



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

**CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS – CESC
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA – QUIBIO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS LICENCIATURA**

EMANUELLE CRISTINE PEREIRA DE SOUSA

POLIMORFISMO DOS GENES *cry4* E *cyt2* DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* ATIVOS A *Aedes aegypti*

CAXIAS-MA

2021

EMANUELLE CRISTINE PEREIRA DE SOUSA

POLIMORFISMO DOS GENES *cry4* E *cyt2* DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* ATIVOS A *Aedes aegypti*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas - Licenciatura do Centro de Estudos Superiores de Caxias, CESC/UEMA, para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Maria Cleoneide da Silva –
CESC/UEMA

CAXIAS-MA

2021

S725p Sousa, Emanuelle Cristine Pereira de
Polimorfismo dos genes cry4 e cyt2 de isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos a *Aedes aegypti* / Emanuelle Cristine Pereira de Sousa. __Caxias: CESC/UEMA, 2020.

36f.

Orientador: Profª. Dra. Maria Cleoneide da Silva.

Monografia (Graduação) – Centro de Estudo de estudos Superiores de Caxias, Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas

1. Variação genética. 2. Entomopatógeno. 3. Endotoxina. I. Título.

CDU 57.858.77:616.988

EMANUELLE CRISTINE PEREIRA DE SOUSA

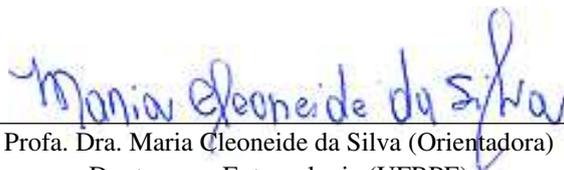
POLIMORFISMO DOS GENES *cry4* E *cyt2* DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*

ATIVOS A *Aedes aegypti*

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas Licenciatura do Centro de Estudos Superiores de Caxias, CESC/UEMA, para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

APROVADO EM: 16 de Dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Cleoneide da Silva (Orientadora)
Doutora em Entomologia (UFRPE)
Universidade Estadual do Maranhão



Profa. Dra. Maria Claudene Barros (Membro)
Doutora em Ciências Biológicas (UFPA)
Universidade Estadual do Maranhão



Profa. Me. Ana Priscila Medeiros Olímpio (Membro)
Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde (UEMA)
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico este trabalho ao meu pai Manoel Messias Cavalcante Sousa, por ser meu melhor amigo e ponto de apoio em tudo que me proponho a fazer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois Ele é o motivo de tudo.

A Universidade Estadual do Maranhão pela formação acadêmica e concessão das bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) e Bolsa de Auxílio Técnico (BATI).

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico pela concessão das bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) que foram de fundamental importância para a minha formação acadêmica.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Cleoneide da Silva por esses cinco anos de parceria, e todos os ensinamentos, onde além de professora e mulher exemplar se tornou uma grande amiga, por qual tenho muita admiração e respeito.

Aos meus pais, Manoel e Idalete, por sempre priorizarem os estudos e nunca deixarem faltar nada em nenhum sentido, o que sou hoje é fruto de todos seus ensinamentos; meu irmão Thiago, pela parceria e por me tirar de tantos apertos.

A minha segunda família, Nivaldo, Dona Camila, Lílian, Seu Chico, Arthur, João Miguel e Camilinha, por terem me acolhido tão bem e por estarem ao meu lado todos os dias, pelo apoio, por todo carinho, e os incontáveis momentos de alegria, vocês fizeram que a caminhada fosse mais fácil.

A todos os meus professores da graduação, sei que cada um deixou sua contribuição importantíssima em minha formação acadêmica.

A Katiane e Juliete, por toda ajuda e dúvidas esclarecidas, que não foram poucas.

Ao Marcelo Almeida e Histelle, por me ensinarem tanto e ajudar sempre que precisei.

Ao meu amigo Walisson Mickael, por ter sido parte essencial nessa fase final, desde o empréstimo do notebook, a todos os puxões de orelha e incentivos.

A minha amiga Sarah Abigail, que estamos juntas desde o início e que sei que torce por mim independente da distância.

A minha amiga Alice Tôrres, por sempre está disponível, seja para conversas pessoais e conselhos sábios, como para ajuda na formatação, e em tudo que se propõe a fazer com dedicação e carinho.

A toda equipe do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas e Marcadores Moleculares - BEMMOL, em especial Dalton e Geysla, por terem sido parte indispensável para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Entomologia Médica (LABEM) e ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL), pela parceria.

A minha turma 2015.1 pelos momentos vividos em sala de aula, laboratório e campo, durante esses cinco anos, em especial, Bruna, Valéria, Adriana, Débora, Lavínia e Yara.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* apresenta atividade entomopatogênica a mosquitos vetores de doenças e pragas da agricultura. Sua principal característica é a produção de cristais proteicos, formados por uma ou mais δ -endotoxinas, chamadas toxinas Cry e Cyt. Isolados de *B. thuringiensis* do Maranhão têm demonstrado atividade tóxica à *Aedes aegypti* e amplificados para vários genes díptero-específicos. Diante disso, este trabalho visa investigar polimorfismo nos genes *cry* e *cyt* em isolados de *B. thuringiensis* do Maranhão ativos a *A. aegypti*. Para tanto, foi realizada a extração do DNA e PCR com os isolados de *B. thuringiensis*, para caracterizar os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas utilizando a ferramenta Clustal W do programa BioEdit, comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank e confirmadas utilizando o BLAST. Dezesesseis isolados de *B. thuringiensis* amplificaram para os genes díptero-específicos *cry4* e *cyt2*, apresentando cinco tipos de combinações, com a maioria dos isolados de *B. thuringiensis* amplificando para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*. A análise das sequências dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* evidenciaram que a região sequenciada de ambos os genes é bastante conservada, sendo encontrado polimorfismo nas sequências de apenas dois isolados para o gene *cry4Aa*: o BtMA-679 que apresentou substituição A6-T (substituição de Adenina por Timina no nucleotídeo 6 do gene *cry4Aa*) e o BtMA-703 que a substituição foi de A12-G (substituição de Adenina por Guanina no nucleotídeo 12 do gene *cry4Aa*) e para o gene *cry4Ba* apresentou substituição de A1-G, no isolado BtMA-691. Os isolados que apresentaram a combinação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba* podem ser considerados potenciais candidatos como linhagens de *B. thuringiensis* para serem utilizados como larvicidas microbianos. A análise das sequências dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* evidenciaram que a região sequenciada de ambos os genes é bastante conservada, sendo encontrado polimorfismo nas sequências de apenas três isolados e não havendo polimorfismo nos genes *cyt2Aa* e *cyt2Ba* nas sequências, em relação as sequências depositadas no Genbank

Palavras-chave: Variação genética, Entomopatógeno, δ -endotoxina.

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis* presents entomopathogenic activity to mosquitoes that are vectors of agricultural diseases and pests. Its main characteristic is the production of protein crystals, formed by one or more δ -endotoxins, called Cry and Cyt toxins. Isolates of *B. thuringiensis* from Maranhão have demonstrated toxic activity to *Aedes aegypti* and have been amplified for several diptera-specific genes. Therefore, this work aims to investigate polymorphism in the *cry* and *cyt* genes in *B. thuringiensis* from Maranhão isolates active to *A. aegypti*. For this purpose, DNA extraction and PCR was performed with *B. thuringiensis* isolates, to characterize the *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* and *cyt2Ba* genes. The sequences obtained were aligned and edited using the Clustal W tool of the BioEdit program, compared with other sequences available on GenBank and confirmed using BLAST. Sixteen isolates amplified for the diptera-specific genes *cry4* and *cyt2* and presented five types of combinations, with the majority of *B. thuringiensis* isolates amplifying for the *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* and *cyt2Ba* genes. The sequences analysis of the *cry4Aa* and *cry4Ba* gene showed that the sequenced region of both genes is quite conserved, with polymorphism found in the sequences of only two isolates for the *cry4Aa* gene: BtMA-679 that presented A6-T substitution (substitution of Adenine by Thymine in nucleotide 6 of the *cry4Aa* gene) and BtMA-703, which was replaced by A12-G (Adenine substitution by Guanine in nucleotide 12 of the *cry4Aa* gene) and for the *cry4Ba* gene, it was substituted by A1-G in the BtMA isolate - 691. The isolates that presented the combination of the *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* and *cyt2Ba* genes can be considered potential candidates as *B. thuringiensis* strains to be used as microbial larvicides. The analysis of the *cry4Aa* and *cry4Ba* gene sequences showed that the sequenced region of both genes is much conserved, with polymorphism found in the sequences of only three isolates and with no polymorphism in the *cyt2Aa* and *cyt2Ba* genes in the sequences, in relation to the sequences deposited in the Genbank

