

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTRATÉGIAS PARA USO DE GENES INSETICIDAS EM *BACILLUS*
THURINGIENSIS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ANÁLISES
GENÔMICAS.**

BEATRIZ BALDIN

PATOS DE MINAS

2025

BEATRIZ BALDIN

**ESTRATÉGIAS PARA USO DE GENES INSETICIDAS EM *BACILLUS*
THURINGIENSIS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ANÁLISES
GENÔMICAS.**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia do
Instituto de Biotecnologia da
Universidade Federal de Uberlândia,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia**

Área de concentração: Biociências.

**Orientador: Aulus Estevão Anjos de Deus
Barbosa**

PATOS DE MINAS

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B177 2025	Baldin, Beatriz, 1998- ESTRATÉGIAS PARA USO DE GENES INSETICIDAS EM BACILLUS THURINGIENSIS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA E ANÁLISES GENÔMICAS. [recurso eletrônico] / Beatriz Baldin. - 2025. Orientador: Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biotecnologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.390 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Biotecnologia. I. Barbosa, Aulus Estevão Anjos de Deus, 1979- , (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biotecnologia. III. Título. CDU: 60
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Rua Vereador Chico Filgueira, 33, Bloco Alfa, Sala 319 - Bairro Caiçaras, Patos de Minas-MG, CEP 38702-178

Telefone: (34) 3823-3714 - Ramal 226 - ppgbiotec@ibtec.ufu.br

**ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO**

Programa de Pós-Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico				
Data:	06 de junho de 2025	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	16:40
Matrícula do Discente:	42312BTC006				
Nome do Discente:	Beatriz Baldin				
Título do Trabalho:	Estratégias para uso de genes inseticidas em <i>Bacillus thuringiensis</i> : expressão heteróloga e análises genômicas.				
Área de concentração:	Biociências				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia aplicada ao melhoramento genético e produção animal e vegetal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Bacillus thuringiensis geneticamente modificado para o controle de pragas do tomateiro				

Reuniu-se, por webconferência via Microsoft Teams, aplicativo padrão da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, composta pelos professores Doutores: Cristine Chaves Barreto (IBTEC/UFU), Simoni Campos Dias (Universidade Católica de Brasília) e Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa (IBTEC)/UFU, presidente da Banca.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa (IBTEC)/UFU, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata. Agradeceu a presença do público e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta ocorreram conforme as normas do Programa.

A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem, sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir a candidata. Encerrada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar, foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/06/2025, às 16:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristine Chaves Barreto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/06/2025, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simoni Campos Dias, Usuário Externo**, em 06/06/2025, às 18:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6395803** e o código CRC **916674BD**.

FOLHA DE APROVAÇÃO

BEATRIZ BALDIN

**Estratégias para uso de genes inseticidas em *Bacillus thuringiensis*:
expressão heteróloga e análises genômicas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia do Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biociências

Banca Examinadora

Presidente da banca (orientador(a)): Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa

Universidade Federal de Uberlândia

Membro: Profa. Dra. Simoni Campos Dias

Universidade Católica de Brasília

Membro: Profa. Dra. Cristine Chaves Barreto

Universidade Federal de Uberlândia

Data da defesa: 06/06/2025

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação, de modo que o orientador atesta que as sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do Programa foram contempladas.

Auxílio Financeiro

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, com o título *Bacillus thuringiensis* geneticamente modificado para o controle de múltiplas pragas do tomateiro. O projeto está registrado com o código APQ-00598-18.

A autora da dissertação, Beatriz Baldin, recebeu bolsa da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes.

Resumo

A demanda por métodos mais sustentáveis de controle de pragas agrícolas tem impulsionado o desenvolvimento de bioinseticidas baseados em *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria capaz de produzir proteínas inseticidas altamente específicas e biodegradáveis. No entanto, o espectro restrito de ação de algumas toxinas e o surgimento de populações de insetos resistentes tornam necessário expandir a diversidade de proteínas inseticidas disponíveis. Nesta dissertação, foram avaliadas estratégias complementares para ampliar o uso de genes inseticidas em Bt, combinando análises genômicas de cepas para prospecção de novos genes com a transformação genética visando à expressão heteróloga de múltiplas toxinas. Foram analisados 25 genomas de Bt disponíveis no GenBank-NCBI, revelando que 52% das cepas possuem genes inseticidas conhecidos, enquanto 48% não apresentaram genes identificáveis, sugerindo diversidade ainda inexplorada. Foram identificadas 64 toxinas, majoritariamente do tipo Cry, com diferentes distribuições em cromossomos e plasmídeos, destacando cepas promissoras como IBL200, NB-176, BMP144 e C15 para desenvolvimento de novos bioinseticidas. Em uma segunda etapa, foi realizada a transformação genética da cepa Bt subsp. *kurstaki* HD-1 com um cassete policistônico contendo os genes *cyt2Aa*, *cry3Bb1* e *cry9Ca1*, construído no plasmídeo pHT01 e propagado em *Escherichia coli* antes da transferência para Bt por eletroporação. Protocolos para preparação de células competentes e eletroporação foram otimizados, e a integração dos genes foi confirmada por PCR. A transformação bem-sucedida da cepa HD-1 com múltiplos genes inseticidas representa um passo importante para o desenvolvimento de bioinseticidas com espectro ampliado de ação, contribuindo para o manejo integrado de pragas do tomateiro com menor dependência de inseticidas químicos.

Palavras-chave: bioinseticidas, genômica comparativa, eletroporação, proteínas inseticidas.

Abstract

The demand for more sustainable methods of agricultural pest control has driven the development of bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* (Bt), a bacterium capable of producing highly specific and biodegradable insecticidal proteins. However, the narrow spectrum of action of some toxins and the emergence of resistant insect populations highlight the need to expand the diversity of available insecticidal proteins. This dissertation evaluated complementary strategies to enhance the use of insecticidal genes in Bt by combining genomic analyses of strains for the discovery of new genes with genetic transformation aimed at heterologous expression of multiple toxins. Twenty-five Bt genomes available in the GenBank-NCBI database were analyzed, revealing that 52% of the strains carry known insecticidal genes, while 48% showed no identifiable genes, suggesting unexplored diversity. A total of 64 toxins were identified, mainly Cry proteins, with diverse chromosomal and plasmid distributions, highlighting promising strains such as IBL200, NB-176, BMP144, and C15 for the development of new bioinsecticides. In a second stage, genetic transformation of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 was performed using a polycistronic cassette containing the *cyt2Aa*, *cry3Bb1*, and *cry9Ca1* genes, cloned into the pHT01 plasmid and propagated in *Escherichia coli* before transfer to Bt by electroporation. Protocols for competent cell preparation and electroporation were optimized, and gene integration was confirmed by PCR. The successful transformation of the HD-1 strain with multiple insecticidal genes represents an important step toward developing bioinsecticides with an expanded spectrum of action, supporting integrated pest management for tomato crops with reduced reliance on chemical insecticides.

Keywords: bioinsecticides, comparative genomics, electroporation, insecticidal proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIB: Produto Interno Bruto

Bt: *Bacillus thuringiensis*

PFT: toxinas formadoras de poro

Cry: proteína cristal

Cyt: toxina citotóxica

Vip: proteína inseticida vegetativa

Mpp: major pore-forming protein

Mtx: toxina mosquitocida

ETX: toxina epsilon

ICPS: Proteínas cristalinas inseticidas

3D-Cry: toxina cristal de três domínios

E. coli: *Escherichia coli*

pb: pares de bases

rpm: rotação por minuto

LB: Luria Bertani

µl: microlitros

ml: mililitros

PCR: reação em cadeia da polimerase

DNA: ácido desoxirribonucleico

Sumário

Capítulo I	1
1. Fundamentação Teórica	1
1.1 Bioinseticidas e <i>Bacillus thuringiensis</i>	2
1.2 Análises Genômicas	12
2. Referências Bibliográficas	13
3. Objetivos	20
Capítulo II	21
4. INTRODUÇÃO	23
5. METODOLOGIA	24
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSSÃO	33
8. REFERÊNCIAS	39
Capítulo III	48
1. INTRODUÇÃO	51
2. METODOLOGIA	53
2.1 Vetor de expressão e cepas	53
2.2 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> e transformação	55
2.3 Extração de plasmídeo	56
2.4 Preparo de células competentes de Bt HD-1	56
2.5 Confirmação da transformação por PCR	57
3. RESULTADOS	58
3.1 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	58
3.2 Transformação da Bt HD-1	60
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

CAPÍTULO I

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A agricultura desempenha um papel fundamental na economia brasileira, contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) do país. Em 2024, o agronegócio representou 23,2% do PIB nacional, totalizando R\$ 2,72 trilhões. Desse montante, R\$ 1,9 trilhão corresponderam ao ramo agrícola. Apesar de uma leve redução em relação aos 23,5% registrados em 2023, o setor manteve uma participação expressiva na economia brasileira, segundo dados obtidos pela Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) e o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea). Esses dados evidenciam a importância contínua da agricultura para a economia do Brasil, destacando o agronegócio como um dos principais pilares do desenvolvimento econômico nacional. De acordo com dados fornecidos pelas Nações Unidas (ONU), estimasse que a população mundial pode alcançar 9,6 bilhões de pessoas ainda nesse século. Espera-se que, até 2050, a demanda por alimentos aumentará de 59% para 98%, sendo necessário que a produção de alimentos acompanhe este aumento a partir da produtividade de culturas mundialmente (Tomar et al., 2024).

Em contrapartida, a alta produção agrícola é constantemente prejudicada devido a ação de insetos-praga, principalmente da ordem lepidóptera (Singh et al., 2021). Anualmente, doenças e insetos pragas são responsáveis por cerca de 20 – 40% das perdas agrícolas (Tomar et al., 2024). Como forma de combater os prejuízos provocados por insetos-praga e para proteger as culturas agrícolas, inseticidas têm sido usados em larga escala e de forma indiscriminada, gerando problemas de saúde pública e ambiental (Januário et al., 2021). Considerado como país destaque na utilização de agroquímicos,

devido a sua elevada produtividade de alimentos e extensão territorial, o Brasil faz uso, praticamente sem controle, desses produtos agroquímicos (Rico; Cavichioli, 2018).

Devido as suas propriedades tóxicas estes inseticidas podem causar contaminação dos solos e águas, se acumular na cadeia alimentar, proporcionar o aparecimento de doenças em humanos (Januário et al., 2021), ocasionar o surgimento de populações de pragas resistentes, o aparecimento de novos organismos pragas e gerar desequilíbrio biológico pela eliminação/diminuição dos inimigos naturais (VAN LENTEREN et al., 2018). Em consequência aos diversos problemas envolvendo o uso dos defensivos agrícolas e o aumento de espécies de insetos consideradas pragas, métodos que substituem os derivados agroquímicos e que apresentam níveis de sustentabilidade ambiental ao mesmo tempo que garantem níveis ideais de proteção das culturas são necessários (Padmakumar et al., 2023).

1.1 Bioinseticidas e *Bacillus thuringiensis*

Como alternativa aos agroquímicos convencionais, os bioinseticidas ou pesticidas biológicos, tem se mostrado a opção eficaz no manejo de pragas e na produção agrícola sustentável. Estes biopesticidas são produtos naturais a base de organismos vivos como plantas, minerais, nematoides e microrganismos que incluem bactérias, fungos e vírus, que podem ser aplicados como substituintes ao uso de pesticidas químicos, devido sua ação eficaz no manejo de pragas e na geração de produtos agrícolas sustentáveis (Samada; Tambunan, 2020). Os biopesticidas apresentam diversas vantagens como alta seletividade contra pragas específicas, redução do risco contra organismos não alvo, não são nocivos contra seres humanos, não causam o desequilíbrio ecológico ao meio ambiente e possuem custo de produção reduzido (Marín-Sáez et al., 2023).

Entre os agentes de controle biológico utilizados como bioinseticidas, as bactérias *Bacillus thuringiensis* (Bt) são excelentes candidatas, se destacando devido à sua

capacidade de sintetizar toxinas ou substâncias inseticidas que são utilizadas em pulverizações ou como genes expressos em culturas transgênicas (Soe et al., 2023). A ação tóxica das Bts tem ampla interferência contra diversos organismos, mas ocorre principalmente contra insetos (Doolotkeldieva et al., 2018). Os genes expressos por Bts são a contribuição mais importante para o controle de pragas no ramo da biotecnologia (Yao et al., 2023).

Diferentemente do que se acredita, o uso das bactérias como agentes no controle de pragas não é recente. Os bioinseticidas produzidos pelas Bt são os mais antigos já comercializados e sua primeira preparação comercial foi realizada no ano de 1938. Porém, apenas com a produção de plantas transgênicas de algodão, transformados com genes de proteínas inseticidas de Bt, no final da década de 1990, que sua ação e utilização passou a ter mais visibilidade como agente eficiente (Heckel, 2020). Atualmente, os produtos biológicos comercializados, que apresentam como constituintes ativos as bactérias Bt, equivalem a um percentual de 90% da indústria de biopesticidas devido a sua especificidade para diferentes organismos-alvo (Singh et al., 2021). No último século, as Bt são consideradas como o biopesticida de maior sucesso no mercado, tendo suas formulações pulverizadas representando mais de 424 milhões de dólares, correspondendo quase a metade do valor de biopesticidas microbianos vendidos mundialmente em torno de 807 milhões de dólares (Jouzani; Valijanlian; Sharafi, 2017).

B. thuringiensis são bactérias gram-positivas, formadoras de esporos que apresentam atividade entomopatogênicas com capacidade de produzir inclusões cristalinas parasporais (Bravo; Gill; Soberón, 2007a). Estas bactérias sintetizam diferentes proteínas inseticidas durante diferentes fases de crescimento (Soberón; Monnerat; Bravo, 2016). Devido à presença destas proteínas inseticidas, vários estudos têm demonstrado a eficiência das Bt no controle de pragas, incluindo lepidópteros de

grande importância e outras diversas ordens de insetos incluindo Díptera, Coleóptera, Himenóptera e Hemíptera. As *Bt* têm sido isoladas de diferentes habitats como solo, água e plantas (Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020). Essas bactérias apresentam como vantagem a alta especificidade das suas toxinas, são inofensivas para seres humanos e outros organismos, e não contaminam o ambiente devido a sua característica biodegradável (Bravo; Gill; Soberón, 2007a). As proteínas inseticidas formadas por inclusões cristalinas após a esporulação são as delta-endotoxinas que compreendem duas famílias multigênicas, as proteínas cristalinas Cry e as proteínas citológicas Cyt que fazem parte da classe de toxinas formadoras de poro (PFT) (Bravo et al., 2011; Gómez et al., 2007). Além das delta-endotoxinas as *Bt* também podem sintetizar outras classes importantes de proteínas com características inseticidas como as proteínas inseticidas vegetativas denominadas vip, produzidas durante a fase vegetativa, e as proteínas inseticidas secretadas denominadas Mpp (Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020).

A ação das bactérias *Bt* dependem da ativação das toxinas inseticidas durante o processo patogênico (Bravo et al., 2011). As proteínas Cry e Cyt são ingeridas na forma de protoxina pelos insetos durante sua fase larval e, devido a ação digestiva do inseto, são convertidas em polipeptídios menores e ativos que se ligam a membrana das células epiteliais do intestino médio. As toxinas aderidas a membrana do intestino eventualmente formam poros que favorecem a entrada de água na célula causando seu inchaço e lise. A morte celular das células do intestino médio do inseto causa a interrupção da sua alimentação e conseqüentemente a sua subsequente morte (figura 1) (Bobrowski et al., 2003; Heckel, 2020).

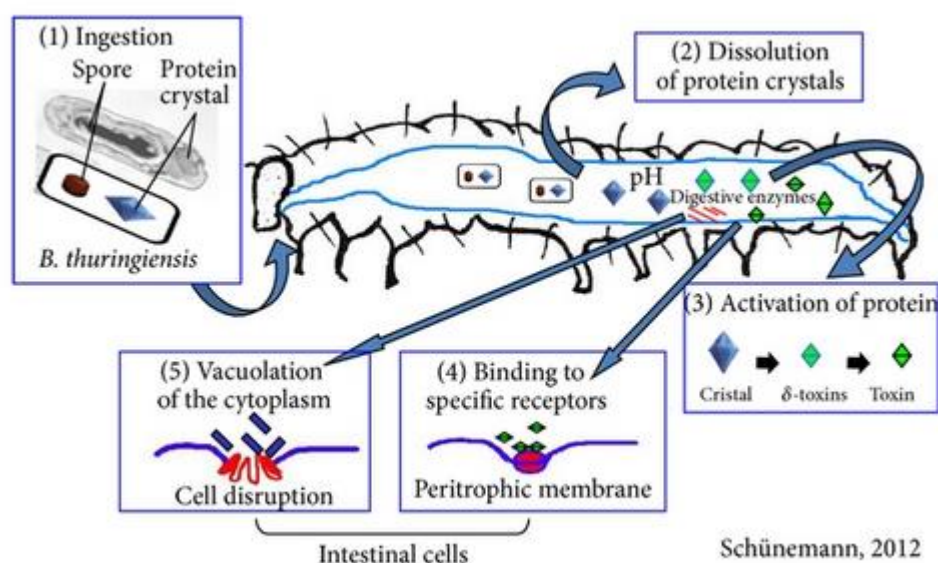


Figura 1: Modo de ação de Bt em lepidópteros (1) Ingestão de bactérias; (2) Solubilização dos cristais; (3) Ativação de proteínas; (4) Ligação de proteínas aos receptores; (5) Formação de poros da membrana e lise de células. Fonte: Modificado de SCHÜNEMANN; KNAAK; FIUZA, 2014).

As bactérias Bt englobam uma ampla diversidade de subespécies, distinguidas por características filogenéticas e genes inseticidas, incluindo diferentes cepas e sorotipos (Jouzani; Valijanian; Sharafi, 2017). Entre as cepas de Bt com importância inseticida, a que se destaca é a *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) em particular devido aos seus corpos paraporaís com ação tóxica contra lepidópteros, representando um dos bioinseticidas mais eficazes utilizados mundialmente (Eleazar Barboza-Corona et al., 2014). Conforme relatado por AKHTAR et al. (2021) é necessário que ocorra uma alta formação de esporos e cristais para que a proteína tenha maior eficiência quando usada como inseticida nos campos de culturas, para que a proteína seja estável a esporulação é um fator chave para que promotores induzam a sua síntese adequadamente (AKHTAR et al., 2021).

Adicionalmente, a engenharia genética se torna uma alternativa para que as cepas de Bt possam ter uma maior eficácia contra os insetos-alvo, ampliando seu espectro de ação inseticida para culturas específicas como também melhorando a persistência em plantas. Neste sentido, alguns métodos da engenharia genética podem ser utilizados para que as cepas de Bt se tornem mais eficazes como a recombinação genética e a transformação da bactéria por meio da eletroporação (Sansinenea; Vázquez; Ortiz, 2010).

1.1.1 Proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*

As bactérias Bt, consideradas atualmente como o bioinseticida de maior eficácia contra diferentes pragas de insetos, produzem diferentes proteínas tóxicas inseticidas, e cada proteína difere no seu modo de síntese. Enquanto algumas delas são sintetizadas durante a fase de esporulação, se acumulando em cristais parasporais conhecidas como Cry e Cyt, outras proteínas denominadas de vip e Mpp são secretadas durante a fase vegetativa de seu crescimento. As inclusões cristalinas parasporais compostas por Cry e Cyt podem ocupar até 30% da célula, sendo as proteínas Cry o principal fator de virulências das bactérias Bt (Portela-Dussán; Chaparro-Giraldo; Alejandro López-Pazos, 2013). Aproximadamente, mais de 846 genes Cry e Cyt já foram descobertos até o ano de 2018 (Peng; Yu; Song, 2019).

1.1.2 Genes Cry

As proteínas Cry pertencem ao grupo de classificação de proteínas pesticidas de patógenos bacterianos e possuem 79 subfamílias e mais de 700 sequências de gene, com patogenicidade contra insetos e nematoides. *B. thuringiensis* são usados como biopesticidas a mais de 100 anos, porém, foi apenas nos últimos 25 anos que seus genes Cry passaram a ser usados no desenvolvimento de culturas transgênicas devido seu

espectro restrito de ação pesticida (Endo, 2022). As proteínas Cry são proteínas cristalinas inseticidas (ICPs) produzidas durante a fase de esporulação, apresentando diversificação na forma de seus cristais. Com base na identidade de sequência de aminoácidos, as mais de 700 sequências do gene Cry foram classificadas em 70 grupos distintos (cry1, cry2...cry70), nos quais as toxinas dentro de cada grupo compartilham pelo menos 40% de identidade entre si, enquanto apresentam menos de 40% de identidade com proteínas pertencentes a outros grupos (Das et al., 2021).

A ampla ação tóxica das proteínas inseticidas de Bt, atribuídas aos seus cristais é específica contra uma gigantesca variedade de insetos incluindo as ordens Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera, Díptera, Homóptera e Ortóptera, além da ação contra nematoides, ácaros e protozoários (Peng; Yu; Song, 2019). As proteínas Cry produzidas por Bt apresentam três domínios (3d-Cry) (Figura 2) (Pardo-López; Soberón; Bravo, 2013) e, apesar de compartilharem a estrutura conservada dos três domínios, as toxinas Cry pertencentes à esta família possuem sequências de aminoácidos bem distintas (PALMA et al., 2014). Os determinantes de especificidade das toxinas estão relacionados com os três domínios da sua estrutura tridimensional que, devido as suas características estruturais, indicam as diferentes etapas do modo de ação da toxina no intestino médio do inseto, principalmente por dar indícios do modo de interação com as proteínas e a inserção nas membranas celulares após ingestão (Jurat-Fuentes; Crickmore, 2017). Considerado como o maior grupo de toxinas Cry, as proteínas 3D-Cry caracterizam-se como protoxinas, podendo ter membros com protoxinas grandes de 130 kDa ou curtas em torno de 65 e 70 kDa, assemelhando-se em suas estruturas devido sua composição de três domínios. O domínio I, formado por um feixe de sete α -hélices é responsável pela inserção na membrana e formação de poros. O domínio II, composto por três folhas β antiparalelas com regiões de loop expostas, e o domínio III, com estrutura

de sanduíche β , estão envolvidos na ligação ao receptor. Além disso, o domínio I compartilha similaridade estrutural com outras proteínas PFT, reforçando sua função na toxicidade (Bravo et al., 2013; Bravo; Gill; Soberón, 2007b).

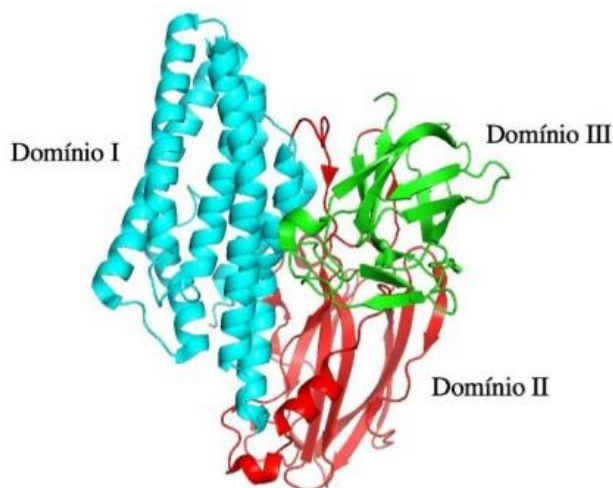


Figura 2. Estrutura 3D geral das proteínas Cry: Domínio I é formado por um pacote de sete α -hélices antiparalelas; Domínio II é composto por três fitas β -antiparalelas; Domínio III consiste em 2 β -antiparalelas formando um β -sanduíche. Fonte: (ROBLEDO GÓMEZ, 2023).

