* in Biological Control. In: Handbook of Biological Control. T. Fisher (Ed.) Academic Press (Ed.) 575-593, ISBN 10: 0-12-257305-6.

FEDERICI, B.A.; PARK, H.W.; BIDESHI, D.K. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. *Open Toxinol. J.* 3, 83–100. 2010.

FERNANDEZ L. E., AIMANOVA K. G., GILL S. S., BRAVO A., SOBERON M. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394:77–84. 2006.

FERNANDEZ-LUNA, M. T., LANZ-MENDOZA, H., GILL, S. S., BRAVO, A., SOBERON, M., & MIRANDA-RIOS, J. An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environmental microbiology*, v. 12, n. 3, p. 746-757, 2010.

GALVÃO, P., GITAHY, P. D., VIDAL, M., de ARAUJO, J. L. S., & BALDANI, J. Plasmídios em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica. *Embrapa Agrobiologia-Documents (INFOTECA-E)*. 2009.

GOLDBERG, L. J., & MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*, v.37, n.3, p.355-358. 1977.

GONZÁLEZ, J. M.; DULMAGE, H. T.; CARLTON, B. C. Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*, v. 5, n. 3, p. 351-365, 1981.

GRANT J. R., STOTHARD, P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res*, v.36, p181-184.2008.

GRANT, J. R.; ARANTES, A. S.; STOTHARD, P. Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. *BMC genomics*, v. 13, n. 1, p. 202, 2012.

GUAN, P., AI, P., DAI, X., ZHANG, J., XU, L., ZHU, J., ... & LIU, H. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar Sichuansis strain MC28. *Journal of bacteriology*, v. 194, n. 24, p. 6975-6975, 2012.

GUANGHONG Z., BAILIN H. CVTree3 web server for whole-genome-based and alignment-free prokaryotic phylogeny and taxonomy, *Genomics Proteomics & Bioinformatics*, v.13, p.321-331. 2015.

GUERCHICOFF, A., DELECLUSE, A. & RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis* cyt genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. *Appl. Environ. Microbiol.* v.67, p.1090–1096. 2001.

GUERCHICOFF, R. A. UGALDE, C. P. RUBINSTEIN. Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, *Appl. Environ. Microbiol.* v.63, p.2716–2721, 1997.

GUILLEMET, E., CADOT, C., TRAN, S. L., GUINEBRETIERE, M. H., LERECLUS, D., & RAMARAO, N. The *InhA* metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 1, p. 286-294, 2010.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S.; ALVES, S. B. Bactérias entomopatogênicas. *Controle microbiano de insetos*, v. 2, p. 383-446, 1998.

HAN, S., CRAIG, J. A., PUTNAM, C. D., CAROZZI, N. B., & TAINER, J. A. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 6, n. 10, p. 932-936, 1999.

HE, J., SHAO, X., ZHENG, H., LI, M., WANG, J., ZHANG, Q., ... & YU, Z. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 15, p. 4074-4075, 2010.

HE, J., WANG, J., YIN, W., SHAO, X., ZHENG, H., LI, M., ... & YU, Z. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 13, p. 3407-3408, 2011.

HERGENROTHER, P. J.; MARTIN, S. F. Determination of the kinetic parameters for phospholipase C (*Bacillus cereus*) on different phospholipid substrates using a chromogenic assay based on the quantitation of inorganic phosphate. *Analytical biochemistry*, v. 251, n. 1, p. 45-49, 1997.

HERNÁNDEZ, C. S., MARTÍNEZ, C., PORCAR, M., CABALLERO, P., FERRÉ, J. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. *Journal of invertebrate pathology*, v. 82, n. 1, p. 57-62, 2003.

HOWLADER, M.T.H.; KAGAWA, Y.; SAKAI, H.; HAYAKAWA, T. Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitoicidal Cry4Aa. *J. Biosci. Bioeng.* 2009, 108, 179–183.

HUA G., ZHANG R., ABDULLAH M. A., ADANG M. J. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis* israelensis and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 47:5101–5110. 2008.

HUANG, J., HAN, D., YU, Z., & SUN, M. A novel cryptic plasmid pBMB175 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* YBT-1765. *Archives of microbiology*, v. 188, n. 1, p. 47-53, 2007.