Keywords: Genetic variation, Entomopathogen, δ -endotoxin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mosquito *Aedes aegypti*..... 12
- Figura 2.** Combinação de genes *cry4* e *cyt2* encontradas nos isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão ativos à *Aedes aegypti*. *cry*: crystal; *cyt*: cytolytic.....20
- Figura 3.** Alinhamento das sequências do gene *cry4Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e sequências depositadas na plataforma GenBank 22
- Figura 4.** Alinhamento das sequências do gene *cry4Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e sequências depositadas na plataforma GenBank 23
- Figura 5.** Alinhamento das sequências do gene *cyt2Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e sequências depositadas na plataforma GenBank 26
- Figura 6.** Alinhamento das sequências do gene *cyt2Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e sequências depositadas na plataforma GenBank 27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão, caracterização molecular quanto aos genes díptero-específicos e atividade larvicida contra larvas de <i>Aedes aegypti</i>	17
Tabela 2. Iniciadores, sequências de nucleotídeos, temperaturas de anelamento (TA) e pares de bases (pb) usados na PCR	18
Tabela 3. Genes <i>cry4</i> e <i>cyt2</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão sequenciados	20
Tabela 4. Comparação da sequência do gene <i>cry4Aa</i> de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.....	23
Tabela 5. Comparação da sequência do gene <i>cry4Ba</i> de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.....	25
Tabela 6. Comparação da sequência do gene <i>cyt2Aa</i> de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.....	27
Tabela 7. Comparação da sequência do gene <i>cyt2Ba</i> de isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Bacillus thuringiensis	11
1.2	Aedes aegypti	12
1.3	Caracterização do problema	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Condições de cultivo dos isolados de B. thuringiensis, Extração de DNA e PCR	17
3.2	Sequenciamento dos genes cry4Aa, cry4Ba, cyt2Aa e cyt2Ba	18
3.3	Análises dos dados	19
4	RESULTADOS	20
4.1	Isolados de Bacillus thuringiensis que amplificaram para os genes cry4Aa, cry4Ba, cyt2Aa e cyt2Ba	20
4.2	Polimorfismo dos genes cry4Aa, cry4Ba, cyt2Aa e cyt2Ba de isolados de Bacillus thuringiensis	20
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) é uma bactéria gram-positiva, aeróbica, em forma de bastonete, com célula vegetativa de 1,0-1,2 µm de largura e 3,0-5,0 µm de comprimento, geralmente com motilidade, que ocorre naturalmente nos solos de todo o mundo (CRICKMORE *et al.*, 1998; IBRAHIM *et al.*, 2010; EL-KERSH *et al.*, 2016; RABINOVITCH *et al.*, 2017).

A principal característica dessa bactéria é a produção de cristais proteicos, sintetizados durante o processo de esporulação (BECHTEL; BULLA, 1976; ARONSON, 2002). Estes cristais proteicos são formados por uma ou mais δ-endotoxinas, chamadas toxinas Cry e Cyt, codificadas por genes *cry* e *cyt*, respectivamente (CRICKMORE *et al.*, 1998; ARONSON, 2002; CRICKMORE *et al.*, 2020).

Estudos detalhados sobre as toxinas Cry e Cyt, baseados em bioensaios contra diferentes larvas de insetos, permitiram identificar que cada uma apresenta especificidade contra uma determinada ordem de insetos (CRICKMORE *et al.*, 1998; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; VAN FRANKENHUYZEN, 2009, 2013).

As toxinas Cry são descritas em maior número e atualmente são conhecidas 731 proteínas (CRICKMORE *et al.*, 2020). As toxinas Cry4 têm maior especificidade a insetos da ordem Diptera e estão divididas em Cry4A, Cry4B, Cry4C e Cry4D, onde Cry4Aa é altamente tóxica a larvas de *Culex* e menos tóxica a *Aedes* e *Anopheles* e Cry4Ba tem alta atividade larvicida contra *Aedes* e *Anopheles* (BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007; OTIENO- AYAYO *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ-LUNA *et al.*, 2010; CRICKMORE *et al.*, 2020).

Já as toxinas Cyt são descritas em menor número (47 proteínas), e estão classificadas em Cyt1, Cyt2, Cyt3, Cyt4, Cyt5, Cyt6 e Cyt7 (CRICKMORE *et al.*, 1998; BEN-DOV, 2014; MONNERAT *et al.*, 2014; ELLEUCH *et al.*, 2015; CRICKMORE *et al.*, 2020). Essas toxinas têm função de potencializar a toxicidade das Cry contra insetos da ordem Diptera.

As toxinas Cyt2Aa e Cyt2Ba são altamente sinérgicas com Cry4Aa e Cry4Ba, contribuindo para a atividade inseticida do *B. thuringiensis* (PROMDONKOY; PROMDONKOY; PANYIM, 2005; MANASHEROB *et al.*, 2006; VALTIERRA-DE-

LUIS

et al., 2020).

Considerando que as toxinas Cry4 apresentam atividade tóxica a dípteros e as toxinas Cyt potencializam a sua toxicidade contra esses insetos, a busca de isolados com as toxinas Cyt e Cry4 tem implicações importantes para desenvolver estratégias de manejo da resistência de toxinas Cry no controle de mosquitos (HUGHES *et al.*, 2005; BELTRÃO; SILVA-FILHA, 2007; SUN *et al.*, 2014; BEN-DOV, 2014; MONNERAT *et al.*, 2014; ELLEUCH *et al.*, 2015).

Várias coleções de *B. thuringiensis* têm sido estudadas, por meio de diferentes técnicas, com o intuito de encontrar isolados capazes de produzir diferentes toxinas e que sejam eficazes para o controle de insetos, especialmente de mosquitos vetores como *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. 1762 (Diptera: Culicidae) responsável pela transmissão do vírus da dengue, uma das maiores arborvirose do mundo, da febre amarela, da chikungunya e do vírus Zika (POWELL; TABACHNICK, 2013; VALLE; PIMENTA; AGUIAR, 2016; HENRIQUES; DUARTE; GARCIA, 2016; ZARA *et al.*, 2016).

1.2 *Aedes aegypti*

O mosquito *A. aegypti*, amplamente disperso no território brasileiro, é uma das maiores preocupações da saúde pública, por ser o principal transmissor dos agentes etiológicos das arboviroses dengue, chikungunya, zika e febre amarela (Figura 1) (POWELL; TABACHNICK, 2013; BRASIL, 2009; HENRIQUES; DUARTE; GARCIA, 2016; VALLE; PIMENTA; AGUIAR, 2016; ZARA *et al.*, 2016; ARAGÃO *et al.*, 2019).

Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*.



Fonte: Daily Breeze (2020).

Originário da África, onde existem populações selvagens e domésticas, o *A. aegypti* tem acompanhado o homem em sua permanente migração (CONSOLI; LOURENÇO- de-OLIVEIRA, 1994). É um mosquito adaptado ao ambiente urbano e utiliza os recipientes mais frequentes no domicílio ou peridomicílio para o desenvolvimento de sua fase larvária, mas também pode se adaptar a outros tipos de criadouros, como por exemplo, bromélias e esgotos a céu aberto encontrados em vários centros urbanos (VAREJÃO *et al.*, 2005; ARAGÃO *et al.*, 2019).

