

Caracterização de genes Cry e Vip em isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Mineiro

*Characterization of cry and vip genes in Bacillus Thuringiensis strains
from the Minas Gerais Cerrado*

GUILHERME MATEUS DE ANDRADE

Discente de Agronomia (UNIPAM)
guilhermemateus@unipam.edu.br

WALTER VIEIRA DA CUNHA

Professor orientador (UNIPAM)
walter@unipam.edu.br

Resumo: A necessidade global de mitigar perdas de produtividade causadas por pragas, estimadas em até 40%, tem impulsionado um aumento de aproximadamente 100% no uso de pesticidas e, paralelamente, o fortalecimento do mercado de biopesticidas. Nesse cenário, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) e suas toxinas inseticidas, entre elas Cry1, Cry2 e Vip3. Considerando a pressão seletiva exercida sobre as populações de pragas e a busca por novas moléculas inseticidas em isolados adaptados a diferentes ambientes, este estudo teve como objetivo identificar os genes *cry1*, *cry2* e *vip3* em isolados de Bt provenientes do Cerrado Mineiro. A metodologia integrou o desenho de primers específicos, obtidos por análises *in silico* de regiões conservadas dos genes-alvo, a ensaios laboratoriais de PCR. O DNA genômico de 35 isolados morfológicos de Bt, obtidos a partir de amostras de solo submetidas a choque térmico, foi extraído, amplificado e analisado por eletroforese. Os resultados indicaram uma frequência de 48,60% para o gene *cry1* e ocorrência reduzida para *cry2* e *vip3*, detectados conjuntamente apenas no Isolado 44, que apresentou o perfil completo dos três genes. Essa baixa frequência, distinta do observado em outras regiões, sugere variabilidade geográfica entre isolados. A maior estabilidade das proteínas Cry, em relação às Vip, contribui para explicar a predominância de *cry1*. O Isolado 44, por conter *cry1*, *cry2* e *vip3*, apresenta potencial inseticida relevante contra Lepidópteros, destacando-se como candidato para futuras análises de expressão proteica e bioensaios, etapas essenciais para confirmar sua efetividade.

Palavras chave: controle biológico; biotecnologia; PCR.

Abstract: The global need to mitigate productivity losses caused by pests—estimated at up to 40%—has driven an approximately 100% increase in pesticide use and, in parallel, strengthened the biopesticide market. In this context, the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its insecticidal toxins, including Cry1, Cry2, and Vip3, have gained prominence. Considering the selective pressure exerted on pest populations and the ongoing search for new insecticidal molecules in isolates adapted to diverse environments, this study aimed to identify the *cry1*, *cry2*, and *vip3* genes in Bt isolates from the Cerrado region of Minas Gerais. The methodology combined the design of specific primers—obtained through *in silico* analyses of conserved regions of the target genes—with laboratory PCR assays. Genomic DNA from 35 morphological Bt isolates, obtained

from soil samples subjected to heat shock, was extracted, amplified, and analyzed via electrophoresis. The results indicated a frequency of 48.60% for the *cry1* gene and reduced occurrence of *cry2* and *vip3*, which were detected together only in Isolate 44, the sole isolate exhibiting the complete profile of all three genes. This low frequency, distinct from patterns observed in other regions, suggests geographic variability among isolates. The greater stability of Cry proteins, compared with Vip proteins, helps explain the predominance of *cry1*. Isolate 44, which contains *cry1*, *cry2*, and *vip3*, presents relevant insecticidal potential against Lepidoptera and emerges as a promising candidate for future protein expression analyses and bioassays—essential steps to confirm its effectiveness.

Keywords: biological control; biotechnology; PCR.

1 INTRODUÇÃO

A produção global de alimentos enfrenta, de forma contínua, perdas expressivas de produtividade decorrentes da ação de pragas e doenças. De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), tais perdas podem atingir até 40%, o que historicamente estimulou a intensificação do uso de pesticidas, resultando em um aumento estimado de 100% no período de 1990 a 2022 (FAO, 2024). Paralelamente, observa-se uma expansão significativa do mercado de biopesticidas, cujo valor foi estimado em US\$ 8 bilhões em 2023, com projeções que indicam a possibilidade de alcançar US\$ 22 bilhões até 2033 (Mawcha *et al.*, 2025). Esse crescimento é particularmente notável no Brasil, onde mais de 50% dos produtores adotam soluções biológicas, índice superior ao observado em países como os Estados Unidos (Fapesp, 2024).

Nesse contexto, entre os biopesticidas de maior utilização global, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que compreende tanto diversos eventos transgênicos quanto formulações comerciais amplamente empregadas (AGROFIT, 2025; ISAAA, 2025). Presente em diferentes ecossistemas ao redor do mundo, Bt é reconhecida por sua capacidade de produzir proteínas com atividades inseticida, fungicida e nematocida, entre outras. Sua eficácia está associada, em grande medida, à diversidade de toxinas que sintetiza, destacando-se, entre as mais utilizadas, as proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 (Santos *et al.*, 2022; Parra, 2023).