HUANG, S., DING, X., SUN, Y., YANG, Q., XIAO, X., CAO, Z., & XIA, L. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* at different growth phases by using an automated online two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry strategy. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 15, p. 5270-5279, 2012.

Huang, S., Ding, X., Sun, Y., Yang, Q., Xiao, X., Cao, Z., Xia, L. Proteomic analysis of *Bacillus thuringiensis* at different growth phases by using an automated online two-dimensional liquid chromatography-tandem mass spectrometry strategy. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 15, p. 5270-5279, 2012.

IATSENKO, I; CORTON, C., PICKARD, D. J., DOUGAN, G., & SOMMER, R. J. Draft genome sequence of highly nematocidal *Bacillus thuringiensis* DB27. *Genome announcements*, v. 2, n. 1, p. e00101-14, 2014.

ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease). Danihon Sanshi Kaiho, v. 114, p. 1-5, 1901.

JEONG, H., JO, S. H., HONG, C. E., & PARK, J. M. Genome sequence of the endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* strain KB1, a potential biocontrol agent against phytopathogens. *Genome announcements*, v. 4, n. 2, p. e00279-16, 2016.

JEONG, Haeyoung; PARK, Seung-Hwan; CHOI, Soo-Keun. Genome sequence of the acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis strain 4Q7, widely used as a recombination host. *Genome announcements*, v. 2, n. 2, p. e00231-14, 2014.

JIA, N., DING, M. Z., GAO, F., & YUAN, Y. J. (2016). Comparative genomics analysis of the companion mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Bc601 and *Bacillus endophyticus* Hbe603 in bacterial consortium. *Scientific Reports*, 6.

JIA, NAN N., DING, M. Z., GAO, F., & YUAN, Y. J. Comparative genomics analysis of the companion mechanisms of *Bacillus thuringiensis* Bc601 and *Bacillus endophyticus* Hbe603 in bacterial consortium. *Scientific Reports*, v. 6, 2016.

JIMÉNEZ-JUAREZ, N., MUÑOZ-GARAY, C., GÓMEZ, I., GILL, S.S., SOBERÓN, M., BRAVO, A. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. *Peptides*. v.29, p.318-323, 2008.

JOHNSON, S. L., DALIGAULT, H. E., DAVENPORT, K. W., JAISSE, J., FREY, K. G., LADNER, J. T., COYNE, S. R. (2015). Complete genome sequences for 35 biothreat assay-relevant *Bacillus* species. *Genome announcements*, 3(2), e00151-15.

KANDA, K.; NAKASHIMA, K.; NAGANO, Y. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar tolworthi strain Pasteur Institute Standard. *Genome announcements*, v. 3, n. 4, p. e00710-15, 2015.

KATAYAMA, H.; KUSAKA, Y.; YOKOTA, H.; AKAO, T.; KOJIMA, M.; NAKAMURA, O.; MEKADA, E.; MIZUKI, E. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca²⁺ influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca²⁺ concentration in toxin-sensitive cells. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 7742–7752.

KATOH, MISAWA, KUMA, MIYATA 2002 (*Nucleic Acids Res.* 30:3059-3066) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform.

KEARSE, M., MOIR, R., WILSON, A., STONES-HAVAS, S., CHEUNG, M., STURROCK, S., BUXTON, S., COOPER, A., MARKOWITZ, S., DURAN, C., THIERER, T., ASHTON, B., MENTJES, P., & DRUMMOND, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

KHASDAN V, BEN-DOV E, MANASHEROB R, BOUSSIBA S, ZARITSKY A. TOXICITY AND KNOWLES, B. H., AND D. J. ELLAR. 1987. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924:509–518

KIM, M. J., HAN, J. K., PARK, J. S., LEE, J. S., LEE, S. H., CHO, J. I., & KIM, K. S. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus*

cereus and *Bacillus thuringiensis* strains. J Microbiol Biotechnol, v. 25, p. 872-879, 2015.

KITADA, S.; ABE, Y.; MAEDA, T.; SHIMADA, H. Parasporin-2 requires GPI-anchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. Toxicology, v.264, p.80–88, 2009.