Essa espécie é antropofílica e tem hábitos diurnos, alimentando-se e depositando seus ovos, preferencialmente, ao amanhecer e no período vespertino próximo ao crepúsculo (NATAL, 2002). Esse mosquito é classificado como holometábolo, pois apresenta metamorfose completa durante o seu desenvolvimento, seu ciclo de vida é composto por quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (NELSON, 1986; BESERRA *et al.*, 2009; BERMUDI *et al.*, 2017).

Desde o seu aparecimento, o *A. aegypti* tem-se perpetuado em consequência das alterações do ambiente por ações antrópicas, que contribui para a incidência e disseminação dos vírus da dengue, chikungunya, zika e febre amarela, transmitidos por este vetor (ZARA *et al.*, 2016; VALLE; PIMENTA; AGUIAR, 2016; HENRIQUES; DUARTE; GARCIA, 2016).

O sucesso adaptativo desse inseto está associado a condições domésticas favoráveis ou condições peridomésticas, como a presença de humanos e criadouros aquáticos; rápido desenvolvimento e ovos resistentes à dessecação (ZARA *et al.*, 2016; CARVALHO; MOREIRA, 2017; BASSANI *et al.*, 2019). Esses fatores dificultam o controle efetivo desse mosquito, constituindo-se um sério problema de saúde pública global.

O principal controle utilizado para controlar o *A. aegypti* é o químico (BRASIL, 2019a). No entanto, esses produtos têm várias consequências negativas, sobretudo quando são aplicados de modo inadequado, como persistência no ambiente por longos períodos, bioacumulação, impactos a espécies de insetos úteis, problemas a saúde humana, além de possuírem um alto custo financeiro (METCALF *et al.*, 1973; BRASIL, 2009; ALANI *et al.*, 2013; CHAIYARAT *et al.*, 2014; NAKAGAWA *et al.*, 2016; DEMING *et al.*, 2016).

Além disso, diversas pesquisas relatam populações de *A. aegypti* resistentes a esses larvicidas inviabilizando o uso desses produtos para o controle desse inseto (BESERRA *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2014; BELLINATO *et al.*, 2016; MORAIS *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2019).

Diante dos diversos problemas apresentados, o controle biológico vem como alternativa ao controle químico e dentre os organismos utilizados como controle biológico de insetos, a bactéria *B. thuringiensis* tem se destacado como um eficiente agente de controle de vetores de doenças, pois é uma bactéria facilmente produzida em larga escala, o que favorece a sua aplicação em campo (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010; BRAVO *et al.*, 2011, KOLLARS; KOLLARS; HULSEY, 2017).

1.3 Caracterização do problema

A bactéria *B. thuringiensis* apresenta atividade entomopatogênica a uma gama de insetos como mosquitos vetores de doenças e pragas agrícolas. É considerada o principal agente de controle biológico do *A. aegypti*, responsável pela transmissão do vírus da dengue, uma das maiores arboviroses do mundo, da febre amarela, da Chikungunya e do vírus Zika (POWELL; TABACHNICK, 2013; BRASIL, 2009; VALLE; PIMENTA; AGUIAR, 2016; HENRIQUES; DUARTE; GARCIA, 2016; ZARA *et al.*, 2016).

Tendo em vista o crescimento das populações do *A. aegypti* e o aumento no número de casos de pessoas acometidas pelos vírus da dengue, chikungunya, zika e febre amarela, transmitidos por esse inseto, é de suma importância a utilização de metodologias que visem diminuir a proliferação desse vetor, como o controle biológico com a bactéria *B. thuringiensis* (LOBO *et al.*, 2018; BRASIL, 2019b; VIEIRA-NETA *et al.*, 2020).

A Coleção de Bactérias Entomopatogênicas do Maranhão (CBENMA), localizada no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas e Marcadores Moleculares (BEMMOL) no CESC/UEMA, possui mais de 1.000 isolados de *B. thuringiensis*, proveniente de diversos substratos como água, plantas, insetos e solo, coletados em diferentes localidades do Estado do Maranhão, dentre os quais, muitos foram submetidos a testes de patogenicidade e toxicidade contra larvas de *A. aegypti* apresentando alto grau de mortalidade e foram caracterizados molecularmente quanto à presença de vários genes díptero-específicos como *cry4* e *cyt2*.

Considerando que os genes *cry4* e *cyt2* tem implicações importantes para a toxicidade de *B. thuringiensis* contra larvas de *A. aegypti*, é importante buscar linhagens com a presença dessas toxinas e caracterizá-las molecularmente a fim de verificar variação genética, uma vez que o sinergismo entre as toxinas Cry4 e Cyt2 representa um importante fator de toxicidade com alto potencial para o controle de populações de mosquitos (PROMDONKOY; PROMDONKOY; PANYIM, 2005; MANASHEROB *et al.*, 2006; VALTIERRA-DE-LUIS *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estimar e caracterizar o polimorfismo em genes *cry4* e *cyt2* de isolados de *B. thuringiensis* provenientes de solo do cerrado e caatinga ativos à *A. aegypti*.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar isolados de *B. thuringiensis* que amplificaram para os genes *cry4* e *cyt2* ativos à *A. aegypti*;
- ✓ Identificar isolados de *B. thuringiensis* com as maiores combinações dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*;
- ✓ Investigar polimorfismo dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de solo (Cerrado e Caatinga) do Maranhão armazenados na Coleção de Bactérias Entomopatogênicas do Maranhão (CBENMA) e no Banco de Bacilos Entomopatogênicos do Maranhão (BBENMA), que amplificaram para os genes díptero-específicos *cry4* e *cyt2* e que apresentaram 100% de mortalidade contra larvas de *A. aegypti*.

Tabela 1. Isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão, caracterização molecular quanto aos genes díptero-específicos e atividade larvicida contra larvas de *Aedes aegypti*.

Isolados	-	Genes díptero-específicos				Atividade larvicida (%)	
		<i>cry4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cyt2Aa</i>	<i>cyt2Ba</i>	24 h	48 h
BtMA-459			+	+			100
BtMA-676*	+		+	+	+		100
BtMA-679	+		+	+	+	100	
BtMA-681			+	+	+	100	
BtMA-682	+			+			100
BtMA-684	+		+	+	+	100	
BtMA-685	+		+	+	+	100	
BtMA-686*	+			+	+		100
BtMA-687	+		+	+	+	100	
BtMA-688	+		+	+	+	100	
BtMA-689	+		+	+	+	100	
BtMA-690	+		+	+	+	100	
BtMA-691			+	+	+	100	
BtMA-694	+		+	+	+		100
BtMA-703	+		+	+	+	100	
BtMA-750	+			+	+	100	

Fonte: Soares-da-Silva *et al.* (2017). * Dados da CBENMA.

3.1 Condições de cultivo dos isolados de *B. thuringiensis*, Extração de DNA e PCR

Os isolados foram cultivados em ágar nutriente por cerca de 12 horas, após esse período uma colônia de cada amostra foi transferida para microtubos autoclavados de 1,5 mL, contendo 1mL de água estéril e levados à centrifugação por 1 min a 12.000 rpm a 25 °C.

Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para a extração do DNA genômico utilizando a matriz Instagene da Bio-Rad, conforme

o protocolo do fabricante, da seguinte forma: 100 µL da matriz foi adicionado ao microtubo com o *pellet*, em seguida, esse material foi incubado em banho-maria a 56 °C por 25 min, agitado vigorosamente em vórtex por 10 s e incubado em água fervente (100 °C) por 8 min. As amostras foram novamente agitadas em vórtex por 10 s e centrifugadas a 25 °C por 2,5 min. Finalmente, 100 µl do sobrenadante foram colhidos e transferidos para microtubos autoclavados. Após a extração, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% para verificação e estocado em freezer a -20 °C até o momento do uso.

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,2 ml, sendo o volume total da reação de 20 µL. A reação foi constituída de 50 ng de DNA, 3 mM de MgCl₂, tampão 10 X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 250 µM de dNTP, 10 µM de cada *primer* (Tabela 1) e duas unidades de *Taq DNA Polimerase*.

