

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE DE *Bacillus thuringiensis* E SEUS GENES
cry E *vip* EM AMOSTRAS METAGENÔMICAS DE DNA
EXTRAÍDO DE SOLO COM CULTIVO DE CANA-DE-
AÇÚCAR E SOLO DE FLORESTA NATIVA EM ESTAÇÕES
CLIMÁTICAS DIFERENTES**

**Natalia dos Santos Pinto
Tecnóloga em Biocombustíveis**

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIVERSIDADE DE *Bacillus thuringiensis* E SEUS GENES
cry E *vip* EM AMOSTRAS METAGENÔMICAS DE DNA
EXTRAÍDO DE SOLO COM CULTIVO DE CANA-DE-
AÇÚCAR E SOLO DE FLORESTA NATIVA EM ESTAÇÕES
CLIMÁTICAS DIFERENTES**

Natalia dos Santos Pinto

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2014

P659d Pinto, Natalia dos Santos
Diversidade de *Bacillus thuringiensis* e seus genes *cry* e *vip* em amostras metagenômicas de DNA extraído de solo com cultivo de cana-de-açúcar e solo de floresta nativa em estações climáticas diferentes / Natalia dos Santos Pinto. – – Jaboticabal, 2014
xi, 49 p. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos
Coorientador: Alessandro de Mello Varani
Banca examinadora: Luciano Takeshi Kishi, Lúcia Maria Carareto Alves
Bibliografia

1. Bactéria de solo. 2. Diversidade microbiana. 3. Bioinformática. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Natalia dos Santos Pinto, nascida no município de Matão, estado de São Paulo, em 29 de abril de 1991. Ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis em 2009 na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal - FATEC onde obteve o título de Tecnóloga em Biocombustíveis em 2011. Em março de 2012 iniciou o mestrado em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP- FCAV).

"Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é amor."

Santo Agostinho

Dedico

Ao Mestre dos mestres: **Deus**;

À minha **família**, pelo incentivo e amor incondicional;

Ao meu **namorado**, por todo apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu amparo e refúgio nos momentos mais difíceis, minha fortaleza para superar todas as dificuldades, a luz a me guiar quando não consigo enxergar o caminho, a providência certa a suprir todas as minhas necessidades;

Aos meus pais, Valditudes e Ana Maria, por me ensinarem a ter fé em Deus e na vida, por acreditarem em minhas capacidades, e pelas vezes que renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu;

Às minhas irmãs, Alessandra e Noely, por me impulsionarem a superar meus limites, pelo carinho, paciência e incentivo constantes;

Ao meu namorado, André, por ser meu porto seguro, instrumento de Deus em minha vida;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, por toda confiança depositada, demonstrando sempre apoio incondicional e compreensão constante, e por ser esse exemplo de profissional que sabe ser além de professor, um grande AMIGO;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani, pelo incentivo em todos os momentos e por transmitir a cada palavra a certeza que este projeto seria possível;

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, por acreditar neste trabalho e por ceder o laboratório para que essa pesquisa fosse desenvolvida;

À Dra. Juliana Regina Rossi, por toda a atenção dispensada, pelo estímulo, compreensão e disposição em esclarecer minhas dúvidas;

Aos amigos, colegas, estudantes e funcionários do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), em especial, Wellington, Milena, André, Elisângela, João, Daniele, Thaís, Bianca, Gabriela, Elwi, Rô e Érica; e do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), em especial, Li e Camila. Deus os colocou em minha vida para deixar a caminhada mais agradável, os fardos mais leves, as manhãs menos solitárias, as tardes mais engraçadas, o difícil menos complicado, e principalmente, para transformar sonhos em realidade;

E a todos os colegas e professores da pós-graduação pelo convívio e aprendizado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	X
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>: CARACTERÍSTICAS GERAIS	3
2.2 ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS DE <i>B. thuringiensis</i>	5
2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS PROTEÍNAS DE <i>B. thuringiensis</i>	5
2.4 MECANISMO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS INSETICIDAS	6
2.5 LINHAGENS DE <i>B. thuringiensis</i>	7
2.6 BIOINSETICIDAS E TRANSGÊNICOS À BASE DE <i>BT</i> EM SUBSTITUIÇÃO AOS INSETICIDAS QUÍMICOS.....	8
2.7 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO	10
2.8 NOVAS TECNOLOGIAS PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE DE GENES	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS	14
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA METAGENÔMICO	15
3.3 SEQUENCIAMENTO DO DNA METAGENÔMICO	16
3.4 ANÁLISE “IN SÍLICO”	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÕES	30
6 REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE	40

DIVERSIDADE DE *Bacillus thuringiensis* E SEUS GENES *cry* E *vip* EM AMOSTRAS METAGENÔMICAS DE DNA EXTRAÍDO DE SOLO COM CULTIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SOLO DE FLORESTA NATIVA EM ESTAÇÕES CLIMÁTICAS DIFERENTES.

RESUMO - O entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* têm se destacado no controle biológico de insetos-praga como alternativa viável em substituição aos inseticidas químicos. A bactéria é caracterizada pela produção de cristais protéicos em concomitância com o processo de esporulação. Esses cristais são formados por polipeptídeos que apresentam propriedade entomopatogênica frente a diversas ordens de insetos, porém são inócuos ao meio ambiente. Dessa forma, o conhecimento da diversidade de genes de *B. thuringiensis* presente no solo é de extrema importância para compreender sua distribuição ecológica e seus efeitos em habitats diferentes. Em paralelo, o uso de técnicas de análise envolvendo metagenômica são propostas para estudar comunidades microbianas presentes no meio ambiente, permitindo inclusive o acesso a microrganismos incultiváveis. A partir desta proposta o presente trabalho analisou a diversidade de genes codificadores das proteínas entomopatogênicas de *B. thuringiensis* em seqüências metagenômicas de DNA extraído de solo com cultivo de cana-de-açúcar e solo de floresta nativa em estações climáticas distintas. Foi possível identificar linhagens que possivelmente deram origem ao material genético via plataforma MG-RAST e os genes codificadores das proteínas entomopatogênicas foram identificados utilizando o software BLAST. Os resultados evidenciam uma provável influência das estações climáticas sobre a diversidade dos genes obtidos por este tipo de análise.

Palavras-chave: bactéria de solo, bioinformática, diversidade microbiana, entomopatogênicos

DIVERSITY OF *Bacillus thuringiensis* AND ITS *cry* AND *vip* GENES FROM SAMPLES METAGENOMIC DNA EXTRACTED FROM SUGARCANE AND NATIVE FOREST SOILS IN DIFFERENT CLIMATIC SEASONS.

ABSTRACT - The entomopathogen *Bacillus thuringiensis* is the most used alternative to control pests as opposed to the use of chemical products. This bacterium is able to produce crystals protein with entomopathogenic properties coded by the *cry* genes during its sporulation phase. The knowledge of the diversity of *cry* genes found in *B. thuringiensis* that is considered a soil bacterium is of extreme importance to allow us to understand the ecological distribution and its potential effects on the environment. Aside from this, the use of metagenomics techniques are being proposed to study microbial communities, as a way to overcome uncultivable microorganism. Based on such proposition this work aimed to evaluate the presence of *B. thuringiensis* entomopathogenic protein coding genes from metagenomic DNA extracted from soil samples on which sugar-cane has been cultivated as well as native forest soil samples obtained during different seasons of the year. It was possible to identify some strains of *B. thuringiensis* using the platform MG-RAST and their respective *cry* genes using the software BLAST. The obtained results allowed us to consider the influence of the climate on the diversity of *cry* genes that could be recognized by this type of analysis.

Keywords: soil bacterium, bioinformatics, microbial diversity, entomopathogenic

1. INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é o microrganismo mais utilizado para fins de controle biológico no mundo (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007). Essa bactéria Gram-positiva apresenta em seu genoma, genes que codificam proteínas com propriedades inseticidas produzidas durante o processo de esporulação (proteínas Cry e Cyt) e durante a fase vegetativa (proteínas Vip) (ESTRUCH et al., 1996; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; DE MAAGD et al., 2003). A alta especificidade e o amplo espectro de ação de suas proteínas conferem a esta abordagem características vantajosas e ambientalmente viáveis para o controle de insetos-praga em substituição aos inseticidas químicos, os quais podem causar danos irreversíveis à saúde humana e à natureza se utilizados indiscriminadamente (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007). De fato, a comercialização de bioinseticidas, tais como *B. thuringiensis*, corresponde a apenas 5% do mercado mundial de pesticidas, porém o uso destes produtos vem crescendo dez vezes mais rápido do que o uso de inseticidas químicos (BRAR et al., 2006).

A ação das proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* frente as mais variadas ordens de insetos ocorre após serem ingeridas pelo inseto suscetível. As protoxinas são ativadas quando processadas por proteases específicas no intestino do inseto. Ocorre então uma ligação irreversível nas células epiteliais levando à formação de poros que alteram a permeabilidade das células. Esta alteração leva à lise celular e ruptura da integridade intestinal, com consequente morte da larva. (COPPING; MENN, 2000; BOISVERT; LACOURSIERE, 2004; BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007).

Sabe-se que as bactérias Gram-positivas representam grande parte da microbiota de solo, o qual constitui o principal ambiente natural que abriga bactérias do gênero *Bacillus sp.* (IBARRA et al., 2003; MOHAMED et al., 2007). A bactéria em questão apresenta características saprofíticas, podendo ser amplamente encontrada em diferentes ecossistemas e habitats, principalmente no solo (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). O número de células de *B. thuringiensis* que podem ser isoladas do solo varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) por

grama de solo (DAMGAARD, 2000). Nesse contexto, o conhecimento da diversidade dos organismos presentes no solo é de suma importância para compreender sua distribuição ecológica aliada à sua importância na natureza, evidenciando a interação com os demais organismos e os efeitos em habitats diferentes (MARTIN; TRAVERS, 1989; BERNHARD et al., 1997).

Progressos recentes mostram que a diversidade genética de microrganismos encontrados no solo é muito maior que a refletida nas coleções e bancos de linhagens, pois apenas uma pequena parcela dos microrganismos é cultivável em laboratório pelas técnicas padrões de isolamento e cultivo (STEELE; STREIT, 2005; TRINGE; RUBIN, 2005).

Dessa forma, em busca de novos conhecimentos sobre a composição das comunidades de microrganismos que habitam diferentes biomas da Terra, surgiu a metagenômica como o importante método de prospecção biotecnológica, pois representa uma possibilidade de avaliação dos genomas da microbiota total encontrada na natureza, valendo-se da acessibilidade também aos microrganismos incultiváveis (HANDELSMAN et al., 1998; KNIGHT et al., 2003).

Amostras de DNA microbiano isoladas de uma determinada amostra ambiental podem vir a representar todo o DNA da comunidade de microrganismos nativos desta área (DANIEL, 2005). Deste modo, a metagenômica possui ferramentas que permitem acesso ao DNA ambiental, o armazenamento das seqüências e sua posterior análise (LEVEAU, 2007). Aliado à essa tecnologia estão também presentes as ferramentas da bioinformática, que surgiram como solução para o tratamento de grande quantidade de informação genética obtida por este tipo de avaliação da diversidade biológica.

Embora *B. thuringiensis* seja encontrado predominantemente no solo, ainda não há estudos aprofundados que utilizem exclusivamente DNA ambiental, sobre os efeitos na distribuição de genes *cry* e de outros genes com atividade entomopatogênica em variados tipos de solo e sob a influência de estações climáticas diferentes. Dessa forma, o presente trabalho buscou compreender melhor a diversidade de linhagens e genes de *B. thuringiensis* em amostras coletadas em área com cultivo de cana-de-açúcar e não cultivada, sugerindo ainda um novo modelo de prospecção, por abordagem metagenômica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bacillus thuringiensis*: CARACTERÍSTICAS GERAIS

A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi descrita pela primeira vez por Berliner (1911) que a isolou a partir de estudos com lagartas da espécie *Anagasta kuehniella*, uma mariposa que se desenvolve em farinha de trigo, também conhecida por “mariposa da farinha”. Apesar de ser esta a primeira descrição do bacilo, não foi o primeiro isolamento.

Estudos indicam que outros pesquisadores também podem ter trabalhado anteriormente com esta bactéria, entre eles, Louis Pasteur pode ter trabalhado com uma subespécie de *B. thuringiensis*, no período de 1865 a 1870, quando estudou doenças de bicho-da-seda (STEINHAUS, 1960). Além disso, em 1901 o bacteriologista japonês Ishiwata isolou o bacilo a partir de estudos com larva morta do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (ISHIWATA, 1901). Em 1908, Iwabuchi a denominou como *B. sotto Ishiwata*, que posteriormente foi considerado nome inválido (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). O nome de *Bacillus thuringiensis* passou a ser utilizado a partir de 1915, em homenagem à província alemã de Thuringia, de onde foi isolado.

O primeiro teste de campo envolvendo a bactéria foi realizado por Husz (1929) através de um programa internacional de controle da lagarta européia do milho da espécie *Ostrinia nubialis*. Em 1953 foi realizada a detecção dos cristais protéicos presentes na bactéria e o estudo da respectiva patogenicidade da bactéria através do pesquisador Hannay (HANNAY, 1953).

A bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*) é entomopatogênica, gram-positiva, catalase positiva, aeróbia (podendo também crescer em anaerobiose), pertencente à família *Bacillaceae*, apresenta formato de bastonete, medindo cerca de 1,0 a 2,0 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, geralmente apresenta mobilidade, possuindo flagelos peritriquios. Esta bactéria é bastante conhecida pela capacidade de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, denominadas δ-endotoxina,

que são responsáveis pela atividade tóxica da espécie (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). Em meio de cultura a esporulação inicia-se na fase estacionária, no final do crescimento da forma vegetativa, e a temperatura ideal de crescimento está em torno de 30°C, com margem de 2°C para mais ou para menos (MORAES; CAPALBO, 1986).