Diferentes classes da proteína Cry tem ações em diferentes ordens de insetos (Federici et al., 1998). Dentre os bioinseticidas mais utilizados no controle dos insetos, destacam-se aqueles que contêm as proteínas Cry1aa, Cry1ab, Cry1ac, Cry1b, Cry1c e Ry1d. A presença dessas proteínas tanto em formulações comerciais quanto em plantas geneticamente modificadas reforça que as principais toxinas Cry utilizadas no controle de pragas pertencem às famílias Cry1A, Cry1C e Cry1F (Queiroz et al., 2023). Alguns insetos-pragas do tomateiro foram estudados e os genes Cry ativos específicos com atuação inseticida contra cada inseto é conhecido. Por exemplo, a proteína cry1Ac apresenta efetividade contra os insetos *Helicoverca spp* e *Pseudoplusia includens*, (Pinto, 2008), já as proteínas Cry9c apresentam efetividade contra os insetos *Agrotis ipsilon*, que também podem ser afetados por Cry2ab(JANSENS et al., 1997), e o gene Cry1Aa

apresentam toxicidade contra os insetos *Tuta absoluta* (Dammak et al., 2016), e por fim os insetos *Diabrotica spp* são afetados por Cry3Bb1 (Siegfried; Vaughn; Spencer, 2005) (Tabela 1). Posto isso, ainda não foi descoberto um gene único da proteína Cry que tenha ação contra diversas pragas ao mesmo tempo, e por este motivo o uso de apenas uma toxina se torna limitado para aplicação em culturas que apresentam diversos insetos pragas alvos.

1.1.3 Genes Cyt

Da mesma forma que as proteínas Cry, proteínas Cyt são proteínas de inclusão parasporal de Bt que exibem efeito tóxico variável para um organismo alvo, apresentando atividade hemolítica (Bravo; Gill; Soberón, 2007b). O espectro de ação das proteínas Cyt é tóxico para insetos dípteros, como mosquitos, e pode afetar algumas espécies de coleópteros (Pardo-López; Soberón; Bravo, 2013). Uma característica fundamental de todas as toxinas Cry é a especificidade de seus receptores. O conjunto de toxinas Cry produzidas por uma cepa específica define seu espectro de hospedeiros. Em contraste, as toxinas Cyt são endotoxinas citolíticas que atuam por meio de mecanismos não específicos, semelhantes a detergentes ou formadores de poros (Fayad et al., 2021). As toxinas Cry e Cyt não possuem similaridade estrutural nem relação filogenética, atuando por mecanismos distintos em larvas de mosquitos (Soares -da- Silva et al., 2022).

As toxinas cyt são classificadas em oito subclasses primárias (cyt1-cyt8) com base na identidade de seus aminoácidos. A Cyt2Aa foi originalmente descoberta em *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis* e posteriormente caracterizada como uma protoxina composta por 259 aminoácidos. As estruturas tridimensionais das toxinas Cyt, incluindo a forma protoxina da Cyt2Aa (anteriormente denominada CytB; UniProt-Q04470), a protoxina Cyt1Aa e as formas ativadas de Cyt2Ba e Cyt1Aa, são altamente conservadas, sugerindo um mecanismo de ação semelhante. A ativação das toxinas cyt ocorre no

intestino médio do inseto, onde aproximadamente 30 resíduos de aminoácidos são removidos por proteólise nos terminais N e C da proteína. *In vitro*, essas toxinas exibem atividade citolítica contra células bacterianas e diversas células de insetos e mamíferos, enquanto *in vivo* apresentam toxicidade específica para dípteros (Šolinc; Anderluh; Podobnik, 2023).

Além da ação inseticida direta, destacam-se por potencializar o efeito de toxinas cry e por contribuírem no manejo da resistência, como observado na superação da resistência à Cry3Aa por *Chrysomela scripta* quando associada à Cyt1Aa (Domínguez-Arrizabalaga et al., 2020). Essa capacidade ocorre devido a interação com receptores no intestino médio dos insetos, funcionando como receptores para as proteínas Cry e desempenhando um papel crucial na toxicidade (Fayad et al., 2021). Dessa forma, a coexpressão de toxinas Cyt e Cry, juntamente com outras proteínas inseticidas, contribuiu para o grande sucesso dos bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (Šolinc; Anderluh; Podobnik, 2023).

O mecanismo exato pelo qual a toxina Cyt se insere na membrana ainda não é totalmente compreendido. No entanto, dois modelos distintos para explicar o mecanismo de ação das toxinas Cyt foram propostos a partir de estudos com a toxina Cyt1A. O primeiro, conhecido como modelo de formação de poros, sugere que, após a ligação à membrana celular, a toxina forma um canal seletivo para cátions, resultando em lise coloidal-osmótica da célula. O segundo modelo propõe um efeito detergente, no qual a agregação não específica da toxina na superfície da membrana causa a desestabilização da bicamada lipídica, levando à morte celular (Onofre et al., 2020).

1.1.4 Genes Vip

As proteínas Vip apresentam diferentes propriedades estruturais e moleculares quando comparadas com as proteínas Cry, sendo atualmente consideradas a nova geração de toxinas inseticidas secretadas pelas bactérias Bt (Bel; Ferré; Hernández-Martínez, 2020). Diferentemente das proteínas cristalinas, as proteínas vip são secretadas durante a fase vegetativa da bactéria, não ocasionando a formação de cristais.

Em um modelo de classificação anterior, a família das toxinas vip era classificada em quatro subfamílias baseada na similaridade de seus aminoácidos, sendo dividida em Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4. De acordo com o novo critério de classificação a nomenclatura das proteínas Vip foi criado a partir das similaridades de suas sequências. As proteínas vegetativas, antes classificadas em quatro classes foram organizadas em apenas três novas classes: Vpb1 e Vpb4, Vpa e Vip. Toxinas anteriormente denominadas Vip1 e Vip4 ganharam a classificação de Vpb1 e Vpb4, respectivamente. As toxinas do grupo Vip2 passaram a ser denominadas de Vpa e por fim, as Vip3 ganharam a nova classificação de Vip (Crickmore et al., 2021). Embora os genes da família de proteínas vegetativas não compartilhem semelhanças nas suas sequências, eles demonstram atividade tóxica contra uma ampla gama de insetos. As proteínas Vpa e Vpb, por exemplo, são eficazes contra algumas espécies de coleópteros e hemípteros. Por outro lado, as proteínas Vip (antes denominadas Vip3) atuam de forma tóxica contra lepidópteros, e seu mecanismo de ação é similar ao das proteínas Cry (Chakroun et al., 2016; Gupta; Kumar; Kaur, 2021).

1.1.5 Genes Mpp

Os genes Mpp foram classificados a partir de um critério de classificação novo, desenvolvido em decorrência da descoberta de uma grande variedade de proteínas inseticidas. Alguns grupos específicos de proteínas não levavam em consideração a similaridade de suas sequências no agrupamento e foi reconhecido que essas proteínas mostravam pouca similaridade, mesmo sendo alocadas como proteínas Cry. Diante disso,

grupos específicos como as proteínas formadoras de poro beta da família ETX/Mtx2 receberam uma nova classificação denominada Mpp. A nova nomenclatura agrupa as proteínas anteriormente denominadas Cry51Aa, Mtx2 e as proteínas secretadas SIP, que apresentam homologia de sequências (Crickmore et al., 2021).

As proteínas Mpp, incluindo Mpp2 (anteriormente Mtx2), fazem parte do segundo maior grupo de proteínas cristalinas, perdendo apenas para as proteínas cristalinas Cry de três domínios. Em Bt, as Mpp são tóxicas contra espécies de coleópteros e dípteros (Peralta et al., 2021).

1.2 Análises Genômicas

As bactérias Bt estão amplamente distribuídas na natureza, e sua capacidade de produzir toxinas com ação específica contra larvas de insetos as torna ferramentas valiosas tanto no controle biológico quanto em diversas aplicações biotecnológicas (Valtierra-De-luis et al., 2020). Considerando a ampla diversidade de cepas e toxinas produzidas por Bt, bem como sua relevância consolidada como agente bioinseticida, torna-se cada vez mais necessário aprofundar a caracterização genética dessas bactérias para potencializar seu uso no controle de pragas. Abordagens de análises genômicas são uma estratégia importante para rastrear novas cepas de Bt que possuem potenciais proteínas inseticidas que podem ser úteis no controle de pragas e de resistência. Além disso, o avanço no sequenciamento completo de genomas de cepas de Bt tem possibilitado investigações mais detalhadas sobre a estrutura e a função de plasmídeos associados à virulência, contribuindo para a compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos na interação com organismos-alvo (ALVES et al., 2023).

O surgimento de resistência por parte dos insetos às proteínas de Bt tem evidenciado a necessidade de identificar novas cepas e toxinas com mecanismos de ação

distintos. Nesse cenário, a mineração genômica tem se destacado como uma abordagem promissora para a descoberta de genes inseticidas e metabólitos bioativos, impulsionada pelos avanços no sequenciamento genômico completo e no desenvolvimento de ferramentas de bioinformática (Yılmaz et al., 2025). A identificação de novas cepas de Bt capazes de produzir proteínas inseticidas divergentes amplia não só o espectro de controle sobre diferentes pragas, mas também contribui para retardar o surgimento de resistência nos insetos (Peralta et al., 2021). Estudos revelam que a combinação de múltiplos modos de ação em uma mesma linhagem como, por exemplo, a expressão simultânea de diferentes toxinas ou mesmo proteínas com múltiplos mecanismos de atuação, pode impedir que as pragas evoluam resistência de forma rápida (WANG et al., 2025). A descoberta de novas cepas produtoras de proteínas com essas características não apenas amplia o alcance do controle biológico, colaborando no manejo integrado de pragas, mas também fortalece novos produtos bioinseticidas a base de Bt.

Devido à alta variabilidade nas sequências genômicas de *Bacillus thuringiensis*, a detecção de genes codificadores de toxinas representa um desafio significativo. Para contornar essa limitação, ferramentas de bioinformática baseadas em sequenciamento completo do genoma (WGS) têm sido empregadas tanto na identificação de genes já conhecidos quanto na predição de novas variantes gênicas (Chung et al., 2024). O crescente número de genomas sequenciados de Bt nos últimos anos tem ampliado significativamente a disponibilidade de dados, especialmente relacionados à identificação de novas cepas com presença de genes codificadores de proteínas cristalinas com atividade inseticida ainda não conhecidos.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, Mahmuda *et al.* Enhanced insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* using a late embryogenesis abundant peptide co-expression system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 188, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106207>

ALVES, G.B., de Oliveira, E.E., Jumbo, L.O.V. *et al.* Genomic–proteomic analysis of a novel *Bacillus thuringiensis* strain: toxicity against two lepidopteran pests, abundance of Cry1Ac5 toxin, and presence of InhA1 virulence factor. *Arch Microbiol* **205**, 143 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03479-y>

BEL, Yolanda; FERRÉ, Juan; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Patricia. **Bacillus thuringiensis Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action**. *ToxinsMDPI*, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/toxins12120785>

BOBROWSKI, Vera Lucia *et al.* Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, set-out. v. 34, n. 1, p. 843–850, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500008>

BRAVO, Alejandra *et al.* **Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide**. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, jul. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

BRAVO, Alejandra *et al.* **Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity**. *Microbial Biotechnology*, jan. 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x>

BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control**. *Toxicon*, 15 mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

CHAKROUN, Maissa *et al.* Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329–350, jun. 2016. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-15>

CHUNG, Taejung *et al.* Comparison of the performance of multiple whole-genome sequence-based tools for the identification of *Bacillus cereus* sensu stricto biovar *Thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 4, 1 abr. 2024. <https://doi.org/10.1128/aem.01778-23>

FAYAD, Nancy *et al.* A Novel Antidipteran *Bacillus thuringiensis* Strain: Unusual Cry Toxin Genes in a Highly Dynamic Plasmid Environment. 2021. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-20>

FEDERICI, Hyun-Woo *et al.* **Sequence Combination with the STAB-SD mRNA Sporulation-Dependent Promoters in by Use of *thuringiensis* *Bacillus* Optimization of Cry3A Yields in Appl. Environ. Microbiol.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/64/10/3932><http://aem.asm.org/content/64/10/3932#ref-list-1>>.

GÓMEZ, I. *et al.* **Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*.** *Peptides*, jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.013>

GUPTA, Mamta; KUMAR, Harish; KAUR, Sarvjeet. **Vegetative Insecticidal Protein (Vip): A Potential Contender From *Bacillus thuringiensis* for Efficient Management of Various Detrimental Agricultural Pests.** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., , 13 maio 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659736>

HECKEL, David G. **How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* John Wiley and Sons Ltd, , 1 jun. 2020. <https://doi.org/10.1002/arch.21673>

JANSENS, Stefan *et al.* (1997) **Transgenic Corn Expressing a Cry9C Insecticidal Protein from *Bacillus thuringiensis* Protected from European Corn Borer Damage.** [S.l.: S.n.]. <https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183X003700050035x>

JANUÁRIO, Thays Lorranny da Silva *et al.* Danos à saúde humana e ao meio ambiente ocasionados pelo uso de agrotóxicos na produção de produtos agrícolas no Brasil. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 5, p. 462–477, 28 mar. 2021. <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.005.0037>

JOUZANI, Gholamreza Salehi; VALIJANIAN, Elena; SHARAFI, Reza. ***Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings.** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer Verlag, , 1 abr. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>

JURAT-FUENTES, Juan Luis; CRICKMORE, Neil. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 5–10, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.018>

MARÍN-SÁEZ, Jesús *et al.* Comprehensive Dissipation of Azadirachtin in Grapes and Tomatoes: The Effect of *Bacillus thuringiensis* and Tentative Identification of Unknown Metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 11, p. 4466–4476, 22 mar. 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07077>

ONOFRE, Janette *et al.* The cyt1aa toxin from *Bacillus thuringiensis* inserts into target membranes via different mechanisms in insects, red blood cells, and lipid liposomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 28, p. 9606–9617, 10 jul. 2020. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013869>

PADMAKUMAR, Ananya *et al.* **Bacteria-Premised Nanobiopesticides for the Management of Phytopathogens and Pests.** **ACS Agricultural Science and Technology** American Chemical Society, , 15 maio 2023. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.3c00025>

PALMA, Leopoldo *et al.* **Bacillus thuringiensis toxins: An overview of their biocidal activity.** **Toxins** MDPI, , 2014. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>

PARDO-LÓPEZ, Liliana; SOBERÓN, Mario; BRAVO, Alejandra. **Bacillus thuringiensis insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection.** **FEMS Microbiology Reviews**, jan. 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>

PENG, Qi; YU, Qingyue; SONG, Fuping. **Expression of cry genes in Bacillus thuringiensis biotechnology.** **Applied Microbiology and Biotechnology** Springer Verlag, , 15 fev. 2019.

PERALTA, Cecilia *et al.* Genome Sequence Analysis and Insecticidal Characterization of *Bacillus thuringiensis* Bt-UNVM_94, a Strain Showing Dual Insecticidal Activity against Lepidopteran and Coleopteran Pests. v. 65, 2021.

PINTO, Laura. Genes cry de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 3, p. 159–168, 23 dez. 2008. <https://doi.org/10.4013/nbc.20083.07>

QUEIROZ, Paulo Roberto *et al.* Identification of cry genes in *Bacillus thuringiensis* by multiplex real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 205, 1 fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106665>

RICO, Gabrielle Kimberlly; CAVICHIOLI, Fábio Alexandre. ANÁLISE GERAL DO USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL. **Revista Interface Tecnológica**, v. 15, n. 2, p. 425–435, 30 dez. 2018. <https://doi.org/10.31510/infa.v15i2.505>

ROBLEDO GÓMEZ, Manuela. **Pró-Reitora Acadêmica Escola de saúde Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia OBTENÇÃO DE PLANTAS DE ALGODÃO GM PARA CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS.** [S.l.: S.n.].

SAMADA, Lukmanul Hakim; TAMBUNAN, Usman Sumo Friend. Biopesticides as promising alternatives to chemical pesticides: A review of their current and future status. **OnLine Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 2, p. 66–76, 2020. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2020.66.76>

SANSINENEA, Estibaliz; VÁZQUEZ, Candelario; ORTIZ, Aurelio. **Genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis* for strain improvement.** **Biotechnology Letters**, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0338-1>

SCHÜNEMANN, Rogério; KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia Mariana. Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture . **ISRN Microbiology**, v. 2014, p. 1–12, 20 jan. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/135675>

SIEGFRIED, Blair D.; VAUGHN, Ty T.; SPENCER, Terence. Baseline susceptibility of western corn rootworm (Coleoptera: Crysomelidae) to Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 4, p. 1320–1324, 2005. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.4.1320>

SINGH, Drishtant *et al.* Exploration of insecticidal potential of Cry protein purified from *Bacillus thuringiensis* VIID1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, p. 362–369, 31 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.143>

SOARES -DA- SILVA, Joelma *et al.* Cyt1Aa toxin gene frequency in *Bacillus thuringiensis* isolates and its relation with pathogenicity for vector mosquitoes. **Acta Tropica**, v. 233, 1 set. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106549>

SOBERÓN, Mario; MONNERAT, Rose; BRAVO, Alejandra. Mode of Action of Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis* and Resistance Mechanisms. *In: Microbial Toxins*. [S.l.]: Springer Netherlands, 2016. p. 1–13. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6725-6_28-1

SOE, Ei Thinzar *et al.* Cry51Aa Proteins Are Active against *Apolygus lucorum* and Show a Mechanism Similar to Pore Formation Model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 5, p. 2279–2289, 8 fev. 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07244>

ŠOLINC, Gašper; ANDERLUH, Gregor; PODOBNIK, Marjetka. *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa forms filamentous oligomers when exposed to lipid membranes or detergents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 674, p. 44–52, 24 set. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.06.078>

TOMAR, Preety *et al.* **Bacterial biopesticides: Biodiversity, role in pest management and beneficial impact on agricultural and environmental sustainability.** *Heliyon* Elsevier Ltd, , 15 jun. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e31550>

VALTIERRA-DE-LUIS, Daniel *et al.* **Potential for *Bacillus thuringiensis* and Other Bacterial Toxins as Biological Control Agents to Combat Dipteran Pests of Medical and Agronomic Importance.** *Toxins* MDPI, , 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.3390/toxins12120773>

VAN LENTEREN, Joop C. *et al.* Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 39–59, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9801-4>

YAO, Xue *et al.* ATP Synthase Subunit α from *Helicoverpa armigera* Acts as a Receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Synergizes Cry1Ac Toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00259>

YILMAZ, Semih *et al.* Genome mining of *Bacillus thuringiensis* strain SY49 reveals novel candidate pesticidal and bioactive compounds. **Pest**

Management Science, v. 81, n. 1, p. 298–307, 26 jan. 2025.
<https://doi.org/10.1002/ps.8433>

X. Wang, Y. Yue, Y. Zhai, F. Wang, X. Zhuang, S. Wu, Y. Yang, B.E. Tabashnik, & Y. Wu, Functional redundancy in the toxic pathway of Bt protein Cry1Ab, but not Cry1Fa, against the Asian corn borer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 122 (16) e2503674122, <https://doi.org/10.1073/pnas.2503674122> (2025).
<https://doi.org/10.1073/pnas.2503674122>

3. OBJETIVOS

- Desenvolver uma cepa de *Bacillus thuringiensis* geneticamente modificada, capaz de expressar um conjunto ampliado de proteínas inseticidas com atividade contra diferentes insetos-praga.
- Realizar análises genômicas em diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* visando caracterizar a diversidade genes inseticidas presentes nestas cepas.

CAPÍTULO II

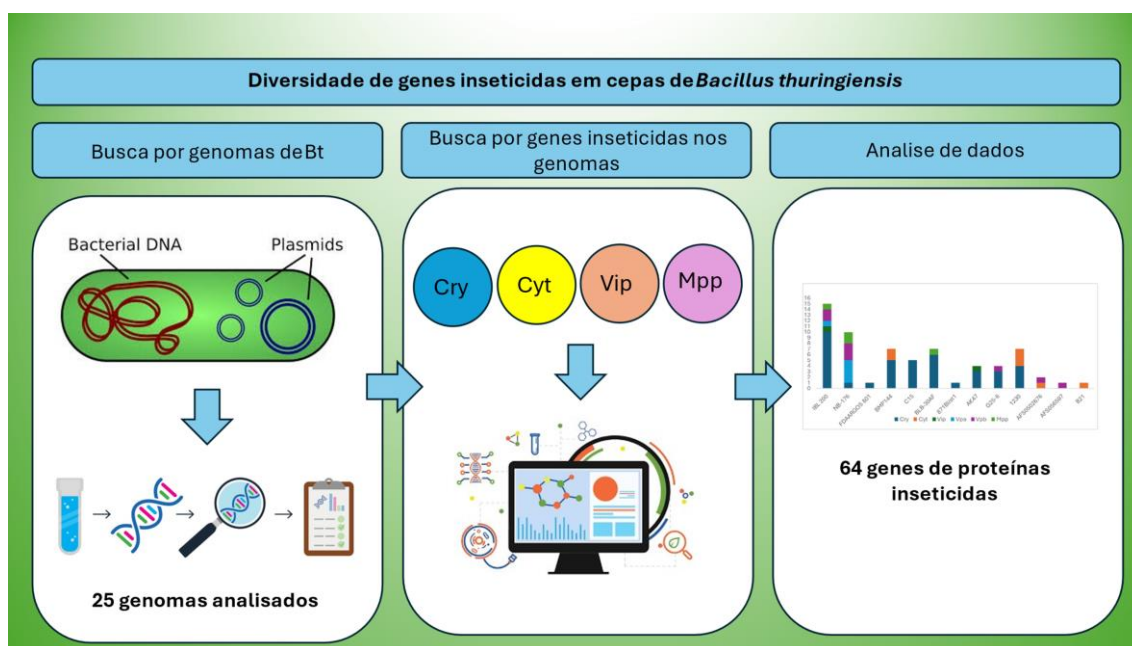
Diversidade Genômica de genes inseticidas em cepas de *Bacillus thuringiensis*

Autores: Beatriz Baldin¹, Hassen Hassan Gharib², Alexia Junia Gonçalves², Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brasil.

²Curso de Graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brasil.

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) é amplamente utilizada no controle biológico de pragas devido à produção de proteínas inseticidas específicas. Neste estudo, foram analisados 25 genomas de cepas de Bt disponíveis no GenBank do NCBI para identificar a presença e diversidade de genes inseticidas das classes Cry, Cyt, Vip, Vpa, Vpb e Mpp. As análises revelaram que 52% das cepas possuem genes inseticidas conhecidos, enquanto 48% não apresentaram genes identificáveis, sugerindo a existência de uma diversidade genômica desconhecida. Foram identificadas 64 toxinas, a maioria pertencente à família Cry, evidenciando a presença de múltiplas classes de proteínas inseticidas em diversas cepas, o que amplia seu potencial para aplicações no controle de pragas agrícolas. A presença de genes inseticidas em cromossomos e plasmídeos foi analisada em quatro cepas com genoma montado, destacando a cepa IBL200 que codifica todos os genes no cromossomo. As cepas IBL200, NB-176, BMP144 e C15 foram as mais promissoras para o desenvolvimento de novos bioinseticidas, pela diversidade de genes inseticidas, incluindo aqueles potenciais contra lepidópteros, coleópteros e nematoides. Estes resultados reforçam a importância da análise genômica para a descoberta de novos genes inseticidas com aplicações agrícolas.