Os genes que codificam tais toxinas apresentam ampla distribuição no território brasileiro (Berçot *et al.*, 2023). Ademais, cepas isoladas em regiões específicas podem demonstrar maior efetividade frente a populações locais de insetos-praga, além de maior adaptação às condições ambientais regionais (Vilas-Bôas; Lemos, 2004). A utilização e a pesquisa de variantes desses genes são consideradas estratégicas, uma vez que se trata de grupos proteicos amplamente caracterizados, com perfis de segurança consolidados e histórico de uso em diversos países. Tais características favorecem a inserção de novas proteínas derivadas desses grupos no mercado (Gupta; Kumar; Kaur, 2021; Palma *et al.*, 2014).

Por essa razão, a identificação e a caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* (Bt), com perfis de toxicidade distintos e possíveis variações de moléculas já empregadas, constituem etapas essenciais para a sustentabilidade do controle biológico e de eventos transgênicos. A pressão seletiva exercida sobre as populações de

pragas reforça a necessidade de prospecção contínua por novas moléculas inseticidas. Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo identificar genes associados à produção de moléculas inseticidas em isolados de *Bacillus thuringiensis* provenientes do cerrado mineiro, com ênfase nos genes *cry1*, *cry2* e *vip3*.

2 METODOLOGIA

Os experimentos foram conduzidos no Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), no Laboratório de Genética e Biotecnologia (GENEB), abrangendo análises *in silico* e ensaios laboratoriais.

Para o desenho dos *primers* específicos, foram utilizadas ferramentas disponíveis na plataforma do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os genes completos referentes às proteínas de interesse possuem entradas catalogadas no banco de dados GenBank, conforme apresentado no Quadro 1. As sequências foram submetidas ao software MEGA, versão 12.0.11 (Kumar *et al.*, 2024), aplicando-se o algoritmo ClustalW, em suas configurações padrão, para o alinhamento múltiplo de cada conjunto gênico. Esse procedimento permitiu a avaliação estatística da proximidade entre as sequências e a identificação de regiões conservadas. Adicionalmente, utilizou-se a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), nas configurações padrão da plataforma, para verificar a similaridade dos alvos e, desse modo, subsidiar o desenho de *primers* específicos para as regiões selecionadas.

Quadro 1: Códigos de acesso para sequências alvo Cry e Vip utilizados para caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do Cerrado Mineiro. Patos de Minas (MG), 2025

Gene	Código de Acesso NCBI
<i>Cry1</i>	JN794058.1; AF081790.1; AF081248.1; AF288683.1.
<i>Cry2</i>	AF200816.1; EF094885.1; GQ866915.1; DQ361266.1.
<i>Vip3</i>	JN990981.1; KU522245.1; FJ494817.1; MH363732.1.

As porções conservadas foram submetidas à ferramenta “Primer-BLAST”, a qual gerou sequências de *primers* para amplificação gênica com base nos seguintes critérios: tamanho entre 18 e 30 nucleotídeos, evitando-se sequências excessivamente curtas, que podem apresentar baixa especificidade ao sítio-alvo, e sequências muito longas, suscetíveis à formação de estruturas secundárias e à redução da eficiência de anelamento; temperatura de *melting* entre 55 °C e 65 °C, faixa na qual aproximadamente metade da sequência alvo se encontra dissociada, favorecendo o anelamento dos *primers*; conteúdo de GC entre 40% e 60%, considerando que pares GC estabelecem três ligações de hidrogênio, em contraste com as duas ligações dos pares AT, conferindo maior estabilidade ao *primer*; e seleção de amplicons curtos, que tendem a apresentar maior eficiência de amplificação e menor suscetibilidade à degradação (Bustin *et al.*, 2020).

As bactérias foram previamente isoladas de diferentes localidades da região do Cerrado Mineiro utilizando-se a metodologia preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o isolamento de bactérias do gênero *Bacillus* com potencial atividade inseticida (WHO, 1985). Foi coletado 1 g de solo, homogeneizado em 5 mL de solução

salina (0,8 g/L de NaCl) e submetido à agitação a 120 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos e incubadas em banho-maria a 80 °C por 12 minutos, seguidos de resfriamento em gelo por 5 minutos. Esse choque térmico teve como finalidade eliminar células vegetativas, preservando apenas estruturas de resistência, como os esporos característicos do gênero *Bacillus*.