Bacillus thuringiensis é uma bactéria ubíqua podendo ser encontrada em uma ampla gama de ambientes terrestres, como também em insetos mortos, grãos estocados, plantas, filoplano de espécies vegetais, detritos e a partir de amostras de água (BRAVO et al., 1998).

O entomopatógeno também pode se multiplicar em microhabitats favoráveis como, por exemplo, os insetos-alvo. De fato, a microflora bacteriana dos insetos, presente no interior do intestino, é rica, diversa e compreende bactérias gram positivas e negativas, algumas delas são patogênicas, como é o caso do *Bacillus thuringiensis* (PRIEST, 2000). Porém, devido à sua baixa ocorrência epizoótica, a probabilidade de os insetos colonizados serem a principal fonte de toxinas e esporos é improvável (ARONSON; SHAI, 2001).

Quanto à ocorrência de *B. thuringiensis* no solo, Meadows (1993) sugere possíveis explicações para isso. Segundo suas pesquisas, a bactéria em questão raramente se desenvolve no solo, porém é depositada neste substrato por insetos e folhas, dessa forma o solo atuaria como um reservatório de esporos, que poderiam, posteriormente, ser transportados a longas distâncias pelo vento; o Bt pode ser patogênico a insetos de solo com reduzida importância econômica, com os quais poucos estudos foram realizados; o *B. thuringiensis* pode se desenvolver no solo quando existem nutrientes suficientes, obtidos principalmente, de resíduos orgânicos em decomposição; e sua afinidade com *B. cereus*, com o qual pode trocar material genético, possibilita sua permanência no ambiente.

2.2 ESPECIFICIDADE DAS PROTEÍNAS DE *B. thuringiensis*

As proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* possuem alta especificidade e não apresentam malefícios ao ser humano, vertebrados e plantas. Além disso, as toxinas são biodegradáveis, ou seja, não geram resíduos tóxicos e cumulativos no ambiente (BRAVO; GILLB; SOBERÓN, 2007).

A estrutura morfológica das proteínas cristais variam, podendo apresentar formato piramidal, bipiramidal, cuboidal, romboidal, esférico e retangular. Estudos indicam que a estrutura do cristal pode estar também diretamente relacionada com a atividade tóxica do mesmo (TAYLOR et al., 1992; LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993; HABIB; ANDRADE, 1998).

Esses cristais são formados por polipeptídios conhecidos como proteínas Cry que apresentam propriedades entomopatogênicas frente a várias ordens de insetos, tais como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemíptera, Orthoptera e outros organismos como nematóides, ácaros e protozoários, apresentando atividade contra mais de 300 espécies de insetos e ácaros (DE MAAGD et al., 2003, GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS PROTEÍNAS DE *B. thuringiensis*

Hofte e Whiteley (1989) propuseram ao término da década de 80 uma classificação para as toxinas de *B. thuringiensis*, baseada na combinação de suas seqüências de aminoácidos e espectro inseticida. Dessa forma, foram agrupadas 38 toxinas em 14 classes diferentes. As quatro principais classes continham toxinas com atividade contra Lepidoptera (I), Lepidoptera e Diptera(II), Coleoptera (III) e Diptera (IV). No entanto, esse esquema apresentou problemas após tentar relacionar toxinas que apresentavam seqüências de aminoácidos similares a diferentes atividades inseticidas.

Na década de 90 Crickmore et al. (1998) propôs uma nova classificação que continua sendo utilizada até hoje e baseia-se unicamente nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Esta mudança possibilitou uma alta relação entre as toxinas e tornou desnecessária a realização de bioensaios com cada proteína contra um grande número de insetos.

A classificação apresenta quatro estágios hierárquicos em decorrência do local que as seqüências ocupam em uma árvore filogenética (CRICKMORE et al., 1998; DE MAAGD et al., 2001). Na primeira etapa da classificação as seqüências recebem um número e quando a similaridade genética é inferior a 45%, esse número se difere (Cry1, Cry2... Cry73). Na etapa seguinte, quando a similaridade é de até 78%, as seqüências recebem uma letra maiúscula (Cry1A, Cry1B, Cry1C...Cry1N) que representa a classe a qual pertencem. Na terceira etapa, quando a similaridade é superior a 95%, as seqüências recebem uma letra minúscula (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac...Cry1Ai) referente a sua subclasse. Na última etapa são atribuídos números de identificação (Cry1Aa1, Cry1Aa2... Cry1Aa24) de acordo com a ordem em que essas seqüências são depositadas no banco de dados. Há um banco de dados on-line com a classificação e nomenclatura das proteínas Cry, mantido pelo pesquisador Neil Crickmore (CRICKMORE et al., 2014).

As δ -endotoxinas compreendem duas famílias multigênicas, Cry e Cyt, atualmente há mais de 630 seqüências de genes que codificam essas toxinas. As proteínas Cry estão classificadas em 73 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de existirem 3 grupos de proteínas Cyt (CRICKMORE et al., 2014; DE MAAGD et al., 2001).

2.4 MECANISMO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS INSETICIDAS

As δ -endotoxinas, na forma como são sintetizadas, apresentam-se como protoxinas sem ação entomopatogênica, sendo necessário sua ativação para o desencadeamento do efeito tóxico. Também são conhecidas como proteínas formadoras de poros (TFP) devido ao seu modo de ação decorrente da inserção ou

translocamento na membrana celular do hospedeiro formando poros que causam a morte do inseto (PARKER; FEIL, 2005).

Segundo Boisvert e Lacoursiere (2004), após o inseto ingerir as proteínas cristais de *B. thuringiensis*, ocorre a dissolução das mesmas no líquido alcalino existente no tubo digestivo do inseto. Longas cadeias de proteínas são liberadas e em seguida separadas por enzimas, possibilitando a produção dos fragmentos tóxicos. Estas toxinas fixam-se sobre receptores específicos das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas suscetíveis às quais elas se ligaram. Após o reconhecimento do receptor, a toxina induz a formação de poros na membrana, provocando um desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio externo à célula, levando o inseto à paralisia e morte.

Zhang et al. (2006) apresenta um outro modo de ação das toxinas, a partir do modelo da transdução de sinal, na qual a interação receptor-toxina estimula a proteína G e a adenil ciclase, aumentando os níveis de AMP cíclico e ativando a proteína kinase A, responsável pela apoptose, que provoca a morte do inseto.

2.5 LINHAGENS DE *B. thuringiensis*

A maior dificuldade na diferenciação dos diversos grupos de *Bt* está nas semelhanças existente entre linhagens de *B. thuringiensis* e de *B. cereus*. Embora geralmente o termo *Bacillus thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, na verdade ele pertence a um complexo de várias espécies denominado *B. cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *Bt* e *B. weihenstephanensis*). *B. thuringiensis* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas muito comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença dos cristais visíveis em microscopia de contraste de fase (LUTHY; WOLFERSBERGER, 2000). Assim, algumas cepas de *Bt* que perdem a capacidade de produzir cristais passam a ser consideradas como *B. Cereus* (LECADET et al., 1999). No entanto, a distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas.

A formação de linhagens com uma grande diversidade de perfis de toxicidade pode ser justificada devido à localização da maioria dos genes *cry* em grandes plasmídeos, freqüentemente conjugativos, o que pode possibilitar a passagem destes plasmídeos de uma linhagem para outra (CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004; LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993).

Algumas cepas apresentam um único gene codificador de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Ex: *Bt kurstaki* HD-73), porém comumente ocorre a presença de dois ou mais genes *cry* funcionais em uma mesma linhagem bacteriana de *B. thuringiensis* e dessa forma o cristal produzido irá conter duas ou mais proteínas Cry com peso molecular variado. Por exemplo, *Bt kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70 kDa), enquanto que *Bt tenebrionis* produz uma única toxina com peso molecular de 67 KDa (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; LERECLUS; DELÉCLUSE; LECADET, 1993).

Dessa forma, a patogenicidade e a virulência conferidas ao isolado de *B. thuringiensis* estão também diretamente relacionadas aos tipos de genes *cry* funcionais que o mesmo apresenta e ao mecanismo de ação das proteínas nele presentes em concomitância com a interação existente entre elas. Essa interação entre as toxinas e seus receptores pode levar a efeitos antagônicos ou sinérgicos. (LECADET et al., 1999).

2.6 BIOINSETICIDAS E TRANSGÊNICOS À BASE DE *BT* EM SUBSTITUIÇÃO AOS INSETICIDAS QUÍMICOS

O emprego de inseticidas químicos de forma indiscriminada, sem orientação técnica, pode ocasionar consequências graves, como a intoxicação aos produtores e animais, pode deixar resíduos nos alimentos que são consumidos em sua maioria in natura ou com pouco preparo, além da contaminação do ambiente e, principalmente, dos inimigos naturais (CHEN et al., 1996; MONNERAT et al., 2004). Além disso, o uso desordenado dos inseticidas sintéticos também tem conduzido à seleção de

populações resistentes aos mais diversos compostos químicos (CASTELO BRANCO; GUIMARÃES, 1990; CASTELO BRANCO, 1999).

Por outro lado, há vantagens comprovadas quanto ao uso de *B. thuringiensis* no controle biológico de pragas, tais como: maior segurança ao homem, ausência de toxicidade às plantas, conservação do meio ambiente, alto índice de especificidade ao inseto alvo, proteção do potencial produtivo da cultura, redução da utilização de produtos químicos tóxicos, baixo custo da produção agrícola, surgimento de novas indústrias visando os bioinseticidas, etc (HABIB; ANDRADE, 1998; ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001; MONNERAT; BRAVO, 2000).

Há mais de 50 anos as formulações à base de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas no campo e ocupam uma posição de destaque, correspondendo a cerca de 90% do mercado mundial de bioinseticidas e 2% de todo o mercado inseticida (VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007; ALI et al., 2010; BRAVO et al., 2011). Os países que mais se destacam na produção desses bioinseticidas são Estados Unidos e Canadá, que respondem por cerca de 50% da produção mundial (TAMEZ-GUERRA et al., 2001).

No Brasil, a maioria dos produtos à base de *B. thuringiensis* é importada, o que provoca acréscimos ao preço final destinado ao consumidor e à consequente diminuição da competitividade destes produtos em relação a inseticidas sintéticos. Este quadro demonstra a necessidade de produção nacional de formulações à base de *B. thuringiensis*, os quais poderiam ser empregados em programas locais de controle de insetos (POOPATHI; KUMAR, 2003; PRABAKARAN; BALARAMAN, 2006).

De modo geral, a busca por uma agricultura mais sustentável embasada nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) têm demonstrado que os bioinseticidas são uma importante ferramenta para o controle biológico (HIGUCHI et al., 2007).

Além disso, temos a opção do uso de plantas geneticamente modificadas que expressem as proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, trata-se das culturas transgênicas, consideradas uma das mais bem sucedidas conquistas biotecnológicas recentes (FERRÉ; VAN RIE; MACINTOSH, 2008; SENA; HERNANDEZ-RODRIGUEZ; FERRE, 2009), devido aos bem sucedidos resultados

em termos de controle dos insetos-alvo, redução no uso de inseticidas químicos e segurança ambiental (DE MAAGD; BOSCH; STIEKEMA, 1999; BETZ; HAMMOND; FUCHS, 2000; FERRÉ; VAN RIE, 2002).

As mais importantes culturas transgênicas *Bt* existentes atualmente são à base de soja, milho, algodão e canola. Em 1996, a primeira cultura transgênica expressando genes de *B. thuringiensis* para proteínas que conferem resistência a insetos foi liberada comercialmente. Desde então muitas outras culturas *Bt* estão sendo adotadas no mundo inteiro. Somente no ano de 2012, foram plantados cerca de 60 milhões de hectares de transgênicos *Bt* (JAMES, 2012). Estimativas indicam que 497 milhões de quilos de defensivos químicos deixaram de ser usados graças à adoção de transgênicos (*Bt*) resistentes a insetos, aliados aos herbicidas, entre os anos de 1996 e 2012 (JAMES, 2013).

Essas plantas transgênicas oferecem ações de longo prazo e são preventivas contra várias espécies de insetos-praga. Porém uma das principais ameaças da ampla adoção destas culturas é a evolução da resistência dos insetos, como uma resposta à forte pressão de seleção que é imposta às populações de insetos (FERRÉ; VAN RIE, 2002). É importante ressaltar que o tempo em que os transgênicos *Bt* permanecem resistentes aos insetos é um importante aspecto avaliado e testado no mercado (ALI et al. 2010).

2.7 DIVERSIDADE MICROBIANA DO SOLO

Alguns tipos de solo podem apresentar o mais alto índice de biodiversidade, fator este que o tornou um dos ambientes mais estudados por microbiologistas (HANDELSMAN et al. 1998; LORENZ et al., 2002). Além disso, o solo é o maior desafio de todos os ambientes naturais, principalmente em relação à identificação da diversidade de espécies presentes e do tamanho das comunidades microbianas (DANIEL, 2005).

Os microrganismos presentes na natureza possuem um importante papel nas evoluções geológicas, geoquímicas e biológicas. Entre as funcionalidades vitais,

está a capacidade de catalisar transformações únicas e indispensáveis nos ciclos biogeoquímicos da biosfera, a produção de componentes essenciais da atmosfera da terra e, além disso, representam uma vasta porção da diversidade genética (TORSVIK; OVREAS; THINGSTAD, 2002). Sendo assim, a diversidade microbiana está diretamente relacionada à estabilidade do ecossistema (KENNEDY, 1999).

No solo, a quantidade e diversidade de microrganismos pode oscilar de acordo com os diferentes tipos e condições do mesmo, prevalecendo na maioria das vezes, as bactérias (WHITMAN et al. 1998). Estudos comprovam que a diversidade de microrganismos presente no solo é tão vasta quanto desconhecida. Um grama de solo pode apresentar cerca de 10 bilhões de microrganismos das mais variadas espécies (ROSSELÓ-MORA; AMANN, 2001; DANIEL, 2005).