KITADA, S.; ABE, Y.; SHIMADA, H.; KUSAKA, Y.; MATSUO, Y.; KATAYAMA, H.; OKUMURA, S.; AKAO, T.; MIZUKI, E.; KUGE, O; SASAGURI, Y. Cytotoxic actions of parasporin-2, an anti-tumor crystal toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Biol. Chem. 2006, 281, 26350–26360.

KRIEG, A. Concerning α -exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. Journal of Invertebrate Pathology, v. 17, n. 1, p. 134-135, 1971.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. Applied and Environmental Microbiology, Washington, US, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.

LEITE, M. D.; AGUIAR, R. W. S. Prospecção de *Bacillus thuringiensis israelensis* com atividade para *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi. Gurupi, p.17-18, 2016. Não publicado.

LEUBER, M., ORLIK, F., SCHIFFLER, B., SICKMANN, A., BENZ, R.. Vegetative insecticidal protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: evidence for oligomer and channel formation. Biochemistry, v. 45, n. 1, p. 283-288, 2006.

LI, J., PANDELAKIS, A.K., ELLAR, D.J. Structure of the mosquitocidal δ -endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. kyushuensis and implications for membrane pore formation. J. Mol. Biol. 257, 129–152. 1996.

LI, M. S., ROH, J. Y., TAO, X., YU, Z. N., LIU, Z. D., LIU, Q., CHOI, J. Y. Cloning and molecular characterization of a novel rolling-circle replicating plasmid, pK1S-1, from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* K1. The Journal of Microbiology, v. 47, n. 4, p. 466-472, 2009.

LI, Q., ZOU, T., AI, P., PAN, L., FU, C., LI, P., & ZHENG, A. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* HS18-1. Journal of biotechnology, v.214, p.61-62. 2015.

LIU, G., SONG, L., SHU, C., WANG, P., DENG, C., PENG, Q., ... & SONG, F. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. Genome announcements, v. 1, n. 2, p. e00080-13, 2013.

LIU, H., BERGMAN, N. H., THOMASON, B., SHALLOM, S., HAZEN, A., CROSSNO, J., YATES, J. Formation and composition of the *Bacillus anthracis* endospore. Journal of bacteriology, v. 186, n. 1, p. 164-178, 2004.

LIU, M., BAYJANOV, J. R., RENCKENS, B., NAUTA, A., SIEZEN, R. J. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC genomics*, v. 11, n. 1, p. 36, 2010.

LIU, X. Y., RUAN, L. F., HU, Z. F., PENG, D. H., CAO, S. Y., YU, Z. N., SUN, M. Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 50, p. 39191-39200, 2010.

LIU, X., RUAN, L., PENG, D., LI, L., SUN, M. E YU, Z. Thuringiensin: um metabolito secundário termoestável de *Bacillus thuringiensis* com atividade inseticida contra uma ampla gama de insetos. *Toxinas*, v. 6, n. 8, p. 2229-2238, 2014.

LIU, X., ZHOU, R., FU, G., ZHANG, W., MIN, Y., TIAN, Y., YANG, Z. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* NBIN-866 with high nematocidal activity. *Genome announcements*, v. 2, n. 3, p. e00429-14, 2014.

LIU, X., ZUO, M., WANG, T., SUN, Y., LIU, S., HU, S., XIA, L. Proteomic analysis of the influence of Cu²⁺ on the crystal protein production of *Bacillus thuringiensis* X022. *Microbial cell factories*, v. 14, n. 1, p. 153, 2015.

LIU, Y., LAI, Q., GÖKER, M., MEIER-KOLTHOFF, J. P., WANG, M., SUN, Y., SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific reports*, v. 5, p. 14082, 2015.

LOEZA-LARA, P. D., BENINTENDE, G., COZZI, J., OCHOA-ZARZOSA, A., BAIZABAL-AGUIRRE, V. M., VALDEZ-ALARCÓN, J. J., & LÓPEZ-MEZA, J. E. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid*, v. 54, n. 3, p. 229-240, 2005.

LOMAN, N. J., CONSTANTINIDOU, C., CHAN, J. Z., HALACHEV, M., SERGEANT, M., PENN, C. W; PALLEEN, M. J. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 9, p. 599-606, 2012.