Após o tratamento térmico, uma alíquota de 100 µL de cada amostra foi distribuída em placas de Petri contendo meio Ágar-Nutriente (1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de cloreto de sódio e 15 g/L de ágar). As placas foram incubadas em estufa BOD a 30 °C por 24 horas, permitindo o desenvolvimento de colônias representativas dos isolados, que passaram a compor a coleção do Laboratório GENEB. Uma alíquota de cada colônia foi transferida para microtubos contendo água destilada autoclavada e armazenada em freezer a -20 °C.

Dentre a coleção de *Bacillus spp.*, 100 isolados foram inoculados em meio sólido Luria-Bertani (10 g/L de caseína, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de cloreto de sódio e 15 g/L de ágar) e incubados a 30 °C por 24 horas para a formação de colônias. Após esse período, as colônias resultantes foram diferenciadas com base em características morfológicas, como coloração e formato. A identificação de *Bacillus thuringiensis* foi realizada considerando-se a formação de colônias com bordas irregulares, centro elevado e coloração branca (Rampersad; Ammons, 2005; Gillis; Mahillon, 2014; Mukhija; Khanna, 2018). Os isolados identificados foram conservados em microtubos contendo água esterilizada e armazenados em freezer a -20 °C.

O DNA genômico foi isolado e purificado conforme Valicente e Silva (2014), com modificações. As bactérias foram cultivadas por 48 horas em 15 mL de meio sólido LB a 25 °C. Após esse período, coletou-se uma porção correspondente a aproximadamente 1 cm² da colônia, a qual foi homogeneizada em 1,5 mL de água duplamente deionizada (H₂O_{dd}) e centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C, permitindo a separação do sobrenadante e do sedimento celular. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi lavado com H₂O_{dd} e ressuspenso em 700 µL de tampão glicose/Tris/EDTA (50 mM de glicose, 25 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA, pH 8, contendo 5% de Triton X-100).

Em seguida, adicionaram-se ao microtubo 15 µL de SDS a 20% (p/v) e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL), incubando-se a 65 °C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 1000 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e a mistura foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. Da fase aquosa superior, retiraram-se 300 µL, transferindo-os para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 300 µL de acetato de potássio 3 M (pH 5,2) e 600 µL de 2-propanol. A amostra foi centrifugada novamente a 12.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante descartado cuidadosamente.

O sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) gelado, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O etanol foi descartado e o sedimento seco à temperatura ambiente. Por fim, o material foi ressuspenso em H₂O_{dd} e armazenado em freezer -20°C.

A amplificação do material genético foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando 13 µL de PCR ReadyMix (Thermo Fisher), 1 µL de *primer forward*, 1 µL de *primer reverse* e 5 µL de amostra, totalizando 20 µL por reação. As condições de amplificação consistiram em desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 57 °C por 45 segundos e 74 °C

por 1 minuto, finalizando com extensão a 74 °C por 10 minutos. Esse protocolo resultou na obtenção de fragmentos amplificados correspondentes aos alvos esperados.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo solução de brometo de etídio a 5×10^{-5} mL/mL, sob condições de 120 V, 250 mA e 90 W, durante 120 minutos. Decorrido o tempo, os fragmentos foram visualizados em transiluminador sob luz UV.

O material amplificado dos isolados de *Bacillus* spp. foi comparado aos controles positivo e negativo provenientes de cepas comerciais listadas na Tabela 1, cujas proteínas Cry e Vip encontram-se descritas no banco de dados UniProt (UNIPROT, 2025).

Tabela 1: Relação de cepas e proteínas de *Bacillus* spp. utilizadas no experimento “Caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do cerrado mineiro”. Patos de Minas (MG), 2025

Cepa	Proteínas
<i>B. thuringiensis</i> Kurstaki HD-1	Cry1, Cry2, Vip3
<i>B. subtilis</i> QST 713	-

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das entradas de *cry1*, *cry2* e *vip3* no software MEGA, utilizando a metodologia de alinhamento múltiplo ClustalW, evidenciou regiões de similaridade entre as sequências nucleotídicas correspondentes aos intervalos 1821–3278, 1–1902 e 1–2394, respectivamente. As sequências depositadas no GenBank (Quadro 1) foram, então, submetidas à ferramenta Primer-BLAST para o desenho de *primers* dentro dessas regiões conservadas previamente identificadas. Após esse processo, foram gerados e selecionados pares de primers para cada gene, obedecendo aos critérios de qualidade estabelecidos anteriormente, resultando na Tabela 2. Os *primers* selecionados foram sintetizados e enviados ao laboratório pela empresa Invitrogen.