Metodologias moleculares têm contribuído massivamente para o desenvolvimento do estudo da diversidade microbiana dos solos, evidenciando o cenário de distribuição dos microrganismos em diferentes habitats (PEDRINHO et al., 2009). Dentre essas, a Metagenômica surge como o principal método de prospecção biotecnológica.

2.8 NOVAS TECNOLOGIAS PARA ESTUDO DA DIVERSIDADE DE GENES

Há pouco tempo atrás a identificação e caracterização de microrganismos só era possível através das técnicas tradicionais de isolamento e cultivo (PACE et al., 1986). Porém, na década de 1980 microbiologistas ambientais perceberam que somente uma pequena parcela de bactérias do solo, variando entre 0,1% a 1,0%, era capaz de formar colônias em meios de cultivo (TRINGE; RUBIN, 2005, TORSVIK, et al. 2002). Estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (STALEY, 1998).

Nesse contexto, surgiu a metagenômica que tornou possível o acesso a genes de organismos incultiváveis, pois se baseia na análise genômica da microbiota total encontrada na amostra dispensando o cultivo em laboratório (KNIGHT et al., 2003).

O termo metagenoma é derivado do conceito estatístico de meta-análise (combinação estatística de análises separadas) e genômica (análise total do material genético de um organismo específico) (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003).

Handelsman et al. (1998) definiu o termo metagenoma como sendo o montante total genômico de uma determinada microbiota em um ambiente específico. Esta envolve a extração de DNA diretamente do ambiente e, posteriormente, são realizados os procedimentos de clonagem e expressão dos genes de interesse, proporcionando assim o acesso a todas as comunidades microbianas, incluindo tanto os microrganismos facilmente cultiváveis quanto os não cultiváveis.

A princípio, o foco principal da metagenômica foi uma melhor compreensão da biodiversidade através da análise de DNA de amostras ambientais (DUPRÉ; O'MALLEY, 2007). No que diz respeito à biotecnologia, a metagenômica veio como uma ferramenta alternativa no âmbito de proporcionar recursos para a descoberta de novas enzimas, compostos químicos e isolamento de genes para o uso em biotecnologia (SCHMEISSER; STEELE; STREIT, et al. 2007).

Nos últimos anos, com o advento da metagenômica e projetos genômicos houve um crescimento intensivo na quantidade de dados gerados, exigindo assim o desenvolvimento de novas tecnologias de seqüenciamento de DNA em larga escala, os chamados “sequenciadores de nova geração”. Estas tecnologias diferem principalmente quanto ao mecanismo químico empregado no processo, ao volume de dados gerados, à precisão de bases, à tecnologia de operação, ao tamanho de fragmento gerado por leitura e ao custo operacional; sendo que a escolha da tecnologia deve basear-se principalmente no suprimento dos dados necessários para a abordagem experimental (MAC LEAN; JONES; STUDHOLME, 2009).

Atualmente, em decorrência desses avanços em técnicas de seqüenciamento mais eficientes, os genomas de milhares de espécies se encontram em bancos de dados e ferramentas como o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permitem buscar e comparar seqüências com as já existentes nesses bancos de dados (ALTSCHUL et al., 1990).

Um dos objetivos do projeto de seqüenciamento é a identificação dos genes presentes no genoma. Uma vez identificados os nucleotídeos dos genes, eles

podem ser usados para inferir as seqüências de aminoácidos das proteínas. Desse modo, a proteína pode ser sintetizada ou isolada e suas propriedades estudadas para determinar sua função (PIERCE, 2004).

Tendo em vista o grande volume de dados a serem processados em diversos tipos de projetos metagenômicos ou genômicos, torna-se necessário o uso de ferramentas computacionais para auxílio às análises diárias dos experimentos laboratoriais. Para a solução deste problema, surgiu então a Bioinformática, um campo interdisciplinar, que age como interface entre os campos científico e tecnológico. A bioinformática se caracteriza por tentar prover métodos computadorizados para interpretar os dados resultantes de sequenciamentos, que geram grandes volumes de dados, de forma a trazer novos avanços para a biologia molecular.

Como apresentado nos projetos de sequenciamento, para a comparação de genomas e análises de expressão gênica, as ferramentas de bioinformática têm importante papel no auxílio às análises dos dados, no controle e na automatização dos processos. Desse modo, algumas ferramentas da bioinformática oferecem um conjunto integrado de funções, nas quais realizam tarefas específicas para cada fase do projeto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas na cidade de Santa Rita do Passa Quatro, interior do Estado de São Paulo, em duas áreas distintas: a primeira em área de cultivo de cana-de-açúcar localizado em uma propriedade particular (Fazenda Coqueiro), (21°42'30.67"S 47°34'56.89"W) e a outra amostra foi coletada em uma Floresta Nativa (Gleba Capetinga Leste do Parque Estadual de Vassununga), (21°42'34.62"S 47°34'30.04"W). Realizou-se duas coletas em períodos sazonais antagônicos, a primeira ocorreu no mês de Fevereiro, período chuvoso, e a segunda em Novembro, período de seca (Tabela 1). As amostras coletadas de solo com cultivo de cana-de-açúcar foram denominadas SCW (Sugarcane Wet) e SCD (Sugarcane Dry), e as amostras coletadas de solo de floresta nativa foram denominadas FW (Forest Wet) e FD (Forest Dry).

Tabela 1. Dados meteorológicos mensais fornecidos pela estação convencional no ano de 2010, gentilmente cedidas pelo departamento de Ciências Exatas - FCAV/UNESP Jaboticabal-SP.

Dados meteorológicos	Períodos de coleta	
	Fevereiro (SCW e FW)	Novembro (SCD e FD)
Temperatura máxima (°C)	32	31
Temperatura mínima (°C)	20,4	18,7
Temperatura média (°C)	25,3	24,1
VR (%)	76,6%	70%
Precipitação (mm)	150,7	100

As amostragens de solo foram obtidas em pontos distintos de 0-20 cm de profundidade dentro de um quadrante, todos a partir dos vértices, distanciando 1m, 10m e 100m totalizando 10 pontos, sendo coletadas em tubos de P.V.C., os quais foram identificados, acondicionados, armazenados em caixas térmicas com gelo e enviados para o Laboratório de Análises de Solo e Planta para análise das propriedades físico-químicas, e para o Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) para a extração das amostras de DNA metagenômico sendo ambos situados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus Jaboticabal.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA METAGENÔMICO

A extração do DNA total presente nas amostras dos solos foi realizada utilizando o Kit FastDNA® SPIN Kit (BIO 101 - QUANTUM BIOTECHNOLOGIES - Catálogo n.º #6560-200). A quantificação foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 µg/mL). A eletroforese foi realizada em uma cuba modelo Horizon 58 com uma alíquota de 3µL de DNA adicionada de 3 µL de tampão de carregamento [0,025% (p/v) de azul de bromofenol e 50% de glicerol (v/v)] e conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), a 100V. Foi aplicado ao gel uma alíquota de plasmídeo pGEM (APPLIED BIOSYSTEMS) com concentração conhecida (50 ng/µL) em diferentes volumes para comparar a intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio e cálculo da concentração do material. A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi documentada em um fotodocumentador (Bio-Rad). A concentração de DNA também foi estimada em espectrofotômetro Nano-Drop ND-1000 (ThermoScientific).

3.3 SEQUENCIAMENTO DO DNA METAGENÔMICO

As amostras de DNA foram obtidas através do processo de extração citado anteriormente e apresentaram ótima qualidade quando visualizados em gel de agarose. Para dosar a concentração dos DNAs utilizou-se Qubit (Invitrogen) e a concentração foi compatível com o descrito no manual TruSeq™DNASamplePreparation V2 Guide. Após o preparo das bibliotecas as mesmas foram seqüenciadas utilizando-se plataforma Illumina®, equipamento HiScanSQ, com bibliotecas do tipo “*paired-end*” com 2x100 pb.

3.4 ANÁLISE “IN SÍLICO”

Inicialmente a análise foi realizada através da comparação das seqüências das amostras já processadas com bases de dados de seqüências conhecidas através da plataforma de análise de dados de metagenomas MG-RAST (MEYER et al., 2008). Essa primeira etapa gerou dados básicos sobre a presença e abundância das linhagens de *B. thuringiensis* nas amostras metagenômicas.

O servidor MG-RAST (<http://metagenomics.anl.gov/>) é uma plataforma de análise automatizada que permite o conhecimento quantitativo de populações microbianas com base em dados de seqüência. Através do upload dos dados provenientes do sequenciamento, o sistema realizou o controle de qualidade, a anotação automatizada e a análise das amostras de DNA metagenômico.

Em uma segunda etapa, foram selecionadas seqüências modelo para fins de comparação durante a prospecção. Somente as seqüências de genes *cry*, *cyt* e *vip*, manualmente anotadas, revisadas e armazenadas no banco de dados internacional UniProt (UNIPROT CONSORTIUM, 2012) foram selecionadas para este fim. Essas seqüências resultaram em um total de oito seqüências *cyt*, 91 seqüências *cry* e 99 seqüências *vip* que passaram a ser utilizadas como seqüências de comparação (subject).

O UniProt (<http://www.uniprot.org/>) é uma colaboração entre o Instituto Europeu de Bioinformática (EMBL-EBI), o Instituto Suíço de Bioinformática SIB e o Protein Information Resource (PIR). Nos três institutos há mais de 100 pessoas envolvidas em tarefas diferentes, como curadoria do banco de dados, desenvolvimento de software e suporte, proporcionando resultados mais confiáveis ao trabalho.

A prospecção ocorreu de forma exaustiva via programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) foi otimizado com o "word size = 7" e com o filtro de complexidade desativado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 60.606.976 e 79.208.498 reads foram obtidos das amostras SCW e SCD, respectivamente; enquanto 63.679.540 e 64.384.450 foram obtidos das amostras FW e FD, respectivamente. De acordo com a plataforma MG-RAST, desse total, cerca de 14,215 (0.023%), 18,013 (0.022%), 9,707 (0.015%) e 11,038 (0.017%) reads das amostras SCW, SCD, FW e FD, respectivamente, pertencem à espécie *B. thuringiensis*. Além disso, para as amostras provenientes de solo com cultivo de cana-de-açúcar e solo de floresta nativa, a proporção de reads do *B. thuringiensis* foi de 0,023% e 0,016%, respectivamente.

A abundância de organismos preditos gerados pela plataforma MG-RAST, detectou a presença de diferentes subespécies de *B. thuringiensis* nas amostras (Figura 1a e Figura1b). Além disso, a distribuição das subespécies de *B. thuringiensis* são muito similares em ambos os solos e estações climáticas em que foram coletados, apenas com ligeiras diferenças observadas para algumas subespécies. As linhagens de *B. thuringiensis subsp. al hakam* e *B. thuringiensis subsp. konkukian* destacaram-se em todas as amostras, apresentando a maior abundância entre todas as indicações de linhagens.

A variabilidade e distribuição de *B. thuringiensis* nos estudos apresentados possivelmente são conseqüências das diferenças ecológicas do local de origem e/ou as relações de co-evolução que podem contribuir com a expressão de diferentes padrões de genes *cry1* em diversos países (GUIDELLI-THULER, 2008).

O período em que a coleta foi realizada também pode ter influenciado consideravelmente na abundância de genes de *B. thuringiensis*. Estes resultados sugerem novamente uma dependência entre as condições geográficas e a distribuição do gene *cry* na natureza.

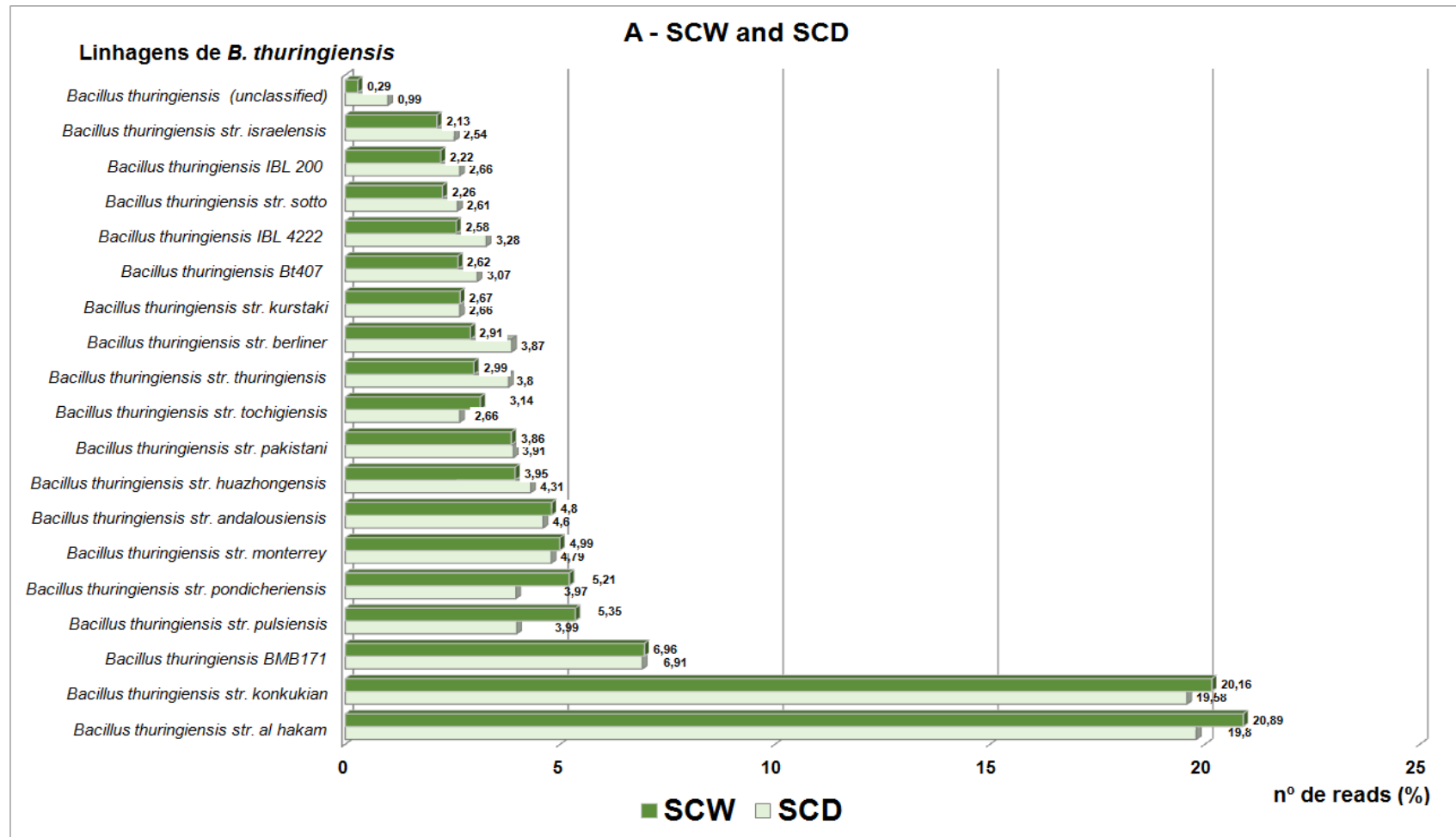


Figura 1a. Diversidade de subespécies de *B. thuringiensis* identificada através do software MG-RAST e a respectiva quantidade de reads existente nos diferentes ambientes em que as amostras de solo com cultivo de cana-de-açúcar foram coletadas; SCW (Sugarcane Wet) e SCD (Sugarcane Dry).