Tabela 2. Iniciadores, sequências de nucleotídeos, temperaturas de anelamento (TA) e pares de bases (pb) usados na PCR.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	TA	pb	Referências
<i>cry4Aa</i>	GAAGTGGGTATGGCACTCAAC (f)	50 °C	777	Costa et al., 2010
	CTCACAACGATTAGACCCTTC (r)			
<i>cry4Ba</i>	GCGAGGTTTCCCATGTCTAC (f)	52 °C	347	
	GTTGTAGGGTGGAATTGTTATC (r)			
<i>cyt2Aa</i>	GCATTAGGAAGACCATTTG (f)	53 °C	361	Costa et al., 2014
	AAGGCTAAGAGTTGATATCG (r)			
<i>cyt2Ba</i>	CAGGAACTCTTAATCAAAGTGTAAT (f)	50 °C	177	
	CATCTACTTGAGGTTCTAAATTTGT (r)			

Para cada *primer* foi utilizado um programa sendo: desnaturação a 94 °C por cinco minutos, seguido de 36 ciclos com temperatura de desnaturação de 94 °C em um minuto, anelamento variando de acordo com o *primer*, conforme tabela 1, durante um minuto, extensão a 72 °C por dois minutos. Adicionalmente, foi realizada uma etapa final de extensão a 72 °C por sete minutos. Os fragmentos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados na presenç a de luz UV.

3.2 Sequenciamento dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*

Os produtos de amplificação das PCRs foram sequenciados utilizando o método didesoxiterminal (SANGER; NICHLEN; COULSON, 1977), com o Kit *ABI Prism TM DyeTerminator v 3.1 Cycle Sequencing Reading Reaction* (Applied Biosystems). Para a reação de sequência foi utilizado: 3,9 µL de H₂O; 1,05 µL de Buffer; 0,35 µL de Primer (0,8 pmol/µL); 1 µL de DNA; 0,7 µL de Big Dye, as reações

de sequenciamento foram realizadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (GENBIMOL).

3.3 Análises dos dados

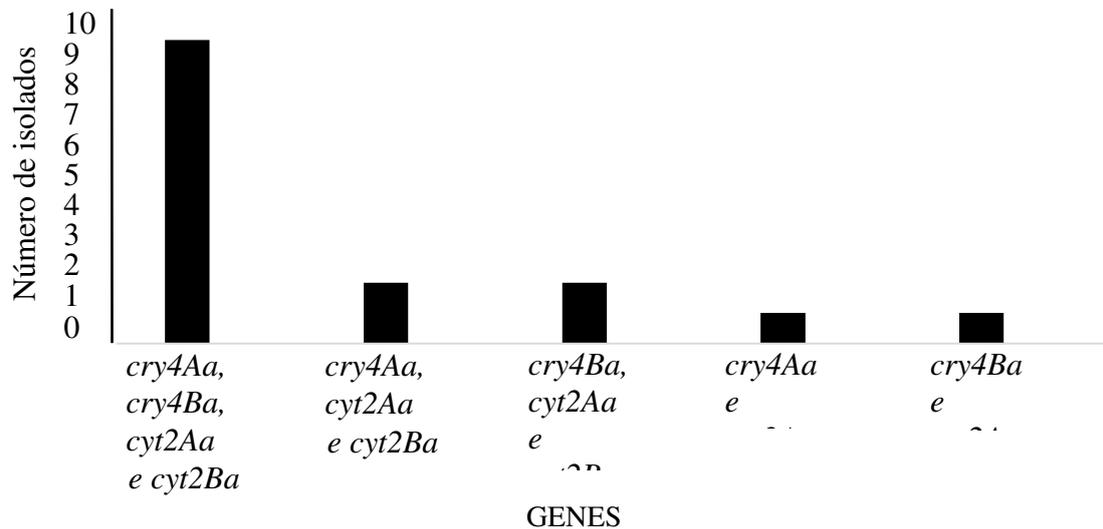
As sequências dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba* foram alinhadas e editadas no programa BioEdit Version 5.0.6 (HALL, 1999) com o auxílio da ferramenta Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1996), sendo essas sequências obtidas comparadas com as sequências depositadas no GenBank por meio da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), para verificar possíveis polimorfismos.

4 RESULTADOS

4.1 Isolados de *Bacillus thuringiensis* que amplificaram para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*

Os 16 isolados de *B. thuringiensis* selecionados que amplificaram para o gene *cry4* em combinação com o gene *cyt2* apresentaram cinco tipos de combinações, sendo um isolado com os genes *cry4Ba* e *cyt2Aa*, 10 isolados com os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*, dois isolados com os genes *cry4Aa*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*, um isolado com a combinação de genes *cry4Aa* e *cyt2Aa* e dois isolados com os genes *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba* (Figura 2).

Figura 2. Combinação de genes *cry4* e *cyt2* encontradas nos isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão ativos à *Aedes aegypti*. *cry*: crystal; *cyt*: cytolytic.



4.2 Polimorfismo dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis*

O polimorfismo foi investigado nos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba* dos isolados de *B. thuringiensis*, conforme tabela 3.

Tabela 3. Genes *cry4* e *cyt2* de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão sequenciados.

Genes	Isolados
<i>cry4Aa</i>	BtMA-679, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-686, BtMA-687, BtMA-688, BtMA-689, BtMA-690, BtMA-694 e BtMA-703
<i>cry4Ba</i>	BtMA-676, BtMA-679, BtMA-681, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-687, BtMA-688, BtMA-689, BtMA-690, BtMA-691, BtMA-694 e BtMA-703
<i>cyt2Aa</i>	BtMA-459, BtMA-676, BtMA-679, BtMA-681, BtMA-682, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-687, BtMA-688, BtMA-689, BtMA-690, BtMA-691, BtMA-694 e BtMA-703
<i>cyt2Ba</i>	BtMA-676, BtMA-679, BtMA-681, BtMA-684, BtMA-685, BtMA-687, BtMA-688, BtMA-689, BtMA-690, BtMA-691, BtMA-694 e BtMA-703

O sequenciamento dos fragmentos dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba*, após a edição e alinhamento, resultou em sequências com 730 e 290 pb, respectivamente. As análises das sequências evidenciaram que a região sequenciada de ambos os genes é bastante conservada, sendo encontrada variação de bases nas sequências do gene *cry4Aa* de apenas dois isolados (BtMA-679 e BtMA-703) e na sequência do gene *cry4Ba* de um isolado (BtMA-691) (Figura 3 e 4).

Na sequência do gene *cry4Aa* foram observadas duas mudanças, sendo uma substituição na posição nucleotídica 6, de adenina por timina (transversão), na sequência do isolado BtMA-679 e uma substituição na posição nucleotídica 12, de adenina por guanina (transição), na sequência do isolado BtMA-703. Enquanto que na sequência do gene *cry4Ba* foi verificada apenas uma alteração, representada por uma substituição de adenina por guanina (transição), no primeiro nucleotídeo da sequência do isolado BtMA-691 (Figura 3 e 4).

Em se tratando de outras classes de gene *cry*, altas taxas de similaridade são do mesmo modo bastante detectadas, confirmando a característica conservada desses genes, como verificado nessa pesquisa para os genes *cry4Aa* e *cry4Ba*.

As sequências do fragmento obtido dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* dos isolados de *B. thuringiensis* do CBENMA foram comparadas com as sequências dos genes de quatro toxinas Cry4Aa (Cry4Aa1, Cry4Aa2, Cry4Aa3 e Cry4Aa4) e cinco toxinas Cry4Ba (Cry4Ba1, Cry4Ba2, Cry4Ba3, Cry4Ba4 e Cry4Ba5), respectivamente, registradas na lista de toxinas disponível no site Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (<https://www.bpprc.org/>).

Verificou-se que as sequências do gene *cry4Aa*, obtidas neste trabalho, possuem identidade com uma região dos genes que codificam as proteínas Cry4Aa1 (Acesso Y00423.1), Cry4Aa2 (Acesso D00248.1) e Cry4Aa4 (Acesso JQ228565.1), diferindo somente das sequências dos isolados BtMA-679 e BtMA-703 nos nucleotídeos alterados. Por tanto, a identidade do gene *cry4Aa* dos nossos isolados foi confirmada, como atesta o alinhamento das sequências na figura 3.