PALAVRAS-CHAVE

Genes Cry, Proteínas inseticidas, Diversidade genômica, Bioinformática, Controle biológico de pragas.

4. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) são bactérias gram-positivas, formadora de esporos, que apresentam atividade entomopatogênica com capacidade de produzir inclusões cristalinas parasporais (1) As proteínas cristalinas, conhecidas como δ -endotoxinas são tóxicas para uma abrangente série de espécies pragas incluindo a ordem dos insetos Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Homoptera, como também para alguns nematoides. Os cristais formados pelas proteínas são biodegradáveis e altamente específicos para certas espécies de insetos, sendo seguras para organismos não alvos, e aplicadas amplamente no controle de pragas agrícolas (2, 3). As Bt são encontradas distribuídas na natureza, podendo ser isoladas de diferentes habitats como solo, água e plantas (4).

As δ -endotoxinas são proteínas inseticidas formadas por inclusões cristalinas após a esporulação e compreendem duas famílias multigênicas, as proteínas cristalinas Cry e as proteínas citológicas Cyt que fazem parte da classe de toxinas formadoras de poro (5). Além destas, as proteínas inseticidas vegetativas Vip e as proteínas inseticidas secretadas Mpp, são outras duas classes importantes de toxinas inseticidas produzidas por Bt (4). Diferentemente das proteínas cristalinas, as proteínas Vip são secretadas durante a fase vegetativa da bactéria, apresentando diferenças estruturais e moleculares, sendo consideradas a nova geração de proteínas inseticidas secretadas pelas Bt (6).

O aumento de estudos voltados para o sequenciamento de genomas de Bt tem possibilitado a descoberta de uma grande variedade de proteínas inseticidas. Para compreender essa diversidade foi necessário a criação de um sistema de classificação mais aprimorado, reforçando a diversidade estrutural das proteínas inseticidas de Bt. Segundo os novos critérios, a classificação das proteínas inseticidas passou a ser baseada

na similaridade estrutural (7). No antigo sistema de classificação, as 147 proteínas vegetativas Vip foram classificadas em Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4. Seguindo a nova classificação, essas proteínas foram nomeadas em apenas três classes diferentes: Vpa, Vpb e Vip (8). Outra diferença perceptível na nova classificação foi em relação as toxinas formadoras de poros beta da família ETX/Mtx2 que passaram a ser classificadas como proteínas Mpp. A classificação Mpp agrupa as anteriormente denominadas proteínas Cry51Aa, Mtx2 e Sip, devido apresentarem homologia de sequencias com possível semelhança em suas configurações estruturais (7).

Além do uso no combate de insetos pragas por meio de bioinseticidas, os genes inseticidas das Bt são essenciais para o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos (9). Os genes cry são os mais conhecidos e utilizados para a produção de plantas devido seu alto potencial toxico contra diversas pragas e, devido ao sucesso na agricultura e seu potencial uso em aplicações médicas, é de grande interesse que novas cepas de Bt sejam encontradas levando a descoberta de novos genes (9, 10). Nos últimos anos, vários genomas de Bt foram sequenciados, o que fornece uma grande quantidade de dados, especialmente, para identificar novos genes de proteínas cristalinas inseticidas (11) além de possibilitar a análise estrutural e funcional das propriedades patogênicas das Bts em organismos alvos (12). Neste sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade de genes inseticidas em cepas de *B. thuringiensis*.

5. METODOLOGIA

No momento da presente análise, existem um total de 1.391 genomas sequenciados de cepas de *Bacillus thuringiensis* encontrados no banco de dados NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=1428>). Contudo, muitos destes genomas não foram analisados com relação a presença de genes que

codificam proteínas inseticidas. Neste trabalho foram analisadas 25 cepas de *B. thuringiensis* cujos genomas ainda não haviam sido avaliados para a presença de genes inseticidas (Tabela 1). As sequências proteicas e genômicas destas cepas foram utilizadas na análise. As seguintes sequências referências de proteínas inseticidas foram utilizadas para comparação pelo alinhamento BLASTp [AAA22353.1 (Cry1Aa1), ABR68091.1 (Cry2Aa), CAA68485.1 (Cry4Aa1), AAA67694.1 (Cry5Aa1), Q03749.1 (Cry7Aa1), WP_087997148.1 (Cry9Aa1), AAA21516.1 (Cry14Aa1) e O32321.1 (Cry20Aa1), ACF35049.1 (Cyt2Aa), 6V1V_A (Vip3), AGC08396.1 (Vpa), AGC08395.1 (Vpb), AKA64627.1 (Mpp)]. O blast foi feito com o software BioEdit (<https://bioedit.software.informer.com/>) e um limiar de E-value de 10^{-6} .

As sequências identificadas foram comparadas no banco de dados Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (<http://bpprc.org/>) para caracterização adicional. Os domínios conservados das sequências proteicas foram identificados por meio da plataforma CD-Search do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Características moleculares como pesos moleculares e ponto isoelétricos foram obtidos na plataforma ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). Os dados dos genomas de cada cepa, incluindo os números de genes, quantidades de plasmídeos e tamanho de cromossomos, foram obtidos no GenBank do NCBI. As posições dos genes nos genomas completos foram identificadas por meio do tBLASTn no programa Bioedit. Os novos genes inseticidas identificados foram enviados para o banco de dados BPPRC para serem nomeados corretamente.

Tabela 1. Lista de genomas de *Bacillus thuringiensis* analisados.

Código do genoma	Cepa	Genoma	Nº de genes
ASM16171v1	IBL 200	1 cromossomo	
ASM2080916v1	NB-176	1 cromossomo e 4 plasmídeos	
ASM2080918v1	BMP144	1 cromossomo e 9 plasmídeos	
ASM399117v1	C15	1 cromossomo e 8 plasmídeos	
ASM2159554v1	B13	1 cromossomo e 1 plasmídeos	
ASM2080912v1	B401	1 cromossomo e 15 plasmídeos	
ASM2080920v1	GC-91	1 cromossomo e 11 plasmídeos	
ASM1334684v1	FDAARGOS 801	incomplete assembly	6.769
ASM3404456v1	BLB30AF	incomplete assembly	6.679
ASM1498250v1	871Blist1	incomplete assembly	6.127
ASM3662133v1	B21	incomplete assembly	6.226
ASM1337556v1	B116	incomplete assembly	
ASM4015143v1	NAHVS5F	incomplete assembly	
ASM256127v1	AFS016919	incomplete assembly	
ASM3803967v1	Q3-6	incomplete assembly	
ASM4342019v1	HBQ-200	incomplete assembly	
ASM257536v1	AFS052676	incomplete assembly	6.271
ASM257436v1	AFS056597	incomplete assembly	5.488
ASM767196v1	DE0555	incomplete assembly	
ASM339946v1	BAM	incomplete assembly	
ASM81655v1	AK47	incomplete assembly	6.715
ASM1584609v1	G25-6	incomplete assembly	6.632
ASM3662135v1	B20	incomplete assembly	
ASM1493294v1	s2744	incomplete assembly	
ASM782929v1	1230	incomplete assembly	6.945

6. RESULTADOS

As análises genômicas realizadas no trabalho abrangeram 25 cepas de *Bacillus thuringiensis* (Tabela 1), nenhuma destas cepas havia sido analisada para a busca de todas as classes de proteínas inseticidas conhecidas em Bt, sendo elas Cry, Cyt, Vip, Vpa, Vpb e Mpp (7). As análises iniciais revelaram que, dos 25, apenas 13 genomas possuem genes de toxinas inseticidas conhecidas, o que indica que em 12 cepas (48%) de *Bacillus thuringiensis* não foram encontrados genes de proteínas inseticidas. Não foram encontrados genes inseticidas nas cepas: B13, B401, GC-91, B116, NAHV5F, AFS016919, Q3-6, HBQ-200, DE0555, BAM, B20, s2744 (Figura 1).

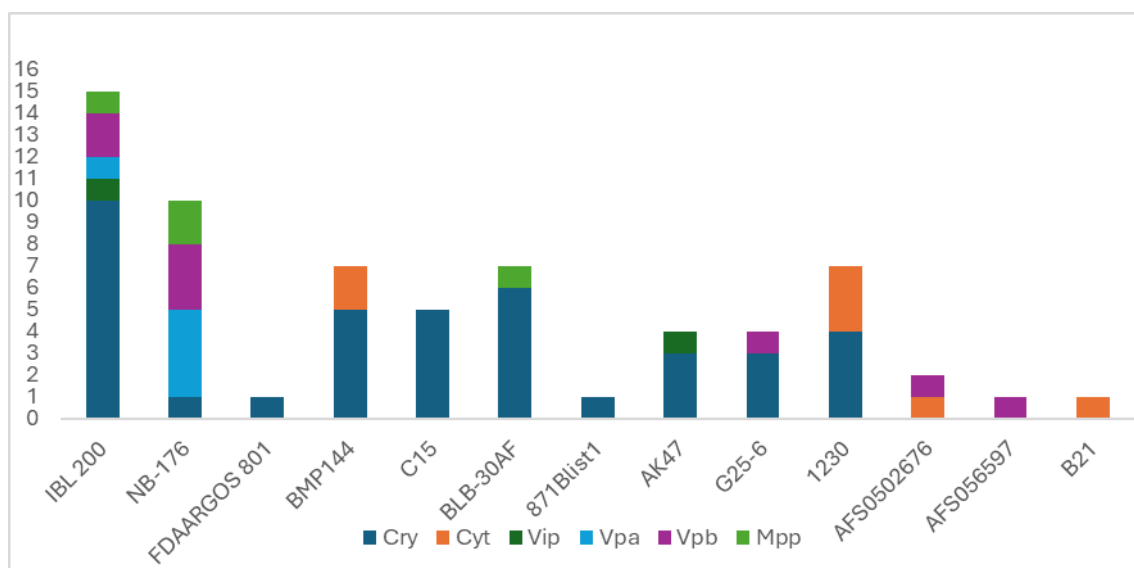


Figura 1. Classes de genes inseticidas encontrados em suas respectivas cepas.

As cepas BLB30AF, 871Blist1, AK47, G25-6, 1230, AFS052676, AFS056597, FDAARGOS801 e B21 não possuem montagem genômica completa, mas apresentaram genes de proteínas inseticidas (Tabela 1). Em contrapartida, as cepas IBL200, NB-176, BMP114 e C15 apresentaram genomas completamente montados, indicando tamanho dos cromossomos e número e tamanho de plasmídeos. A partir do alinhamento BLASTp das sequências proteicas das cepas, foi possível identificar a

presença de 64 toxinas (Tabela 2), algumas com as sequências conhecidas, além de proteínas não identificadas, mas com possível ação inseticida.

Tabela 2. Genes de proteínas inseticidas identificados nos genomas de *B. thuringiensis* analisados.

Cepa	Gene	Identidade (%)	Nº de Acesso	Nº de AA	Peso Molecular (Da)	pI
IBL 200	Cry1Ab18	100%	WP_000369820.1	1177	133340,00	4,98
IBL 200	Cry1Ja2	100%	WP_000405158.1	1167	132690,00	5,08
IBL 200	Cry1Bb1	100%	WP_000203375.1	1229	139770,00	5,07
IBL 200	Cry1Id1	100%	WP_000837623.1	719	81400,00	5,74
IBL 200	Cry2Ad1	100%	WP_001089637.1	633	70750,00	8,17
IBL 200	Cry1Da3	99,90%	WP_000405159.1	1167	131991,08	5,27
IBL 200	Vip3Af1	99,70%	WP_001066376.1	786	87792,17	5,19
IBL 200	Vpb1Ca1	99,60%	WP_000727639.1	772	86737,07	5,57
IBL 200	Cry1Nb1	99,30%	WP_001087541.1	671	76957,73	6,60
IBL 200	Cry1Hb1	98,30%	WP_000453539.1	1169	132522,37	5,07
IBL 200	Vpa2Ac1	98,10%	WP_000255144.1	453	51252,4	7,57
IBL 200	Vpb1Ba1	61,60%	WP_000728165.1	779	87140,45	5,58
IBL 200	Cry1Ma2	38,70%	WP_001087511.1	680	77634,39	5,87
IBL 200	Mpp83Aa1	28,20%	WP_003308447.1	282	31237,02	7,76
IBL 200	Cry2Aa5	23,70%	WP_042972902.1	667	75750,94	8,07
NB-176	Cry3Aa12	100%	WP_052574943.1	644	73108,62	5,32
NB-176	Vpb1Ae1	99,70%	WP_000727638.1	871	97428,82	5,68
NB-176	Vpa2Aa3	93,40%	WP_000253776.1	453	51062,07	8,09
NB-176	Mpp5Ac1	78,30%	WP_086405553.1	364	40788,97	8,90
NB-176	Vpa2Ba1	76,80%	WP_086405651.1	446	50241,18	8,88
NB-176	Vpa2Bb1	71,60%	WP_223697903.1	432	49286,16	8,88
NB-176	Vpb1Ad1	57,10%	WP_080893310.1	999	111948,80	5,50

NB-176	Vpb1Ad1	55,30%	WP_086405652.1	889	99505,84	5,13
NB-176	Mpp3Aa2	25,10%	WP_086405659.1	323	35926,50	9,06
NB-176	Vpa2Ac1	22,50%	WP_044798436.1	448	51222,75	9,19
NB-176	Vpa2Ah1	20,60%	WP_044798434.1	274	31578,83	9,03
FDAARGOS 801	Cry1Ab1	100%	WP_000369819.1	1155	130623,66	5,03
BMP144	Cry11Aa1	100%	WP_000390241.1	643	72348,84	5,37
BMP144	Cry4Ba1	100%	WP_012211099.1	1136	127764,22	4,86
BMP144	Cry4Aa2	100%	WP_012211114.1	1180	134538,7	5,03
BMP144	Cry10Aa3	100%	WP_001070502.1	675	77759,63	7,66
BMP144	Mcf1Ca1	12,20%	WP_001123130.1	5010	522035,14	4,01
BMP144	Cyt3Aa1	16,2	WP_000074462.1	234	24770,17	7,8
BMP144	Cry4Ba1	34,5	WP_012211101.1	489	55884,48	4,63
BMP144	Vpb1Da1	19,6	WP_000754156.1	917	98787,44	6,07
BMP144	Cyt2Ba1	100	WP_000550493.1	263	29843,1	6,3
BMP144	Cyt1Aa1	100	WP_000429377.1	249	27341,13	4,66
BMP144	Vip3Aa40	18,5	WP_000420482.1	583	67013,07	4,99
C15	Cry21Aa2	46,3	WP_127064390.1	1135	129129,49	4,86
C15	Cry21Aa3	100	WP_127064356.1	1167	131221,68	4,99
C15	Cry21Ca2	63,9	WP_127064393.1	1229	137881,09	5,16
C15	Cry21Ca2	66,3	WP_164727840.1	1289	144845,06	4,95
C15	Cry1Aa6	22,3	WP_127064340.1	681	75631,73	4,84
C15	Cry7Fb1	18,9	WP_000754164.1	917	98845,44	6
BLB-30AF	Cry69Aa2	63,8	WP_320483923.1	1240	140655,55	5,77
BLB-30AF	Cry4Ca1	36,4	WP_320483957.1	564	64135,09	5,46
BLB-30AF	Cry52Aa1	68,3	WP_320483958.1	697	78607,03	6,36
BLB-30AF	Cry29Aa1	29	WP_320483967.1	670	75334,1	6,14
BLB-30AF	Cry54Aa2	28,9	WP_320484100.1	652	72841,45	7,06
BLB-30AF	Cry70Ba1	97	WP_320483948.1	808	90737,94	7,2
BLB-30AF	Mpp83Aa1	30,1	WP_320483626.1	315	34793,4	8,9

871Blist1	Cry1Ma2	38,5	WP_193533771.1	681	77804,54	5,80
AK47	Cry1Ia10	100	WP_000769223.1	719	81216,24	5,98
AK47	Cry2Aa1	100	WP_001067062.1	633	70852,44	8,21
AK47	Cry2Ab1	100	WP_001089638.1	633	70741,23	8,73
AK47	Vip3Aa10	100	WP_001039073.1	789	88672,19	5,05
G25-6	Cry19Ba1	68,1	WP_197223348.1	674	76915,51	6,74
G25-6	Cry27Aa1	72,9	WP_197223343.1	781	89126,33	5,62
G25-6	Cry70Bb1	66,7	WP_086390033.1	802	90241,75	6,93
G25-6	Vpb4Ba1	99,3	WP_176330612.1	887	99361,83	5,46
1230	Cry4Ba1	81,3	WP_114365447.1	924	103781,57	5,12
1230	Cry10Aa3	99,9	WP_144481769.1	675	77731,61	7,66
1230	Cry11Aa1	100	WP_000390241.1	643	72348,84	5,37
1230	Cyt2Ba1	100	WP_000550493.1	263	29843,1	6,30
1230	Cyt1Aa1	100	WP_000429377.1	249	27341,13	4,66
1230	Cyt1Ca1	100	WP_000079177.1	525	60331,79	5,94
AFS0502676	Vpb1Ea2	20,2	WP_097961776.1	738	81484,59	5,69
AFS0502676	Cyt2Ca1	30,7	WP_097961786.1	215	25446,77	5
AFS056597	Vpb1Ea2	19,8	WP_098251400.1	738	81549,79	5,87
B21	Cyt2Ca1	30,7	WP_332285436.1	215	25413,7	5,09

As 64 sequências genômicas foram analisadas no banco BPPRC para averiguação das porcentagens de identidades e a presença das proteínas em cada cepa. 50% das sequencias apresentaram similaridade acima de 95% com proteínas já listadas (Tabela 2). As sequencias proteicas inferiores a 95% foram submetidas ao CD-Search no qual foi observado uma predominância de proteínas da família Cry, presentes em quase todas as cepas exceto AFS052676, AFS056597 e B21 (Tabela S1). Essas cepas apresentaram apenas os genes Vpb1Ea2 e Cyt2Ca1, Vpb1Ea2, Cyt2Ca1, respectivamente. Identidades iguais e/ou próximas as famílias das proteínas Vip foi observado com menor frequência,

sendo encontrada nas cepas AFS052676, AFS056597, G25-6, AK47, NB-176 e IBL200. Os genes referentes as proteínas Cyt e Mpp foram mais raros. As cepas BMP114, 1230, AFS056597 e B21 possuem a presença de Cyt enquanto as cepas BLB-30AF, NB-176 e IBL200 apresentam os genes Mpp. Em relação aos pesos moleculares, as proteínas Cry variam entre 50 e 140 kDa (13), enquanto as proteínas Cyt, em geral, possuem um peso molecular entre aproximado de 25 a 28 kDa. Em relação às outras famílias de toxinas, as proteínas Vpb apresentam massa média em torno de 100 kDa, enquanto as do tipo Vpa giram em torno de 52 kDa. As protoxinas Vip exibem peso médio de 89 kDa (8). Os genes referentes as proteínas Mpp possuem um peso molecular médio é torno de 35 kDa, conforme dados fornecidos pelo Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (BPPRC). Sendo assim, todas classes de proteínas analisadas apresentaram variações consideradas dentro dos padrões esperados (Tabela 2).

Apenas as cepas com montagens completas (IBL200, NB-176, BMP144, e C15) foram analisadas por meio do tBLASTn para identificar a posição genômica dos genes inseticidas. O genoma da cepa IBL200 indicou que todos os genes estão localizados no cromossomo, que possui um tamanho de 6.731.790 pb sem plasmídeos. Nesta cepa foi constatado a presença de 15 genes inseticidas sendo eles Cry1Ab18, Cry1Bb1, Cry1Da3, Cry1Hb1, Cry1Id1, Cry1Ja2, Cry1Ma2, Cry1Nb1, Cry2Aa5, Cry2Ad1, Vip3Af, Vpa2Ac1, Vpb1Ba1, Vpb1Ca1 e Mpp83Aa1 (Tabela 3). A cepa NB-176 apresentou um cromossomo de 5.427.105pb e 4 plasmídeos, no qual apenas o plasmídeo pCH_187, além do cromossomo, codifica genes inseticidas. A maioria dos genes codificados no plasmídeo pertence à família das proteínas Vip nomeadas Vpa2Aa3, Vpa2Ba1, Vpa2Ac1, Vpb1Ad1, Vpb1Ae1 e Vpb1Ae1. Dois genes codificam as proteínas Mpp (Mpp5Ac1 e Mpp3Aa2), e apenas um gene a proteína Cry3Aa12. O gene presente no cromossomo codifica, também, a proteína Cry3Aa12 (Tabela 3).

Na cepa BMP144 foi observado a presença de 9 plasmídeos com um cromossomo de 5.496.624 pb. A presença de genes inseticidas foi identificada apenas no plasmídeo pCH_133-d que codifica as proteínas Cry11Aa1, Cry4Ba1, Cry4Aa2, Cry10Aa3, Cry4Ba1, Cyt2Ba1, Cyt1Aa1, Vpb1Da1, gene também encontrado no cromossomo (Tabela 3). Diferentemente das outras cepas analisadas, a cepa C15 apresentou o maior número de plasmídeos codificantes de genes inseticidas. Dentre os 9 plasmídeos do seu genoma, 3 deles codificam proteínas inseticidas. O plasmídeo pBMB22 codifica os genes Cry21Aa2 e Cry21Ca2, que também é codificado pelo plasmídeo pBMB13. Os genes Cry1Aa6 e Cry21Aa3 são codificados pelo plasmídeo pBMB172 (Tabela 3).

Tabela 3. Posições genômicas dos genes inseticidas nas cepas com genoma completamente montado.