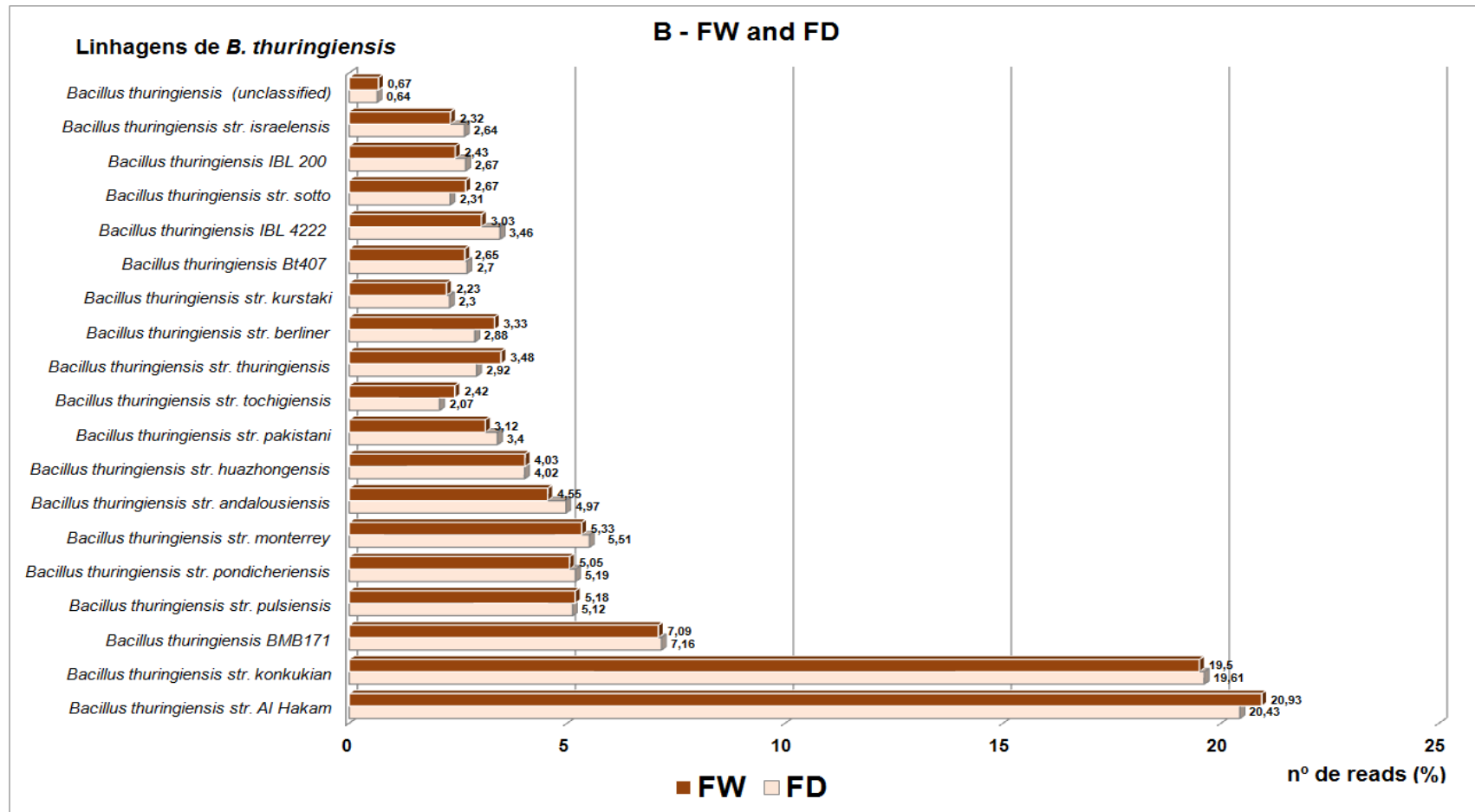


Figura 1b. Diversidade de subespécies de *B. thuringiensis* identificada através do software MG-RAST e a respectiva quantidade de reads existente nos diferentes períodos em que as amostras de solo de floresta nativa foram coletadas; FW (Forest Wet) e FD (Forest Dry).

Depois de confirmar a presença de sequências genéticas pertencentes ao *B. thuringiensis* nas amostras analisadas, estas sequências foram prospectadas frente aos genes *cry*, *cyt* e *vip* por anotação manual. De modo geral, essa prospecção via programa BLAST com base nas sequências de comparação (*subject*) selecionadas anteriormente através do banco de dados UniProt, resultou na identificação de 222 sequências *cry* e 19 sequências *vip* entre as amostras SCW, SCD, FW e FD. Curiosamente, nenhum gene *cyt* foi detectado nas amostras. A ausência de genes *cyt* nas amostras de sequências metagenômicas analisadas se deve provavelmente à baixa quantidade de sequências de comparação (*subject*) utilizadas para as avaliações de similaridade, além disso, a abundância de genes *cry* encontrados na natureza, de fato, é maior do que os demais genes codificadores de proteínas entomopatogênicas de *B. thuringiensis* (CRICKMORE et al., 2014).

Na Tabela 2 estão correlacionados os genes identificados na prospecção e a linhagem de *Bacillus thuringiensis* correspondente, de acordo com informações exibidas no banco de dados UniProt, referente às sequências de comparação utilizadas.

Tabela 2. Genes de *B. thuringiensis* e a(s) linhagem(s) correspondentes, segundo o banco de dados UniProt.

Genes	Linhagens
<i>cry1aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i>
<i>cry1ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i>
<i>cry1ac</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
<i>cry1ad</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>
<i>cry1ae</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>alesti</i>
<i>cry1ag</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>thuringiensis</i>
<i>cry1ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>
<i>cry1bc</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>

Genes	Linhagens
<i>cry1be</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1ca</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>
<i>cry1cb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>
<i>cry1da</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>
<i>cry1db</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1ea</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i>
<i>cry1fa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>
<i>cry1fb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>
<i>cry1ga</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1gb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>wuhanensis</i>
<i>cry1hb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>
<i>cry1ia</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
<i>cry1ib</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>entomocidus</i>
<i>cry1ic</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1id</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1ja</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1jb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry1ka</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>
<i>cry2aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kenyae</i>
<i>cry2ad</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry3aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tenebriones</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>san diego</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i>
<i>cry3ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i>
<i>cry3ca</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>
<i>cry4aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>

Genes	Linhagens
<i>cry4ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>
<i>cry5aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>darmstadiensis</i>
<i>cry5ac</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry5ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry6aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry7aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry7ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>
<i>cry8aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>
<i>cry8ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>
<i>cry8ca</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>japonensis</i>
<i>cry9aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>galleriae</i>
<i>cry9da</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>japonensis</i>
<i>cry9ea</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>
<i>cry11ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>jegathesan</i>
<i>cry11bb</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i>
<i>cry14aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>sotto</i>
<i>cry19aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>jegathesan</i>
<i>cry19ba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>higo</i>
<i>cry20aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>fukuokaensis</i>
<i>cry21aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry22aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry24aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>jegathesan</i>
<i>cry25aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>jegathesan</i>
<i>cry26aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>finitimus</i>
<i>cry27aa</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>higo</i>
<i>vip1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Genes	Linhagens
<i>vip1a</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>vip2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>vip2a</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>vip2ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>vip3a</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Grande parte das linhagens correspondentes a cada gene, segundo dados do UniProt, não foi identificada em nossas análises de subespécies de *B. thuringiensis* através da plataforma MG-RAST. Este fator sugere que há outras linhagens de *B. thuringiensis* que também apresentam os mesmos genes codificadores de proteínas inseticidas.

Apesar da tentativa de montagem de contigs com as sequências *cry* e *vip*, isso não foi possível. Este resultado está de acordo com a baixa proporção de *B. thuringiensis* encontrado em todas as amostras, indicando assim um possível reservatório de genes *cry* e *vip* novo e inexplorado presente nas amostras.

Na Figura 2 observa-se que 21 (50%) das sequências encontradas na amostra SCW pertencem à classe de genes *cry1*. O segundo gene mais identificado foi o *vip1* representando 5 (11,9%) do total de sequências, e também foram identificados 2 (4,7%) genes *cry9* e *cry22*. Analisando a amostra SCD o gene *cry1* também apresentou maior abundância com 40 sequências (48,78%), além desse, destacaram-se os genes *cry5* e o gene *cry8*, com 13 (15,85%) e 5 (6,1%) sequências, respectivamente.

A amostra FW continha 28 (58,33%) genes pertencentes ao perfil *cry1*, seguido pelos genes *cry11*, *cry19* e *vip1*, todos com 3 (6,25%) sequências. Por fim, a amostra FD também apresentou grande quantidade de gene *cry1* com 45 (65,22%) sequências, acompanhado pelo gene *cry5* com 6 (8,70%) sequências.

Em suma, o gene *cry1*, como esperado, apresentou maior abundância para todas as amostras, com 134 sequências, representando 55,6% de todos os genes identificados. O segundo gene mais identificado foi o *cry5*, com 22 (9,13%)

sequências e em terceiro lugar ficaram os genes *cry11* e *vip1* com 12 (4,9%) sequências cada um.

Os resultados evidenciam que independentemente das subclasses de genes existentes, a maioria dos alinhamentos ocorreu para o gene *cry1* nas quatro amostras metagenômicas. Como dito anteriormente, não há na literatura pesquisas realizadas com essa mesma abordagem, porém, os resultados mostram grande proximidade em relação aos experimentos realizados com isolados de *B. thuringiensis* em variados locais, seja em território nacional, assim como em outros países do mundo. Em pesquisa realizada na Colômbia, os genes *cry1* representaram 73% dos resultados, apresentando 30 perfis diferentes de genes *cry1* em 137 cepas analisadas. Chak et al. (1994) analisaram 225 isolados provenientes de ecossistemas de Taiwan, e desses, cerca de 98,2% continham os genes *cry1*. Além disso, pesquisas realizadas em diferentes ecossistemas no México evidenciaram que 49,6% dos 496 isolados de *Bt* apresentaram genes *cry1* (BRAVO et al., 1998). Ferrandis et al. (1999) após estudar 223 isolados de *B. thuringiensis* na Espanha identificaram também que (54,3%) era representada por genes *cry1*.

Ferrandis et al. (1999) também identificaram genes *cry5* (66%) e *cry2* (42%) nos isolados estudados e, em uma análise realizada especificamente com isolados que apresentaram genes *cry1* foram detectados os seguintes perfis de genes: *cry1Ac* (62%), *cry1Aa* (49%), *cry1D* (43%), *cry1C* (35%) e *cry1Ab* (34%), os quais também foram identificados no presente trabalho.

Na Coreia, 58 cepas de *Bacillus thuringiensis* foram isoladas de solos de várias regiões e analisadas por PCR utilizando iniciadores específicos dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* e *cry5*. Os resultados mostraram que a frequência do gene *cry1C* (57%) foi predominante, seguido por *cry1Ab* (45%) e o gene *cry2A* (34%). Mas, os genes *cry1E*, *cry1F*, *cry3*, *cry4C* e *cry5* não foram encontrados (KIM et al., 1998). Destes, apenas o gene *cry4C* também não foi encontrado nas quatro amostras analisadas.

Vilas-bôas e Lemos (2004) também analisaram vários isolados e os que apresentaram genes *cry1* foram os mais abundantes (48%) seguido pelos genes *cry11* e *cyt* (7%) e genes *cry8* (2%). Estes valores se aproximam bastante dos resultados aqui apresentados, pois o gene *cry1* também foi o mais abundante

(55,60%), e os genes cry11 (4,98%) e cry8 (3,32%) também foram significativos, diferenciando-se apenas pela abundância dos genes cry5 (9,13%) e vip1 (4,98%).