Da mesma forma, as sequências do gene *cry4Ba* obtidas foram idênticas a uma região dos genes que codificam as proteínas Cry4Ba3 (Acesso M20242.1) e Cry4Ba5 (Acesso AL731825.1), exceto na base com alteração na sequência do isolado BtMA-691. Assim, a identidade do gene *cry4Ba* dos nossos isolados foi confirmada, como atesta o alinhamento das sequências na figura 4.

Figura 3. Alinhamento das seqüências do gene cry4Aa de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e seqüências depositadas na plataforma GenBank .

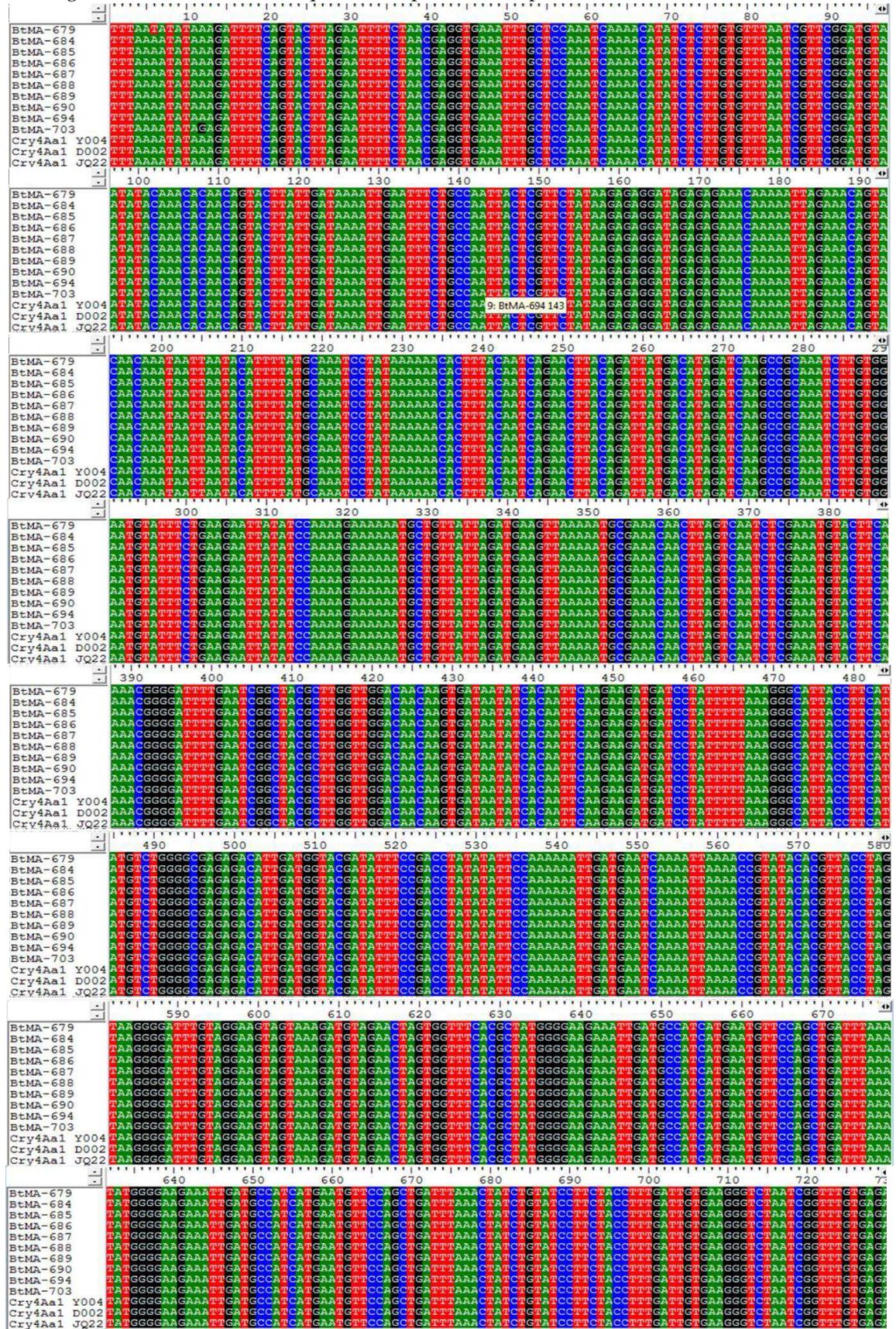


Figura 4. Alinhamento das seqüências do gene *cry4Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e seqüências depositadas na plataforma GenBank.



As seqüências obtidas para ambos os genes *cry4* dos isolados de *B. thuringiensis* analisados na presente pesquisa também foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank, usando a Ferramenta BLAST. A variação obtida para as seqüências nucleotídicas do gene *cry4Aa* foi de, aproximadamente, 98 à 100% com as seqüências de 30 cepas de *B. thuringiensis*, sendo 15 sequenciadas a partir de linhagens *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) e as demais de isolados de *B. thuringiensis* nativos de diferentes localidades (Tabela 4). Enquanto as seqüências do gene *cry4Ba* apresentaram identidade de 100% com as seqüências de seis cepas de *B. thuringiensis*, sendo todas sequenciadas a partir de linhagens de *Bti* (Tabela 5).

Tabela 4 - Comparação da seqüência do gene *cry4Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão, com as seqüências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.

Descrição	Pontuação máxima	Pontuação total	Cobertura de consulta	Valor E	Identidade	Acesso
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain 1.24 plasmid pT0124-4, complete sequence	1336	2555	100%	0.0	99%	KY352353.1

<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> plasmid pBTI-6 DNA, complete sequence, strain: HD522	1336	2555	100%	0.0	99%	LC128536.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain AM65-52 plasmid pAM65-52-4-128K, complete sequence	1336	2555	100%	0.0	99%	CP013279.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD- 789 plasmid pBTHD789- 3, complete sequence	1336	2555	100%	0.0	99%	CP003766.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain BRC-LLP29 putative cry4A gene, complete cds	1336	1336	100%	0.0	99%	JQ228565.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> plasmid pBtoxis	1336	2555	100%	0.0	99%	AL731825.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> gene for 130 kDa delta- endotoxin	1336	1336	100%	0.0	99%	Y00423.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>israelensis</i> plasmid gene for 130 kDa insecticidal protein (ISRH4), complete cds	1336	1336	100%	0.0	99%	D00248.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-BT6 Cry4A gene, complete cds	1314	1314	100%	0.0	99%	EF424470.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Cry4A (<i>cry4A</i>) gene, complete cds	1314	1314	100%	0.0	99%	EF208904.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-BT3 Cry4A gene, complete cds	1308	1308	100%	0.0	99%	EF424468.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-BT4 Cry4A gene, complete cds	1306	1306	99%	0.0	99%	EF424472.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-BT5 Cry4A gene, complete cds	1297	1297	100%	0.0	99%	EF424469.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> Cry4A (<i>cry4a</i>) gene, partial cds	1214	1214	97%	0.0	98%	DQ174290.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain CAB199 Cry4A (<i>cry4A</i>) gene, partial cds	909	909	68%	0.0	99%	GU549496.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain PBT602 130 kDa crystal protein (<i>cry</i>) gene, complete cds	869	869	65%	0.0	99%	AY847707.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>israelensis</i> bt8 gene for 130 kDa crystal protein (mosquito-specific toxin)	869	869	65%	0.0	99%	X07423.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> gene for 130 kDa delta-	869	869	65%	0.0	99%	X07082.1

endotoxin						
<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i> plasmid gene for 130 kDa insecticidal protein (ISRH3), complete cds	869	869	65%	0.0	99%	D00247.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-Bt3 pesticidal crystal protein gene, complete cds	857	857	65%	0.0	99%	EF468627.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> delta-endotoxin (cry4BLB) gene, complete cds	857	857	65%	0.0	99%	AY729887.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-Bt2 truncated pesticidal crystal protein gene, complete cds	852	852	65%	0.0	99%	EF468626.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-Bt1 pesticidal crystal protein gene, complete cds	846	846	65%	0.0	99%	EF468625.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-Bt6 pesticidal crystal protein gene, complete cds	841	841	65%	0.0	99%	EF468630.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-Bt4 pesticidal crystal protein gene, complete cds	835	835	65%	0.0	98%	EF468628.1
<i>B. thuringiensis</i> mosquitocidal protein (CryD2) gene, complete cds	832	832	65%	0.0	98%	M20242.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> isolate DAB-Bt5 pesticidal crystal protein gene, complete cds	824	824	65%	0.0	98%	EF468629.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis/tochigiensis</i> cry4A gene, partial cds	745	745	56%	0.0	99%	EF182768.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain LDC-9 cry4A insecticidal protein (cry4A) gene, partial cds	508	508	37%	8e-140	100%	DQ078744.1
Mutant <i>Bacillus thuringiensis</i> Cry4Aa (cry4Aa) gene, complete cds	442	442	34%	8e-120	98%	DQ910835.1

Tabela 5. Comparação da sequência do gene *cry4Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.