LOMAN, N. J., MISRA, R. V., DALLMAN, T. J., CONSTANTINIDOU, C., GHARBIA, S. E., WAIN, J., & PALLEEN, M. J. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnology*, v. 30, n. 5, p. 434-439, 2012.

LUKJANCENKO, O.; WASSENAAR, T. M.; USSERY, D. W. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial ecology*, v. 60, n. 4, p. 708-720, 2010.

MACLEAN, D.; JONES, J. DG; STUDHOLME, D. J. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 287-296, 2009.

MANASHEROB, R. ITSKO, M., SELA-BARANES, N., BEN-DOV, E., BERRY, C., COHEN, S., & ZARITSKY, A. Cyt1Ca from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: production in *Escherichia coli* and comparison of its biological activities with those of other Cyt-like proteins. *Microbiology*, v. 152, n. 9, p. 2651-2659, 2006.

MANCEVA, S.D., PUSZTAI-CAREY, M., RUSSO, P.S., BUTKO, P.A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Biochem.*, v.44, p.589–597, 2005.

MARCON, J., TAKETANI, R. G., DINI-ANDREOTE, F., MAZZERO, G. I., SOARES, F. L., MELO, I. S.; ANDREOTE, F. D. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain BrMgv02-JM63, a chitinolytic bacterium isolated from oil-contaminated mangrove soil in Brazil. *Genome announcements*, v. 2, n. 1, p. e01264-13, 2014.

MEDINI, D., DONATI, C., TETTELIN, H., MASIGNANI, V., & RAPPUOLI, R. The microbial pan-genome. *Current opinion in genetics & development*, v. 15, n. 6, p. 589-594, 2005.

METZKER, Michael L. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, v. 11, n. 1, p. 31-46, 2010.

MIRA, A., MARTÍN-CUADRADO, A. B., D'AURIA, G., & RODRÍGUEZ-VALERA, F. The bacterial pan-genome: a new paradigm in microbiology. *International Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 45-57, 2010.

MITANI, K & WATARI, J. A new method to isolate the toxin of *Bacillus sotto ishiwata* by passing through a bacterial filter and a preliminary report on the toxic action of this toxin to the silkworm larvae. *Archi Gensanshu Serzojo Hokoku*. v. 3, p. 33-42. 1916.

MIZUKI, E., PARK, Y. S., SAITOH, H., YAMASHITA, S., AKAO, T., HIGUCHI, K., & OHBA, M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, v. 7, n. 4, p. 625-634, 2000.

MONNERAT, R., PEREIRA, E., TELES, B., MARTINS, E., PRAÇA, L., QUEIROZ, P., e SOARES, C. M. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. *Journal of invertebrate pathology*, v. 121, p. 70-73, 2014.

MONNERAT, R., PEREIRA, E., TELES, B., MARTINS, E., PRAÇA, L., QUEIROZ, P., e SOARES, C. M. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. *Journal of invertebrate pathology*, v. 121, p. 70-73, 2014.

MURAWSKA, E., FIEDORUK, K., BIDESHI, D. K., & SWIECICKA, I. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strain IS5056, an isolate highly toxic to *Trichoplusia ni*. *Genome announcements*, v. 1, n. 2, p. e00108-13, 2013.

NAGAMATSU, Y.; OKAMURA, S.; SAITOU, H.; AKAO, T.; MIZUKI, E. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 494– 498, 2010.

NARANJO, M., DENAYER, S., BOTTELDOORN, N., DELBRASSINNE, L., VEYS, J., WAEGENAERE, J., & DIERICK, K. Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *Journal of clinical microbiology*, v. 49, n. 12, p. 4379-4381, 2011.

NISNEVITCH, M. COHEN, S., BEN-DOV, E., ZARITSKY, A., SOFER, Y., & CAHAN, R. Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis* israelensis: activation by putative endogenous

protease. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 344, n. 1, p. 99-105, 2006.

NORMAND R, YANAI I. An introduction to high-throughput sequencing experiments: design and bioinformatics analysis. *Methods Mol Biol.* 2013; 1038:1-26.

OHBA, M., MIZUKI, E., UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticanc. Res.* v.29, p.427-434, 2009.