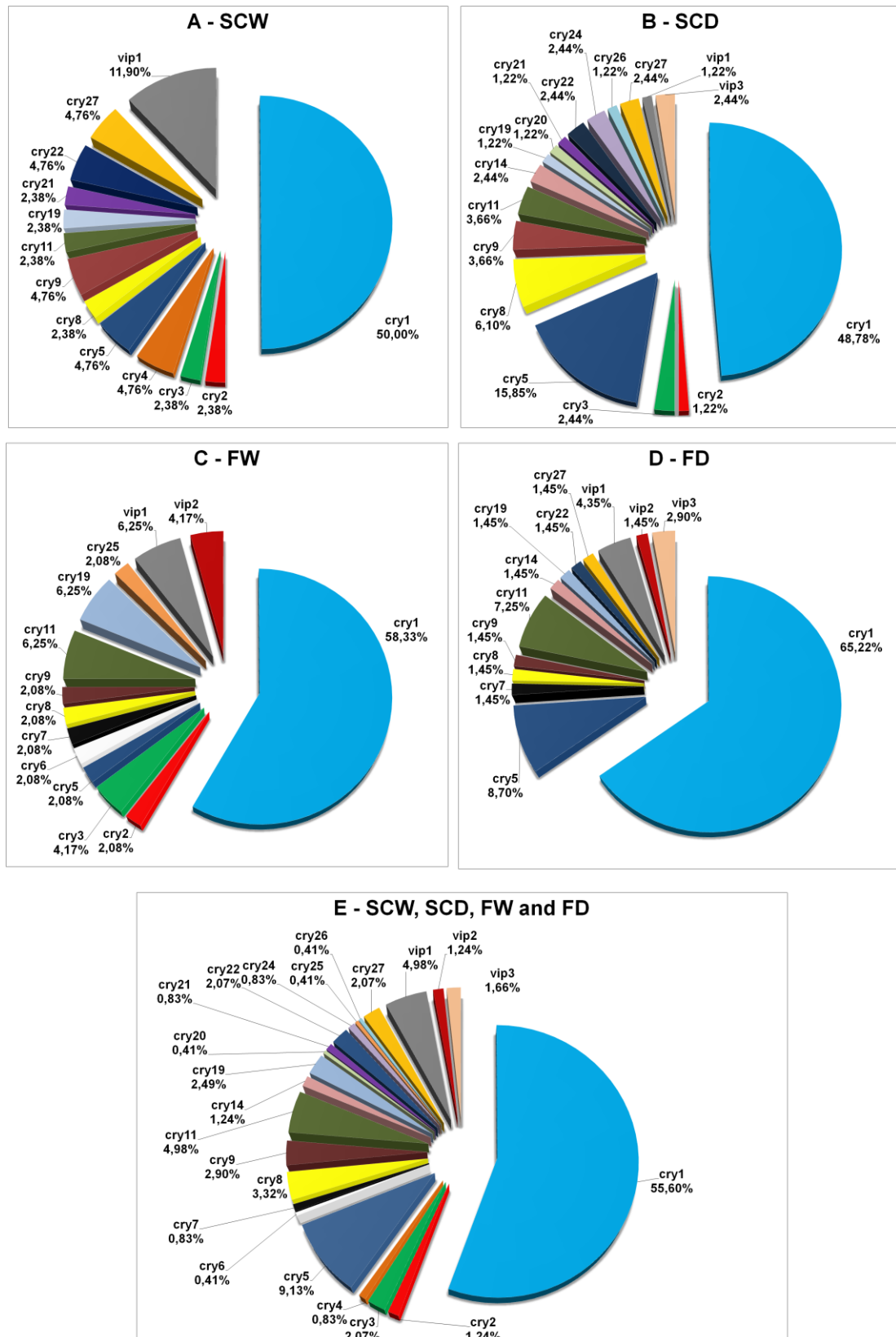


Figura 2. Quantificação de perfis de genes codificadores de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* identificados em SCW – Sugarcane Wet (A), SCD – Sugarcane Dry (B), FW – Forest Wet (C) e FD - Forest Dry (D) via programa BLAST. “E” mostra a junção dos resultados obtidos para todas as amostras.

Na Figura 3 estão representados três diagramas relacionando as amostras pesquisadas. O diagrama A relaciona os genes *cry* e *vip* presentes nas duas amostras de solo com cultivo de cana-de-açúcar. Ainda neste diagrama, pode-se notar que há 17 perfis de genes em comum entre as amostras, 11 perfis de genes presentes somente em SCW e 18 perfis de genes presentes somente em SCD. Desconsiderando as subclasses dos genes pode-se observar que o gene *cry4* está presente somente em SCW e os genes *cry14*, *cry20*, *cry24*, *cry26* e *vip3* ocorrem somente em SCD.

O diagrama B faz referência aos genes encontrados em FW e FD. Há 15 perfis de genes em comum entre as duas amostras, 14 genes presentes somente em FW e 22 genes presentes somente em FD. Os genes *cry2*, *cry3*, *cry6* e *cry25* estão presentes somente em FW e os genes *cry14*, *cry22*, *cry27* e *vip3* foram encontrados somente em FD.

O diagrama C exhibe os genes *cry* e *vip* identificados em amostras de diferentes culturas. Foi possível concluir que há 32 perfis de genes em comum entre as amostras coletadas em diferentes ambientes, 14 genes presentes somente em SCW+SCD e 19 genes presentes somente em FW+FD.

Por último, o diagrama D detectou a relação entre as amostras obtidas durante diferentes estações climáticas. A comparação resultou em 22 perfis coincidentes em ambas as amostras analisadas, enquanto 19 genes foram identificados apenas nas amostras SCW +FW e 20 seqüências de genes ocorreram somente em SCD+FD.

Pesquisa desenvolvida por Konecka et al. (2012) com isolados de solo e de água identificou nas cepas de *B. thuringiensis* provenientes de solo os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*. Enquanto cepas cultivadas em água apresentaram somente os genes *cry1* e *cry15*. O gene *cry1A* estava presente em todos os isolados, assemelhando-se ao resultado obtido nesta análise, na qual todas as amostras apresentaram esse mesmo gene. Todas as cepas de *B. thuringiensis* obtidos a partir de amostras de solo possuíam *cry2A* e *cry1I*. Neste trabalho, o gene *cry2A* somente não foi identificado na amostra FD e o gene *cry1I* foi identificado na amostra coletada em solo com cultivo de cana-de-açúcar em período chuvoso e em amostra de floresta nativa em período seco.

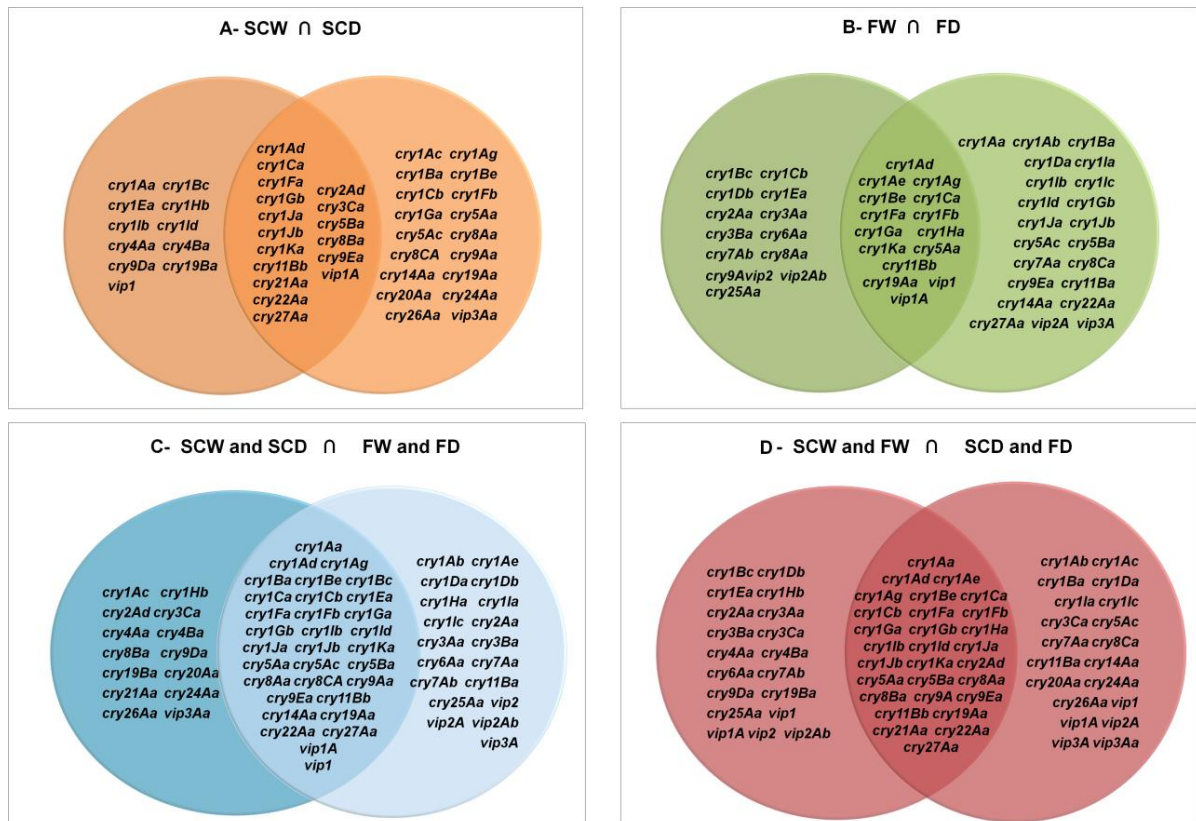


Figura 3. Diagramas de Venn mostrando a diversidade de genes *cry* e *vip* identificada nas amostras. O “diagrama A” demonstra a intersecção entre os genes identificados nas duas amostras SCW e SCD. O “diagrama B” representa a intersecção existente entre os genes das amostras FW e FD, o “diagrama C” apresenta a intersecção entre os genes de amostras provenientes de diferentes culturas e o “diagrama D” relaciona os genes obtidos nas amostras coletadas em estações climáticas distintas.

Como foi verificado nas diversas pesquisas, a frequência de *B. thuringiensis* em vários locais e as diferenças encontradas podem ser atribuídas a inúmeros fatores, incluindo variações geográficas, climáticas, atividade agrícola, tipo de solo e método de isolamento.

Há uma grande quantidade de proteínas Cry e Vip já descritas, porém os resultados apresentados também incitam a busca por novas toxinas através da Metagenômica aliada à Bioinformática. Esta busca por toxinas até então desconhecidas pode possibilitar uma maior eficácia para o controle de insetos, visando também novas alternativas para reduzir os problemas relacionados à resistência (VILAS-BÔAS; LEMOS, 2004).

5. CONCLUSÕES

- Em todas as amostras foi possível identificar uma grande diversidade de linhagens de *B. thuringiensis* e seus genes codificadores de proteínas entomopatogênicas;
- Foram identificadas as mesmas linhagens de *Bacillus thuringiensis* em todas as amostras coletadas, independentemente da estação climática ou tipo de cultura analisados, variando apenas a quantidade de sequências;
- A quantidade de sequências de genes *cry* encontrada nas amostras analisadas, de fato, é maior do que as sequências de genes *cyt* e *vip* de *B. thuringiensis*;
- O gene *cry1* representa mais da metade dos genes identificados;
- Há uma provável influência das estações climáticas sobre a diversidade dos genes obtidos nesta análise;
- O novo modelo de prospecção, por abordagem metagenômica aliada à bioinformática, mostra-se bastante promissor e incita a busca por novas toxinas de *B. thuringiensis*.

6. REFERÊNCIAS

ALI, S.; ZAFAR, Y.; ALI, G. M.; NAZIR, F. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, 2010.

ALMEIDA, J.E.M.; BATISTA FILHO, A. Banco de microrganismos entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 21, p. 30-3, 2001.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p. 403-410, 1990.

ARONSON, A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p.1-8, 2001.

BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe. **Z. Gesamte Getreidewesen**, v. 3, p. 63-70, 1911.

BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 70, p. 59-68, 1997.

BETZ, F. S., HAMMOND B. G., FUCHS R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 156-173, 2000.

BOISVERT, J.; LACOURSIERE, J. O. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. **Envirodoq No. ENV/2004/0278. Ministère de l'Environnement**, Quebec, 2004.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILLB, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Amsterdam, v. 49, n. 4, 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**, Oxford, v. 41, n. 7, p.423-431, 2011.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *B. thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BOREM, A. [Ed.]. **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, p. 309-350, 2004

CASTELO BRANCO, M.; GUIMARÃES, A.L. Controle da traça-das-crucíferas em repolho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 24-25, 1990.

CASTELO BRANCO, M. Associação de armadilhas de feromônio e número de machos coletados para a redução do uso de inseticidas no controle da traça das crucíferas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.17, p. 280, 1999.

CHAK, K. F.; CHAO, D. C.; TSENG, M. Y.; KAO, S. S.; TUAN, S. J.; FENG, T. Y. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.7, p.2415-2420, 1994.

CHEN, C. C; CHANG, S. J.; CHENG. L. L.; HOU, R. F. Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Yponomeutidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 120, n. 3, p. 165 - 169, 1996.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, n. 88, p. 651-676, 2000.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; VAN RIE, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 63, p.807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M; ZEIGLER, D. R. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

DAMGAARD, P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES JF, DELÉCLUSE A, NIELSEN-LE ROUX C (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, p. 23-40, 2000.

DANIEL, R. The Metagenomics of soil. **Nature**, v. 3, p. 471-478, 2005.

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999.

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

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409 – 433, 2003.

DUPRÉ, J.; O'MALLEY. A. Metagenomics and biological ontology. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 834-846, 2007.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULIS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FERRANDIS, M. D.; JUÁREZ-PÉREZ, V. M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 2, p.179-185, 1999.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501-533, 2002.

FERRÉ, J., VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM), p. 41–85. In J. Romeis, A. M. Shelton, and G. G. Kennedy (ed.), Integration of insectresistant genetically modified crops within IPM programs. **Springer Science and Business Media**, Dordrecht, The Netherlands, 2008.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis* biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley & Sons**, 2000. 350 p.

GUIDELLI-THULER, A. M.; DESIDÉRIO, J. A.; ABREU, I. L.; DAVOLOS, C. C.; ALVES, S. B.; POLANCZYK, R. A.; LEMOS, M. V. *Bacillus thuringiensis*, diversidade gênica em isolados lepidoptera-específicos. **Arquivos do Instituto Biológico (Impresso)**, v. 75, p. 411-420, 2008.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 383-446, 1998.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, Cambrige, v. 5, p. R245-249, 1998.