Cepa	Gene	Código	Local do gene	Posição do gene
IBL 200	Cry2Aa5	WP_042972902.1	Cromossomo	5448393-5.446.393
IBL 200	Vip3Af1	WP_001066376.1	Cromossomo	5499489-5501846
IBL 200	Cry2Ad1	WP_001089637.1	Cromossomo	5508319-5510217
IBL 200	Cry1Hb1	WP_000453539.1	Cromossomo	5619913-5623419
IBL 200	Cry1Bb1	WP_000203375.1	Cromossomo	5626990-5630676
IBL 200	Cry1Ab18	WP_000369820.1	Cromossomo	5635952-5639482
IBL 200	Cry1Nb1	WP_001087541.1	Cromossomo	5653150-5651138
IBL 200	Cry1Ja2	WP_000405158.1	Cromossomo	5661330-5657830
IBL 200	Cry1Id1	WP_000837623.1	Cromossomo	5666756-5664600
IBL 200	Cry1Da3	WP_000405159.1	Cromossomo	5670743-5670743
IBL 200	Mpp83Aa1	WP_003308447.1	Cromossomo	5758741-5759586
IBL 200	Vpa2Ac1	WP_000255144.1	Cromossomo	5770163-5771521
IBL 200	Vpb1Ca1	WP_000727639.1	Cromossomo	5771538-5773853
IBL 200	Vpb1Ba1	WP_000728165.1	Cromossomo	5891746-5889410
IBL 200	Cry1Ma2	WP_001087511.1	Cromossomo	6061784-6063826

NB-176	Cry3Aa12	WP_052574943.1	Cromossomo	289460-287529
NB-176	Vpa2Ba1	WP_086405651.1	plasmid pCH_187	172994-174331
NB-176	Vpb1Ad1	WP_086405652.1	plasmid pCH_187	174348-177014
NB-176	Mpp3Aa2	WP_086405659.1	plasmid pCH_187	189735-188767
NB-176	Vpa2Aa3	WP_000253776.1	plasmid pCH_187	229303-230661
NB-176	Vpb1Ae1	WP_000727638.1	plasmid pCH_187	230678-233290
NB-176	Mpp5Ac1	WP_086405553.1	plasmid pCH_187	301948-300857
NB-176	Vpa2Ah1	WP_044798434.1	plasmid pCH_187	433533-434354
NB-176	Vpa2Ac1	WP_044798436.1	plasmid pCH_187	437357-438700
NB-176	Vpb1Ad1	WP_080893310.1	plasmid pCH_187	442300-445296
NB-176	Vpa2Bb1	WP_223697903.1	plasmid pCH_187	453975-455270
BMP144	Vpb1Da1	WP_000754156.1	Cromossomo	4536878-4534128
BMP144	Cry4Aa2	WP_012211114.1	plasmid pCH_133-d	39209-42748
BMP144	Cry10Aa3	WP_001070502.1	plasmid pCH_133-d	45805-47829
BMP144	Cry4Ba1	WP_012211101.1	plasmid pCH_133-d	47899-49365
BMP144	Cry4Ba1	WP_012211099.1	plasmid pCH_133-d	103114-99707
BMP144	Cyt2Ba1	WP_000550493.1	plasmid pCH_133-d	104599-105387
BMP144	Cry11Aa1	WP_000390241.1	plasmid pCH_133-d	115921-113993
BMP144	Cyt1Aa1	WP_000429377.1	plasmid pCH_133-d	117588-118334
C15	Cry7Fb1	WP_000754164.1	Cromossomo	4494167-4496917
C15	Cry21Aa2	WP_127064390.1	plasmid pBMB22	4577-1173
C15	Cry21Ca2	WP_127064393.1	plasmid pBMB22	8550-12236
C15	Cry1Aa6	WP_127064340.1	plasmid pBMB172	26455-28497
C15	Cry21Aa3	WP_127064356.1	plasmid pBMB172	74303-70803
C15	Cry21Ca2	WP_164727840.1	plasmid pBMB13	4131-265

7. DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi analisar cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) disponíveis no GenBank, com o intuito de identificar novas candidatas promissoras que

apresentem genes inseticidas com potencial uso no controle de pragas agrícolas. Das cepas avaliadas, 52% apresentaram genes com atividade inseticida reconhecida (Tabela 2). Embora milhares de cepas de Bt já tenham sido isoladas e sequenciadas, muitas ainda carecem de dados genômicos completos ou de análises funcionais aprofundadas. Nesse contexto, estudos comparativos entre cepas contribuem para uma compreensão mais ampla da diversidade genômica da espécie e fornecem subsídios para a prospecção e a descoberta de novas variantes com potencial inseticida (3), visto que, no conjunto das cepas estudadas, foram identificados genes com ação inseticida já descrita na literatura, reforçando seu potencial para o controle de diversas ordens de pragas agrícolas, incluindo Lepidoptera, Díptera, Coleóptera e nematoides.

Dentre os genes identificados, os mais abundantes foram os relacionados às proteínas Cry, com destaque para a família cry1, encontrada 13 vezes em cinco cepas distintas. Em seguida, observaram-se as famílias cry4, cry2, cry10, cry11, cry21 e cry70. Já os genes cry3, cry19, cry27, cry52 e cry69 foram encontrados apenas uma vez, indicando ocorrência pontual nas cepas analisadas. A cepa C15, em particular, apresentou os genes cry1 e cry21, sugerindo um potencial inseticida ampliado, com possível atuação tanto contra lepidópteros quanto contra nematoides. Até o momento, apenas sete famílias de cry foram descritas como tóxicas para nematoides, sendo cry21 uma delas. Este gene tem demonstrado toxicidade tanto para nematoides fitopatogênicos quanto para parasitas intestinais de mamíferos (14). Sabe-se que os genes cry1 são ativos contra lepidópteros, enquanto cry2, cry4, cry10, cry11 e cry21 atuam contra dípteros. O gene cry3 apresenta especificidade para coleópteros, e cry21 é conhecido por sua ação contra nematoides (15).

A partir das análises realizadas neste estudo, foi possível observar uma ampla diversidade de genes cry, com predominância da família cry1, mas também com a presença de outras variantes sendo algumas de ocorrência pontual. Essa diversidade

sugere a existência de diferentes mecanismos de ação e especificidade inseticida entre as cepas analisadas. Entre as toxinas produzidas por Bt, as proteínas cry de três domínios destacam-se como as mais estudadas (16). Apesar de compartilharem uma estrutura conservada em três domínios, essas toxinas apresentam sequências de aminoácidos altamente divergentes, o que pode influenciar diretamente sua especificidade e eficácia contra diferentes ordens de insetos (17). A atividade tóxica dessas proteínas está intimamente relacionada à sua estrutura tridimensional, sendo os domínios II e III especialmente importantes para a determinação da especificidade de ação (18, 19). Estudos evolutivos indicam que essas proteínas podem sofrer eventos de recombinação gênica e troca de domínios, principalmente o domínio III, favorecendo a geração de variantes com novas especificidades inseticidas (20). Esse processo pode explicar, por exemplo, a presença de toxinas com estruturas semelhantes, mas com ação direcionada a diferentes grupos de insetos-praga.

Dessa forma, a diversidade das proteínas cry encontradas na natureza pode ser atribuída a dois mecanismos principais: a evolução independente dos três domínios estruturais e a troca do domínio III entre diferentes genes, o que contribui para a seleção de proteínas com ação tóxica semelhante, mas com alvos distintos (18). Além disso, o alto grau de plasticidade genética dessas proteínas, somado à abundância de elementos transponíveis associados aos genes cry, favorece a ocorrência de eventos de transferência horizontal entre diferentes cepas de Bt, contribuindo para a emergência de novas linhagens com perfis tóxicos distintos (9, 21).

Dados obtidos nas análises indicaram que as cepas IBL200 e BMP144 apresentam simultaneamente genes cry e vip, o que pode resultar em um efeito sinérgico entre essas toxinas e ampliar seu potencial para o controle de pragas, especialmente aquelas com resistência prévia a proteínas Cry. As proteínas Vip desempenham um papel relevante no

manejo de pragas agrícolas; apesar de possuírem estrutura e função distintas das Cry, atuam de forma complementar, contribuindo para ampliar o espectro e a eficácia das formulações inseticidas. A combinação entre Vip e Cry tem sido amplamente utilizada na construção de linhagens comerciais de *Bt*, visando o controle eficiente de populações de insetos resistentes (8).

A segunda classe gênica mais abundante nas cepas analisadas foi *vpb*, detectada nas cepas IBL200, NB-176, BMP144, G25-6, AF96 e AF67, seguida pelas famílias *vip* e *vpa*. As proteínas vegetativas codificadas por essas famílias apresentam atividade inseticida, embora não compartilhem similaridade de sequência entre si. As proteínas *Vpa* e *Vpb* têm sido associadas à toxicidade contra espécies de coleópteros e hemípteros, enquanto as proteínas *Vip* (anteriormente denominadas *Vip3*) exibem atividade contra lepidópteros e compartilham um modo de ação funcionalmente semelhante ao das proteínas *Cry* (8, 10). As análises indicaram que as famílias gênicas *cyt* e *mpp* foram as menos frequentes entre as toxinas inseticidas identificadas nas cepas avaliadas. Os genes *cyt* foram detectados em apenas quatro cepas (BMP144, 1230, AF76 e B21), enquanto os genes *mpp* foram encontrados exclusivamente nas cepas IBL200, NB-176 e BLB-30AF, sugerindo que essas classes estão menos distribuídas em comparação com os genes *cry* e vegetativos.

Apesar da baixa frequência, a presença dessas toxinas é biologicamente relevante. Estudos demonstram que proteínas cristalinas Cry e Cyt podem atuar de forma sinérgica. Em especial, as proteínas Cyt1A são capazes de se ligar a receptores do intestino médio dos insetos, favorecendo a atuação conjunta com proteínas Cry e ampliando a toxicidade do complexo proteico (22). Neste contexto, destaca-se a cepa BMP144, que apresentou genes *cyt1A* juntamente com múltiplos genes *cry*, bem como a cepa 1230, que revelou a presença dos genes *cry4Ba1*, *cry10Aa3*, *cry11Aa1*, *cyt1Aa1*, *cyt1Ca1* e *cyt2Ba1*. Esta

última apresenta um perfil genético semelhante ao de *B. thuringiensis* serovar israelensis, cepa amplamente utilizada no controle de mosquitos. Essa cepa comercializada é conhecida pela produção de um consórcio de proteínas inseticidas, incluindo *Cry4Aa*, *Cry4Ba*, *Cry10Aa*, *Cry11Aa*, *Cyt1Aa* e *Cyt2Ba*, cuja ação sinérgica confere alta eficácia larvicida (2). Diante disso, a cepa 1230 desponta como uma forte candidata para estudos futuros voltados ao controle de dípteros, especialmente mosquitos vetores, devido à composição gênica que sugere elevada atividade inseticida sinérgica.

Como foi observado, as cepas BMP144 e C15 possuem 9 plasmídeos em seus genomas, porém os genes inseticidas estão contidos em apenas um plasmídeo na cepa BMP144 e em três plasmídeos na C15. Além destas, a cepa NB-176 também apresentou os genes concentrados em um único plasmídeo, dados esses que indicam que as cepas analisadas podem ter grandes plasmídeos autotransmissíveis. O sequenciamento e análise dos plasmídeos das cepas de Bt são um recurso importante uma vez que, frequentemente, é onde muitos dos genes de virulência com patogenicidade significativa são codificados, dando origem a diversidade de fenótipos e patologias das bactérias (3). As cepas de Bt podem conter uma diversidade de plasmídeos com o número variando de 1 a 16 e tamanhos diferentes. Os genes Cry em maioria estão localizados em plasmídeos (23) e, geralmente, são grandes plasmídeos autotransmissíveis responsáveis pelo mecanismo de conjugação entre as cepas. Outro fator importante é que as Bts não possuem genes distribuídos aleatoriamente, sendo encontrados em poucos plasmídeos (24).

Alguns genes inseticidas, entretanto, foram encontrados dentro de cromossomos. Identificamos que todas as cepas apresentam pelo menos um gene codificado no cromossomo, com destaque especial para a cepa IBL200 que apresentou todos os genes codificados fora de plasmídeos e, notavelmente, esta cepa não apresenta nenhum plasmídeo em seu genoma. A posição incomum dos genes foi relatada em poucos estudos

e pode ocorrer devido a presença de ilhas genômicas contendo elementos IS que cercam o cromossomo (25), o que pode indicar uma possível mobilidade dos genes do plasmídeo para o cromossomo (22). Além disso, a partir da ordenação dos genes observamos que alguns deles possuem distâncias intergênicas curtas. Por exemplo, a cepa IBL200 apresentou uma distância de apenas 17 pb entre os genes Vpa2Ac1 e Vpb1Ca1, presentes no cromossomo. O mesmo pode ser observado na cepa NB-176, que apresentou a mesma distância entre os genes Vpa2Ba1 e Vpb1Ad1 presentes no plasmídeo pCH-187. Uma distância curta entre genes também foi observada na cepa BMP144 que mostrou uma distância de 70 pb entre os genes Cry10Aa3 e Cry4Ba1 presentes no plasmídeo pCH_133-d. Essa curta distância entre os genes pode indicar a presença de operons controlando 2 genes inseticidas diferentes (26). A presença de operons pode ser explicada por meio do favorecimento da expressão gênica diferencial resultando em cristais parasporais que contêm diferentes toxinas ou em cristais distintos com toxinas específicas (27).

Outro ponto importante para a caracterização das proteínas são as análises referentes aos parâmetros físico-químicos, uma vez que são essenciais por fornecerem indicativos do seu potencial tóxico. Essas características estão diretamente relacionadas à estabilidade, solubilidade e capacidade de interação com receptores no intestino de insetos-alvo. A avaliação de tais parâmetros, sobretudo quando comparada aos valores típicos de proteínas inseticidas já caracterizadas, é fundamental para prever a eficácia biológica e subsidiar o desenvolvimento de formulações comerciais mais eficazes (5, 17). As proteínas cry apresentam variações de peso molecular e podem ser classificadas como protoxinas curtas (~70 kDa) ou longas (~130 kDa) (13). Os resultados identificaram ambos os tipos, confirmando a diversidade de proteínas cry nas cepas analisadas. No que se refere às proteínas Mpp, quatro proteínas indicaram compatibilidade com esse perfil

ao apresentarem uma variação entre 30 e 40 kDa, reforçando sua classificação como potenciais membros da família de toxinas Mpp.

Por fim, as análises revelaram que as cepas IBL200, NB-176, BMP114 e C15 apresentam elevada diversidade de genes inseticidas, superando, em número, o perfil genético clássico da cepa HD-1. Essa diversidade sugere que essas cepas possuem potencial biotecnológico promissor para o desenvolvimento de bioinseticidas de amplo espectro, especialmente em estratégias de manejo integrado de pragas. A cepa *Bacillus thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 é a mais amplamente utilizada comercialmente como bioinseticida e é considerada padrão de referência no controle biológico de pragas agrícolas (28). Estudos mostram que essa cepa possui ao menos seis genes cry, incluindo cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa e cry2Ab (29). A identificação de cepas que apresentam um repertório genético ainda mais diversificado que HD-1 reforça o potencial das cepas estudadas neste trabalho como candidatas a novos bioinseticidas de alta eficácia e ampla aplicabilidade.

8. REFERÊNCIAS

1. Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>
2. Fayad N, Patiño-Navarrete R, Kambris Z, Antoun M, Osta M, Chopineau J, Mahillon J, El Chamy L, Sanchis V, Kallassy Awad M. 2019. Characterization and Whole Genome Sequencing of AR23, a Highly Toxic *Bacillus thuringiensis* Strain Isolated from Lebanese Soil. *Curr Microbiol* 76:1503–1511. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01775-9>
3. Sun H, Xiang X, Li Q, Lin H, Wang X, Sun J, Luo L, Zheng A. 2021. Comparative genome analysis of *Bacillus thuringiensis* strain HD521 and HS18-1. *Sci Rep* 11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96133-w>

4. Domínguez-Arrizabalaga M, Villanueva M, Escriche B, Ancín-Azpilicueta C, Caballero P. 2020. Insecticidal activity of bacillus thuringiensis proteins against coleopteran pests. *Toxins* (Basel). MDPI AG <https://doi.org/10.3390/toxins12070430>.
5. Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>.
6. Bel Y, Ferré J, Hernández-Martínez P. 2020. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. *Toxins* (Basel). MDPI <https://doi.org/10.3390/toxins12120785>.
7. Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC. 2021. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *J Invertebr Pathol* 186. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
8. Gupta M, Kumar H, Kaur S. 2021. Vegetative Insecticidal Protein (Vip): A Potential Contender From *Bacillus thuringiensis* for Efficient Management of Various Detrimental Agricultural Pests. *Front Microbiol.* *Frontiers Media S.A.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659736>.
9. Sajid M, Geng C, Li M, Wang Y, Liu H, Zheng J, Peng D, Sun M. 2018. Whole-genome analysis of *Bacillus thuringiensis* revealing partial genes as a source of novel Cry toxins. *Appl Environ Microbiol* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.00277-18>
10. Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J. 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80:329–350. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-15>
11. Fu Z, Xiao R, Luo R, Hu Z, Yang H, Guo Z, Lei P, Shan S. 2017. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* HD133. *Genome Announc* 5. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00909-17>
12. Alves GB, Melo FL, Oliveira EE, Haddi K, Costa LTM, Dias ML, Campos FS, Pereira EJG, Corrêa RFT, Ascêncio SD, Santos GR, Smagghe G, Ribeiro BM, Aguiar RWS. 2020. Comparative genomic analysis and mosquito larvicidal activity of four *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strains. *Sci Rep* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60670-7>

13. Maagd RA, Bravo A, Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet. 17:193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)
14. Bel Y, Andrés-Antón M, Escriche B. 2023. Abundance, distribution, and expression of nematicidal crystal protein genes in *Bacillus thuringiensis* strains from diverse habitats. International Microbiology 26:295–308. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00307-z>
15. Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. Appl Microbiol Biotechnol. Springer Verlag <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>.
16. Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol Rev <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x>.
17. Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. Toxins (Basel). MDPI <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>.
18. Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Rodríguez-Almazan C, Pardo L, Soberón M. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microb Biotechnol <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x>.
19. Jurat-Fuentes JL, Crickmore N. 2017. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. J Invertebr Pathol 142:5–10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.018>
20. Das SK, Pradhan SK, Samal KC, Singh NR. 2021. Structural, functional, and evolutionary analysis of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*: an in silico study. Egypt J Biol Pest Control. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00394-6>.
21. Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. Bioeng Bugs 1:31–50. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>

22. Fayad N, Kambris Z, Chamy L El, Mahillon J, Awad MK. 2021. A Novel Antidipteran *Bacillus thuringiensis* Strain: Unusual Cry Toxin Genes in a Highly Dynamic Plasmid Environment <https://doi.org/10.1128/AEM>.
23. Fernando P, Cardoso H, Turra MF, Brasileira De Pesquisa Agropecuária -Embrapa E, Presidente D, Duque A, Diretores P, Ângela E, Brito Da Cunha B, Daniel D, Scolari G, Roberto J, Peres R. República Federativa do Brasil.
24. John D, Thomas I, Alun J, Morgan W, Whipps JM, Saunders JR. 2000. Plasmid Transfer between the *Bacillus thuringiensis* Subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in Laboratory Culture and Soil and in Lepidopteran and Coleopteran Larvae APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.
25. Lechuga A, Lood C, Salas M, van Noort V, Lavigne R, Redrejo-Rodríguez M. 2020. Completed genomic sequence of *Bacillus thuringiensis* HER1410 reveals a cry-containing chromosome, two megaplastids, and an integrative plasmidial prophage. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 10:2927–2939. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401361>
26. Costechareyre D, Dridi B, Rahbé Y, Condemine G. 2010. Cyt toxin expression reveals an inverse regulation of insect and plant virulence factors of *Dickeya dadantii*. *Environ Microbiol* 12:3290–3301. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02305.x>
27. Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis* A genomics and proteomics perspective. *Bioeng Bugs* <https://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>.
28. Day M, Ibrahim M, Dyer D, Bulla L. 2014. Genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1. *Genome Announc* 2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00613-14>
29. Sauka DH, BaSuRto-RíoS R, iBaRRa J, BenintenDe gRaciela B. Biological control characterization of an argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* Similar to the HD-1 Strain.

Tabela S1. Domínios conservados dos genes inseticidas identificados em cepas de *B. thuringiensis*.

Cepa	N° de acesso	Identificação	Identidade (%)	Codigo CDD	E-value	intervalo
IBL 200	WP_000369820.1	Cry1Ab18	100%	cd04085	2,73E-58	463-606
				pfam00555	5,22E-52	259-461
				cl39422	7,73E-33	684-868
				cl04339	6,47E-28	48-251
				cl39784	3,78E-05	616-680
IBL 200	WP_000405158.1	Cry1Ja2	100%	cl39784	1,08E-03	902-939
				pfam00555	9,15E-61	258-449
				cd04085	1,06E-56	449-593
				cl39422	1,43E-32	671-855
				cl04339	2,00E-22	49-250
IBL 200	WP_000203375.1	Cry1Bb1	100%	cl39784	1,06E-04	602-666
				pfam00555	2,23E-64	283-495
				cd04085	9,36E-57	496-639
				cl39422	2,70E-30	739-919
				cl04339	2,45E-22	72-275
IBL 200	WP_000837623.1	Cry1Id1	100%	cl39784	6,34E-05	953-1025
				cl39784	7,92E-04	649-713
				cd04085	1,71E-61	498-644
				pfam00555	1,71E-60	287-497
				cl04339	2,10E-27	76-279
IBL 200	WP_001089637.1	Cry2Ad1	100%	pfam09131	4,51E-131	267-472
				cl04339	2,02E-25	52-262
				pfam03944	2,39E-12	494-628
IBL 200	WP_000405159.1	Cry1Da3	99,90%	pfam00555	3,14E-53	258-450
				cd04085	1,53E-50	452-592
				cl39422	4,11E-33	668-852
				cl04339	4,68E-29	47-250
IBL 200	WP_001066376.1	Vip3Af1	99,70%	cl39784	1,26E-03	600-664
				pfam12495	6,43E-109	10-186
				pfam02018	1,94E-16	534-651
IBL 200	WP_000727639.1	Vpb1Ca1	99,60%	cl09551	2,81E-26	224-299
				cl38748	8,13E-21	302-498
				cl38749	4,23E-11	501-615

				cl08459	4,43E-09	50-154
IBL 200	WP_001087541.1	Cry1Nb1	99,30%	cd04085	1,40E-53	454-594
				pfam00555	1,20E-45	256-452
				cl04339	2,55E-23	40-245
				cl39784	7,10E-06	604-665
IBL 200	WP_000453539.1	Cry1Hb1	98,30%	pfam00555	4,54E-56	256-454
				cd04085	3,44E-47	456-596
				cl39422	4,97E-34	672-856
				cl04339	1,19E-24	49-248
				cl39784	7,33E-05	604-668
				cl39784	1,51E-03	890-927
IBL 200	WP_000255144.1	Vpa2Ac1	98,10%	cd00233	1,97E-76	255-451
				cl00173	4,53E-10	77-230
IBL 200	WP_000728165.1	Vpb1Ba1	61,60%	cl38748	1,64E-29	296-485
				cl09551	6,68E-26	224-293
				cl38749	9,22E-13	500-605
				cl08459	4,93E-09	47-151
IBL 200	WP_001087511.1	Cry1Ma2	38,70%	pfam00555	3,31E-41	299-517
				cd04085	7,83E-31	520-679
				cl04339	1,26E-29	86-291
IBL 200	WP_003308447.1	Mpp83Aa1	28,20%	cd20223	8,72E-26	59-181
IBL 200	WP_042972902.1	Cry2Aa5	23,70%	cl04339	8,94E-15	125-312
NB-176	WP_052574943.1	Cry3Aa12	100%	pfam00555	5,60E-60	295-499
				cd04085	3,58E-50	502-644
				cl04339	5,24E-26	83-287
NB-176	WP_000727638.1	Vpb1Ae1	99,70%	cl38748	3,38E-30	299-496
				cl09551	3,95E-25	221-296
				cl08459	1,72E-08	50-154
				cl38749	2,26E-08	502-607
NB-176	WP_000253776.1	Vpa2Aa3	93,40%	cd00233	3,10E-76	255-451
				cl00173	6,10E-12	77-255
NB-176	WP_086405553.1	Mpp5Ac1	78,30%	cl03107	8,30E-43	135-334
NB-176	WP_086405651.1	Vpa2Ba1	76,80%	pfam03496	2,44E-67	261-446
				cl00173	1,43E-12	115-249
NB-176	WP_223697903.1	Vpa2Bb1	71,60%	pfam03496	1,05E-61	247-432
				cl00173	1,22E-18	45-235
NB-176	WP_080893310.1	Vpb1Ad1	57,10%	cl38748	7,71E-31	306-505
				cl09551	8,78E-23	231-303
				cl38749	2,80E-14	511-616
				cl08459	4,21E-10	50-154
				cl07770	1,99E-05	811-863
NB-176	WP_086405652.1	Vpb1Ad1	55,30%	cl09551	4,73E-24	230-299
				cl38748	1,89E-23	302-496
				cl38749	7,02E-14	506-611
				cl08459	8,39E-12	49-157
				cl07770	3,83E-09	776-877