OHBA, M., MIZUKI, E., UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticanc. Res.* v.29, p.427-434, 2009.

OKUMURA, S., OHBA, M., MIZUKI, E., CRICKMORE, N., CÔTÉ, J.-C., NAGAMATSU, Y., KITADA, S., SAKAI, H., HARATA, K. AND SHIN, T. "Parasporin nomenclature" (2010) <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/>.

OTIENO-AYAYO, Z. N., ZARITSKY, A., WIRTH, M. C., MANASHEROB, R., KHASDAN, V., CAHAN, R., & BEN-DOV, E. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environmental microbiology*, v. 10, n. 9, p. 2191-2199, 2008.

PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., & CABALLERO, P. Draft genome sequences of two *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a putative 41.9-kDa insecticidal toxin. *Toxins*, v. 6, n. 5, p. 1490-1504, 2014.

PALMA, L., MUÑOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PALMA, L., MUÑOZ, D., MURILLO, J., & CABALLERO, P. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *tolworthi* strain Na205-3, an isolate toxic for *Helicoverpa armigera*. *Genome announcements*, v. 2, n. 2, p. e00187-14, 2014.

PÉREZ, C. Fernandez, L. E., Sun, J., Folch, J. L., Gill, S. S., Soberón, M., & Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 51, p. 18303-18308, 2005.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PINTO, L. M. N., BERLITZ, D. L., CASTILHOS-FORTES, R., & FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia. Ciência e Desenvolvimento*, v.11, n.38, p.24-31, 2010.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociencia*, v. 7, n. 2, p. 1-9, 2003.

PRAÇA, L. B., MARTINS, E., MELATTI, V. M., & MONNERAT, R. G. (2007). *Bacillus thuringiensis* Berliner (EUBACTERIALES: BACILLACEAE): aspectos gerais, modo de ação e utilização. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos.

PROMDONKOY, B., AND ELLAR, D. J. (2000) Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 350, 275– 282.

PROMDONKOY, B., ELLAR, D.J., 2003. Investigation of the poreforming mechanism of a cytolytic d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 374, 255–259.

PROMDONKOY, B.; RUNGROD, A.; PROMDONKOY, P.; PATHAICHINDACHOTE, W.; KRITTANAI, C.; PANYIM, S. Amino acid substitutions in α A and α C of Cyt2Aa2 alter hemolytic activity and mosquito-larvicidal specificity. *J. Biotech.* 2008, 133, 287–293.

QUAN, M., XIE, J., LIU, X., LI, Y., RANG, J., ZHANG, T., DING, X. Comparative Analysis of Genomics and Proteomics in the New Isolated *Bacillus thuringiensis* X022 Revealed the Metabolic Regulation Mechanism of Carbon Flux Following Cu²⁺ Treatment. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.

RAMBAUT A: Tree Figure Drawing Tool, version 1.4.0. tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree. 2012.

RAMÍREZ-LEPE, Mario; RAMÍREZ-SUERO, Montserrat. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. INTECH Open Access Publisher, 2012.

RANG, J., HE, H., WANG, T., DING, X., ZUO, M., QUAN, M., e XIA, L. Comparative analysis of genomics and proteomics in *Bacillus thuringiensis* 4.0718. *PloS one*, v. 10, n. 3, p. e0119065, 2015.

RASKO, DAVID A. RASKO, D. A., ALTHERR, M. R., HAN, C. S., & RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS microbiology reviews*, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

RAYMOND, B., Johnston, P. R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., & Crickmore, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?. *Trends in microbiology*, v. 18, n. 5, p. 189-194, 2010.

REYES-RAMÍREZ, A.; IBARRA, J. E. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 1, p. 125-129, 2008.

RIBEIRO, T. P., ARRAES, F. B. M., LOURENÇO-TESSUTTI, I. T., SILVA, M. S., LISEI-DE-SÁ, M. E., LUCENA, W. A., ALVES-FERREIRA, M. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. *Plant Biotechnology Journal*, 2017.

RIVERA, A. M. G.; PRIEST, F. G. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. *Systematic and applied microbiology*, v. 26, n. 2, p. 254-261, 2003.

RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; RUIZ DE ESCUDERO, I.; CANTON, P.E.; MUNOZ-GARAY, C.; PEREZ, C.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. The amino- and carboxyl-terminal fragments of the *Bacillus thuringiensis* Cyt1Aa toxin have differential roles in toxin oligomerization and pore formation. *Biochemistry*, v. 50, n. 3, p. 388-396, 2010.

RUSCONI, B., CHEN, Y., KOENIG, S. S., EL-HELOW, E. R., & EPPINGER, M. Genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain Btm27, an Egyptian isolate highly toxic to cotton leafworm. *Genome announcements*, v. 3, n. 3, p. e00446-15, 2015.

SAMPSON, M. N.; GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*, v. 144, n. 8, p. 2189-2194, 1998.

SANAHUJA, G., BANAKAR, R., TWYMAN, R. M., CAPELL, T., & CHRISTOU, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant biotechnology journal*, 9(3), 283-300.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N. V., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., DEAN, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.

SHEPPARD, A. E., POEHLEIN, A., ROSENSTIEL, P., LIESEGANG, H., & SCHULENBURG, H. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain 407 Cry. *Genome announcements*, v. 1, n. 1, p. e00158-12, 2013.

SHI, Y., MA, W., YUAN, M., SUN, F., & PANG, Y. Cloning of vip1/vip2 genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, v. 23, n. 4, p. 501, 2007.

SOBERÓN, M. Fernández, L. E., Pérez, C., Gill, S. S., & Bravo, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. *Toxicon*, v. 49, n. 5, p. 597-600, 2007.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. *Cellular and molecular life sciences*, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

SOROKIN, A., CANDELON, B., GUILLOUX, K., GALLERON, N., WACKEROW-KOUZOVA, N., EHRLICH, S. D., SANCHIS, V. Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 2, p. 1569-1578, 2006.

STEIN, C. JONES, G. W., CHALMERS, T., & BERRY, C. Transcriptional analysis of the toxin-coding plasmid pBtoxis from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Applied and environmental microbiology*, v. 72, n. 3, p. 1771-1776, 2006.

STRAUB, S. C., FISHBEIN, M., LIVSHULTZ, T., FOSTER, Z., PARKS, M., WEITEMIER, K.; LISTON, A. Building a model: developing genomic resources for common milkweed (*Asclepias syriaca*) with low coverage genome sequencing. *BMC genomics*, v. 12, n. 1, p. 211, 2011.

TANG, H. Genome Assembly, Rearrangement, and Repeats. *Chem. Rev.*, v. 107, p.3391-3406, 2007.

ILLUMINA. MiSeq System User Guide. Disponível em: >http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq.html< Acessadi em 15 de setembro de 2016.

THIERY, I.; DELECLUSE, A.; TAMAYO, M.C.; ORDUZ, S. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 468–473.

THOMAS, W.E. & ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. israelensis crystal-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science* 60:181–197. 1983.

VAN DER AUWERA, G. A., FELDGARDEN, M., KOLTER, R., e MAHILLON, J. Whole-genome sequences of 94 environmental isolates of *Bacillus cereus* sensu lato. *Genome announcements*, v. 1, n. 5, p. e00380-13, 2013.

VARANI, A. M., LEMOS, M. V., FERNANDES, C. C., LEMOS, E. G., ALVES, E. C., DESIDÉRIO, J. A. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* var. thuringiensis strain T01-328, a Brazilian isolate that produces a soluble pesticide protein, Cry1Ia. *Genome announcements*, v. 1, n. 5, p. e00817-13, 2013.

VIDAL-QUIST, J. C.; CASTAÑERA, P.; GONZÁLEZ-CABRERA, J. Cyt1Aa protein from *Bacillus thuringiensis* (Berliner) serovar israelensis is active against the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata* (Wiedemann). *Pest management science*, v. 66, n. 9, p. 949-955, 2010.

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

VILAS-BOAS, G., SANCHIS, V., LERECLUS, D., LEMOS, M. V. F., & BOURGUET, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 1414-1424, 2002.