Tabela 2: *Primers* específicos desenhados na plataforma PRIMER-BLAST para os genes *cry* e *vip*. “Caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do cerrado mineiro”. Patos de Minas (MG), 2025

Primer	Sequência	Tm	Fragmento (pb)
<i>cry1</i> F	AATGTGCCAGGTACGGGTTC	57.8	141 pb
<i>cry1</i> R	GGCACACTTTTCTCCATCCC	56.3	
<i>cry2</i> F	ACGCTGTTCCTTTATCAATAACTTC	56.5	133 pb
<i>cry2</i> R	TGTAAATTGGCTGCCTGTGC	56.5	
<i>vip3</i> F	ATTGATCGTCCCGCCAAGTG	58.1	132 pb
<i>vip3</i> R	GTTCCATTCCTCCGCCTGT	57.7	

*As siglas Tm e pb são referentes à Temperatura de *melting* e pares de bases.

Dentre os 100 isolados bacterianos de *Bacillus* spp. cultivados em meio LB, foram identificados como potenciais *Bacillus thuringiensis*, com base no perfil morfológico típico da espécie, os seguintes isolados: 01, 02, 04, 05, 06, 07, 08, 11, 14, 15, 20, 33, 35, 36, 39, 44, 47, 52, 53, 57, 61, 62, 64, 65, 67, 72, 74, 81, 86, 87, 88, 89, 90, 95, 100.

Considerando que *B. thuringiensis* integra o grupo *Bacillus cereus* sensu lato, o qual abrange outras nove espécies com morfologia semelhante, a identificação definitiva requer análises genéticas e fenotípicas adicionais. Entre os métodos recomendados destacam-se a detecção do cristal parasporal (Bavykin *et al.*, 2004) e identificação por marcadores genéticos (Fichant *et al.*, 2022).

Os isolados selecionados tiveram seu DNA genômico extraído e submetido à amplificação das regiões correspondentes aos genes *cry1*, *cry2* e *vip3* por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se primers específicos (Tabela 2). Em seguida, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel, possibilitando sua visualização. As Figuras 1 a 3 apresentam os padrões de bandas de acordo com os pesos moleculares esperados, confirmando a presença ou ausência dos genes investigados, conforme sintetizado na Tabela 3.

Tabela 3: Relação da presença de genes *cry* e *vip* em cepas e isolados de *Bacillus* spp com base em perfis eletroforéticos. “Caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do cerrado mineiro”. Patos de Minas (MG), 2025

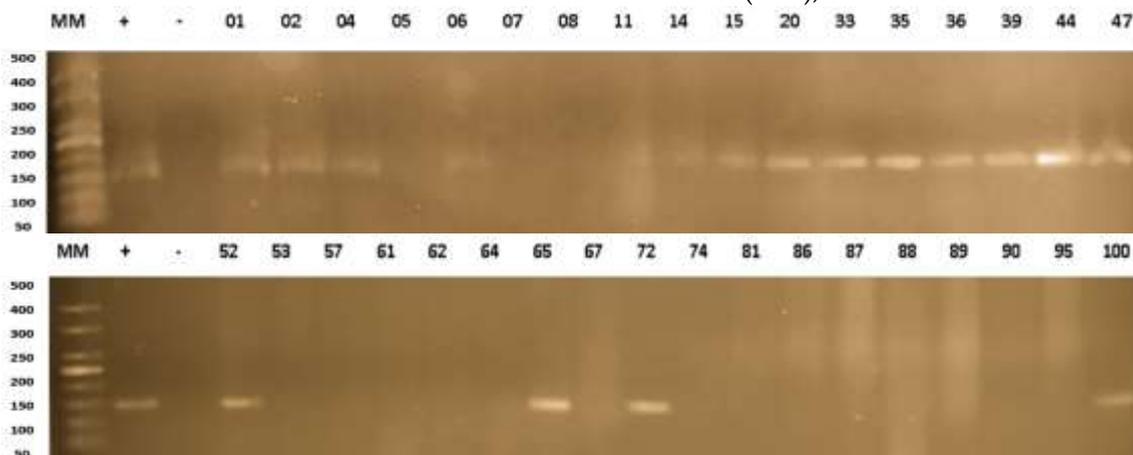
Cepa / Isolado	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>vip3</i>	Cepa / Isolado	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>vip3</i>
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	+	52	+		
<i>Kurstaki</i> HD-1							
<i>B. subtilis</i> QST				53			
713							
01	+			57			
02	+			61			
04	+			62			
05				64			
06	+			65	+		
07				67			
08				72	+		
11				74			
14	+			81			
15	+			86			
20	+			87			
33	+			88			
35	+			89			
36	+			90			
39	+			95			
44	+	+	+	100	+		
47	+						

*O símbolo “+” indica a presença dos genes em questão, enquanto a ausência de símbolo a falta dos mesmos.