Descrição	Pontuação máxima	Pontuação total	Cobertura de consulta	Valor E	Identidade	Acesso
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain	540	540	100%	1e-149	100%	KY352353.1

1.24 plasmid pT0124-4, complete sequence							
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> plasmid pBTI-6 DNA, complete sequence, strain: HD522	540	540	100%	1e-149	100%	LC128536.1	
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain AM65-52 plasmid pAM65-52-4-128K, complete sequence	540	540	100%	1e-149	100%	CP013279.1	
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 plasmid pBTHD789-3, complete sequence	540	540	100%	1e-149	100%	CP003766.1	
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> plasmid pBtoxis	540	540	100%	1e-149	100%	AL731825.1	
<i>B.thuringiensis</i> mosquitocidal protein (CryD2) gene, complete cds	540	540	100%	1e-149	100%	M20242.1	

Foram obtidas treze seqüências para o gene *cyt2Aa* e doze seqüências para o gene *cyt2Ba*, ao serem plotadas na plataforma BLAST apresentaram alta similaridade com amostras de *B. thuringiensis* do GenBank. O banco de dados para o gene *cyt2Aa* apresentou 300 pb e o *cyt2Ba* 140 pb. As análises das seqüências evidenciaram que ambos os genes são bastante conservados, não sendo demonstrada variação nucleotídica em ambos os genes (Figuras 5 e 6) (Tabelas 6 e 7).

Figura 5. Alinhamento das seqüências do gene *cyt2Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e seqüências depositadas na plataforma GenBank.



Figura 6. Alinhamento das sequências do gene *cyt2Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão e sequências depositadas na plataforma GenBank.

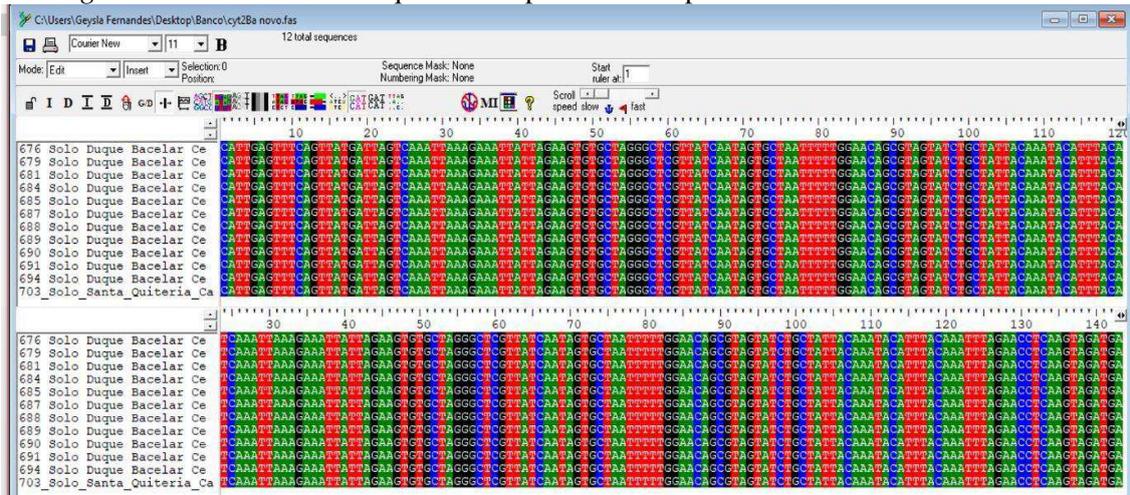


Tabela 6. Comparação da sequência do gene *cyt2Aa* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.

Descrição	Identidade	Acesso
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BT-59 plasmid p4, complete sequence	100.00%	CP039725.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> strain 1.24 plasmid pT0124-4, complete sequence	100.00%	KY352353.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 plasmid pBTHD789-3, complete sequence	100.00%	CP003766.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain T0139 plasmid pT0139-4, complete sequence	100.00%	CP037468.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bti plasmid pT0124-4,	100.00%	CP037887.1

Tabela 7. Comparação da sequência do gene *cyt2Ba* de isolados de *Bacillus thuringiensis* do Maranhão, com as sequências de banco de dados do GenBank, com utilização da ferramenta Blast, no NCBI.

Descrição	Identidade	Acesso
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain BT-59 plasmid p4, complete sequence	99.30%	CP039725.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain Bti plasmid pT0124-4, complete sequence	99.30%	CP037887.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> strain NBBt2 cytolytic protein 2B (<i>cyt2B</i>) gene, partial cds	99.30%	KY777431.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> plasmid pBTI-6 DNA, complete sequence, strain: HD522	99.30%	LC128536.1
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789 plasmid pBTHD789-3, complete sequence	99.30%	CP003766.1

5 DISCUSSÃO

Os isolados deste estudo que apresentaram a combinação de genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba*, podem ser considerados potenciais candidatos como linhagens de *B. thuringiensis* para serem utilizados como larvicidas microbianos, devido ao seu amplo espectro de ação, bem como, a sua atividade larvicida.

Algumas pesquisas têm evidenciado o potencial de Cyt2 em agir em sinergismo com as toxinas Cry4. Promdonkoy; Promdonkoy; Panyim (2005) verificaram que a coexpressão das toxinas Cry4Ba e Cyt2Aa, produzidas em *Escherichia coli* incrementou a toxicidade para larvas de *A. aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, demonstrando, com isto, a alta atividade sinérgica entre as toxinas combinadas.

Já Manasherob *et al.* (2006) relataram a capacidade da combinação de Cyt2Ba interagir com Cry4Aa, sendo tóxica contra larvas de *A. aegypti*. E da mesma forma, Valtierra- de-Luis *et al.* (2020) demonstraram que a combinação das toxinas Cry4Aa e Cyt2Ba exibiram uma alta atividade inseticida contra larvas de segundo instar de *A. aegypti* (CL₅₀ = 13,41 ng/mL), em comparação a atividade inseticida de Cry4Aa de forma isolada (CL₅₀ = 34,63 ng/mL).

Quanto ao polimorfismo, nossos resultados foram semelhantes aos do estudo realizado por Bukhari; Shakoob (2010), no qual uma região conservada do gene *cry4* de isolados de *B. thuringiensis* nativos, tóxicos para larvas de *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) (Diptera: Anophelinae), foi sequenciada e analisando as sequências obtidas, verificaram-se alterações de nucleotídeos nos fragmentos, variando de uma a quatro mudanças por isolado.

O sequenciamento do gene *cry4Aa* realizado no trabalho de Corrêa *et al.* (2012) revelou oito diferenças de base nucleotídica. Já na sequência do gene *cry4Ba* analisada por Corrêa *et al.* (2013) apenas uma alteração nucleotídica foi verificada.