NB-176	WP_086405659.1	Mpp3Aa2	25,10%	cd20223	1,04E-33	101-225
NB-176	WP_044798436.1	Vpa2Ac1	22,50%	cd20493	3,83E-49	246-443
				cl00173	5,18E-13	56-244
NB-176	WP_044798434.1	Vpa2Ah1	20,60%	pfam03496	1,69E-57	74-272
HD521	WP_080989235.1	Cry7Da1	100%	cd04085	1,70E-54	493-638
				pfam00555	1,92E-44	284-491
				cl39422	6,30E-34	725-899
				cl04339	3,86E-25	76-276
				cl39784	4,33E-03	934-969
HD521	WP_050822470.1	Cry7Fb1	100%	cd04085	2,39E-39	499-660
				cl39422	2,17E-34	750-917
				pfam00555	6,89E-31	296-502
				cl04339	3,37E-17	83-288
HD521	WP_277680490.1	Cry7Ga1	99,30%	cd04085	2,35E-42	470-621
				cl39422	6,38E-38	701-878
				pfam00555	3,54E-29	259-467
				cl04339	6,75E-20	63-251
				cl39784	4,98E-03	913-948
HD521	WP_000811551.1	Vpb1Ea2	20,20%	cl09551	3,86E-11	75-137
				cl40431	1,09E-05	180-257
				cd04085		
FDAARGOS 801	WP_000369819.1	Cry1Ab1	100%		7,18E-58	463-606
				pfam00555	1,64E-52	259-461
				cl39422	1,22E-31	684-842
				cl04339	6,84E-28	48-251
				cl39784	1,48E-05	616-680
				cl39784	3,59E-03	876-913
				cl04339		
BMP144	WP_000390241.1	Cry11Aa1	100%	cl04339	9,43E-20	56-239
BMP144	WP_012211099.1	Cry4Ba1	100%	cl39422	9,60E-76	713-903
				pfam00555	1,34E-40	284-470
				pfam03944	2,06E-35	480-623
				cl04339	1,45E-16	69-268
				cl39784	1,19E-06	644-706
BMP144	WP_012211114.1	Cry4Aa2	100%	cl39422	1,23E-75	757-947
				pfam00555	6,89E-43	322-528
				cd04085	8,58E-42	530-678
				cl04339	4,85E-12	110-314
				cd04085		
BMP144	WP_001070502.1	Cry10Aa3	100%	cl04339	3,36E-38	503-650
				cl04339	1,64E-16	95-300
BMP144	WP_000074462.1	Cyt3Aa1	16,2	COG0580	4,94E-86	1-216
BMP144	WP_012211101.1	Cry4Ba1	34,5	cl39422	3,90E-74	58-256
BMP144	WP_000754156.1	Vpb1Da1	19,6	cd07474	4,63E-113	195-590
				cl28883	1,47E-21	385-497
				pfam05922	7,83E-10	81-158
				cl29105	1,62E-05	768-813
				cl03169		
BMP144	WP_000550493.1	Cyt2Ba1	100		1,33E-100	26-245

BMP144	WP_000429377.1	Cyt1Aa1	100	pfam01338	4,37E-123	18-249
BMP144	WP_000420482.1	Vip3Aa40	18,5	cl37069	4,08E-12	181-383
C15	WP_127064356.1	Cry21Aa3	100	cd04085	1,95E-24	540-686
				cl39422	3,88E-24	772-936
				cl04339	2,18E-06	82-327
				cl39784	2,05E-04	712-765
C15	WP_127064390.1	Cry21Aa2	46,3	cl39422	7,20E-26	736-900
				cl04339	6,36E-25	83-299
				pfam03944	3,54E-19	501-647
				cl39784	5,46E-05	667-728
C15	WP_127064393.1	Cry21Ca2	63,9	cl39422	2,92E-25	834-998
				pfam03944	5,21E-15	524-661
				cl04339	3,82E-11	57-297
				cl39784	1,73E-04	765-827
C15	WP_164727840.1	Cry21Ca2	66,3	cl39422	1,22E-27	888-1052
				pfam03944	2,76E-15	564-701
				cl04339	1,13E-09	97-337
				cl39784	6,38E-04	819-881
C15	WP_127064340.1	Cry1Aa6	22,3	cl04339	5,20E-19	112-337
				cl14880	1,05E-05	583-675
C15	WP_000754164.1	Cry7Fb1	18,9	cd07474	4,73E-113	195-590
BLB-30AF	WP_320483923.1	Cry69Aa2	63,8	cl39422	4,24E-60	727-923
				cl39422	4,24E-60	727-923
				cd04085	2,01E-23	498-648
				cl15971	1,16E-16	287-497
				cl39784	1,15E-03	660-720
BLB-30AF	WP_320483957.1	Cry4Ca1	36,4	cl39422	1,62E-74	58-254
BLB-30AF	WP_320483958.1	Cry52Aa1	68,3	cd04085	7,89E-37	518-658
				pfam00555	1,02E-33	302-516
				cl04339	7,01E-28	81-288
BLB-30AF	WP_320483967.1	Cry29Aa1	29	cl04339	1,15E-13	96-282
BLB-30AF	WP_320484100.1	Cry54Aa2	28,9	cl04339	7,82E-18	112-301
				pfam03944	1,68E-17	519-648
BLB-30AF	>WP_320483948.1	Cry70Ba1	97	cl04339	5,25E-18	110-337
BLB-30AF	WP_320483626.1	Mpp83Aa1	30,1	cd20223	7,69E-31	88-218
871Blist1	WP_193533771.1	Cry1Ma2	38,5	pfam00555	1,96E-40	299-517
				cd04085	7,04E-31	520-679
				cl04339	9,05E-29	86-291
AK47	WP_000769223.1	Cry1Ia10	100	cd04085	5,57E-61	498-644
				pfam00555	2,56E-60	287-497
				cl04339	9,33E-27	76-279
				cl39784	2,52E-03	656-713
AK47	WP_001067062.1	Cry2Aa1	100	pfam09131	7,38E-143	267-472
				cl04339	8,92E-27	80-262
				pfam03944	1,27E-13	494-628
AK47	WP_001089638.1	Cry2Ab1	100	pfam09131	2,00E-135	267-472

				cl04339	6,00E-27	48-262
				cl14880	3,32E-09	494-628
AK47	WP_001039073.1	Vip3Aa10	100	pfam12495	2,68E-108	12-188
				pfam02018	4,58E-16	536-653
G25-6	WP_197223348.1	Cry19Ba1	68,1	pfam00555	1,60E-42	291-494
				cd04085	6,03E-39	496-636
				cl04339	2,17E-20	74-278
G25-6	WP_197223343.1	Cry27Aa1	72,9	cd04085	1,39E-27	519-681
				cl04339	9,45E-14	120-301
				cl15971	1,07E-11	314-498
G25-6	WP_086390033.1	Cry70Bb1	66,7	cl04339	1,24E-17	110-338
				cl14880	2,75E-04	560-656
G25-6	WP_176330612.1	Vpb4Ba1	99,3	cl09551	5,83E-25	213-290
1230	WP_114365447.1	Cry4Ba1	81,3	cl39422	1,38E-76	713-903
				pfam00555	1,15E-39	284-470
				pfam03944	4,97E-35	480-623
				cl04339	1,57E-16	69-268
				cl39784	9,36E-07	644-706
1230	WP_000390241.1	Cry11Aa1	100	cl04339	9,43E-20	56-239
1230	WP_000550493.1	Cyt2Ba1	100	cl03169	1,33E-100	26-245
1230	WP_000429377.1	Cyt1Aa1	100	pfam01338	4,37E-123	18-249
1230	WP_000079177.1	Cyt1Ca1	100	pfam01338	1,23E-111	12-244
				cd23445	4,37E-31	384-521
				cd23445	4,60E-30	235-374
1230	WP_144481769.1	Cry10Aa3	99,9	cd04085	3,30E-38	503-650
				cl04339	1,76E-16	95-300
1230	WP_114365447.1	Cry4Ba1	81,3	cl39422	1,38E-76	713-903
				pfam00555	1,15E-39	284-470
				pfam03944	4,97E-35	480-623
				cl04339	1,57E-16	69-268
				cl39784	9,36E-07	644-706
AFS0502676	WP_097961776.1	Vpb1Ea2	20,2	cl09551	7,49E-11	75-137
				cl40431	1,20E-05	180-257
AFS0502676	WP_097961786.1	Cyt2Ca1	30,7	cl03169	4,43E-24	5-199
AFS056597	WP_098251400.1	Vpb1Ea2	19,8	cl09551	3,57E-11	75-137
				cl40431	1,19E-05	180-257
B21	WP_332285436.1	Cyt2Ca1	30,7	cl03169	3,26E-24	5-199

CAPÍTULO III

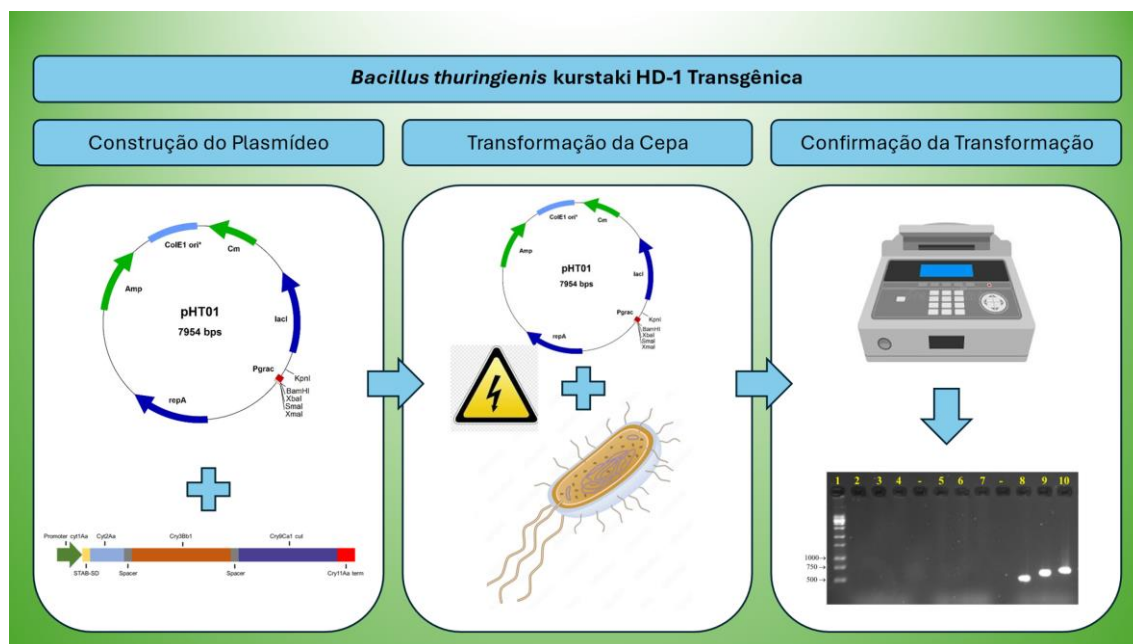
Transformação de *Bacillus thuringiensis* com um conjunto ampliado de proteínas inseticidas.

Autores: Beatriz Baldin¹, Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brasil.

²Curso de Graduação em Biotecnologia, Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, Brasil.

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

O presente estudo teve como objetivo a transformação genética da cepa *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 com um conjunto ampliado de genes inseticidas visando o controle de insetos pragas. Foi utilizado o plasmídeo pHT01 contendo um cassete de expressão policistrônico com os genes *cyt2Aa*, *cry3Bb1* e *cry9Ca1*. A construção foi inicialmente propagada em *Escherichia coli* C2925 e posteriormente introduzida na cepa HD-1 por eletroporação. A confirmação da transformação foi realizada por PCR, evidenciando a presença dos três genes na cepa transformada. Os protocolos de preparação de células competentes e os parâmetros de eletroporação foram otimizados para aumentar a eficiência do processo, incluindo o uso de glicina para enfraquecimento da parede celular e tampões com sacarose. Os resultados obtidos demonstram a viabilidade da transformação genética da cepa HD-1 com múltiplos genes inseticidas, representando um passo importante para o desenvolvimento de um bioinseticida com espectro ampliado de ação. Etapas futuras incluem a confirmação da expressão das proteínas por SDS-PAGE e a condução de bioensaios para validação da eficácia inseticida. Em conclusão, este estudo reforça o potencial da engenharia genética na obtenção de bioinseticidas mais eficazes, com espectro de ação ampliado, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de manejo integrado de pragas com aplicação direta na agricultura brasileira.

Palavras-chave: bioinseticida, eletroporação, proteínas Cry e Cyt, transformação genética, controle biológico.

1. INTRODUÇÃO

Entre as culturas agrícolas de maior relevância econômica, o tomateiro se destaca como a hortaliça mais consumida no mundo, conforme dados da Embrapa. Segundo o portal Notícias Agrícolas (2024), o Brasil cultivou aproximadamente 56,8 mil hectares de tomate, resultando em uma produção estimada de 4,3 milhões de toneladas. Em termos econômicos, o valor bruto da produção (VBP) do tomate alcançou cerca de R\$ 8,7 bilhões em 2023, com rendimento médio de R\$ 15.882,47 por hectare. No ano seguinte, o VBP cresceu 7,09%, impulsionado por um aumento de 19,20% na produção, mesmo diante de uma queda de 10,16% nos preços reais (Notícias Agrícolas, 2024). Esses números reforçam a importância da cultura do tomate para a economia agrícola brasileira, tanto pela expressiva produção quanto pela geração de renda aos produtores. No entanto, devido à elevada demanda para consumo in natura e industrial, essa hortaliça figura entre as mais contaminadas por agrotóxicos. Em 2022, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) apresentou um relatório indicando que, de todos os agrotóxicos comercializados no país, 45 são utilizados na pulverização de culturas de tomate, na maioria das vezes com concentrações acima do permitido, conforme dados apresentados pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, tornando-se um risco para o consumo alimentar.

Independentemente do sistema de produção, no campo aberto ou em estufas, o tomateiro está sujeito ao ataque de diversos insetos-praga que podem estar presentes em todos os níveis de cultivo (Embrapa Hortaliças, 2019). Entre as diversas pragas, algumas se destacam como mais prejudiciais e importantes para manejo como os insetos *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, *Tuta absoluta* (MICHEREFF et al., 2022) e outras se mostram como pragas secundárias, ou seja, com menor importância em relação a prejuízos econômicos, mas que provocam certo grau de danos, como *Diabrotica spp*, *Spodoptera*

spp, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, *Rachiplusia nu* e *Pseudoplusia includen* (MOURA et al., 2014). Diante dos inúmeros impactos negativos provocados pelos defensivos agrícolas convencionais e do crescente número de insetos praga, principalmente nas culturas de tomate, torna-se urgente a adoção de estratégias alternativas que aliem eficiência no controle de pragas à preservação ambiental. Assim, soluções sustentáveis que substituam os insumos químicos tradicionais têm ganhado destaque. (Padmakumar et al., 2023).

Nesse cenário, organismos biológicos surgem como promissoras ferramentas no controle de pragas. Entre essas alternativas, destaca-se o uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria entomopatogênica capaz de produzir proteínas inseticidas altamente específicas, com potencial para o controle biológico de diversas pragas agrícolas (Bravo; Gill; Soberón, 2007a; Soberón; Monnerat; Bravo, 2016). Entre as cepas de Bt com importância inseticida, a que se destaca é a *B. thuringiensis subsp. kurstaki* (HD-1) em particular devido aos seus corpos paraporiais com ação tóxica contra lepidópteros, representando um dos bioinseticidas mais eficazes utilizados mundialmente (Eleazar Barboza-Corona et al., 2014). Conforme relatado por AKHTAR et al. (2021) é necessário que ocorra uma alta formação de esporos e cristais para que a proteína tenha maior eficiência quando usada como inseticida nos campos de culturas, para que a proteína seja estável a esporulação é um fator chave para que promotores induzam a sua síntese adequadamente (AKHTAR et al., 2021). Adicionalmente, a engenharia genética se torna uma alternativa para que as cepas de Bt possam ter uma maior eficácia contra os insetos-alvo, ampliando seu espectro de ação inseticida para culturas específicas como também melhorando a persistência em plantas. Neste sentido, alguns métodos da engenharia genética podem ser utilizados para que as cepas de Bt se tornem mais eficazes como a

recombinação genética e a transformação da bactéria por meio da eletroporação (Sansinenea; Vázquez; Ortiz, 2010).

2. METODOLOGIA

2.1 Vetor de expressão e cepas

O plasmídeo selecionado para o projeto foi o pHT01. O plasmídeo pHT01 é um funciona como um vetor de transporte compatível tanto com *Escherichia coli* quanto com *Bacillus thuringiensis*, conferindo resistência à ampicilina em *E. coli* e ao cloranfenicol em *B. thuringiensis* (Akhtar et al., 2021). Neste plasmídeo foi clonado um cassete de expressão contendo Promotor cyt1Aa + STAB-SD + Cyt2Aa + espaçador + Cry3Bb1 + espaçador + cry9Ca1 cut + Cry11Aa terminador. Este inserto foi sintetizado e clonado entre os sítios XbaI/SmaI no plasmídeo pHT01 empresa GenScript Biotech ([Nova Jersey, EUA](#)) (Figura 3). O promotor cyt1Aa controla a expressão dos genes durante a esporulação, e a sequência STAB-SD é uma sequência Shine-Dalgarno que ajuda a recrutar o ribossomo para o RNAm dessa construção, aumentando a o nível de expressão das proteínas. Essa construção irá funcionar como um RNA policistrônico, expressando os genes Cyt2Aa, Cry3Bb1 e Cry9Ca1. As sequências codantes desses genes estão separadas por espaçadores curtos e no final da construção temos o terminador Cry11Aa para finalizar a síntese de RNAm.

Esse plasmídeo foi inserido na cepa de *Escherichia coli* C2925 para multiplicação e posterior extração. Esta cepa é caracterizada por não metilar o DNA. E o uso de plasmídeos não metilados facilita a posterior transformação de células de *B. thuringiensis*.

Foi selecionada para o projeto a cepa de *B. thuringiensis kurstaki* HD-1. A cepa HD-1 é a mais empregada como bioinseticida em nível mundial, sendo considerada um padrão de referência para o controle biológico de pragas (Day et al., 2014). Na cepa HD-1 são encontrados, naturalmente, os genes: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac Cry2A (AKHTAR et al., 2021). Essa combinação de genes e cepa HD-1 pode permitir o controle de diversos insetos pragas do tomateiro (Tabela 1).

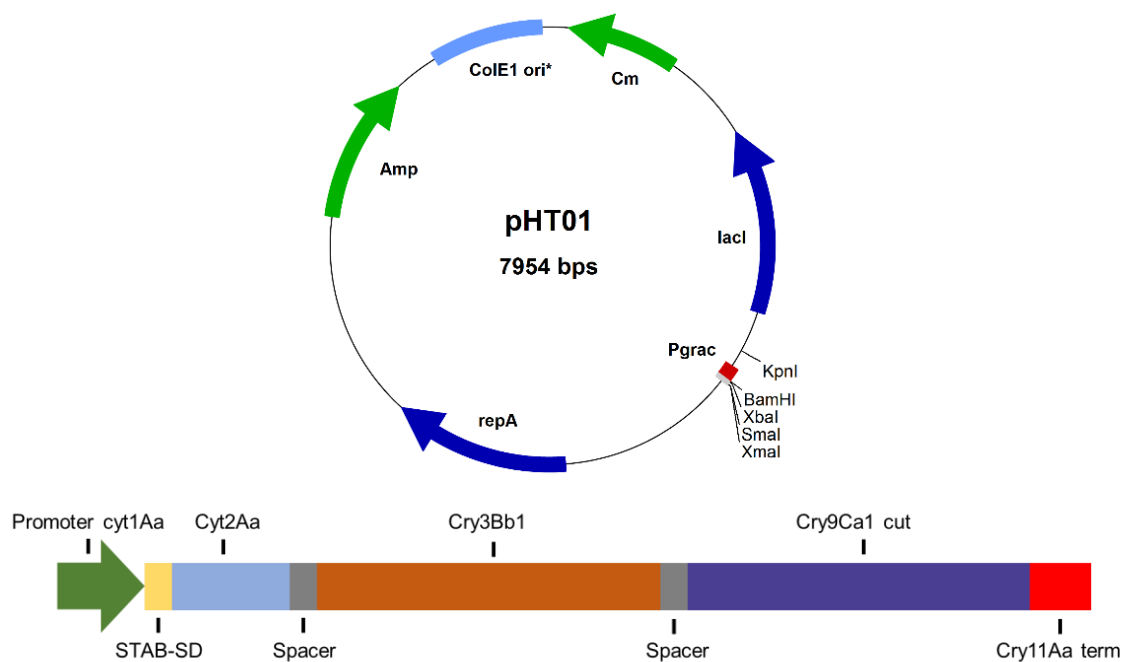


Figura 3. Plasmídeo pHT01 e cassete de expressão de proteínas inseticidas. O inserto foi clonado entre os sítios XbaI/SmaI do plasmídeo pHT01 entre os sítios XbaI/SmaI.

Tabela 1: Genes Cry e Cyt de *Bacillus thuringiensis* e suas respectivas ações inseticidas contra pragas do tomateiro. A tabela mostra a relação entre os genes Cry e as espécies de insetos-praga alvos, destacando a especificidade de cada gene no combate a diferentes pragas que afetam a cultura do tomate.

Gene	Inseto-praga	Nome Popular	Referência
Cry1Ac	<i>Helicoverpa spp</i>	lagarta-helicoverpa	(Macrae et al., 2005)
Cry1Ac	<i>Pseudoplusia includens</i>	lagarta-falsa-medideira	(Bernardi et al., 2012)
Cry9c e Cry2ab	<i>Agrotis ipsilon</i>	lagarta-rosca	(Lambert et al., 1996)
Cry1Aa	<i>Tuta absoluta</i>	traça-do-tomateiro	(Dammak et al., 2016)
Cry1A	<i>Bemisia tabaci</i>	mosca-branca	(Cabra; Fernandez, 2019)
Cry1A	<i>Rachiplusia nu</i>	lagarta-da-soja	(Macrae et al., 2005)
Cry3Bb1	<i>Diabrotica spp</i>	vaquinha-verde	(Siegfried; Vaughn; Spencer, 2005)
Cyt2Aa	<i>Myzus persicae</i>	pulgão-verde	(Chougule et al., 2013)

2.2 Preparo de células competentes de *E. coli* e transformação

Inicialmente, para a multiplicação do plasmídeo pHT01, a cepa C2925 de *Escherichia coli* (*E. coli*) foi transformada por eletroporação. A obtenção de células competentes foi feita segundo protocolo previamente publicado. Uma colônia de *E. coli* foram coletadas e pré-cultivada em meio SOC (composição 2 % peptona, 0.5 % extrato de levedura, 10 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgSO₄, 10mmol/L MgCl₂ e 20 mmol/L glicose) a 37°C e 190 rpm, por 16h. Em seguida, 2 mL do pré-inóculo foi adicionado em 100 mL de meio SOC fresco e incubada a 37 °C e 190 rpm até atingir uma densidade óptica (OD600) entre 0,2 e 0,3. Após a incubação as células foram resfriadas no gelo por 10 minutos e centrifugadas a 800 g e 4 °C por 20 minutos. O *pellet* resultante passou por duas lavagens com solução de 10% de glicerol gelada antes de nova

centrifugação sob as mesmas condições. Por fim, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas no volume residual da solução de lavagem e ajustadas para atingir uma concentração final entre $1,25$ e $7,5 \times 10^{10}$ células por mL ($A_{600} = 25\text{--}150$) (NOVÁKOVÁ et al., 2014). A suspensão resultante foi utilizada imediatamente para eletroporação ou armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ após congelamento em glicerol 50%.