HANNAY, C. L. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. **Nature**, v. 172, n. 4387, p. 1004–1004, 1953.

HIGUCHI, M.; HAGINOYA, K.; YAMAZAKI, T.; MIYAMOTO, K.; KATAGIRI, T.; TOMIMOTO K.; SHITOMI Y.; HAYAKAWA T.; SATO R.; HORI, H. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to brush border membrane vesicles of midgut from Cry1Ac susceptible and resistant *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 147, n. 4, p. 716-724, 2007.

HOFTE, H; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

HUSZ, B. On the use of *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corn borer. **Inst. Corn Borer Invest. Sci. Rep.** v.2, p.99-110, 1929.

IBARRA, J. E.; DEL RINCON, M. C.; ORDUZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.9, p.5269–5274, 2003.

ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1). **Dainihon Sanshi Kaiho**, v. 114, p.1-5, 1901.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. **ISAAA Brief** n. 41. ISAAA, Ithaca, NY, 2012.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. **ISAAA Brief**, n 46. ISAAA: Ithaca, NY, 2013.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KIM, H. S.; LEE, D.W.; WOO, S. D.; YU, Y. M. Distribution, serological identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. **Current Microbiology**, v. 37, p.195-200, 1998.

KNIGHT, V.; SANGIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 446-458, 2003.

KONECKA, E.; BARANEK, J.; HRYCAK, A.; KAZNOWSKI, A. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. **Scientific World Journal**, n. 710501, 2012.

LECADET, M. M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V. C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.; THIERY, I. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, p.660-672, 1999.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, A. A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. New York: Wiley, p. 37-70, 1993.

LEVEAU, J. H. J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 279–300, 2007.

LORENZ, P.; LIEBETON, K.; NIEHAUS, F.; ECK, I. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenomes as a resource of novel functional sequence space. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 6, p. 572-577, 2002.

LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, p. 167-180, 2000.

MAC LEAN, D.; JONES, J. D. G.; STUDHOLME D. J. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 287-296, 2009.

MARTIN, P.; TRAVERS, R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2437-2442; 1989.

MEADOWS, M.P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S. BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Ed). *Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice*. **Chichester: John Wiley**, p. 193-220, 1993.

MEYER, F.; PAARMANN, D; SOUZA, M.D.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBA, M.; PACZIAN, T.; RODRIGUEZ, A.; STEVENS, R.; WILKE, A.; WILKENING, J.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **Bmc Bioinformatics**, v. 9, set. 2008.

MOHAMED, E. A. M.; ABE, M.; GHANEM, K. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; NAKAGAWA, Y.; EL-HELOW, E. R. Diversity of *Bacillus* Genotypes in soil samples from El-omayed biosphere reserve in Egypt. **Journal of Culture Collections**, v. 5, p. 78-84, 2007.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds) Controle Biológico. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p.163-200, 2000.

MONNERAT R. G.; LEAL-BERTIOLI S. C. M.; BERTIOLI D. J.; BUTT T. M.; BORDAT D. Caracterização de populações geograficamente distintas da traça-das-crucíferas por suscetibilidade ao *Bacillus thuringiensis* Berliner e RAPD- PCR. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 607-609, 2004.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Coord.). **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, p. 297-310, 1986.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, n. 1, p. 1-55, 1986.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PEDRINHO, E. A. N.; LEMOS E. G. M.; PEREIRA, R. M.; SCAQUITTO, D. C.; SILVEIRA, E. L.; VAL-MORAES, S. P.; ALVES, L. M. C.; WICKERT, E.; VALARINI, M. J. Avaliação do impacto do lodo de esgoto na microbiota do solo utilizando o gene 16S rRNA. **Arquivos do Instituto Biológico** (Impresso), v. 76, p. 447-452, 2009.

PIERCE, A. B. Genética: Um Enfoque Conceitual. 5ª Edição. Rio de Janeiro: **Editora Guanabara Koogan**, 2004.

POOPATHI, S.; KUMAR, K. A. Novel fermentation media for production of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. **Journal of Economic Entomology**, 96, 1039–1044, 2003.

PRABAKARAN G.; BALARAMAN, K. Development of a cost-effective medium for the large-scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. **Biological Control**, v. 36, p. 288–292, 2006.

PRIEST, F. G. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Netherlands: Kluwer Academic Publishers**, p. 1-22, 2000.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Madison, v. 14, n. 3, p. 303-310, 2003.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with nonculturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 955–962, 2007.

SENA, J. A. D.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009.

STALEY, J. **Microbial Diversity and the Biosphere**. 1998. Disponível em: <<http://www.bdt.org.br/oea/sib/staley>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics: Advances in ecology and Biotechnology. **FEMS Microbiology Letters**, Duisburg, v. 247, n. 2005, p. 105-111, 2005.

STEINHAUS, E.A. Insect pathology: Challenge, achievement and promise. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 6, n. 1, p. 9-16, 1960.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L. J.; MEDRADO-ROLDÁN, H.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; RODRÍGUEZ-PADILLA, C.; GÓMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-GUERRA, R. S. Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización em México, **Ciência UANL**, San Nicolás de los Garzas, v. 4, n. 2. p. 143-152, 2001.

TAYLOR R., TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v.6, p.1211-1217, 1992.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity – Magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

TORSVIK, V.; DAAE, F. L.; SANDAA, R. A.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Bergen, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

TRINGE, S. G.; RUBIN, E. M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. **Nature Reviews Genetics**, California, v. 6, n. 11, p. 805–814, 2005.

UNIPROT CONSORTIUM. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, nov. 2012.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Jaboticabal, v. 50, n. 8, p. 605-613, 2004.

VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 673-687, 2007.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 1998.

ZHANG, X.; GRIKO, N. B.; CORONA, S. K.; BULLA Jr., L.A. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R1 induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. **Comparative Biochemistry and Physiology**, USA, v. 149, n. 4, p. 581-588, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TABELA 1A. Dados da prospecção via programa BLAST para a amostra SCW - SUGARCANE WET.

Reads (QUERY)	Gene (SUBJECT)	Tamanho	% Positivos	Rank	Gaps	Query		Hit	
						Início	Fim	Início	Fim
(...)1103:13673:91223_2(...)	sp_Q45774_CR1BC_BACTM	44	52,27%	1	7	19	129	901	944
(...)1105:5911:68269_2(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	34	67,64%	1	3	4	96	562	595
(...)1105:16285:70345_2(...)	sp_Q9ZAZ6_CR1GB_BACTZ	33	54,54%	1	0	1	99	666	698
(...)1113:17122:44434_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	32	62,50%	1	0	1	96	799	830
(...)1115:10279:85460_1(...)	sp_Q45774_CR1BC_BACTM	21	80,95%	1	0	12	74	76	96
(...)1203:7380:26380_1(...)	sp_P0A368_CR1AA_BACTE	32	62,50%	1	0	414	445	2	97
(...)1205:4892:81037_2(...)	sp_Q9S597_C27AA_BACUH	23	73,91%	1	0	12	80	224	246
(...)1205:19848:84917_1(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	32	68,75%	1	0	3	98	921	952
(...)1209:8295:30726_1(...)	sp_P56956_C21AA_BACTU	25	72%	1	0	12	86	867	891
(...)1212:17190:76451_2(...)	sp_Q9XDL1_CR1ID_BACTU	27	66,66%	1	1	2	79	414	440
(...)1214:13702:20612_1(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	26	53,85%	1	0	4	81	807	832
(...)1216:10239:16803_1(...)	sp_Q57458_CR1EA_BACTX	27	51,85%	1	0	17	97	777	803
(...)1308:8805:48483_1(...)	sp_P16480_CR4AA_BACTI	22	72,72%	1	0	17	82	755	776
(...)1310:8816:100052_1(...)	sp_Q9ZNL9_CR9EA_BACTA	32	62,50%	1	0	2	97	110	141
(...)1311:9837:23060_1(...)	sp_Q45774_CR1BC_BACTM	21	80,95%	1	0	34	96	76	96
(...)1312:15546:62010_2(...)	tr_G8C881_G8C881_BACCE	31	70,97%	1	1	2	94	530	559

(...)1101:17459:13693_1/1101:17459:13693_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	3	122	392	430
(...)1101:7386:35488_1/1101:7386:35488_2(...)	sp_P56957_C22AA_BACTU	54	59,26%	1	1	16	174	289	342
(...)1104:5339:93733_1/1104:5339:93733_2(...)	sp_Q45712_CR5BA_BACTU	36	61,11%	1	4	16	111	91	126
(...)1105:18948:13160_1/1105:18948:13160_2(...)	sp_Q45712_CR5BA_BACTU	35	62,86%	1	2	24	128	27	59
(...)1110:19753:38894_1/1110:19753:38894_2(...)	tr_B2LWZ1_B2LWZ1_BACTU	45	55,55%	1	1	22	156	99	142
(...)1110:13207:68670_1/1110:13207:68670_2(...)	tr_B2LWZ1_B2LWZ1_BACTU	47	57,45%	1	1	6	146	95	140
(...)1113:15248:81633_1/1113:15248:81633_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	34	67,64%	1	2	2	103	65	96
(...)1115:10978:35054_1/1115:10978:35054_2(...)	sp_Q45744_CR3CA_BACTK	54	48,14%	1	3	21	182	309	359
(...)1115:21085:72500_1/1115:21085:72500_2(...)	sp_P05519_CR4BA_BACTI	25	72,00%	1	0	24	98	711	735
(...)1115:7777:81453_1/1115:7777:81453_2(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	44	61,36%	1	0	12	143	408	451
(...)1201:16785:82124_1/1201:16785:82124_2(...)	sp_O86170_C19BA_BACUH	39	53,85%	1	0	2	118	643	681
(...)1202:17720:12575_1/1202:17720:12575_2(...)	sp_Q45709_CR1IB_BACTE	45	60,00%	1	6	14	148	199	237
(...)1202:13933:88907_1/1202:13933:88907_2(...)	sp_Q45718_CR1HB_BACTM	47	44,68%	1	0	7	147	765	811
(...)1206:13018:18798_1/1206:13018:18798_2(...)	sp_P0A369_CR1AA_BACTS	34	70,59%	1	2	56	157	329	360
(...)1206:11602:63471_1/1206:11602:63471_2(...)	sp_Q9RMG3_CR2AD_BACTU	53	49,05%	1	1	4	159	520	572
(...)1206:10588:95873_1/1206:10588:95873_2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	26	69,23%	1	1	77	151	430	455
(...)1208:4593:59901_1/1208:4593:59901_2(...)	sp_O06014_CR9DA_BACTP	56	60,71%	1	4	16	171	250	305
(...)1209:4396:86493_1/1209:4396:86493_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	5	124	392	430
(...)1214:11569:36140_1/1214:11569:36140_2(...)	tr_B0YIU8_B0YIU8_BACTU	37	67,57%	1	0	40	150	98	134
(...)1214:7838:41894_1/1214:7838:41894_2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	50	50,00%	1	0	10	159	192	241
(...)1215:20165:90729_1/1215:20165:90729_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	76	47,37%	1	14	2	187	675	749
(...)1305:14966:6580_1/1305:14966:6580_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	47	51,06%	1	5	7	132	805	851
(...)1312:8177:84834_1/1312:8177:84834_2(...)	sp_P56957_C22AA_BACTU	53	60,38%	1	3	4	153	269	321

(...)1313:16692:50940_1/1313:16692:50940_2(...)	sp_Q45705_CR8BA_BACUK	34	64,71%	1	0	33	134	39	72
(...)1314:15261:36174_1/1314:15261:36174_2(...)	sp_Q9S597_C27AA_BACUH	37	62,16%	1	0	60	170	547	583
(...)1316:5192:83655_1/1316:5192:83655_2(...)	tr_M1QYU2_M1QYU2_BACTU	59	54,24%	1	9	4	180	96	145

TABELA 2A. Dados da prospecção via programa BLAST para a amostra SCD - SUGARCANE DRY

Reads (QUERY)	Gene (SUBJECT)	Tamanho	% Positivos	Rank	Gaps	Query		Hit	
						Início	Fim	Início	Fim
(...)1102:3163:22181_1(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	29	55,17%	1	0	1	87	799	827
(...)1103:7886:21665_1(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	32	53,13%	1	0	4	99	670	701
(...)1103:7886:21665_1(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	32	53,13%	2	0	4	99	686	717
(...)1103:7886:21665_1(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	32	53,13%	3	0	4	99	702	733
(...)1103:7886:21665_1(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	32	53,13%	4	0	4	99	718	749
(...)1110:7981:35562_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	26	61,54%	1	0	21	98	799	824
(...)1201:7923:19078_2(...)	sp_Q45705_CR8BA_BACUK	30	70,00%	1	0	10	99	998	1027
(...)1201:1932:78911_1(...)	sp_P56956_C21AA_BACTU	29	75,86%	1	0	5	91	907	935
(...)1211:3977:91822_2(...)	sp_P05068_CR1AC_BACTK	31	100%	1	0	3	95	1	31
(...)1212:19658:19990_1(...)	sp_Q45760_CR5AA_BACUD	30	60,00%	1	0	7	96	439	468
(...)1302:2476:68814_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	30	63,33%	1	4	4	93	808	833
(...)1308:19524:78393_1(...)	sp_Q45704_CR8AA_BACUK	20	80,00%	1	0	18	77	1018	1037
(...)1310:3273:51140_1(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	16	87,50%	1	0	18	65	293	308
(...)1313:5225:22601_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	16	87,50%	1	0	27	74	293	308
(...)1314:12146:81330_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	33	63,64%	1	4	2	100	804	832
(...)1101:15629:24060_1/1101:15629:24060_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	16	87,50%	1	0	23	70	293	308