WANG, A., PATTEMORE, J., ASH, G., WILLIAMS, A., & HANE, J. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain DAR 81934, which exhibits molluscicidal activity. *Genome announcements*, v. 1, n. 2, p. e00175-12, 2013. (a)

WANG, P., ZHANG, C., GUO, M., GUO, S., ZHU, Y., ZHENG, J., ... & SUN, M. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YBT-1518, a typical strain with high toxicity to nematodes. *Journal of biotechnology*, v. 171, p. 1-2, 2014.

WANG, Y., COLEMAN-DERR, D., CHEN, G., GU, Y. Q. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic acids research*, v. 43, n. W1, p. W78-W84, 2015.

WANG, Y., PENG, D., DONG, Z., ZHU, L., GUO, S., & SUN, M. Cloning and analysis of a large plasmid pBMB165 from *Bacillus thuringiensis* revealed a novel plasmid organization. *PLoS one*, v. 8, n. 12, p. e81746, 2013 (b).

WARREN, G.W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p 109 –121. In Carozzi NB, Koziel M (ed), *Advances in insect control, the role of transgenic plants*. Taylor & Francis Ltd, London, United Kingdom. 1997.

WIRTH M. C.; GEORGHIOU G. P.; FEDERECI B. A. CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:10536–40.

WU, H.J.; WANG, A. HJ; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current opinion in chemical biology*, v. 12, n. 1, p. 93-101, 2008.

WU, J., ZHAO, F., BAI, J., DENG, G., QIN, S., & BAO, Q. Evidence for positive Darwinian selection of vip gene in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 34, n. 7, p. 649-660, 2007.

XU, C. WANG, B. C., YU, Z., SUN, M. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, v. 6, n. 9, p. 2732-2770, 2014.

XU, J. Next-generation sequencing: Current technologies and applications. Norfolk, England: Caister Academic Press, 2014.

YAMASHITA, S.; KATAYAMA, H.; SAITOH, H.; AKAO, T.; PARK, Y.S.; MIZUKI, E.; OHBA, M.; ITO, A. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *J. Biochem.*, 138, 663–672, 2005.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREIN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein VIP3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, US, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.

ZEQUI, J. A.; LOPES, J.; SANTOS, F. P. Controle de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Culex* (*Culex quinquefasciatus*) Say, 1823 através de formulados contendo *Bacillus thuringiensis israelensis* em temperaturas controladas. *EntomoBrasilis*, v. 4, n. 3, p. 130-134, 2011.

ZHANG, Qi; HUA, Gang; ADANG, Michael J. Effects and mechanisms of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins for mosquito larvae. *Insect Science*, 2016.

ZHU, J., ZHANG, Q., CAO, Y., LI, Q., ZHU, Z., WANG, L., LI, P. (2016). The complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar Hailuosis YWC2-8. *Journal of biotechnology*, 219, 38-39.

ZHU, Y., SHANG, H., ZHU, Q., JI, F., WANG, P., FU, J., ... & ZHU, L. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar finitimus strain YBT-020. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 9, p. 2379-2380, 2011.

ZHUANG, M., OLTEAN, D.I., GOMEZ, I., PULLIKUTH, A., K., SOBERON, M., BRAVO, A. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* v.277, p.13863–13872, 2002.

ZORZETTI, J., RICIETTO, A. P., DA SILVA, C. R., WOLF, I. R., VILAS-BÔAS, G. T., NEVES, P. M., ... & VILAS-BOAS, L. A. Genome sequence of the mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain BR58, a biopesticide product effective against the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Genome announcements*, v. 3, n. 6, p. e01232-15, 2015.

ZWICK, M. E., JOSEPH, S. J., DIDELOT, X., CHEN, P. E., BISHOP-LILLY, K. A., STEWART, A. C., ... & SOZHAMANNAN, S. Genomic characterization of the *Bacillus*

Bacillus cereus sensu lato species: backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome research*, v. 22, n. 8, p. 1512-1524, 2012.

8. ANEXO

Anexo: Cálculo da cobertura média para *reads* nos genomas dos isolados T0124, T0131, T0137 e T0139. (NORMAND e YANAI, et al., 2013).

$$\text{COBERTURA MÉDIA} = \frac{\text{Tamanho dos reads} + \text{Número de reads}}{\text{Tamanho do genoma}}$$