A metodologia utilizada para a transformação das células foi a eletroporação. As cubetas de eletroporação (0,2 cm) foram previamente resfriadas em gelo, e 50 μL de células competentes foram misturados, ainda sob refrigeração, com 2 μL (160 pg) do DNA plasmidial. Em seguida, essa suspensão foi transferida para a cubeta de eletroporação e submetida a um campo elétrico de 2,5 kV. Logo após a aplicação do pulso elétrico, foi adicionado 1 mL de meio LB (ou SOC), e a mistura foi transferida para um tubo e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1h hora para recuperação celular. Diluições apropriadas da suspensão foram plaqueadas em meio de ágar LB suplementado com 100 mg/L de ampicilina. As placas foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite para análise do crescimento das colônias transformadas (Nováková et al., 2014a).

2.3 Extração de plasmídeo

O DNA plasmidial purificado foi extraído conforme método padrão de Midiprep (Sambrook & Russel, 2000). As amostras foram quantificadas em equipamento Qubit fluorometer Invitrogen e analisadas quanto sua integridade em gel de agarose 1%.

2.4 Preparo de células competentes de Bt HD-1

No preparado de células HD-1 competentes, uma colônia da bactéria foi cultivada em um 20 mL de meio LB a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 190 rpm, por 16h. Em seguida, após o crescimento do pré-inóculo, 2 mL do pré-inóculo foi adicionado em 100 mL de meio LB, e incubado

em agitador a 30 °C e 190 rpm. A densidade óptica (OD600) foi mensurada a cada hora até atingir o valor entre 0,2 e 0,3. Após atingir a OD esperada, foi inserido no meio de cultura glicina até a concentração de 3%, o meio foi mantido por mais 2h em 30 °C e 190 rpm. Após a incubação, as células foram mantidas em gelo por 10 minutos e em seguida transferidas para dois tubos falcons e centrifugadas por 5 minutos a 5.000g em 4 °C. Por fim, as células passaram por três lavagens consecutivas com o tampão de eletroporação (272 mmol L⁻¹ sacarose, 0,5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 5 mmol L⁻¹ K₂HPO₄ e 0,5 mmol L⁻¹ KH₂PO₄), em pH 7,2, foram ressuspensas em um volume da mesma solução. A suspensão celular resultante foi então congelada para uso futuro ou utilizada imediatamente no processo de eletroporação (Peng et al., 2009a).

A eletroporação das células de Bt foi realizada em cubetas 0,2 cm previamente resfriadas, onde 100 µL de células foram combinadas com 2,3 µL (1 µg) e 10µL (4,4 µg) de DNA plasmidial. Após a eletroporação as suspensões de células foram diluídas com 1 mL de meio LB e incubadas por 1h em 30 °C e 190 rpm. Alíquotas foram espalhadas em placas de ágar LB suplementadas com 5 µg/mL do antibiótico cloranfenicol e foram mantidas em estufa por 16h a 30 °C.

2.5 Confirmação da transformação por PCR

A confirmação da transformação de *B. thuringiensis* HD-1 foi feita por PCR. Foram utilizados primers específicos para os genes Cyt2Aa, Cry3Bb1 e Cry9Ca1 (Tabela 2). O DNA das cepas Bt HD-1 controle e Bt HD-1 transformada foram extraídos por um método simples que usa sonicador para romper as células. Células de Bt HD-1 e Bt HD-1 transformada foram inoculadas em placas contendo meio LB e incubadas a 30 °C overnight. Uma colônia de cada bactéria foi suspensa em 30 µL de H₂O destilada em um tubo eppendorf de 1,5 mL. A solução foi tratada por sonicação a 40 kHz em temperatura

ambiente por 5 min e centrifugadas por 1 min em 10.000 g. A fase aquosa foi transferida para outro microtubo e as amostras foram testadas usando-se 1 µL de DNA nas reações de PCR (CHEN; YUAN, 2023).

A amplificação por PCR foi realizada em um Termociclador-AmpliGene Lite Loccus, utilizando oligonucleotídeos específicos previamente desenhados, com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos e 30 segundos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 63 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. Ao final dos ciclos, foi realizada uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, corados com GelRed e visualizados por transluminador.

Tabela 2. Primers usados nas reações de PCR.

Gene amplificado	Nome do primer	Sequência	Fragmento amplificado
Cyt2Aa	Cyt2Aa-Forward	ACGGTTCCATCCAGTGATTTAGA	393 pb
	Cyt2Aa-Reverse	ATTGTGGGCGGATAAACTATGC	
Cry3Bb1	Cry3Bb1-forward	ATACGCGTCTTCAACCTGGTT	552 pb
	Cry3Bb1-reverse	AAGCACCTGAAGACAAGGCAT	
Cry9Ca1	Cry9Ca1-forward	CAAACCCACAGCTTACACGTG	628 pb
	Cry9Ca1-reverse	TTAAGGTCCACATCACGACGG	

3. RESULTADOS

Transformações da cepa C2925 de *E. coli* e da cepa HD-1 de Bt foram realizadas por meio do procedimento de eletroporação. As transformações bem-sucedidas foram confirmadas por extração de plasmídeo, eletroforese e por PCR.

3.1 Transformação de *Escherichia coli*

As células de *Escherichia coli* foram transformadas com o objetivo de produzir o plasmídeo pHT01 que, posteriormente, foi purificado e utilizado na transformação das

cepas de *Bacillus thuringiensis* HD-1. Após a incubação a 37°C *overnight*, foi observada a formação de uma única colônia da cepa C2925 transformada, indicando um resultado positivo para a eletroporação, porém com baixa eficiência de transformação. Para confirmar a presença do plasmídeo, foram realizados testes complementares. Primeiramente, a colônia foi submetida a um teste de resistência à ampicilina, sendo cultivada em meio líquido LB contendo o antibiótico e incubada a 37°C *overnight*. O crescimento bacteriano foi observado, confirmando a presença do plasmídeo, uma vez que ele confere resistência à ampicilina para *E. coli*. Em seguida, foi realizada a extração do DNA plasmidial e a quantificação revelou uma alta concentração de DNA, aproximadamente 441 ng/μL, corroborando o sucesso da transformação. A integridade do plasmídeo foi verificada por eletroforese em gel de agarose, onde as amostras apresentaram perfis compatíveis com o esperado (Figura 4). A confirmação da transformação genética e a obtenção bem-sucedida do plasmídeo foram etapas fundamentais para a continuidade dos experimentos subsequentes, principalmente porque a cepa C2925 não metila o DNA, e o uso de DNA não metilado favorece a transformação de *Bacillus thuringiensis*.

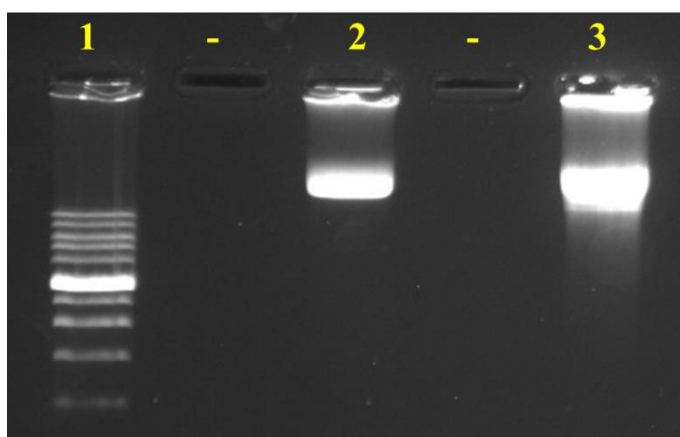


Figura 4. Extração de plasmídeo pHT-01 da cepa C2925. 1 – Marcador de peso molecular; 2 – 3 μl da midiprep; 3 – 6 μl da midiprep.

3.2 Transformação da Bt HD-1

Foram testadas duas concentrações de DNA para a eletroporação de *Bacillus thuringiensis* utilizando a mesma preparação de células competentes. Na condição com 2,3 μ L de DNA (1 μ g), não houve formação de colônias nas placas de ágar após a incubação, indicando ausência de transformação. Por outro lado, a concentração de 10 μ L de DNA (4,4 μ g) resultou na formação de colônias, demonstrando uma transformação bem-sucedida. Esses resultados indicam que uma quantidade maior de DNA foi essencial para aumentar a eficiência do processo de transformação em *Bt*. Adicionalmente, durante a padronização do protocolo de transformação, foram testadas outras duas abordagens para preparo de células competentes, utilizando tampões de eletroporação alternativos: um à base de sacarose e glicerol (Peng et al., 2009b), e outro contendo polietilenoglicol (PEG6000) (Mahillon; Lereclus, [S.d.]). Apesar de terem sido executados conforme descrito na literatura, os procedimentos não apresentaram resultados satisfatórios com a cepa utilizada, sendo incluídos neste trabalho como parte dos procedimentos experimentais avaliados.

A presença dos genes *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9Ca1* em *Bacillus thuringiensis* HD-1 transformada foi confirmada por PCR. Os resultados obtidos demonstraram bandas com os tamanhos esperados para os genes-alvo, confirmando a presença das sequências inseridas no plasmídeo pHT01. A cepa controle, *Bt* HD-1 não transformada, não apresentou amplificação para os genes testados, corroborando a especificidade da reação (Figura 5). Os perfis de amplificação observados validam o sucesso da transformação por eletroporação e indicam que os genes inseridos foram efetivamente introduzidos na cepa de *Bt* HD-1.

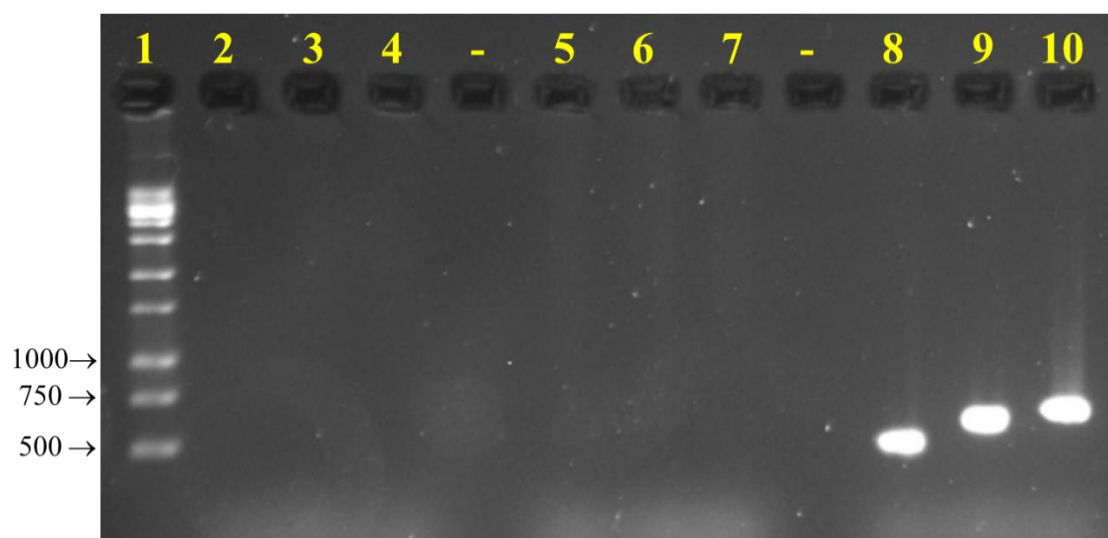


Figura 5. PCR confirmando a presença dos genes *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9Ca1* na bactéria *B. thuringiensis* HD1. 1 - Marcador de peso molecular; 2, 3 e 4 - controle negativo das reações de PCR para os genes *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9Ca1*; 5, 6 e 7 - PCR para os genes *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9Ca1* usando DNA total extraído da cepa HD1 não transformada; 8, 9 e 10 - PCR para os genes *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9Ca1* usando DNA total extraído da cepa HD1 transgênica.

4. DISCUSSÃO

Dentre as diversas cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) descritas, a HD-1 é a mais amplamente utilizada como bioinseticida comercial, sendo referência no controle biológico de pragas agrícolas e florestais (Day et al., 2014). Sua alta eficiência está associada à presença de múltiplos genes *cry*, responsáveis pela produção de proteínas com atividade inseticida. A cepa Bt HD-1 foi selecionada para transformação genética devido possuir, naturalmente, os genes *Cry1Aa*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry2Aa* e *Cry2Ab* (Sauka et al., [S.d.]). Estudos mostraram que os genes *Cry1Aa*, *Cry1Ac*, *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9c* apresentam, em conjunto, atividade contra cinco espécies de insetos-praga do tomateiro (?), e os genes *Cry1Aa*, *Cry1Ac* e *Cry2Ab* já estão presentes no genoma da cepa HD-1. Portanto, para ampliar o espectro de ação da cepa HD1 contra pragas do tomateiro, os genes *Cyt2Aa*, *Cry3Bb1* e *Cry9c* foram introduzidos por meio das sequências codificantes sintetizadas e clonadas no vetor pHT01.

A introdução de novos genes inseticidas, como os que codificam proteínas Cyt, tem sido uma estratégia importante para ampliar o espectro de ação dos bioinseticidas. Diferentemente das proteínas Cry, as toxinas Cyt possuem um modo de ação distinto, o que as torna uma alternativa promissora para auxiliar no controle de populações resistentes. Estudos indicam que a combinação de proteínas Cry e Cyt pode resultar em um efeito sinérgico, aumentando a eficácia dos bioinseticidas e reduzindo a taxa de evolução da resistência entre as pragas-alvo (Fayad et al., 2021). Além disso, as toxinas Cry3 e Cry9 também foram escolhas importantes para a construção do plasmídeo por serem eficazes contra coleópteros e lepidópteros, respectivamente (Ben-dov et al., 1999).

A transformação eficiente das cepas de Bt depende do método utilizado é um pré-requisito para a manipulação genética bem-sucedida. Entre os métodos de transformação de Bt existentes, a eletroporação tem a escolha mais amplamente utilizada devido à sua técnica simples, rápida e que pode ser realizada com estoques de células congeladas (Masson; Préfontaine; Brousseau, 1989). Apesar de algumas cepas de *Bacillus* spp. serem naturalmente competentes (ou seja, capazes de absorver DNA naturalmente), a maioria das cepas não é naturalmente competente para absorver DNA exógeno, exigindo tratamentos específicos para que a transformação seja bem-sucedida. Para isso, alguns fatores devem ser considerados para garantir uma maior eficiência no processo de transformação. Um fator está relacionado à passagem do DNA plasmidial pela parede celular, cuja composição pode influenciar diretamente a permeabilidade ao DNA. Além disso, o tamanho do plasmídeo pode afetar a eficiência da transformação. Outro fator envolve o sistema de restrição-modificação da célula hospedeira, que pode degradar o DNA exógeno caso o padrão de metilação não seja compatível (Zegeye; Aspholm, 2022a).

Algumas espécies de bactéria produzem enzimas que clivam somente DNA metilado (Spath; Heinl; Grabherr, 2012), muitas vezes dificultando o processo devido a degradação do plasmídeo pela célula (Zegeye; Aspholm, 2022b). Por este motivo, foi realizada a escolha da cepa de *E. coli* C2925, que não metila o DNA, para se obter uma melhor eficiência na transformação da cepa HD-1. Segundo demonstrado por SPATH (2012) transformações realizadas com o plasmídeo propagado em cepas C2925 apresentam maior eficiência. O preparo de célula competente da cepa C2925, realizado com o meio SOC se mostrou mais eficiente em relação a competência em relação ao uso do meio LB, o que pode ser devido ao meio apresentar mais nutrientes e açúcar que o meio LB que é composto apenas por 1% peptona, 0,5% extrato de levedura e 0,5% NaCl (Nováková et al., 2014b).

Bactérias gram-positivas, como *Bacillus thuringiensis*, geralmente apresentam menor eficiência de transformação em comparação com gram-negativas, devido à estrutura mais espessa de sua parede celular. A espessura da parede bacteriana pode ter relação direta com a eficiência na transformação uma vez que pode interferir na permeabilidade do plasmídeo na célula (Zegeye; Aspholm, 2022a). Para contornar essa limitação, diferentes estratégias têm sido testadas para enfraquecer a parede e facilitar a entrada de DNA. A glicina, em particular, tem se destacado como um agente eficaz, pois se incorpora às pontes interpeptídicas do peptidoglicano no lugar da alanina, reduzindo a reticulação da parede celular e aumentando sua permeabilidade ao DNA.

Neste estudo o método de enfraquecimento da parede celular mediado por glicina foi utilizado e demonstrou ser eficaz na competência da célula para a eletroporação, uma vez que o tratamento aumentou a eficiência de transformação. Estudos indicam que seu uso melhora a transformação de Bt quando aplicada em baixa concentração e por curtos

períodos, evitando efeitos negativos no crescimento bacteriano e melhorando significativamente a eficiência do processo de transformação (Peng et al., 2009b).

Outro fator determinante para a transformação é a composição da solução tampão utilizada na eletroporação. De acordo com Peng et al., a solução contendo 272 mmol L⁻¹ de sacarose, 0,5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 5 mmol L⁻¹ de K₂HPO₄ e 0,5 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄ demonstrou alta eficiência na transformação de células de Bt, assim como relatado para outras. A sacarose, nesse contexto, parece atuar na proteção osmótica das células após o tratamento com glicina e exposição a altos campos elétricos. Além disso, a presença de MgCl₂, K₂HPO₄ e KH₂PO₄ pode contribuir para a estabilidade iônica e manutenção do pH adequado, fatores essenciais para otimizar a eficiência do processo (Peng et al., 2009b).

A competência celular de Bt também representa outro ponto importante para a transformação por eletroporação eficiente e está diretamente relacionada ao seu ciclo de crescimento, particularmente às fases vegetativa e de esporulação (Lereclus et al., 1989). Em um estudo realizado por Masson et al. (1989) foi demonstrado que a eficiência da transformação por eletroporação em Bt pode ser afetada pela fase de crescimento das células. Durante a fase exponencial (vegetativa), as células apresentam maior competência para captar DNA exógeno, já que estão metabolicamente ativas e com uma estrutura mais permeável. Isso facilita a entrada do DNA durante a eletroporação. Conforme a cultura entra na fase estacionária e avança para a esporulação, a parede celular se torna mais rígida e a membrana menos fluida, dificultando o processo e impactando negativamente a eficiência da transformação, devido a redução da capacidade da célula de absorver o material genético introduzido (Masson; Préfontaine; Brousseau, 1989).

As delta-endotoxinas são codificadas por genes que estão tipicamente localizados em grandes plasmídeos (>30-MDa) (Sauka et al., [S.d.]). Para uma transformação eficiente a construção do DNA plasmídeo deve ser capaz de passar facilmente pela parede celular bacteriana para atingir o interior da célula (Zegeye; Aspholm, 2022b). Segundo estudos, a eficiência de transformação de bactérias Bt pode diminuir ligeiramente com o aumento do tamanho do DNA (Ohse et al., 1995) já que moléculas maiores possuem mais dificuldade para passarem pelos canais na membrana celular. O plasmídeo pHT01 com os genes inseridos neste projeto possui 13375 pb, considerado um plasmídeo grande e, por este motivo, seu tamanho pode ter reduzido a eficiência de transformação (Chan et al., [S.d.]). Com isso, os resultados obtidos no estudo representam um passo essencial no desenvolvimento de um bioinseticida geneticamente modificado, possibilitando a continuidade das análises para avaliar a expressão das proteínas inseticidas e sua aplicação no controle de pragas.

5. CONCLUSÃO

A transformação genética de *Bacillus thuringiensis* (Bt) por eletroporação é um processo amplamente utilizado para inserção de DNA exógeno, permitindo a modificação genética deste microrganismo de interesse biotecnológico. A partir dos experimentos realizados, foi possível observar que a abordagem utilizada apresentou potencial para o desenvolvimento de um bioinseticida à base de *Bacillus thuringiensis*. Os resultados obtidos demonstraram que a linhagem estudada possui características promissoras, indicando a presença do gene responsável pela produção de proteínas com potencial inseticida, embora ainda seja necessário confirmar sua expressão. Além disso, para validar a eficácia do bioinseticida e sua aplicabilidade em condições reais, ainda são necessários experimentos adicionais.

Dentre as etapas futuras, a realização de um ensaio em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) é essencial para confirmar a expressão das proteínas-alvo, garantindo que a cepa transformada está de fato produzindo as novas proteínas durante a esporulação. Além disso, a condução de bioensaios permitirá avaliar a eficiência da bactéria contra os insetos-alvo, determinando seu real potencial de aplicação. Dessa forma, embora os resultados obtidos até o momento sejam promissores, o projeto ainda necessita de avanços experimentais para consolidar sua viabilidade. A continuidade da pesquisa permitirá não apenas a otimização do processo de produção, mas também a validação da bioatividade do produto a ser desenvolvido, contribuindo para alternativas sustentáveis no controle de pragas agrícolas. Os dados aqui obtidos abrem caminho para novas estratégias de melhoramento genético de Bt com foco em resistência múltipla e estabilidade em ambientes agrícolas. A bactéria *Bacillus thuringiensis* desenvolvida neste trabalho, caso se mostre efetiva no controle de insetos praga, será panteada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MOURA, Alexandre Pinho de; MICHEREFF FILHO, Miguel; GUIMARÃES, Jorge Anderson; LIZ, Ronaldo Setti de. *Manejo integrado de pragas do tomateiro para processamento industrial*. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2014. (Circular Técnica, 129). ISSN 1415-3033.

AKHTAR, Mahmuda *et al.* Enhanced insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* using a late embryogenesis abundant peptide co-expression system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 188, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106207>

BEN-DOV, Eitan *et al.* **Multiplex PCR Screening To Detect cry9 Genes in Bacillus thuringiensis Strains** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aem>>.

BERNARDI, Oderlei *et al.* Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 68, n. 7, p. 1083–1091, jul. 2012. <https://doi.org/10.1002/ps.3271>

CABRA, Eneida Torres; FERNANDEZ, Javier Adolfo Hernandez. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* Colombian native strains against *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 59, n. 4, p. 503–511, 2019.

CHAN, Vicky *et al.* **The Effect of Increasing Plasmid Size on Transformation Efficiency in Escherichia coli** *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.dsmz.de/lit/lit5183.htm>.

CHEN, Nuo; YUAN, Xiaoming. A Quick DNA Extraction Method for High Throughput Screening in Gram-positive Bacteria. **Bio-protocol**, v. 13, n. 8, 20 abr. 2023. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4653>

CHOUGULE, Nanasaheb P. *et al.* Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 21, p. 8465–8470, 21 maio 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222144110>

DAMMAK, Mariam *et al.* Involvement of the processing step in the susceptibility/tolerance of two lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 46–50, 1 fev. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.005>

DAY, Michael *et al.* Genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD-1. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, 2014. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00613-14>

ELEAZAR BARBOZA-CORONA, José *et al.* ***Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 as a factory to synthesize alkali-labile ChiA74Δsp chitinase inclusions, Cry crystals and spores for applied use.** [S.l.: S.n.]. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-15>

FAYAD, Nancy *et al.* A Novel Antidipteran *Bacillus thuringiensis* Strain: Unusual Cry Toxin Genes in a Highly Dynamic Plasmid Environment. 2021. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-20>

LAMBERT, Bart *et al.* A *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Protein with a High Activity against Members of the Family Noctuidae **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/aem>>.