(...)1101:8521:47933_1/1101:8521:47933_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	46	50,00%	1	0	6	143	681	726
(...)1101:17192:94799_1/1101:17192:94799_2(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	43	67,44%	1	0	34	162	854	896
(...)1102:14042:8835_1/1102:14042:8835_2(...)	sp_Q45704_CR8AA_BACUK	40	67,50%	1	0	2	121	48	87
(...)1102:20833:92531_1/1102:20833:92531_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	49	57,14%	1	2	21	167	663	709
(...)1102:20833:92531_1/1102:20833:92531_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	54	55,56%	2	2	6	167	674	725
(...)1102:20833:92531_1/1102:20833:92531_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	54	55,56%	3	2	6	167	690	741
(...)1103:5193:3030_1/1103:5193:3030_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	46	50,00%	1	0	30	167	681	726
(...)1103:15841:59799_1/1103:15841:59799_2(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	56	57,14%	1	7	2	169	106	154
(...)1104:20535:84898_1/1104:20535:84898_2(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	54	59,26%	1	2	2	163	40	91
(...)1105:3693:17090_1/1105:3693:17090_2(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	36	63,89%	1	0	56	163	759	794
(...)1105:14373:31631_1/1105:14373:31631_2(...)	sp_Q9S597_C27AA_BACUH	66	56,06%	1	4	1	186	705	770
(...)1106:18340:33247_1/1106:18340:33247_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	36	66,67%	1	4	49	156	802	833
(...)1107:6147:30802_1/1107:6147:30802_2(...)	sp_Q9ZAZ6_CR1GB_BACTZ	43	60,47%	1	3	29	148	286	328
(...)1107:18073:38773_1/1107:18073:38773_2(...)	sp_Q9X597_C26AA_BACTF	50	52%	1	0	2	151	1028	1077
(...)1107:8766:52983_1/1107:8766:52983_2(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	48	56,25%	1	6	2	145	388	429
(...)1108:14019:82759_1/1108:14019:82759_2(...)	tr_F6GPM3_F6GPM3_BACTU	49	51,02%	1	3	23	169	640	685
(...)1109:2473:79853_1/1109:2473:79853_2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	33	57,57%	1	0	36	134	403	435
(...)1109:6729:82815_1/1109:6729:82815_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	36	66,67%	1	4	28	135	802	833
(...)1109:19324:89369_1/1109:19324:89369_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	57	59,65%	1	1	1	171	664	719
(...)1109:19324:89369_1/1109:19324:89369_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	56	58,93%	2	1	4	171	681	735
(...)1109:19324:89369_1/1109:19324:89369_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	54	57,41%	3	1	4	165	697	749
(...)1110:14150:23705_1/1110:14150:23705_2(...)	sp_P0A374_CR1BA_BACTE	53	47,17%	1	0	13	171	257	309
(...)1110:18963:62813_1/1110:18963:62813_2(...)	sp_Q99031_CR9AA_BACTG	49	48,99%	1	1	1	144	226	274

(...)1110:1840:88598_1/1110:1840:88598_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	46	67,39%	1	2	5	142	663	706
(...)1111:12024:9449_1/1111:12024:9449_2(...)	tr_F6GPM3_F6GPM3_BACTU	49	51,02%	1	3	23	169	640	685
(...)1111:3008:17927_1/1111:3008:17927_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	45	51,11%	1	0	9	143	97	141
(...)1111:11085:25694_1/1111:11085:25694_2(...)	sp_O85805_CR1BE_BACTU	56	46,43%	1	4	9	164	1037	1092
(...)1111:6546:89367_1/1111:6546:89367_2(...)	sp_Q45712_CR5BA_BACTU	45	57,78%	1	0	41	175	591	635
(...)1112:16694:92654_1/1112:16694:92654_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	45	57,78%	1	2	36	164	941	985
(...)1114:3867:8215_1/1114:3867:8215_2(...)	sp_P56953_CR1CB_BACTG	57	52,63%	1	5	9	164	533	589
(...)1114:9642:41366_1/1114:9642:41366_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	36	66,67%	1	4	51	158	802	833
(...)1114:7925:61645_1/1114:7925:61645_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	37	156	392	430
(...)1114:15659:67793_1/1114:15659:67793_2(...)	sp_Q45710_C14AA_BACTS	44	50%	1	4	11	142	678	717
(...)1114:1422:85295_1/1114:1422:85295_2(...)	sp_Q45706_CR8CA_BACTP	43	60,47%	1	0	41	169	594	636
(...)1115:8915:94730_1/1115:8915:94730_2(...)	sp_P56957_C22AA_BACTU	56	44,64%	1	2	21	182	76	131
(...)1201:4108:28496_1/1201:4108:28496_2(...)	sp_O87905_C24AA_BACTJ	42	54,76%	1	9	50	148	577	618
(...)1202:17527:40474_1/1202:17527:40474_2(...)	sp_Q45712_CR5BA_BACTU	45	57,78%	1	0	1	135	591	635
(...)1203:14902:33510_1/1203:14902:33510_2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	26	65,38%	1	0	24	101	432	457
(...)1204:16433:75728_1/1204:16433:75728_2(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	41	53,66%	1	1	11	133	758	797
(...)1205:11590:38627_1/1205:11590:38627_2(...)	sp_Q45706_CR8CA_BACTP	40	65%	1	0	6	125	594	633
(...)1205:3312:70103_1/1205:3312:70103_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	60	48,33%	1	1	5	181	669	727
(...)1205:3312:70103_1/1205:3312:70103_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	60	48,33%	2	1	5	181	685	743
(...)1205:4706:94784_1/1205:4706:94784_2(...)	sp_P56953_CR1CB_BACTG	57	52,63%	1	5	8	163	533	589
(...)1206:13613:15529_1/1206:13613:15529_2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	26	65,38%	1	0	104	181	432	457
(...)1206:4867:59274_1/1206:4867:59274_2(...)	sp_P56957_C22AA_BACTU	49	55,10%	1	0	21	167	295	343
(...)1206:11614:71862_1/1206:11614:71862_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	36	66,67%	1	4	28	135	802	833

(...)1206:16497:77900_1/1206:16497:77900_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	46	50,00%	1	0	21	158	681	726
(...)1209:14897:82748_1/1209:14897:82748_2(...)	sp_Q9ZNL9_CR9EA_BACTA	35	62,86%	1	0	52	156	109	143
(...)1210:3663:7658_1/1210:3663:7658_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	47	48,94%	1	1	27	164	701	745
(...)1210:7049:85546_1/1210:7049:85546_2(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	33	66,67%	1	0	1	99	762	794
(...)1211:14392:98482_1/1211:14392:98482_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	46	50,00%	1	0	6	143	681	726
(...)1212:16303:27637_1/1212:16303:27637_2(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	29	55,17%	1	0	61	147	799	827
(...)1213:9617:26846_1/1213:9617:26846_2(...)	sp_P21733_YCR2_BACTK	49	59,18%	1	10	3	119	66	114
(...)1213:9617:26846_1/1213:9617:26846_2(...)	sp_P21733_YCR2_BACTK	48	60,42%	2	10	3	116	127	174
(...)1213:15300:33282_1/1213:15300:33282_2(...)	sp_Q45712_CR5BA_BACTU	45	57,78%	1	0	6	140	591	635
(...)1213:17365:89731_1/1213:17365:89731_2(...)	sp_O66377_CR1FB_BACTM	27	74,07%	1	0	73	153	440	466
(...)1213:13851:96369_1/1213:13851:96369_2(...)	sp_O32321_C20AA_BACUF	43	58,14%	1	0	31	159	234	276
(...)1214:1570:99168_1/1214:1570:99168_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	39	51,28%	1	2	28	144	680	716
(...)1214:1570:99168_1/1214:1570:99168_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	39	51,28%	2	2	28	144	696	732
(...)1214:1570:99168_1/1214:1570:99168_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	39	51,28%	3	2	28	144	712	748
(...)1302:17100:11841_1/1302:17100:11841_2(...)	sp_P0A376_CR1CA_BACTA	43	55,81%	1	6	30	158	417	453
(...)1302:18304:76381_1/1302:18304:76381_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	42	52,38%	1	1	3	125	803	844
(...)1304:2731:29139_1/1304:2731:29139_2(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	42	64,29%	1	0	5	130	493	534
(...)1305:17887:27638_1/1305:17887:27638_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	12	131	392	430
(...)1305:2045:30534_1/1305:2045:30534_2(...)	sp_Q45710_C14AA_BACTS	45	60,00%	1	0	4	138	984	1028
(...)1305:15604:45708_1/1305:15604:45708_2(...)	sp_Q9RMG3_CR2AD_BACTU	49	55,10%	1	0	2	148	174	222
(...)1305:16852:46785_1/1305:16852:46785_2(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	29	55,17%	1	0	46	132	799	827
(...)1305:5389:61078_1/1305:5389:61078_2(...)	sp_Q45744_CR3CA_BACTK	43	53,49%	1	2	20	148	344	384
(...)1305:7146:70014_1/1305:7146:70014_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	43	51,16%	1	0	9	137	684	726

(...)1306:15298:62922_1/1306:15298:62922_2(...)	sp_O32307_C19AA_BACTJ	41	51,22%	1	0	3	125	405	445
(...)1306:18431:94823_1/1306:18431:94823_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	36	58,33%	1	0	4	111	97	132
(...)1307:2151:29642_1/1307:2151:29642_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	52	50,00%	1	0	4	159	1150	1201
(...)1309:5883:90114_1/1309:5883:90114_2(...)	sp_O87905_C24AA_BACTJ	43	62,79%	1	3	4	132	57	96
(...)1310:13407:80741_1/1310:13407:80741_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	29	55,17%	1	4	15	101	814	838
(...)1314:3803:7465_1/1314:3803:7465_2(...)	sp_Q99031_CR9AA_BACTG	48	47,92%	1	6	15	140	987	1034
(...)1314:18332:23360_1/1314:18332:23360_2(...)	sp_Q45744_CR3CA_BACTK	51	56,86%	1	5	38	175	102	152
(...)1315:7977:3873_1/1315:7977:3873_2(...)	tr_B0YIU8_B0YIU8_BACTU	51	60,78%	1	4	16	156	98	148
(...)1315:9711:60287_1/1315:9711:60287_2(...)	sp_Q9ZAZ6_CR1GB_BACTZ	64	45,31%	1	5	3	179	250	313
(...)1315:10099:62986_1/1315:10099:62986_2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	33	57,57%	1	0	36	134	403	435
(...)1315:12540:71733_1/1315:12540:71733_2(...)	sp_Q9S597_C27AA_BACUH	46	52,17%	1	0	15	152	209	254
(...)1316:6101:67189_1/1316:6101:67189_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	16	87,50%	1	0	15	62	293	308
(...)1316:3114:77015_1/1316:3114:77015_2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	44	52,27%	1	7	19	129	901	944

TABELA 3A. Dados da prospecção via programa BLAST para a amostra FW - FOREST WET

Reads (QUERY)	Gene (SUBJECT)	Tamanho	% Positivos	Rank	Gaps	Query		Hit	
						Início	Fim	Início	Fim
(...)1104:16841:79142_2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	31	51,61%	1	2	8	94	777	807
(...)1109:6234:97618_1(...)	sp_Q45748_CR1HA_BACTU	32	56,25%	1	0	5	100	773	804
(...)1112:9965:41144_1(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	29	55,17%	1	4	16	90	808	836
(...)1112:14324:79071_1(...)	sp_Q57458_CR1EA_BACTX	27	62,96%	1	2	14	88	784	810
(...)1112:11719:85057_2(...)	sp_Q03748_CR1AE_BACTL	35	51,43%	1	3	1	96	781	815
(...)1113:6277:10862_1(...)	sp_Q45774_CR1BC_BACTM	22	72,73%	1	0	6	71	521	542
(...)1116:2791:13948_1(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	28	57,14%	1	0	10	93	781	808
(...)1202:8735:60387_1(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	27	55,55%	1	0	16	96	807	833
(...)1202:12038:76023_2(...)	sp_O66377_CR1FB_BACTM	30	63,33%	1	0	1	90	547	576
(...)1206:17704:94358_1(...)	tr_Q7RFQ7_Q7RFQ7_PLAYO	29	65,52%	1	0	9	95	98	126
(...)1208:4121:53350_1(...)	sp_Q45708_CR7AB_BACUK	26	73,08%	1	0	16	93	124	149
(...)1209:8945:42903_1(...)	sp_O32307_C19AA_BACTJ	33	81,82%	1	1	2	100	195	226
(...)1209:13499:66305_2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	31	54,84%	1	0	7	99	786	816
(...)1209:2798:77447_1(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	27	74,07%	1	0	3	83	762	788
(...)1210:19052:85768_1(...)	tr_M1QYU2_M1QYU2_BACTU	23	69,56%	1	0	4	72	218	240
(...)1212:4382:98503_1(...)	sp_Q45760_CR5AA_BACUD	30	70,00%	1	0	1	90	1023	1052