A Figura 1 apresenta o padrão obtido para o par de primers específicos de *cry1*, no qual se observa a presença de bandas em 17 isolados. Céron *et al.* (1995) identificaram o gene *cry1A* em aproximadamente 48% dos isolados avaliados em seu estudo, proporção semelhante à verificada no presente trabalho, no qual 17 dos 35 isolados apresentaram amplificação para *cry1*, correspondendo a 48,6% da população analisada. Resultados compatíveis também foram reportados por Nogueira e Ibarra (2010), que registraram maior frequência de genes *cry1* em populações de *B. thuringiensis*. De modo semelhante, Guidelli-Thuller *et al.* (2008), ao analisarem 1073 isolados, identificaram que 55,7% continham o gene *cry1*.

Devido ao fato de o gene *cry1* apresentar variações polimórficas mesmo em regiões consideradas conservadas, diversos estudos voltados à identificação da família de proteínas Cry1 recorrem ao uso de primers degenerados ou conjuntos de primers específicos (Bravo *et al.*, 1998; Guidelli-Thuller *et al.*, 2008; Lone *et al.*, 2017). Juárez-Pérez *et al.* (1997) destacam que determinadas sequências do gene *cry1* podem não ser detectadas por primers altamente específicos, o que torna necessária a adoção de técnicas moleculares mais sensíveis e robustas, tais como PCR com primers degenerados, PCR multiplex, PCR-RFLP, qPCR, ddPCR, TAIL-PCR e *Southern blotting* (Queiroz *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2020; Nogueira; Ibarra, 2010).

Figura 1: Eletroforese em gel utilizando marcador molecular de 50 pb analisando o gene *cry1*. “Caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do cerrado mineiro”. Patos de Minas (MG), 2025



* MM: marcador de peso molecular 50pb; “+”: controle positivo, *B. thuringiensis* Kurstaki HD-1; “-”: controle negativo: *B. subtilis* QST 713.

Observando o perfil eletroforético dos isolados para o par de primers específicos *cry2*, pode-se observar a presença de banda apenas para o isolado 44, contrastando a frequência do gene *cry2* em populações como a mencionada por Thammasittirong e Attathom (2008) em seu trabalho que identificou a presença de 80,60% do gene em uma população de *B. thuringiensis* na Tailândia.

Figura 2: Eletroforese em gel utilizando marcador molecular de 50 pb analisando o gene *cry2*. “Caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do cerrado mineiro”. Patos de Minas (MG), 2025

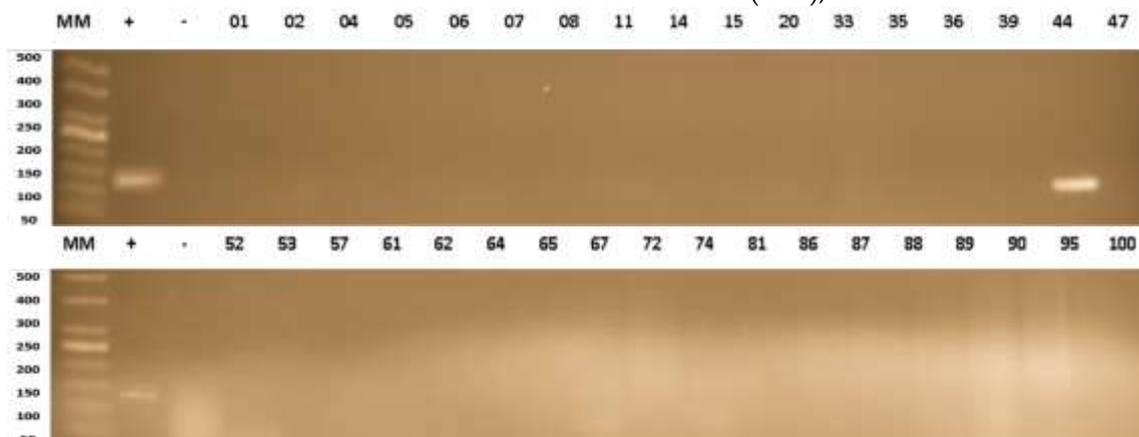


* MM: marcador de peso molecular 50pb; “+”: controle positivo, *B. thuringiensis* Kurstaki HD-1; “-”: controle negativo: *B. subtilis* QST 713.

A ocorrência simultânea dos genes *cry1* e *cry2* é uma tendência em diversas populações de *Bacillus thuringiensis* (Ben-Dov *et al.*, 1997; Hernández-Rodríguez; Ferre, 2009). De forma semelhante, isolados que demonstram a presença de genes *vip3*, também demonstram a presença de genes *cry1* e *cry2* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009), fato observado neste estudo com o isolado 44.

O indicativo para que proteínas Cry sejam mais presentes nas populações de Bt, se demonstra pelo fato de se apresentarem em formas estáveis sobre inclusões cristalinas, provendo resistência a longo tempo e condições adversas. O cristal protege a proteína de degradação até que seja consumida pelo inseto praga alvo. Contudo, a produção desta proteína é reservada apenas para a fase de esporulação, assim não podendo atuar sobre alvos presentes durante a fase vegetativa (Chen *et al.*, 2022).