Em se tratando de outras classes de gene *cry*, altas taxas de similaridade são do mesmo modo bastante detectadas (LETOWSKI *et al.*, 2005; CHOI *et al.*, 2007; CORRÊA *et al.*, 2012; MERA; VILLEGAS; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, 2012; BOUKEDI *et al.*, 2016), confirmando a característica conservada desses genes, como verificado nessa pesquisa para os genes *cry4Aa* e *cry4Ba*.

Altas taxas de similaridade são verificadas também para o gene *cyt* de isolados nativos de *B. thuringiensis*, provenientes de diferentes substratos e diferentes

regiões do mundo (WU *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2014; SOARES-DA-SILVA, 2017).

Sendo assim faz-se necessário novos estudos como o sequenciamento das demais toxinas presentes em *B. thuringiensis*, que poderão possibilitar o entendimento da relação das toxinas expressas por esses genes, essas informações poderão fornecer conhecimentos para desvendar o mecanismo envolvido na atividade tóxica desses isolados e assim buscar novos agentes de controle biológico contra o *A. aegypti*.

A busca por novas linhagens de *B. thuringiensis* é realizada em diferentes laboratórios do mundo, com intuito de obter linhagens que estejam adaptadas às condições locais de cada região, esse fato pode contribuir para uma maior variabilidade genética das diferentes linhagens de *Bacillus*, ressaltando assim a importância de coletas nos diferentes biomas maranhenses. Com isso, espera-se que os isolados que apresentaram maior número de genes, possam ser utilizados como ferramenta biotecnológica, consistindo em ingrediente para a fabricação de inseticida biológico para o controle de vetores, utilizando os próprios recursos naturais da região estudada (PINTO *et al.*, 2003, GOBATTO *et al.*, 2010).

6 CONCLUSÃO

- Os isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram a combinação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cyt2Aa* e *cyt2Ba* podem ser considerados potenciais candidatos como linhagens de *B. thuringiensis* para serem utilizados como larvicidas microbianos.
- A análise das sequências dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* evidenciaram que a região sequenciada de ambos os genes é bastante conservada, sendo encontrado polimorfismo nas sequências de apenas três isolados (BtMA-679, BtMA-691 e BtMA-703);
- Não foi verificado polimorfismo nos genes *cyt2Aa* e *cyt2Ba* nas sequências, em relação as sequências depositadas no Genbank.

REFERÊNCIAS

- AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, p. 34-39, 2005.
- ALANI, R.; DROUILLARD, K.; OLAYINKA, K.; ALO, B. Bioaccumulation of organochlorine pesticide residues in fish and invertebrates of Lagos Lagoon, Nigeria. **American Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 4, p. 22-30, 2013.
- ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 945-958, 2010.
- ARAGÃO, C.F.; PINHEIRO, V.C.S.; NUNES NETO, J.P.; SILVA, E.V.P.; PEREIRA, G.J.G.; NASCIMENTO, B.L.S.; CASTRO, K.S.; MAIA, A.M.; CATETE, C.P.; MARTINS, L.C.; TADEI, W.P.; SILVA, S.P.; CRUZ, A.C.R. Natural infection of *Aedes aegypti* by chikungunya and dengue type 2 virus in a transition area of north-northeast Brazil. **Viruses**, v. 11, p. 1126, 2019.
- ARAÚJO, A. P. D.; PAIVA, M. H. S.; CABRAL, A. M.; CAVALCANTI, A. E. H. D.; PESSOA, L. F. F.; DINIZ, D. F. A.; HELVECIO, E.; SILVA, E. V. G. D.; SILVA, N. M. D.; ANASTÁCIO, D. B.; PONTES, C.; NUNES, V.; SOUZA, M. D. F. M. D.; MAGALHÃES, F. J. R.; SANTOS, M. A. V. D. M.; AYRES, C. F. J. Screening *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations From Pernambuco, Brazil for Resistance to Temephos, Diflubenzuron, and Cypermethrin and Characterization of Potential Resistance Mechanisms. **Journal of Insect Science**, v. 19, p. 1-15, 2019.
- ARONSON, A. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 417-425, 2002.
- BARROS, N. M. *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 1039-1046, 2010.
- BASSANI, A. T. TRAMONTINA, A. C. TRAMONTINA, F. F. Educação ambiental, vigilância em saúde e o controle do vetor *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: culicidae). **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 36, p. 339-356, 2019.
- BECHTEL, D. B.; BULLA, L. A. J. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 127, p. 1472-1481, 1976.
- BELLINATO, D. F.; VIANA-MEDEIROS, P. F.; ARAÚJO, S. C.; MARTINS, A. J.; LIMA, J. B. P.; VALLE, D. Resistance Status to the Insecticides Temephos, Deltamethrin, and Diflubenzuron in Brazilian *Aedes aegypti* Populations. **BioMed Research International**, v. 2016, p.1-12, 2016.
- BELTRÃO, H. B. M.; SILVA-FILHA, M. H. N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **FEMS Microbiology Letters**, v. 266, p. 163-169, 2007.
- BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its Dipteran-Specific

Toxins.

BERMUDI, P.; KOWALSKI, F.; MENZATO, M.; FERREIRA, M.; PASSOS, W.; OKU, V.; KUMOW, A.; LUCIO, V.; LIMA-CAMARA, T.; URBINATTI, P.; CHIARAVALLOTI, F.; *Aedes aegypti* breeding site in an underground rainwater reservoir: a warning. **Revista Saúde Pública**, v. 51, p. 122, 2017.

BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R. M.; QUEIROGA, M. D. F. C. D.; CASTRO, F. P. JR.; Resistência de Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) ao Organofosforado Temefós na Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 303-307, 2007.

BESERRA, E. B.; FREITAS, E. M.; SOUZA, J. T.; FERNANDES, C. R. M.; SANTOS, K. D. Ciclo de vida de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) em águas com diferentes características. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 3, p. 281-285, 2009.

BOUKEDI, H.; SELLAMI, S.; KTARI, S.; HASSAN, N. B. B.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; TOUNSI, S.; ABDELKEFI-MESRATI, L. Isolation and characterization of a new *Bacillus thuringiensis* strain with a promising toxicity against Lepidopteran pests. **Microbiological Research**, v. 186, p. 9-15, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Controle de vetores - larvicidas recomendados pela Organização Mundial de Saúde para uso em água potável (OMS, 2012). Brasília: **Ministério da Saúde**, 2019a. Disponível em:<<http://www.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/controle-de-vetores>>. Acesso em: setembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009. Disponível em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf>. Acesso em: agosto de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para *Aedes aegypti* (LIRAA), **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 13. 2019b. Disponível em:<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/abril/30/2019-013_Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-urbanas-transmitidas-pelo-Aedes-publicacao.pdf>. Acesso em: agosto 2019.

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

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, 2011.

BUKHARI, D. A.; SHAKOOR, A. R. Isolation and molecular characterization of *cry4* harbouring *Bacillus thuringiensis* isolates from pakistan and mosquitocidal activity of their spores and total proteins. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 42, p. 1-15, 2010.

CARVALHO, F. D.; MOREIRA, L. A.; Why is *Aedes aegypti* Linnaeus so successful as a species? **Neotropical Entomology**, v. 46, p. 243-255, 2017.

CHAIYARAT, R.; SOOKJAMA, C.; EIAM-AMPAIB, K.; DAMRONGPHOL, P. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in the liver of birds from Boraphet wetland, Thailand. **ScienceAsia**, v. 40, p. 198-203, 2014.

CHOI, J. Y.; LI, M. S.; SHIM, H. J.; ROH, J. Y.; WOO, S.; JIN, B. R.; JE, Y. H. Isolation and characterization of strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* containing two novel cry1-type toxin genes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 1498, 2007.

COHEN, S.; ZARITSKY, A. Cyt1Ca from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: production in *Escherichia coli* and comparison of its biological activities with those of other Cyt-like proteins. **Microbiology**, v. 152, p. 2651-2659, 2006.

CONSOLI, R. A. G. B.; LOURENÇO-de-OLIVEIRA, R. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.

CORRÊA, R. F. T.; AGUIAR, R.; MONNERAT, R.; RIBEIRO, B. *Cry4aa* and *cry4ba* from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* expressed in insect cells by recombinant baculoviruses are toxic to *aedes aegypti* larvae. **Virus Reviews & Research**, v. 18, p. 5, 2013.