(...)1214:13255:63666_2(...)	sp_Q45757_CR6AA_BACTU	28	71,43%	1	0	13	96	265	292
(...)1215:10932:56583_1(...)	sp_O32307_C19AA_BACTJ	26	73,08%	1	0	8	85	525	550
(...)1215:12870:76265_2(...)	sp_Q45704_CR8AA_BACUK	24	79,17%	1	0	11	82	103	126
(...)1216:16335:77887_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	25	68,00%	1	0	8	82	457	481
(...)1301:5638:85356_1(...)	sp_O32307_C19AA_BACTJ	31	80,65%	1	0	8	100	193	223
(...)1304:14580:40129_1(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	30	73,33%	1	1	1	90	663	691
(...)1305:5268:28767_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	30	63,33%	1	4	3	80	809	838
(...)1311:13223:17315_1(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	16	87,50%	1	0	17	64	293	308
(...)1311:18313:39834_1(...)	sp_P0A378_CR2AA_BACTX	32	62,50%	1	0	2	97	337	368
(...)1313:11095:60586_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	26	53,85%	1	0	5	82	808	833
(...)1314:9689:97004_1(...)	tr_G3LT33_G3LT33_BACTU	21	90,48%	1	0	34	96	170	190
(...)1315:17037:67543_2(...)	sp_Q57458_CR1EA_BACTX	27	62,96%	1	2	12	86	784	810
(...)1316:20767:42151_2(...)	sp_O85805_CR1BE_BACTU	20	85,00%	1	0	2	61	370	389
(...)1104:7854:3891_1/1104:7854:3891_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	30	70,00%	1	0	18	107	762	791
(...)1105:16810:51296_1/1105:16810:51296_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	42	66,67%	1	1	1	126	663	703
(...)1108:8786:26537_1/1108:8786:26537_2(...)	sp_Q57458_CR1EA_BACTX	56	48,21%	1	1	2	166	1089	1136
(...)1111:12827:90985_1/1111:12827:90985_2(...)	sp_P0A381_CR3AA_BACTD	31	74,19%	1	0	67	159	506	536
(...)1113:15928:99925_1/1113:15928:99925_2(...)	sp_O32000_YOKG_BACSU	57	54,38%	1	2	16	180	242	298
(...)1115:3579:62494_1/1115:3579:62494_2(...)	sp_O87906_C25AA_BACTJ	43	54,89%	1	0	6	134	381	423
(...)1201:3126:58611_1/1201:3126:58611_2(...)	sp_P17969_CR3BA_BACTO	51	62,74%	1	1	2	154	161	210
(...)1209:4882:87350_1/1209:4882:87350_2(...)	tr_M1PXE3_M1PXE3_BACTU	60	51,67%	1	0	5	184	291	350
(...)1210:10610:24281_1/1210:10610:24281_2(...)	tr_B0YIU8_B0YIU8_BACTU	38	60,53%	1	0	19	132	98	135
(...)1215:9136:65143_1/1215:9136:65143_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	36	155	392	430

(...)1216:18685:8234_1/1216:18685:8234_2(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	24	75,00%	1	0	78	149	403	426
(...)1216:6414:75516_1/1216:6414:75516_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	29	68,96%	1	1	33	116	805	833
(...)1216:4498:95883_1/1216:4498:95883_2(...)	sp_Q99031_CR9AA_BACTG	55	57,73%	1	1	8	169	405	459
(...)1304:4897:9041_1/1304:4897:9041_2(...)	sp_O32000_YOKG_BACSU	57	54,38%	1	2	16	180	242	198
(...)1305:13357:54367_1/1305:13357:54367_2(...)	tr_M1QYU2_M1QYU2_BACTU	52	53,85%	1	0	13	168	95	146
(...)1305:8590:64460_1/1305:8590:64460_2(...)	sp_P56953_CR1CB_BACTG	41	60,97%	1	0	48	170	57	97
(...)1308:4003:51875_1/1308:4003:51875_2(...)	sp_Q45747_CR1DB_BACTU	46	65,22%	1	1	3	137	347	392
(...)1309:13521:74135_1/1309:13521:74135_2(...)	sp_Q03748_CR1AE_BACTL	45	60,00%	1	3	4	129	386	430
(...)1310:2214:48389_1/1310:2214:48389_2(...)	sp_O66377_CR1FB_BACTM	45	51,11%	1	5	4	138	381	420
(...)1313:15963:77818_1/1313:15963:77818_2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	42	66,67%	1	1	1	126	663	703
(...)1314:12354:69831_1/1314:12354:69831_2(...)	sp_Q57458_CR1EA_BACTX	36	47,22%	1	0	2	109	784	819
(...)1316:17787:90176_1/1316:17787:90176_2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	17	136	392	430

TABELA 4A. Dados da prospecção via programa BLAST para a amostra FD - FOREST DRY

Read (QUERY)	Gene (SUBJECT)	Tamanho	% Positivos	Rank	Gaps	Query		Hit	
						Início	Fim	Início	Fim
(...)1101:6379:21068_1(...)	sp_P0A374_CR1BA_BACTE	26	73,08%	1	0	8	85	335	360
(...)1101:3517:82006_1(...)	sp_Q03748_CR1AE_BACTL	32	100,00%	1	0	2	97	571	602
(...)1101:3517:82006_2(...)	sp_P0A368_CR1AA_BACTE	33	100,00%	1	0	2	100	537	569
(...)1102:4486:60156_2(...)	sp_P56957_C22AA_BACTU	26	69,23%	1	0	7	84	301	326
(...)1105:15949:2948_1(...)	sp_Q45730_C11BA_BACTJ	29	65,52%	1	0	1	87	374	402
(...)1105:2191:75062_2(...)	sp_Q03749_CR7AA_BACTU	30	66,67%	1	0	10	99	133	162
(...)1106:13123:90426_2(...)	sp_O85805_CR1BE_BACTU	28	64,28%	1	0	11	94	831	858
(...)1107:8429:94242_2(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	28	57,14%	1	0	2	85	781	808
(...)1109:6042:3820_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	25	68,00%	1	0	5	79	457	481
(...)1109:7634:92252_1(...)	sp_Q45710_C14AA_BACTS	32	62,50%	1	0	3	98	679	710
(...)1110:11804:82499_2(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	27	66,67%	1	0	10	90	1095	1121
(...)1111:19877:87631_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	22	63,64%	1	0	35	100	821	842
(...)1112:13252:30068_2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	31	64,52%	1	0	6	98	317	347
(...)1112:13614:42409_1(...)	sp_Q45712_CR5BA_BACTU	31	61,29%	1	0	7	99	914	944
(...)1113:5348:36208_1(...)	sp_Q9XDL1_CR1ID_BACTU	32	62,50%	1	0	4	99	268	299
(...)1115:12839:63064_1(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	31	54,84%	1	0	7	99	786	816
(...)1115:8094:68151_2(...)	tr_D9HPB0_D9HPB0_BACTU	28	75,00%	1	3	3	77	420	447

(...)1116:16421:53116_2(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	28	75,00%	1	0	17	100	424	451
(...)1116:4216:72214_2(...)	sp_Q45709_CR1IB_BACTE	33	78,79%	1	0	1	99	180	212
(...)1202:15114:11415_2(...)	tr_B0YIU8_B0YIU8_BACTU	27	74,07%	1	0	14	94	498	524
(...)1203:14663:42853_2(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	28	57,14%	1	0	9	92	781	808
(...)1207:11513:38954_2(...)	sp_Q45748_CR1HA_BACTU	29	65,52%	1	1	12	98	785	812
(...)1210:19025:37523_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	26	53,85%	1	0	2	79	813	838
(...)1211:3370:69605_1(...)	sp_O87404_CR1IC_BACTU	25	76,00%	1	0	25	99	362	386
(...)1211:18797:83809_2(...)	sp_Q45730_C11BA_BACTJ	28	60,71%	1	0	9	92	309	336
(...)1212:14741:31758_1(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	28	53,57%	1	0	3	86	795	822
(...)1213:11981:18115_1(...)	sp_Q9ZNL9_CR9EA_BACTA	24	70,83%	1	0	19	90	1084	1107
(...)1213:8663:55457_1(...)	sp_Q9S597_C27AA_BACUH	26	65,38%	1	0	10	87	737	762
(...)1213:18290:67079_2(...)	sp_Q45730_C11BA_BACTJ	29	65,52%	1	0	7	93	680	708
(...)1301:15321:52153_1(...)	sp_Q45746_CR1GA_BACTU	28	75,00%	1	0	17	100	424	451
(...)1302:19633:40996_1(...)	sp_P19415_CR1DA_BACTA	27	74,07%	1	0	15	95	408	434
(...)1302:8335:51573_1(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	33	66,67%	1	0	2	100	393	425
(...)1304:7469:11766_1(...)	sp_P0A371_CR1AB_BACTB	28	67,86%	1	0	4	87	196	223
(...)1305:7471:51037_2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	25	68,00%	1	0	5	79	457	481
(...)1307:12252:22337_2(...)	tr_M1QYU2_M1QYU2_BACTU	24	70,83%	1	0	14	85	217	240
(...)1308:14604:11677_1(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	24	75,00%	1	0	24	95	403	426
(...)1310:2883:58575_2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	20	60,00%	1	0	12	71	783	802
(...)1310:8071:91548_1(...)	sp_O66377_CR1FB_BACTM	30	63,33%	1	0	5	94	547	576
(...)1311:10338:71077_2(...)	tr_D9HPB0_D9HPB0_BACTU	31	61,29%	1	6	3	95	462	486
(...)1312:20509:51502_2(...)	sp_Q45730_C11BA_BACTJ	29	62,07%	1	0	3	89	374	402
(...)1314:14309:91747_2(...)	sp_Q45752_CR1IA_BACTK	33	66,67%	1	0	1	99	187	219

(...)1102:17097:91033 1/1102:17097:91033 2(...)	sp_Q45760_CR5AA_BACUD	47	61,70%	1	1	30	167	891	937
(...)1106:14114:101476 1/1106:14114:101476 2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	57	47,37%	1	1	2	169	670	726
(...)1109:16896:69383 1/1109:16896:69383 2(...)	sp_Q9ZAZ6_CR1GB_BACTZ	38	52,63%	1	4	22	135	776	809
(...)1110:2572:6334 1/1110:2572:6334 2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	43	55,81%	1	3	5	124	392	430
(...)1111:15731:48761 1/1111:15731:48761 2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	46	50,00%	1	0	41	178	681	726
(...)1112:10984:8147 1/1112:10984:8147 2(...)	sp_Q45706_CR8CA_BACTP	50	62,00%	1	1	3	152	62	110
(...)1112:15506:55681 1/1112:15506:55681 2(...)	tr_B0YIU8_B0YIU8_BACTU	38	60,53%	1	0	39	152	99	136
(...)1113:12843:70639 1/1113:12843:70639 2(...)	sp_Q03746_CR1FA_BACTA	36	55,55%	1	5	76	168	430	464
(...)1114:15911:40525 1/1114:15911:40525 2(...)	sp_Q45748_CR1HA_BACTU	50	56,00%	1	6	11	160	413	456
(...)1201:6636:36789 1/1201:6636:36789 2(...)	tr_B2LWZ0_B2LWZ0_BACTU	53	67,92%	1	1	2	160	16	67
(...)1203:2938:74488 1/1203:2938:74488 2(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	52	42,31%	1	0	4	159	783	834
(...)1206:2709:90221 1/1206:2709:90221 2(...)	sp_Q45760_CR5AA_BACUD	38	63,16%	1	0	60	173	946	983
(...)1207:7350:2679 1/1207:7350:2679 2(...)	sp_O85805_CR1BE_BACTU	41	58,54%	1	4	42	152	1131	1171
(...)1209:4475:3024 1/1209:4475:3024 2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	49	65,31%	1	1	24	167	576	623
(...)1209:6210:67520 1/1209:6210:67520 2(...)	sp_P19415_CR1DA_BACTA	47	46,81%	1	0	27	167	330	376
(...)1213:9661:51934 1/1213:9661:51934 2(...)	sp_P56955_CR5AC_BACTU	57	47,37%	1	1	15	182	670	726
(...)1213:5686:66734 1/1213:5686:66734 2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	62	46,77%	1	8	8	169	672	733
(...)1213:5686:66734 1/1213:5686:66734 2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	62	46,77%	2	8	8	169	688	749
(...)1214:19488:34893 1/1214:19488:34893 2(...)	sp_P19415_CR1DA_BACTA	56	57,14%	1	1	2	166	401	456
(...)1214:14844:94711 1/1214:14844:94711 2(...)	sp_Q9ZAZ6_CR1GB_BACTZ	38	52,63%	1	4	22	135	776	809
(...)1215:19326:29383 1/1215:19326:29383 2(...)	sp_P0A375_CR1CA_BACTE	42	54,76%	1	3	3	119	393	430
(...)1216:13561:7870 1/1216:13561:7870 2(...)	sp_Q45716_CR1JB_BACTU	41	56,10%	1	5	57	164	391	431
(...)1216:8631:30543 1/1216:8631:30543 2(...)	sp_Q03744_CR1AD_BACTA	52	42,31%	1	0	4	159	783	834
(...)1216:14304:45841 1/1216:14304:45841 2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	49	63,26%	1	1	6	149	481	527

(...)1216:3071:61499 1/1216:3071:61499 2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	31	58,06%	1	0	1	93	676	706
(...)1216:3071:61499 1/1216:3071:61499 2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	31	58,06%	2	0	1	93	692	722
(...)1216:3071:61499 1/1216:3071:61499 2(...)	sp_Q9ZIU5_C11BB_BACTV	31	58,06%	3	0	1	93	708	738
(...)1216:8265:79207 1/1216:8265:79207 2(...)	sp_Q45752_CR1IA_BACTK	49?	63,26%	1	0	30	176	251	299
(...)1303:16771:34299 1/1303:16771:34299 2(...)	tr_M1QYU2_M1QYU2_BACTU	59	50,85%	1	3	2	178	98	153
(...)1309:6903:4827 1/1309:6903:4827 2(...)	sp_Q45715_CR1KA_BACTM	34	58,82%	1	0	3	104	457	490
(...)1312:18995:98348 1/1312:18995:98348 2(...)	sp_O32000_YOKG_BACSU	57	54,38%	1	2	24	188	242	298
(...)1313:13086:55187 1/1313:13086:55187 2(...)	sp_P0A371_CR1AB_BACTB	48	50,00%	1	5	26	169	767	809
(...)1314:19469:13955 1/1314:19469:13955 2(...)	sp_Q9S515_CR1AG_BACTU	22	77,27%	1	0	76	141	483	504
(...)1315:15074:9631 1/1315:15074:9631 2(...)	sp_Q45738_CR1JA_BACTU	30	63,33%	1	0	47	136	542	571
(...)1315:14313:43104 1/1315:14313:43104 2(...)	sp_O32307_C19AA_BACTJ	38	65,79%	1	1	2	112	54	91