LERECLUS, D. *et al.* Transformation and expression of a cloned 6-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis* **FEMS Microbiology Letters**. [S.l.: S.n.].

MACRAE, Ted C. *et al.* Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A gene for control of lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 577–587, 2005. <https://doi.org/10.1093/jee/98.2.577>

MAHILLON, Jacques; LERECLUS, Didier. **Chapter 30 Electroporation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus***. [S.l.: S.n.].

MASSON, Luke; PRÉFONTAINE, Gabrielle; BROUSSEAU, Roland. Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 60, n. 3, p. 273–278, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03485.x>

MICHEREFF, Miguel *et al.* Manejo Integrado de Pragas do Tomate para Mesa. [S.d.].

NOVÁKOVÁ, Jana *et al.* Improved method for high-efficiency electrotransformation of *Escherichia coli* with the large BAC plasmids. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 1, p. 53–61, jan. 2014a. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0267-1>

NOVÁKOVÁ, Jana *et al.* Improved method for high-efficiency electrotransformation of *Escherichia coli* with the large BAC plasmids. **Folia Microbiologica**, v. 59, n. 1, p. 53–61, jan. 2014b. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0267-1>

OHSE, Morimasa *et al.* Effects of Plasmid DNA Sizes and Several Other Factors on Transformation of *Bacillus subtilis* ISW1214 with Plasmid DNA by Electroporation.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v. 59, n. 8, p. 1433–1437, 1995.
<https://doi.org/10.1271/bbb.59.1433>

PADMAKUMAR, Ananya *et al.* **Bacteria-Premised Nanobiopesticides for the Management of Phytopathogens and Pests**. ACS Agricultural Science and Technology American Chemical Society, , 15 maio 2023.
<https://doi.org/10.1021/acsagscitech.3c00025>

PENG, D. *et al.* Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1849–1858, 2009a. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04151.x>

PENG, D. *et al.* Elaboration of an electroporation protocol for large plasmids and wild-type strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1849–1858, 2009b. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04151.x>

Sambrook & Russel - Molecular Cloning - Vol. 1, 2, 3 - 3rd edition - c2000 CSHL Press. [S.d.].

SANSINENEA, Estibaliz; VÁZQUEZ, Candelario; ORTIZ, Aurelio. **Genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis* for strain improvement**. **Biotechnology Letters**, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0338-1>

SAUKA, Diego H. *et al.* **Biological control characterization of an argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* Similar to the HD-1 Strain**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.ebi.>>.

SIEGFRIED, Blair D.; VAUGHN, Ty T.; SPENCER, Terence. Baseline susceptibility of western corn rootworm (Coleoptera: Crysomelidae) to Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 4, p. 1320–1324, 2005.
<https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.4.1320>

SPATH, Katharina; HEINL, Stefan; GRABHERR, Reingard. “Direct cloning in *Lactobacillus plantarum*: Electroporation with non-methylated plasmid DNA enhances transformation efficiency and makes shuttle vectors obsolete”. **Microbial Cell Factories**, v. 11, 25 out. 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-141>

ZEGEYE, Ephrem Debebe; ASPHOLM, Marina. Efficient Electrotransformation of *Bacillus thuringiensis* for Gene Manipulation and Expression. **Current Protocols**, v. 2, n. 11, 1 nov. 2022a. <https://doi.org/10.1002/cpz1.588>

ZEGEYE, Ephrem Debebe; ASPHOLM, Marina. Efficient Electrotransformation of *Bacillus thuringiensis* for Gene Manipulation and Expression. **Current Protocols**, v. 2, n. 11, 1 nov. 2022b. <https://doi.org/10.1002/cpz1.588>

CONCLUSÃO

O presente trabalho englobou duas abordagens complementares envolvendo *Bacillus thuringiensis*, com foco na ampliação de seu potencial para o controle biológico de insetos praga. Como primeira abordagem, foi realizado o melhoramento genético da cepa HD-1 por meio da introdução dos genes *cyt2Aa*, *cry3Bb1* e *cry9c*, visando ampliar seu espectro inseticida. A construção do plasmídeo, a padronização do protocolo de eletroporação e a confirmação molecular da transformação demonstraram a viabilidade da metodologia aplicada e indicam o potencial da cepa recombinante no desenvolvimento de bioinseticidas mais eficazes, embora ainda sejam necessários testes adicionais, como ensaios de expressão e bioensaios, para validar sua atividade inseticida.

De forma complementar, a segunda abordagem envolveu a análise genômica de diferentes cepas de *B. thuringiensis*, com o objetivo de caracterizar a diversidade de genes inseticidas por meio de ferramentas de bioinformática. Essa estratégia permitiu identificar perfis gênicos distintos entre as cepas analisadas, fornecendo subsídios para a identificação de cepas com maior potencial biotecnológico.

A integração entre as estratégias de engenharia genética e de análise genômica amplia a compreensão sobre as aplicações biotecnológicas de *B. thuringiensis* e fortalece sua utilização como recurso no desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e sustentáveis para o manejo de pragas. Os dados obtidos contribuem para a consolidação de novas soluções voltadas ao controle biológico, com potencial impacto na redução do uso de agrotóxicos e na promoção de uma agricultura mais segura e ecologicamente sustentável.

ANEXOS

Normas do periódico científico “**Applied and Environmental Microbiology**”

<https://journals.asm.org/writing-your-paper>

On this page are formatting guidelines that apply to all journals published by ASM.

Authors do not have to follow formatting guidelines for their initial submission. See the Initial Submission Checklist for details. The guidelines described below are only required during revision.

LaTeX Template

We provide a LaTeX template for research and review articles. Try [Overleaf](#), or [download from GitHub](#) to use with the editor of your choice.

These templates are for most ASM Journals (not currently supported for *ASM Case Reports*, *Microbiology Resource Announcements* [MRA], or the *Journal of Microbiology and Biology Education* [JMBE]).

Overleaf, a free, cloud-based, collaborative authoring tool, supports authors by:

- Helping you to prepare, collaborate, and submit your manuscript.
- Walking you through formatting requirements for your submission.
- Being great for math and equations.
- Enabling you to manage references and footnotes easily.
- Not needing coding/programming experience.

If you experience any issues when creating your LaTeX manuscript in Overleaf, contact their support team:

Email: support@overleaf.com

[Overleaf Support Contact Form](#)

If you are new to Overleaf and LaTeX, help is available via their [free introductory course](#) and [short tutorial video](#).

Word Templates for MRA

We also provide [Word templates](#) and an [author checklist](#) for *Microbiology Resource Announcements* (MRA) articles. We encourage MRA authors to use these templates. This will help you include all required components, and reduce the number of potential modifications needed.

Paperpal

Paperpal Preflight Overview

We are now providing a pre-submission research article check for *Microbiology Spectrum* submissions. Try [Paperpal Preflight](#).

- Purpose: automated tool to check manuscripts against Spectrum submission guidelines.
- Benefit: identifies potential issues to prevent rejection during initial review.
- Free Service: provides a walk-through of identified issues at no cost.
- Paid Service: offers a tracked-changes manuscript with spelling, punctuation, and grammar suggestions.

Using Paperpal Preflight

- Document Format: upload your manuscript as a Microsoft Word file (.doc or .docx).
- Formatting Requirements: must adhere to ASM Journals' guidelines (see [our formatting webpage](#) for details).
- File Size Limit: 10 MB maximum. Remove embedded figures if necessary and re-upload.

Submission and Publication

- Independent Process: using [Paperpal Preflight](#) does not impact the peer review or publication decision.
- Official Submission: manuscripts must be submitted through the [Spectrum submission system](#) to be considered for publication.
- Further Review: all manuscripts undergo additional checks and must meet Spectrum's administrative criteria for further consideration.

ASM Journals Style

ASM journals use the in-house ASM Style Guide (ASM, 2023) and other reference guides like [The Chicago Manual of Style Online](#), 17th ed. (CMS), [The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers](#), 8th ed. (CSE), and the [Merriam-Webster Unabridged Dictionary](#).

Please note, this section is meant for revised manuscripts. For your initial submission, there is more [flexibility in your formatting](#).

Formatting Basics

Double-Spacing

Double-space all text, figure legends, table footnotes, and references.

Page Numbering

Number all manuscript pages in chronological order.

Font Size and Clarity

- The font size should be no smaller than 12 points.
- Ensure that characters like the number zero "0" and the letter "O" are easy to tell apart. Other examples include "1," "l," and "I," and "x" and "×" (multiplication sign).

Page Size and Formatting

- Set page size to 8.5 by 11 inches (about 21.6 by 28 centimeters).
- Italicize words requiring italics and place headings in bold.

Placement of Figure Legends and Tables

- Place figure legends and tables after the References section.

Article Type Formatting

- Review [journal-specific formatting information](#) for article sections and headings.

Abbreviations and Conventions

About Abbreviations

Use them conservatively

Abbreviations should be used as an aid to the reader rather than as a convenience to the author, and therefore their use should be limited. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (Biochemical Nomenclature and Related Documents, 1992) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

It is often possible to use pronouns or to paraphrase a long word after its first use (e.g., “the drug” or “the substrate”). Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, Leu, etc.) may also be used.

Define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., “cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM).” Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

Nomenclature

The following are standards recommended by experts in the fields mentioned. ASM does not require authors to use these conventions, but we list them here for your reference and consideration.

Bacteria

Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Escherichia coli*), should be used for all bacteria. Names of categories at or above the genus level may be used alone, but specific and subspecific epithets may not. A specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper. Thereafter, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (e.g., *E. coli*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper. Names of all bacterial taxa (kingdoms, phyla, classes, orders, families, genera, species, and subspecies) are printed in italics; strain designations and numbers are not.

Chemistry and Biochemistry

The recognized authority for the names of chemical compounds is *Chemical Abstracts* (CAS), <https://www.cas.org/> and its indexes. *The Merck Index Online* (<https://www.rsc.org/merck-index>) is also an excellent source. For guidelines on the use of biochemical terminology, consult *Biochemical Nomenclature and Related Documents* (Portland Press, London, United Kingdom, 1992), available at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/bibliog/white.html> and the instructions for authors of the *Journal of Biological Chemistry*.

- For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (IUB) as described in *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, Inc., New York, NY, 1992) and its supplements and at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>.
- If a nonrecommended name is used, place the proper (trivial) name in parentheses at first use in the abstract and text. Use the EC number when one has been assigned.
- Authors of papers describing enzymological studies should review the standards of the STREND A Commission for information required for adequate description of experimental conditions and for reporting enzyme activity data at <https://www.beilstein-institut.de/en/projects/strenda/guidelines>.

Drug Nomenclature

- Chemical or generic names of drugs should be used; the use of code numbers or trade names is generally not permitted.
- When code names or corporate proprietary numbers are to be used, either the chemical structure of the compound or a published literature reference illustrating the chemical structure, if known, must be provided at the first occurrence of the code name or number.
- For compounds not identified by generic nomenclature, all previous or concurrent identification numbers or appellations should be listed in the manuscript.

Genetics

To facilitate accurate communication, it is important that standard genetic nomenclature be used whenever possible and that deviations or proposals for new naming systems be endorsed by an appropriate authoritative body. Review and/or publication of submitted manuscripts that contain new or nonstandard nomenclature may be delayed by the editor or the Journals Department so that they may be reviewed.

Bacteria

- The genetic properties of bacteria are described in terms of phenotypes and genotypes.
- The phenotype describes the observable properties of an organism.
- The genotype refers to the genetic constitution of an organism, usually in reference to some standard wild type.
- The guidelines that follow are based on the recommendations of Demerec et al. ([Genetics 54:61–76, 1966](#)).

Phenotype Designations

- Phenotype designations must be used when mutant loci have not been identified or mapped. They can also be used to identify the protein product of a gene, e.g., the OmpA protein.
- Phenotype designations generally consist of three-letter symbols; these are not italicized, and the first letter of the symbol is capitalized. It is preferable to use Roman or Arabic numerals (instead of letters) to identify a series of related phenotypes. Thus, a series of nucleic acid polymerase mutants might be designated Pol1, Pol2, and Pol3, etc.
- Wild-type characteristics can be designated with a superscript plus (Pol⁺), and, when necessary for clarity, negative superscripts (Pol[−]) can be used to designate mutant characteristics.
- Lowercase superscript letters may be used to further delineate phenotypes (e.g., Str^r for streptomycin resistance). Phenotype designations should be defined.

Genotype Designations

- Genotype designations are also indicated by three-letter locus symbols. In contrast to phenotype designations, these are lowercase italic (e.g., *ara his rps*).
- If several loci govern related functions, these are distinguished by italicized capital letters following the locus symbol (e.g., *araA araB araC*).
- Promoter, terminator, and operator sites should be indicated as described by Bachmann and Low ([Microbiol Rev 44:1–56, 1980](#)), e.g., *lacZp*, *lacAt*, and *lacZo*.

Wild-Type Alleles

- Wild-type alleles are indicated with a superscript plus (*ara*⁺*his*⁺). A superscript minus is not used to indicate a mutant locus; thus, one refers to an *ara* mutant rather than an *ara*[−] strain.

Mutation Sites

- Mutation sites are designated by placing serial isolation numbers (allele numbers) after the locus symbol (e.g., *araA1 araA2*). If only a single such locus exists or if it is not known in which of several related loci the mutation has occurred, a hyphen is used instead of the capital letter (e.g., *ara-23*). It is essential in papers reporting the isolation of new mutants that allele numbers be given to the mutations.
- For *Escherichia coli*, there is a registry of such numbers: the Coli Genetic Stock Center (<http://cgsc2.biology.yale.edu/>).
- For the genus *Salmonella*, the registry is the *Salmonella* Genetic Stock Centre (<http://people.ucalgary.ca/~kesander/>).
- For the genus *Bacillus*, the registry is the *Bacillus* Genetic Stock Center (<http://www.bgsc.org/>).

Superscripts with Genotypes

- Using superscripts with genotypes (other than + to indicate wild-type alleles) should be avoided. Designations indicating amber mutations (Am), temperature-sensitive mutations (Ts), constitutive mutations (Con), cold-sensitive mutations (Cs), production of a hybrid protein (Hyb), and other important phenotypic properties should follow the allele number [e.g., *araA230*(Am) *hisD21*(Ts)].
- All other such designations of phenotype must be defined at the first occurrence.
- If superscripts must be used, they must be approved by the editor and defined at the first occurrence in the text.

Subscripts may be used in two situations.

1. Subscripts may be used to distinguish between genes (having the same name) from different organisms or strains; e.g., *hisE. coli* or *hisK-12* for the *his* gene of *E. coli* or strain K-12, respectively, may be used to distinguish this gene from the *his* gene in another species or strain. An abbreviation may also be used if it is explained.
2. Similarly, a subscript is also used to distinguish between genetic elements that have the same name. For example, the promoters of the *gln* operon can be designated *glnAp1* and *glnAp2*. This form departs slightly from that recommended by Bachmann and Low (e.g., *desC1p*).

Deletions

- Deletions are indicated by the symbol Δ placed before the deleted gene or region, e.g., $\Delta trpA432$, $\Delta(aroP-aceE)419$, or $\Delta(hisQ-hisJo)1256$. Similarly, other symbols can be used (with appropriate definition). Thus, a fusion of

the *ara* and *lac* operons can be shown as $\Phi(ara-lac)95$. Likewise, $\Phi(araB'-lacZ+)96$ indicates that the fusion results in a truncated *araB* gene fused to an intact *lacZ* gene, and $\Phi(malE-lacZ)97$ (Hyb) shows that a hybrid protein is synthesized. An inversion is shown as $IN(rrnD-rrnE)I$.

- An insertion of an *E. coli his* gene into plasmid pSC101 at zero kilobases (0 kb) is shown as pSC101 $\Omega(0kb::K-12hisB)4$. An alternative designation of an insertion can be used in simple cases, e.g., *galT236::Tn5*.
- The number 236 refers to the locus of the insertion, and if the strain carries an additional *gal* mutation, it is listed separately. Additional examples, which utilize a slightly different format, can be found in the papers by Campbell et al. and Novick et al. cited below.
- It is important in reporting the construction of strains in which a mobile element was inserted and subsequently deleted that this fact be noted in the strain table. This can be done by listing the genotype of the strain used as an intermediate in a table footnote or by making a direct or parenthetical remark in the genotype, e.g., (F[−]), ΔMu *cts*, or *mal::\Delta Mu cts::lac*.
- In setting parenthetical remarks within the genotype or dividing the genotype into constituent elements, parentheses and brackets are used without special meaning; brackets are used outside parentheses.
- To indicate the presence of an episome, parentheses (or brackets) are used (λ , F⁺).
- Reference to an integrated episome is indicated as described above for inserted elements, and an exogenote is shown as, for example, W3110/F'8(*gal*⁺).
- For information about the symbols in current use, consult Berlyn (Microbiol Mol Biol Rev 62:814–984, 1998) for *E. coli* K-12, Sanderson and Roth (Microbiol Rev 52:485–532, 1988) for *Salmonella* serovar Typhimurium, Holloway et al. ([Microbiol Rev 43:73–102, 1979](#)) for the genus *Pseudomonas*, Piggot and Hoch (Microbiol Rev 49:158–179, 1985) for *Bacillus subtilis*, Perkins et al. (Microbiol Rev 46:426–570, 1982) for *Neurospora crassa*, and Mortimer and Schild (Microbiol Rev 49:181–213, 1985) for *Saccharomyces cerevisiae*. For yeasts, *Chlamydomonas* spp., and several fungal species, symbols such as those given in the *Handbook of Microbiology*, 2nd ed. (A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, ed., CRC Press, Inc., Cleveland, OH, 1988), should be used.

Conventions for Naming Genes

- It is recommended that (entirely) new genes be given names that are mnemonics of their function, avoiding names that are already assigned and earlier or alternative gene names, irrespective of the bacterium for which such assignments have been made. Similarly, it is recommended that, whenever possible, orthologous genes present in different organisms receive the same name.

- When homology is not apparent or the function of a new gene has not been established, a provisional name may be given by one of the following methods. (i) The gene may be named on the basis of its map location in the style *yaaA*, analogous to the style used for recording transposon insertions (*zef*) as discussed below. A list of such names in use for *E. coli* has been published by Rudd (Microbiol Mol Biol Rev 62:985–1019, 1998). (ii) A provisional name may be given in the style described by Demerec et al. (e.g., *usg*, gene upstream of *folC*). Such names should be unique, and names such as *orf* or *genX* should not be used. For reference, the Coli Genetic Stock Center's database includes an updated listing of *E. coli* gene names and gene products. It is accessible on the Internet (<http://cgsc.biology.yale.edu/index.php>). A list can also be found in the work of Riley (Microbiol Rev 57:862–952, 1993). For the genes of other bacteria, consult the references given above.
- For prokaryotes, gene names should not begin with prefixes indicating the genus and species from which the gene is derived. (However, subscripts may be used where necessary to distinguish between genes from different organisms or strains, as described in section v of "[Bacteria](#)" above.)
- For eukaryotes, such prefixes may be used for clarity when discussing genes with the same name from two different organisms (e.g., *ScURA3* versus *CaURA3*); the prefixes are not considered part of the gene name proper and are not italicized.

Locus Tags

- Locus tags are systematic, unique identifiers that are assigned to each gene in GenBank.
- All genes mentioned in a manuscript should be traceable to their sequences by the reader, and locus tags may be used for this purpose in manuscripts to identify uncharacterized genes.
- In addition, authors should check GenBank to make sure that they are using the correct, up-to-date format for locus tags (e.g., uppercase versus lowercase letters and the presence or absence of an underscore, etc.).
- Locus tag formats vary between different organisms and also may be updated for a given organism, so it is important to check GenBank at the time of manuscript preparation.

"Mutant" Versus "Mutation"

- Keep in mind the distinction between a mutation (an alteration of the primary sequence of the genetic material) and a mutant (a strain carrying one or more mutations). One may speak about the mapping of a mutation, but one cannot map a mutant. Likewise, a mutant has no genetic locus, only a phenotype.

"Homology" Versus "Similarity"

- For use of terms that describe relationships between genes, consult the articles by Theissen (Nature 415:741, 2002) and Fitch (Trends Genet 16:227–231,

2000). "Homology" implies a relationship between genes that have a common evolutionary origin; partial homology is not recognized.

- When sequence comparisons are discussed, it is more appropriate to use the term "percent sequence similarity" or "percent sequence identity," as appropriate.

Strain Designations

- Do not use a genotype as a name (e.g., "subsequent use of *leuC6* for transduction"). If a strain designation has not been chosen, select an appropriate word combination (e.g., "another strain containing the *leuC6* mutation").

Viruses

- The genetic nomenclature for viruses differs from that for bacteria. In most instances, viruses have no phenotype, since they have no metabolism outside host cells. Therefore, distinctions between phenotype and genotype cannot be made.
- Superscripts are used to indicate hybrid genomes.
- Genetic symbols may be one, two, or three letters. For example, a mutant strain of λ might be designated λ *Aam11 int2 red114 cI857*; this strain carries mutations in genes *cI*, *int*, and *red* and an amber-suppressible (Am) mutation in gene *A*. A strain designated λ *att434imm21* would represent a hybrid of phage λ that carries the immunity region (*imm*) of phage 21 and the attachment (*att*) region of phage 434.
- Host DNA insertions into viruses should be delineated by square brackets, and the genetic symbols and designations for such inserted DNA should conform to those used for the host genome.
- Genetic symbols for phage λ can be found in reports by Szybalski and Szybalski (Gene 7:217–270, 1979) and Echols and Murialdo (Microbiol Rev 42:577–591, 1978).

Eukaryotes

- FlyBase (<http://flybase.org/>) is the genetic nomenclature authority for *Drosophila melanogaster*.
- WormBase (<https://www.wormbase.org/#01-23-6>) is the genetic nomenclature authority for *Caenorhabditis elegans*.
- When naming genes for *Aspergillus* species, the nomenclature guidelines posted at <http://www.aspergillusgenome.org/Nomenclature.shtml> should be followed, and the *Aspergillus* Genome Database (<http://www.aspgd.org/>) should be searched to ensure that any new name is not already in use.
- The *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/>) and the *Candida* Genome Database (<http://www.candidagenome.org/>) are authorities for *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* genetic nomenclature, respectively.

- Authors should use nomenclature consistent with community databases, including [SGD](#), [CGD](#), [AspGD](#), [PomBase](#), the [Broad Institute genomic databases](#), and the [EuPathDB family of databases](#). “[Classification and Nomenclature of Human Parasites](#)” offers useful information on current parasite nomenclature.