CORRÊA, R. F. T.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. **PLoS one**, v. 7, p. e46121, 2012.

COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, V. F. M.; DESIDÉRIO, J. A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: culicidae). **Neotropical Entomology**, v.39, p.757-766, 2010.

COSTA, M. L.; LANA, U. G.; BARROS, E. C.; PAIVA, L. V.; VALICENTE, F. H. Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* *cyt* genes and their effect against fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. 128-137. 2014.

CRICKMORE, N., BERRY, C., PANNEERSELVAM, S., MISHRA, R., CONNOR, TR E BONNING, BC. Bacterial Pesticidal Protein Resource Center, visualizado em 12 de novembro de 2020, <https://www.bpprc.org>. 2020.

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

DAILY BREEZE Meet the new *Aedes* mosquito spreading misery around a wide swath of Southern California. 2020. Disponível em: <<https://www.dailybreeze.com/2018/08/21/meet-aedes-a-new-mosquito-spreading-misery-around-a-wide-swath-of-southern-california/>> Acesso em: 11/09/2020.

DEMING, R.; MANRIQUE-SAIDE, P.; BARREIRO, A. M.; CARDEÑA, E. U. K.; CHE- MENDOZA, A.; JONES, B.; LIEBMAN, K.; VIZCAINO, L.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G.; LENHART, A. Spatial variation of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* presents unique vector control challenges. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-10, 2016.

DINIZ, M. M. C. D. S. L.; HENRIQUES, A. D. D. S.; LEANDRO, R. D. S.; AGUIAR, D. L.; BESERRA, E. B. Resistência de *Aedes aegypti* ao temefós e desvantagens adaptativas. **Revista Saúde Pública**, v.48, p. 775-782, 2014.

ecosystem studies of the environmental fate of six organochlorine pesticides. **Environmental Health Perspectives**, v. 4, p. 35-44, 1973.

EL-KERSH, T. A.; AHMED, A. M.; AL-SHEIKH, Y. A.; TRIPET, F.; IBRAHIM, M. S.; METWALLI, A. A. M. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (s.l.). **Parasites & Vectors**. v. 9, p. 647, 2016.

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

FERNÁNDEZ-LUNA, M. T.; TABASHNICK, B. E.; LANZ-MENDOZA, H.; BRAVO, A.; SABERÓN, M.; MIRANDA-RÍOS, J. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, p. 231-233, 2010.

GOBATTO, V.; GIANI, S. G.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; SPECHT, A.;

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HENRIQUES, C. M. P.; DUARTE, E.; GARCIA, L. P. Desafios para o enfrentamento da epidemia de microcefalia. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 7-10, 2016.

HUGHES, P. A.; STEVENS, M. M.; PARK, H. W.; FEDERICI, B. A.; DENNIS, E. S.;

IBRAHIM, M.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L. *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 31-50, 2010.

KHASDAN, V.; CAHAN, R.; BEN-DOV, E. Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2191-2199, 2008.

KOLLARS, T. M. JR.; KOLLARS, P.; HULSEY, B. Efficacy trial of camouflage provector nettys with entobac d against *Aedes aegypti*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 12, p. 10-12, 2017.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of *cryI* gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5391-5398, 2005.

LOBO, K. D. S.; SOARES-DA-SILVA, J.; SILVA, M. C. D.; TADEI, W. P.; POLANCZYK, R. A.; PINHEIRO, V. C. S. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* found in soils of the Cerrado region of Brazil, and their toxicity to *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, p. 5-12, 2018.

MANASHEROB, R.; ITSKO, M.; SELA-BARANES, N.; BEN-DOV, E.; BERRY, C.;

MERA, M. I. O.; VILLEGAS, J. B.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. LSSP-PCR para la identificación de polimorfismos en el gen *cryIB* en cepas nativas de *Bacillus*

thuringiensis. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, p. 121-134, 2012.

METCALF, R. L.; KAPOOR, I. P.; LU, P. Y.; SCHUTH, C. K.; SHERMAN, P. Model

MONNERAT, R.; PEREIRA, E.; TELES B.; MARTINS, E., PRAÇA, L.; QUEIROZ, P.; SOBERON, M.; BRAVO, A.; RAMOS, F.; SOARES, C. M. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 121, p. 70-73, 2014.

MORAIS, J. O.; RIBEIRO, S. A.; MONTEIRO, S. A.; RODRIGUES, F. D. A. F.; MORAIS, A. M. B. D.; Avaliação do regulador de crescimento de insetos pyriproxyfen em populações de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Temas em saúde**, v.17, p. 403-420, 2017.

NAKAGAWA, L. E.; POTENZA, M. R.; ICHIRRARO, T. H.; PAPINI, S. Persistence of chlorpyrifos in greenhouse air. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-4, 2016.
NATAL, D. Bioecologia do *Aedes aegypti*. **Biológico**, São Paulo v.64, p. 205-207, 2002.

NELSON, M. J. *Aedes aegypti: biologia y ecologia*, Washington, DC, Organización Panamericana de la Salud; 1986.

OTIENO-AYAYO, Z. N.; ZARITSKY, A.; WIRTH, M. C.; MANASHEROB, R.;

PINTO, L. M. N.; BERTIZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 38, p. 24-31, 2003.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 11-17, 2013.

PROMDONKOY, B.; PROMDONKOY, P.; PANYIM S. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *Escherichia coli* revealed high synergism against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larvae. **FEMS Microbiology Letters**. v. 252, p. 121-126, 2005.

RABINOVITCH, L.; VIVONI, A. M.; MACHADO, V.; KNAAK, N.; BERLITZ, D. L.; POLANCZYK, R. A.; FIUZA, L. M. *Bacillus thuringiensis* characterization: morphology, physiology, biochemistry, pathotype, cellular, and molecular aspects. **Springer**, v.1 p. 1-18, 2017.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5468, 1977.

sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673- 4680, 1996.

SOARES-DA-SILVA, J.; CONCEICAO, S. G.; AGUIAR, J. S.; VIANA, J. L.; VIEIRA NETA, M. R. A.; SILVA, M. C.; PINHEIRO, V. C. S.; POLANCZYK, R. A. ; CARVALHO-ZILSE, G. A. ; TADEI, W. P. Molecular characterization of the gene profile of *Bacillus thuringiensis* Berliner isolated from Brazilian ecosystems and showing pathogenic activity against mosquito larvae of medical importance. **Acta Tropica**, v. 16, p. 197-205, 2017.

SUN, Y.; ZHAO, Q.; ZHENG, D.; DING, X.; WANG, J.; HU, Q.; XIA, L. Construction and characterization of the interdomain chimeras using Cry11Aa and Cry11Ba from *Bacillus thuringiensis* and identification of a possible novel toxic chimera. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 105-111, 2014.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the **Toxins**, v. 6, p. 1222-1243, 2014.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 419-422, 2016.

VALTIERRA-DE-LUIS, D.; VILLANUEVA, M. LAI, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. Potential of Cry10Aa and Cyt2Ba, Two Minority δ -endotoxins Produced by *Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, for the Control of *Aedes aegypti* Larvae. **Toxins**, v. 12, p. 355, 2020.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 76-85, 2013.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 1-16, 2009.

VAREJÃO, J. B. M.; SANTOS, C. B. D.; REZENDE, H. R.; BEVILACQUA, L. C. E.; FALQUETO, A. Criadouros de *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38 p. 238-240, 2005.

VIEIRA-NETA, M. R. A.; SOARES-DA-SILVA, J.; VIANA, J. L.; SILVA, M. C.; TADEI, W. P.; PINHEIRO, V. C. S. Strain of *Bacillus thuringiensis* from Restinga, toxic to *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus)(Diptera, Culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, (AHEAD), 2020.

WU, Y.; GAO, M.; DAI, S.; YI, D.; FAN, H. Investigation of the *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* and the biological activities of *Bt* isolates from the soil of China. **Biological Control**, v.47, p. 335-339, 2008.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.