Figura 3: Eletroforese em gel utilizando marcador molecular de 50 pb analisando o gene *vip3*. “Caracterização de genes *cry* e *vip* em isolados de *Bacillus thuringiensis* do cerrado mineiro”. Patos de Minas (MG), 2025



* MM: marcador de peso molecular 50pb; “+”: controle positivo, *B. thuringiensis* Kurstaki HD-1; “-”: controle negativo: *B. subtilis* QST 713.

O gene *vip3* tem ocorrência menos documentada dentro das populações de Bt, com alta variabilidade nos trabalhos analisados, variando de 7% no estudo de Zahner e colaboradores (2005) até 90% no trabalho de Sauka e Benintende (2017). Dentro da população avaliada neste trabalho apenas um isolado (isolado 44) apresentou banda referente ao gene *vip3* (Figura 9), desta forma compondo aproximadamente 3% da população amostral. A não presença de genes *vip3* em determinadas populações pode estar relacionado ao fato de a molécula ser produzida durante a multiplicação bacteriana e secretada no meio, porém, possui instabilidade devido à degradação por radiação UV, calor e proteases, tornando assim menos vantajoso que as moléculas Cry no âmbito evolutivo (Sahin *et al.*, 2018).

Amostrados em diversas localidades da Argentina, uma população de 268 isolados foram avaliados quanto a presença de genes *cry1*, *cry2* e *vip3*, estes apresentaram porcentagens de 92,50%, 92,50% e 91,30%, respectivamente (Sauka; Benintende, 2017). Comparando ao trabalho de Berçot *et al.* (2023), cuja população de 257 isolados foram selecionados em diversas localidades do Brasil, foi demonstrado a presença de genes *cry1*, *cry2* e *vip3* na proporção de 93,33%, 73,33% e 80,00%, respectivamente, para a região sul-sudeste do Brasil. Demonstrando assim uma tendência da presença destes genes nas populações de localidades cujo clima se apresenta como tropical, subtropical e temperaturas amenas.

Em contrapartida, levando em conta que os resultados obtidos nesse estudo são relativos ao cerrado mineiro, o trabalho de Berçot na porção sul-sudeste não consegue compreender significativamente o bioma da área de estudo, visto que o cerrado mineiro compreende apenas 22% da área referente e, assim possibilitando a não assertividade da comparação. Desta forma, avaliando isolados do Centro Oeste, região a qual o bioma cerrado compreende a 43% em área, apresentaram redução da presença destes genes (69,57% *cry1*, 65,22% *cry2* e 60,87% *vip3*) (IBGE, 2025; Berçot *et al.*, 2023). Análises realizadas em isolados obtidos no cerrado maranhense, não apresentaram genes *cry1Ab* e *cry2*, porém apresentaram alta frequência na presença de outros genes *cry* e, além disso, alto potencial inseticida em bioensaios com larvas de *Aedes aegypti* (Soares-da-Silva *et al.*, 2017). Estudo por Fané e colaboradores (2017) analisaram 52 isolados no Mali e identificaram apenas 21% dos isolados demonstrando presença de genes *cry1* e *cry2*. Assim vale destacar a variabilidade existente destes genes em diferentes porções geográficas e dentro de populações amostrais.

Tanto os genes *cry* quanto os genes *vip* são transmitidos horizontalmente nas populações de *Bacillus thuringiensis* através de mecanismos como a conjugação, ou seja, transferência de plasmídeos. A presença de gene *vip3*, para que seja transcrito em proteína, necessita da presença de outro gene regulador *vipR*, sequência também encontrada em antes de genes *cry1* e *cry2*, indicando que cepas com a presença de ambos, tem mais possibilidade de produzir proteínas Vip3 (Chen *et al.*, 2022).

Análises genéticas frequentemente demonstram a presença de diversos genes *cry* e *vip*, entretanto estudos proteômicos demonstram que apenas alguns desses genes são de fato expressos como proteínas e alguns em níveis muito baixos (Gomis-Cebolla *et al.*, 2018). Isso se deve ao fato de que a regulação gênica é realizada em múltiplos níveis (transcricional, pós-transcricional e pós traducional) e podem ser influenciados pela fase

de crescimento, proteínas regulatórias, condições ambientais e por isolado (Chen *et al.*, 2022; Sahin *et al.*, 2018; Deng *et al.*, 2014).

A presença de genes *cry1*, *cry2* e *vip3* demonstra a potencial toxicidade a insetos da ordem Lepidóptera (Carvalho *et al.*, 2020; Chakroun *et al.*, 2016). Nesse contexto, o isolado 44 necessita de avaliações adicionais referentes à expressão e funcionalidade dessas proteínas, a fim de determinar sua viabilidade para utilização em bioensaios.