Transposable Elements, Plasmids, and Restriction Enzymes

- Nomenclature of transposable elements (insertion sequences, transposons, and phage Mu, etc.) should follow the recommendations of Campbell et al. (Gene 5:197–206, 1979), with the modifications given in section vi of “[Bacteria](#)” above. The Internet site where insertion sequences of eubacteria and archaea are described and new sequences can be recorded is <https://www-is.biotoul.fr>.
- The system of designating transposon insertions at sites where there are no known loci, e.g., *zef-123::Tn5*, has been described by Chumley et al. (Genetics 91:639–655, 1979). The nomenclature recommendations of Novick et al. (Bacteriol Rev 40:168–189, 1976) for plasmids and plasmid-specified activities, of Low (Bacteriol Rev 36:587–607, 1972) for F' factors, and of Roberts et al. (Nucleic Acids Res 31:1805–1812, 2003) for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes should be used whenever possible. The nomenclature for recombinant DNA molecules constructed *in vitro* follows the nomenclature for insertions in general. DNA inserted into recombinant DNA molecules should be described by using the gene symbols and conventions for the organism from which the DNA was obtained.
- Tetracycline resistance determinants. The nomenclature for tetracycline resistance determinants is based on the proposal of Levy et al. (Antimicrob Agents Chemother 43:1523–1524, 1999). The style for such determinants is, e.g., Tet B; the space helps distinguish the determinant designation from that for phenotypes and proteins (TetB). The above-referenced article also gives the correct format for genes, proteins, and determinants in this family.

Mice

- For mouse strain and genetic nomenclature, ASM encourages authors to refer to the guidelines set forth by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, available on the Mouse Genome Informatics home page at <http://www.informatics.jax.org/> and in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, 3rd ed. (M. F. Lyon et al., ed., Oxford University Press, Oxford, England, 1996).

Microorganisms

- Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Escherichia coli*), must be used for all microorganisms. Names of categories at or above the genus level may be used alone, but specific and subspecific epithets may not. A specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper. Thereafter, the

generic name should be abbreviated to the initial capital letter (e.g., *E. coli*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper. Names of all bacterial taxa (kingdoms, phyla, classes, orders, families, genera, species, and subspecies) are printed in italics and should be italicized in the manuscript; strain designations and numbers are not. Vernacular (common) names should be in lowercase roman type (e.g., streptococcus, brucella). For *Salmonella*, genus, species, and subspecies names should be rendered in standard form: *Salmonella enterica* at first use, *S. enterica* thereafter; *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* at first use, *S. enterica* subsp. *arizonae* thereafter. Names of serovars should be in roman type with the first letter capitalized: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. After the first use, the serovar may also be given without a species name: *Salmonella* Typhimurium, *S. Typhimurium*, or *Salmonella* serovar Typhimurium. For other information regarding serovar designations, see *Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars*, 9th ed. (P. A. D. Grimont and F.-X. Weill, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris, France, 2007; see <http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>). For a summary of the current standards for *Salmonella* nomenclature and the Kaufmann-White criteria, see the article by Brenner et al. (*J Clin Microbiol* 38:2465–2467, 2000), the opinion of the Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (*Int J Syst Evol Microbiol* 55:519–520, 2005), and the article by Tindall et al. (*Int J Syst Evol Microbiol* 55:521–524, 2005).

- The spelling of bacterial names should follow the *Approved Lists of Bacterial Names (Amended) & Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes* (V. B. D. Skerman et al., ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1989) and the validation lists and notification lists published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (formerly the *International Journal of Systematic Bacteriology*) since January 1989. In addition, two sites on the World Wide Web list current approved bacterial names: Prokaryotic Nomenclature Up-to-Date (PNU) (<https://www.gbif.org/dataset/52a423d2-0486-4e77-bcee-6350d708d6ff>) and List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN) (<https://lpsn.dsmz.de/>).
- If there is reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be enclosed in quotation marks in the title and at its first use in the abstract and the text and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text. "*Candidatus*" species should always be set in quotation marks.
- Since the classification of fungi is not complete, it is the responsibility of the author to determine the accepted binomial for a given organism. Sources for these names include *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 5th ed. (C. P. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout, ed., Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 2011),

and *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. (P. M. Kirk, P. F. Cannon, D. W. Minter, and J. A. Stalpers, ed., CABI International, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom, 2008); see also <http://www.speciesfungorum.org/Names/Fundic.asp>.

- Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and reported on the ICTV Virus Taxonomy website (<https://talk.ictvonline.org/>). In addition, the recommendations of the ICTV regarding the use of species names should generally be followed: when the entire species is discussed as a taxonomic entity, the species name, as with other taxa, is italic and has the first letter and any proper nouns capitalized (e.g., *Tobacco mosaic virus*, *Murray Valley encephalitis virus*). When the behavior or manipulation of individual viruses is discussed, the vernacular (e.g., tobacco mosaic virus, Murray Valley encephalitis virus) should be used. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.
- Microorganisms, viruses, and plasmids should be given designations consisting of letters and serial numbers. It is generally advisable to include a worker's initials or a descriptive symbol of locale or laboratory, etc., in the designation. Each new strain, mutant, isolate, or derivative should be given a new (serial) designation. This designation should be distinct from those of the genotype and phenotype, and genotypic and phenotypic symbols should not be included.
- Plasmids are named with a lowercase "p" followed by the designation in uppercase letters and numbers. To avoid the use of the same designation as that of a widely used strain or plasmid, check the designation against a publication database such as Medline.

Viruses

- Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and reported on the [ICTV Virus Taxonomy website](#). In addition, the recommendations of the ICTV regarding the use of species names should generally be followed: when the entire species is discussed as a taxonomic entity, the species name, as with other taxa, is italic and has the first letter and any proper nouns capitalized (e.g., *Tobacco mosaic virus*, *Murray Valley encephalitis virus*).
- When the behavior or manipulation of individual viruses is discussed, the vernacular (e.g., tobacco mosaic virus, Murray Valley encephalitis virus) should be used.
- If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Figures and Tables

Key Takeaways

- Ensure high-quality images: submit figures with the right resolution and size.

- Individual files should not exceed 15 MB at initial submission and 20 MB at revision.
- Review our [image manipulation guidelines](#) before submitting your work.
- Follow guidelines for colors: RGB is preferred. Consider those with [visual impairments](#).
- Provide effective descriptions: legends should be clear and informative, explaining the figures without needing to refer to the main text.
- Seek permissions: obtain and provide necessary permissions for reproducing or modifying images.
- Add cover images: consider submitting a standout image from your work to be published in an issue as part of the journal's Table of Contents.

Submission and Formats

- For initial submissions:
 - Submit figures as individual PDFs or in a single combined PDF. A legend should accompany each figure for clarity during review.
 - Submit main text and tables in a single combined PDF. Tables cannot be uploaded as separate files.
 - Individual files should not exceed 15 MB.
- For revised manuscripts:
 - Supply production-quality files (review “Quality, Dimensions, and File Size” for more information).
 - Place your legends in the main text file after references (legends will be edited for final publication). Use bitmap, grayscale, or RGB color mode (RGB is preferred).
 - Individual figure files should not exceed 20 MB.
 - We review figures with continuous tones (e.g., photographs, immunofluorescent images, western blots, etc.) for screening before publication, but there are exceptions (e.g., biographical photos are not screened.). Review our [image manipulation guidelines](#) for more information.
 - Place tables in the manuscript text file after the main text.

Tips for Meeting the Figure File Size Limit

- Keep all figure files within the dimensions for acceptable figure file sizes. Recommended dimensions are 7 inches by 9 inches or less.
- Figure file resolution should not be higher than 600 dpi, and 300 dpi is sufficient in nearly all cases.

- Flatten layers in figure files whenever possible.
- Remove all excess “whitespace” - crop files so only the figure itself is within the file.

Quality, Dimensions, and File Size

- Resolution: use 300 – 600 dpi for color or grayscale, combined images, or line art.
- Submit graphics at their intended publication size to prevent resizing issues.
- Ensure illustrations have enough contrast for clear visibility (we encourage you to review [the contrast checker from WebAIM \(Web Accessibility In Mind\)](#)).
- Individual files should not exceed 15 MB for initial submissions and 20 MB for revisions.

Enhancing Readability and Accessibility

- Use recommended fonts Arial, Helvetica, and Times New Roman to avoid complications.
- Color illustrations should ideally be in RGB mode for online viewing. RGB displays a broader color range than CMYK.
- Design figures with color vision deficiency in mind. For example, avoid problematic color combinations like red and green; yellow and bright green; light blue and pink; dark blue and violet. Magenta can be substituted for red in fluorescent stain images, which typically use a combination of red and green. Review information on color vision deficiency provided by the [U.S. National Library of Medicine](#).
 - Search the Internet for a color vision deficiency simulator to see how your image might appear to someone who experiences color vision deficiency.
 - If you have access to Adobe Photoshop or Adobe Illustrator, you can go to View/Proof Setup/Color Blindness, and your images will be transformed to show you how they will appear to someone who has color vision deficiency
 - Please refer to the following website for more information: <https://www.ascb.org/science-news/how-to-make-scientific-figures-accessible-to-readers-with-color-blindness/>.

Drawings and Representations

- Submit drawings, graphs, and diagrams as the final version, ensuring all elements are clear.
- For line art: avoid using screens, maintain good contrast, use solid lines, and avoid ambiguous representations. (Review Figures 2 and 3 published in in <https://doi.org/10.1128/aem.01962-23> for examples.)

- Nucleic acid sequences should be presented clearly, ensuring easy readability and proper annotations. (Review the tables published in <https://doi.org/10.1128/jvi.01350-23> for examples.)

Tables

- Captions and footnotes should help clarify the table without frequent reference to the text.
- Tables should be organized logically. Data in columns should be of the same kind, and headings should be clear. (Review Table 1 published in [/doi/10.1128/msystems.01045-23](https://doi.org/10.1128/msystems.01045-23) as an example.)
- If your table has artwork or complex designs, submit it as an illustration.
- For revisions, place tables in the manuscript text file after the main text.

Changes to Artwork

While minor adjustments like brightness or contrast are acceptable, please don't remove, add, or significantly alter specific sections of an image. (Review our [Image Manipulation guidelines](#) for more information.)

Permissions

- If you're using previously published material, get permission from the original author and publisher.
- Make sure you've received approval for citing unpublished data or personal communications.

Cover Images

- ASM journals represent each issue with a highlighted image from an article. If your work has a standout image, consider submitting it.
- ASM will only consider images that meet the following criteria:
 - Authors created or own the image.
 - The image hasn't been previously published.
- By submitting, you agree that the image can be used under the same terms as the published article.
- The image should be of high quality, in TIF or EPS format, and in RGB mode.
- The image should be 7.5 inches wide by 8.25 inches tall (at least 2,250 pixels wide by 2,475 pixels tall) with at least 300 dpi resolution (600 dpi preferred). The image should not contain arrows, panel labels, or other figure elements.
- Please provide a short description of the image. We recommend 1-2 sentences. (Review this [example](#) for guidance.)
- [Review the cover guidelines](#) for more information.

- Please download and use [this interactive template](#) in Adobe to ensure that your proposed cover image meets our size requirements.

Supplemental Material

Key Takeaways

- Supplemental material definition: material that provides extra non-essential content, which fosters greater understanding of research findings.
- [Data Policy](#): large or complex data sets should be deposited in a public repository rather than submitted as supplemental material.
- Submission requirements: all content can be in a single file. For final revisions, supplemental material must be uploaded separately from the main manuscript, with a file size limit of 15 MB (100 MB for videos).
- Reference formatting: references related only to the supplemental material should be included within the supplemental files, not in the References section of the main manuscript. Supplemental items should be numbered with an “S” and submitted in specified standard formats.
- Accepted supplemental material: [publication fees apply to supplemental material](#); modifications post-publication require a formal correction; copyright remains with the author but requires a license permitting ASM to post the content.

Supplemental Material Guidelines

What is Supplemental Material?

Supplemental material consists of additional supporting content that, while not essential, enhances the reader's comprehension of the research. Examples include:

- Additional figures, tables, and equations,
- In-depth methodological descriptions,
- Surveys,
- Instruments,
- Brief video clips

Using Data Repositories (Instead of Submitting Supplemental Material Files)

Consistent with our commitment to open data, ASM encourages depositing extensive or intricate data sets in recognized public repositories over supplemental material submission. Review our [open data policy](#) for guidance on data sharing.

Submitting Supplemental Files

Initial Submission

You can submit their manuscript and supplemental material(s) as a single PDF file for initial submission.

Revised Manuscripts

- For revisions, supply supplemental material and legends separately from the main manuscript file.
- You can submit all supplemental material as one file or you can separate them into a maximum of 10 individual supplemental material files.
- The maximum file size is 15 MB, except for video files, which have a 100 MB limit.

Formatting Your Supplemental Files

- References that are only about supplemental material should be in the supplemental file(s), not in the manuscript's main References section.
- If a reference is cited in both the main text of the manuscript and the supplemental material, the reference should be included in the main References section and in the supplemental material file.
- Use an “S” to number supplemental items (e.g., Fig. S1, Table S2).
 - Acceptable file formats include standard document and image types.
 - BAM
 - BED
 - CDX
 - CSV
 - EPS
 - Excel
 - FASTA
 - GIF
 - HTML
 - JPEG
 - MPEG
 - PDF
 - PNG
 - PPT
 - RTF
 - STL
 - SVG
 - TIFF

- TXT
 - Acceptable video formats are AVI, MOV, MP2, MP3, MP4, MPEG, and WMV.

Peer Review and Publishing of Supplemental Material

Reviewing Supplemental Material

- Supplemental material will be peer reviewed with the manuscript.
- Editors decide whether supplemental material will be published with the accepted manuscript.

After Acceptance — Fees, Corrections, and Copyright

Publication Fees

We charge [fees to publish supplemental material](#) across most ASM journals.

Modifications and Corrections to Supplemental Material

- ASM does not edit supplemental material. Authors are responsible for the accuracy of their supplemental material.
- All post-publication changes [follow the correction and erratum process](#).

Copyright and Supplemental Material

- Authors retain copyright of supplemental material, but a license permitting posting by ASM is included in the [copyright transfer agreement](#) or [license to publish](#) completed by the corresponding author.
- If you are not the copyright owner, we expect you to provide signed permission from the copyright owner to reuse their content.
- You must acknowledge any copyright notices required by the owner, within your supplemental material file or legend.

Reporting Guidelines

ASM Journals endorses the [NIH Principles and Guidelines for Reporting Preclinical Research](#).

Authors should provide a comprehensive description of their research design, methodology and analysis. Study-type-specific reporting guidelines can be found via the [EQUATOR Network library](#) or the [FAIRsharing registry](#).

Key reporting guidelines are listed below:

- Randomized Clinical Trials: [CONSORT guidelines](#) (and [extensions](#).)
- Animal Preclinical Studies: [ARRIVE guidelines](#)
- Observational Studies: [STROBE guidelines](#) (and extensions, including [STROME-ID](#))

- Diagnostic/Prognostic Studies: [STARD guidelines](#)
- Case Reports: [CARE guidelines](#)
- Enzymology Data: [STREND A guidelines](#)

References

This section offers examples to help you format your references in line with ASM reference style, covering a variety of reference types from journal articles to online sources.

Journal Articles (Both Print and Online)

Journal Article in Print

Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM. 2012. *In vivo* and *in vitro* analyses of regulation of the pheromone-responsive *prgQ* promoter by the PrgX pheromone receptor protein. J Bacteriol 194:3386–3394.

Online Journal Article

Bina XR, Taylor DL, Vikram A, Ante VM, Bina JE. 2013. *Vibrio cholerae* ToxR downregulates virulence factor production in response to cyclo(Phe-Pro). mBio 4:e00366-13.

Online Journal Article with DOI

Online publication dates or revision dates can be used to indicate the year of publication. Authors should use either a DOI (preferred) or URL for articles that don't use page numbers.

Magalon A, Mendel RR. 15 June 2015, posting date. Biosynthesis and insertion of the molybdenum cofactor. EcoSal Plus 2015 <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013>.

Accepted Manuscripts

Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 February 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. Proc Natl Acad Sci U S A <https://doi.org/10.1073/pnas.041593698>.

Preprints

Wang Y, Rozen D. 2016. Colonization and transmission of the gut microbiota of the burying beetle, *Nicrophorus vespilloides*, through development. bioRxiv <https://doi.org/10.1101/091702>.

Books (Both Print and Online)

da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA. 2001. Genus I. *Thermus* Brock and Freeze 1969, 295, ^{AL} emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p 404–414. In Boone DR, Castenholz RW, Garrity GM (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed, vol 1. Springer, New York, NY.

Book Chapters (Publication Title Is Required)

Fitzgerald G, Shaw D. *In* Waters AE (ed), Clinical microbiology, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA. (NOTE: chapter title is optional.)>

Patents and Patent Applications

Odell JC. April 1970. Process for batch culturing. US patent 484,363,770. (NOTE: include the name of the patented item/process if possible; the patent number is mandatory.)

Theses and Dissertations

O'Malley DR. 1998. PhD thesis. University of California, Los Angeles, CA. (NOTE: title is optional.)

Published Conference Proceedings

Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ. 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr P-038, p 445. Abstr 105th Gen Meet Am Soc Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. (NOTE: abstract title is optional.)

Meeting Abstracts, Posters, and Presentations

Green PN, Hood D, Dow CS. 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p 251–254. *In* Crawford RL, Hanson RS (ed), Microbial growth on C₁ compounds. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Rotimi VO, Salako NO, Mohaddas EM, Philip LP. 2005. Abstr 45th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother, abstr D-1658. (NOTE: abstract title is optional.)

García CO, Paira S, Burgos R, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR. 1996. Detection of *Salmonella* DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients using the polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 39(Suppl 9):S185. (Example of a meeting abstract published in a journal supplement.)

Letters (to the Editor)

Falagas ME, Kasiakou SK. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob Agents Chemother* 50:2274–2275. (Letter.) (“Letter” or “Letter to the editor” is allowed but not required at the end of such an entry.)

Company Publications

URLs for companies that make any of the products mentioned in your study should not be included in your article. URLs for products being sold should also not be included in your article.

Company URLs that provide access to data related to the study, or to shareware used in the study, can be included.

Stratagene. 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. (NOTE: use the company name as the author if none is provided for a company publication.)

In-Press Journal Articles, Books, and Book Chapters

Cox CS, Brown BR, Smith JC. J Gen Genet, in press. (Article title is optional; journal title is mandatory.)

Fitzgerald G, Shaw D. *In* Waters AE (ed), Clinical microbiology, in press. EFH Publishing Co, Boston, MA. (NOTE: chapter title is optional.)

When to Use In-Text Citations

In-text citations should be used for unpublished data, submitted manuscripts, and websites.

. . . similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

. . . system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

. . . as suggested by the World Health Organization
(<https://www.who.int/campaigns/immunization-week/2017/en/>).

Data Sets and Code

Data sets and code should be mentioned in a "Data availability" paragraph and listed in the References section. The reference should include the information below.

- Responsible party (for example, senior author, collector, agency)
- Publication year
- Complete name of the data set, database or repository, URL, or analysis software name (including the version and the related project, if applicable)
- Publisher (where applicable)
- Persistent unique identifier(s) (for example, URL or accession number)

Nesbitt HK, Moore JW. 2016. Data from “Species and population diversity in Pacific salmon fisheries underpin indigenous food security.” Dryad Digital Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.ng8pf>. (Data set in repository.)

Including Citations in Abstracts

The article abstract should be easily understood when people read it without having to read the article. References cited in the abstract should be clear without needing to review the References section.

Examples of how to format citations that appear in the abstract of the article.

(P. S. Satheshkumar, A. S. Weisberg, and B. Moss, J Virol 87:10700 –10709, 2013, <https://doi.org/10.1128/JVI.01258-13>)

(J. H. Coggin, Jr., p. 93–114, in D. O. Fleming and D. L. Hunt, ed., *Biological Safety. Principles and Practices*, 4th ed., 2006)

“... in a recent report by D. A. Hopwood (mBio 4:e00612-13, 2013, <https://doi.org/10.1128/mBio.00612-13>)”

References Only About Supplemental Material

If references are only about the supplemental material, they should be included in the supplemental material file.

If a reference is cited in both the article and supplemental material, include the reference in the main References section and in the supplemental material file.

Errata, Author Corrections, Retractions

Overview

After an article has been published, errors may be noted that require correction of that final publication, the version of record. ASM staff and Editors will review requests for correction to ensure that any needed changes follow the guidelines of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Posting needed changes, which are permanent and transparent, to the article version of record ensures the integrity of the scientific record.

Any necessary changes published will be accompanied with a notice permanently bidirectionally linked to the original article so that readers are aware of necessary changes. Notices can take the form of Errata, Author Corrections, Expressions of Concern, Retractions, or Matters Arising.

Authors may notify ASM upon finding errors in a published article, especially those that could affect the interpretation of data or reliability of the information. If you believe that a correction, retraction, or Matter Arising is necessary for your article, [email the specific journal](#).

Options for Correcting the Record

Errata

Errata provide a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or publication (e.g., a misspelling, a dropped word or line, or mislabeling in a figure) of a published article. [Errata may be submitted via the eJP online manuscript submission and peer review system](#).

How: In the Abstract section of the submission form (a required field), use the phrase “Not Applicable.” Upload the text of the Erratum as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting.

Author Corrections

Author Corrections provide a means of correcting errors of omission (e.g., author names or citations) and errors of a scientific nature that do not alter the overall basic results or conclusions of a published article (e.g., an incorrect unit of measurement or order of

magnitude used throughout, contamination of one of numerous cultures, or misidentification of a mutant strain, causing erroneous data for only a [noncritical] portion of the study). This is not the venue for the addition of new data.

For corrections of a scientific nature or issues involving authorship, including contributions and use or ownership of data and/or materials, all disputing parties must agree, in writing, to publication of the Correction. For omission of an author's name, e-mails from or letters signed by the authors of the article and the author whose name was omitted must be sent to the [appropriate journal staff](#). The editor who handled the article will be consulted if necessary. An Author Correction may be [submitted via the eJP online manuscript submission and peer review system](#).

How: In the submission form, select Author Correction as the manuscript type. In the Abstract section (a required field), use the phrase "Not Applicable." Upload the text of the Author Correction as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting. Signed letters of agreement must be supplied as Miscellaneous Files Not for Publication (scanned PDF files). E-mail agreement is also acceptable, which may be confirmed [by the specific journal](#).

Matters Arising

The Matters Arising option provides an opportunity to offer clarifications and reexaminations of specific issues in primary research papers published in ASM Journals. Matters Arising submissions are subject to peer review before publication online.

Once accepted, the authors of the original article will be given the opportunity to offer a Reply to the Matters Arising comments. The Reply will be evaluated by the Editor and may be reviewed at the discretion of that Editor. The Matters Arising and the Reply will be published together. Matters Arising submissions will be accepted or rejected on the basis of evaluation by an Editor; they will not be returned to the author for further experiments.

Matters Arising are not appropriate for identifying simple errors or mistakes in published papers and do not replace formal Letters to the Editor or Comment letters. ASM will not consider Matters Arising on papers published in journals not published by ASM.

How: Upload the text of the Matter Arising as a Microsoft Word file.

Retractions

Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article.

Retractions will be assigned to the Editor in Chief of the journal and the Editor who handled the paper. The chairperson of the ASM Journals Committee will be consulted. If all parties agree to the publication and content of the Retraction, it will be sent to the Journals Department for publication. [Submit Retractions via the eJP online manuscript submission and peer review system](#).

How: In the Abstract section of the submission form (a required field), put “Not Applicable.” Upload the text of your Retraction as a Microsoft Word file. Letters of agreement signed by all of the authors must be supplied as Miscellaneous Files Not for Publication (scanned PDF files).

Crossmark

ASM has implemented Crossmark. Crossmark is a multipublisher initiative to provide a standard way for readers to locate the current version of an article. Additional information about Crossmark can be found on the Crossref [website](#) and on [ASM's Crossmark policy page](#).