4 CONCLUSÃO

A seleção de isolados com base na morfologia e perfil genético apresentada neste trabalho selecionou o isolado 44 com a presença de genes *cry1*, *cry2* e *vip3*. Contudo, as técnicas utilizadas podem subestimar a detecção de outros isolados capazes de produzir esses genes, bem como de variantes adicionais com propriedades inseticidas.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Consulta Aberta**. 2025. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br>.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00060-15>.

BAVYKIN, S. G.; LYSOV, Y. P.; ZAKHARIEV, V.; KELLY, J. J.; JACKMAN, J.; STAHL, D. A.; CHERNI, A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* Gene Sequence Analysis To Determine Phylogenetic Relationships of *Bacillus cereus* Group Microorganisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3711-3730, ago. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.42.8.3711-3730.2004>.

BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E. Extended Screening by PCR for Seven *cry*-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4883-4890, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.63.12.4883-4890.1997>.

BERÇOT, M. R.; QUEIROZ, P. R. M.; GRYNBERG, P.; TOGAWA, R.; MARTINS, E. S.; ROCHA, G. T.; MONNERAT, R. G. Distribution and Genetic Diversity of Genes from Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strains Toxic to Agricultural Insect Pests Revealed by Real-Time PCR. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 4, p. 2515-2526, 1 jul. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-023-02255-1>.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑES-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERA, R. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.64.12.4965-4972.1998>.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R.; NOLAN, T. Parameters for Successful PCR Primer Design. **Methods In Molecular Biology**, p. 5-22, 2 out. 2019. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2.

CARVALHO, K. S.; BARBOSA, T. A. N.; LANA, U. G. P.; VALICENTE, F. H. Selection and Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strain Efficient Against Soybean Looper (*Chrysodeixis includens*) and *Spodoptera* Species. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 64, n. 4, p. 1, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9665-rbent-2020-0080>.

CÉRON, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECAL, L.; RAVO, A. Specific PCR Primers Directed to Identify *cryI* and *cryIII* Genes Within a *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 3826-3831, 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.61.11.3826-3831.1995>.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.80, n. 2, p. 329-350.

CHEN, H.; VERPLAETSE, E.; SLAMTI, L.; LERECLUS, D. Expression of the *Bacillus thuringiensis vip3A* Insecticidal Toxin Gene Is Activated at the Onset of Stationary Phase by VipR, an Autoregulated Transcriptional Factor. **Microbiology Spectrum**, v. 10, i. 4, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01205-22>.

DENG, C.; PENG, Q.; SONG, F.; LERECLUS, D. Regulation of *cry* Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, v. 6, p. 2194-2209, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6072194>.

FANÉ, R.; KASSOGUÉ, A.; TRAORÉ, D.; DAO, S.; MAIGA, K.; BAH, A.; VALICENTE, F.H.; BABANA, A.H. Molecular Characterization and Insecticidal Activities of Malian Native Crystalliferous *Bacillus thuringiensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 17, p. 983-988, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5897/ajb2017.15908>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Pest and Pesticide Management**. 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/pest-and-pesticide-management/about/understanding-the-context/en/>.

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. **Registration of Biological Pest Control Products Exceeds that of Agrochemicals in Brazil.** Disponível em: <https://fapesp.br/week/registration-of-biological-pest-control-products-exceeds-that-of-agrochemicals-in-brazil>.

FICHANT, A.; FELTEN, A.; GALLET, A.; FIRMESSE, O.; BONIS, M. Identification of Genetic Markers for the Detection of *Bacillus thuringiensis* Strains of Interest for Food Safety. **Foods**, v. 11, p. 1-15, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/foods11233924>.

GILLIS, A.; MAHILLON, J. Influence of Lysogeny of Tectiviruses GIL01 and GIL16 on *Bacillus thuringiensis* Growth, Biofilm Formation, and Swarming Motility. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7620-7630, 15 dez. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01869-14>.

GOMIS-CEBOLLA, J.; RICHIETTO, A.; FERRÉ, J. A Genomic and Proteomic Approach to Identify and Quantify the Expressed *Bacillus thuringiensis* Proteins in the Supernatant and Parasporal Crystal. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 193, 10 maio 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10050193>.

GUIDELLI-THULER, A.M.; SENA, J.A.D.; ABREU, I.L.; DAVOLOS, C.C.; ALVES, S.B.; POLANCZYK, R.A.; VALICENTE, F.H.; LEMOS, M.V.F. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 4, p. 405-414, out. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657v75p4052008>.

GUPTA, M.; KUMAR, H.; KAUR, S. Vegetative Insecticidal Protein (Vip): a potential contender from *Bacillus thuringiensis* for efficient management of various detrimental agricultural pests. **Frontiers In Microbiology**, v. 12, 13 maio 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.659736>.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and Identification of *vip* Genes in *Bacillus thuringiensis* Strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p. 219-225, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04199.x>.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; FERRÉ, J. Ecological Distribution and Characterization of Four Collections of *Bacillus thuringiensis* Strains. **Journal of Basic Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 152-157, abr. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.200800121>.

ISAAA – International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. 2025. Disponível em: <https://www.isaaa.org/default.asp>.

IBGE. **Biomass e sistema costeiro-marinho do Brasil.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/biomass/#/home>.

JUÁREZ-PÉREZ, V.M.; FERRANDIS, M.D.; FRUTOS, R. PCR-ased Approach for Detection of Novel *Bacillus thuringiensis cry* Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 2997-3002, 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.63.8.2997-3002.1997>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; SULESKI, M.; SANDERFORD, M.; SHARMA, S.; TAMURA, K. MEGA12: molecular evolutionary genetic analysis version 12 for adaptive and green computing. **Molecular Biology And Evolution**, v. 41, n. 12, dez. 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msae263>.

LONE, S. A.; MALIK, A.; PADARIA, J. C. Characterizarion of Lepidopteran-Specific *cry1* and *cry2* Gene Harbouring Natitve *Bacillus thuringiensis* Isolates Toxic Against *Helicoverpa armigera*. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 27-32, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2017.05.001>.

MAWCHA, K. T.; MALINGA, L.; MUIR, D.; GE, J.; NDOLO, D. Recent Advances in Biopesticide Research and Development with a Focus on Microbials. **F1000Research**, v. 13, p. 1071, 11 mar. 2025. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.154392.5>.

MUKHIJA, B.; KHANNA, V. Isolation, Characterization and Crystal Morphology Study of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Soil of Punjab. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 189-193, 30 mar. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.22207/jpam.12.1.24>.

NOGUEIRA, P. A.; IBARRA, J. E. Detection of New *cry* Genes of *Bacillus thuringiensis* by Use of a Novel PCR Primer System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6150-6155, 15 set. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00797-10>.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v.6, p.3296-3325, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6123296>.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: state of art and perspectives. **Scientia Agricola**, v. 80, 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992x-2023-0080>.

QUEIROZ, P.R.; POSSO, M.C.; MARTINS, E.S.; GLYNBERG, P.; TOGAWA, R.; MONNERAT, R.S. Identification of *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* by Multiplex Real-Time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 205, p. 106665, fev. 2023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106665>.

RAMPERSAD, J.; AMMONS, D. A. *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel strain, low selection and high throughput produced atypical results. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 1, 24 set. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-5-52>.

SAHIN, B.; GOMIS-CEBOLLA, J.; GUNES, J.; FERRÉ, J. Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolates by Their Insecticidal Activity and Their Production of Cry and Vip3 Proteins. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. e0206813, 1 nov. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0206813>.

SANTOS, E. N.; MENEZES, L. P.; DOLABELLA, S. S.; SANTINI, A.; SEVERINO, P.; CAPASSO, R.; ZIELINSKA, A.; SOUTO, E. B.; JAIN, S. *Bacillus thuringiensis*: from biopesticides to anticancer agents. **Biochimie**, v. 192, p. 83-90, jan. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2021.10.003>.

SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. Diversity and Distribution of Lepidopteran-Specific Toxin Genes in *Bacillus thuringiensis* Strains from Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 49, n. 3, p. 273-281. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.02.003>.

SOARES-DA-SILVA, J.; QUEIRÓS, S.G.; AGUIAR, J.S.; VIANA, J.L.; NETA, M.R.A.V.; 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. 176, p. 197-205, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.08.006>.

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. PCR-Based Method for the Detection of *cry* genes in Local Isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.98, p. 121-126, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.001>.

UNIPROT. Universal Protein Resource – Protein Knowledgebase. Disponível em: <https://www.uniprot.org/>.

VALICENTE, F. H.; SILVA, R. B. fAFLP analysis of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates. **Springerplus**, v. 3, n. 1, 20 maio 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-3-256>.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of crygenes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 605-613, 1 ago. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1139/w04-052>.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Informal Consultation on the Development of *Bacillus sphaericus* as a Microbial Larvicide. Geneva, UNDP/ World Bank/ **Who Special Programme for Research and Training in tropical Diseases**. 1985.

ZAHNER, V.; CABRAL, D. A.; RÉGUA-MANGIA, A. H.; RABINOVITCH, L.; MOREAU, G.; McINTOSH, D. Distribution of Genes Encoding Putative Virulence Factors and Fragment Length Polymorphisms in the *vrrA* Gene among Brazilian Isolates of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8107-8114, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.12.8107-8114.2005>.