MARISE TANAKA SUZUKI

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LINHAGENS ENDOFÍTICAS DE *Bacillus thuringiensis* DE
MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

Dissertação (Mestrado) apresentada ao
Programa de Pós-graduação Interunidades
em Biotecnologia da Universidade de São
Paulo/ Instituto Butantan/ Instituto de
Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2006

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS
ENDOFÍTICAS DE *Bacillus thuringiensis* DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Crantz)

MARISE TANAKA SUZUKI

Dissertação (Mestrado) apresentada ao
Programa de Pós-graduação Interunidades
em Biotecnologia da Universidade de São
Paulo/ Instituto Butantan/ Instituto de
Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2006

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Suzuki, Marise Tanaka.

Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) / Marise Tanaka Suzuki. -- São Paulo, 2006.

Orientador: Itamar Soares de Melo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. Área de
concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Microbiologia ambiental / controle biológico.

Versão do título para o inglês: Isolation, identification and characterization of endophytic strains
of *Bacillus thuringiensis* from cassava (*Manihot esculenta* Crantz).

Descritores: 1. Microrganismos endofíticos 2. Controle biológico 3. *Bacillus thuringiensis* 4.
Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) 5. Gene *cry* 6. Diversidade microbiana I. Melo, Itamar
Soares de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB011/2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Marise Tanaka Suzuki.

Título da Dissertação: Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) .

Orientador(a): Itamar Soares de Melo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais,

Ikuro Suzuki e

Emília A. Tanaka Suzuki

Aos meus irmãos,

Érika Tanaka Suzuki

Kleber Tanaka Suzuki

*Por todo o apoio, carinho, amor, incentivo, compreensão da minha ausência e
constante torcida para o meu sucesso.*

*Ao meu irmão **Marcelo Tanaka Suzuki** (in memoriam) que muito me ajudou no início
dessa conquista e que agora, mesmo distante, tem me dado forças
para alcançar meus objetivos.*

Com muito amor e gratidão,

DEDICO

À Deise M. F. Capalbo,

Olivia M. N. Arantes e

Gislayne F. T. Vilas-Bôas.

*Minhas eternas amigas e orientadoras, tanto
em minha vida pessoal quanto profissional,
pelo incondicional incentivo e estímulo para
que eu prossiga na carreira científica.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao **Dr. Itamar Soares de Melo** pela orientação, confiança e oportunidade que foram dadas no decorrer deste trabalho.
- À **Dra. Deise M. F. Capalbo** pela importante co-orientação, gratificante amizade, paciência, dedicação e apoio incondicional durante todo o desenvolvimento desta dissertação.
- À **Profa. Dra. Olivia M. N. Arantes** pelos ensinamentos, dedicação, amizade e distinto exemplo que estão contribuindo de forma relevante em meu desenvolvimento profissional.
- Aos meus amigos **Dr. Laurival e Dra. Gislayne Vilas-Bôas** pelos conselhos dados para o início deste trabalho e palavras de conforto quando algo não dava certo.
- À **Dra. Rose G. Monnerat**, pelo apoio indispensável no desenvolvimento desta dissertação, pela atenção, valiosas orientações e a quem tenho profundo agradecimento.
- Ao Prof. Dr. **Wellington Luiz de Araújo**, pelas valiosas informações e sugestões fornecidas no início deste trabalho e incentivos e apoio nos momentos de dificuldade.
- À **equipe do laboratório de entomologia** da Universidade Estadual de Londrina–UEL, em especial ao **prof. Dr. José Lopes** por fornecer larvas de Diptera e materiais, além de me incentivar sempre.
- **Aos meus amigos de Laboratório de Microbiologia Ambiental:** Manoel A. Teixeira, Harrison Oliveira, Pablo Oliviera, Aldo R. L. Procópio, Francisco G. Costa, Francisco E. Costa, Flávia Nunes, Flávia Melo, Alex Moretini, Fernanda Domingues, César R. Terrasan, Ana Cândida T. Piza, João Paulo Tozzi, Elida Correa, Flávio Medeiros, Luciana Ávila, Luciana Reyes, Zayame V. Pinto, Cristina Marchesan, Amanda Berenschot, Pietro Agostini, Sarah

Canova, Mariana Lotto, Eduardo Gotardo e Eduardo Bernardo pela amizade, colaboração, e pelo agradável convívio. Em especial *Harllen S. Alves Silva* pela ajuda, incentivo, companheirismo e carinho.

– Ao ***Luis Alexandre Sereda***, pelo “bom humor”, amizade, apoio em informática e disposição em ajudar.

– À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – ***Centro Nacional de Pesquisa e Avaliação do Impacto Ambiental*** (Embrapa– Meio Ambiente), em Jaguariúna–SP, por ceder–me o Laboratório de Microbiologia Ambiental para a realização dos experimentos;

– Aos ***técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Produtos Naturais***: João Luiz da Silva, Roseli Nascimento, Mara Mendes, Rosângela Quintino e Márcia Parma, Elke, Cindi Camargo sempre dispostos a ajudar.

– Ao **Laboratório de Entomologia da EMBRAPA Meio Ambiente** pelo fornecimento de larvas de *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* e estrutura para a realização dos testes de toxicidade.

– À ***Maria Amélia de T. Leme*** e ***Victor Simão***, pela competência, simpatia e disposição.

– À ***todos os funcionários, estagiários e terceirizados da Embrapa Meio Ambiente***, por todo o incentivo e carinho, e pela grande amizade nesses anos;

– Às amigas ***Erica Soares e Patrícia*** (Cenargen), pela amizade e inestimável cooperação da amplificação dos genes.

- À equipe do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP, por estarem sempre dispostos a me ajudar e pela amizade.
- Aos professores do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia e à Universidade de São Paulo (USP/SP), pelos ensinamentos e oportunidades durante o curso.
- Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação em Biotecnologia (ICB-USP), *Eliane, Miqueias e Fábria*, por todos os serviços prestados.
- À amiga *Adelaide*, pelas caronas, presteza, conselhos e discussões do projeto.
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.
- À todos aqueles que de uma maneira ou outra, prestaram o seu apoio e incentivo para a realização desse trabalho.

*“O homem que venceu na vida é aquele que viveu bem,
riu muitas vezes e amou muito;
que conquistou o respeito dos homens inteligentes e o amor das crianças,
que preencheu um lugar e cumpriu uma missão,
que deixou o mundo melhor do que encontrou,
que procurou o melhor nos outros e
deu o melhor de si.”*

R.L. Stevenson

RESUMO

SUZUKI, M.T. Isolamento, identificação e caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2006.

Bactérias endofíticas provavelmente desenvolveram uma relação com planta hospedeira através de processos coevolucionários, podendo influenciar de alguma forma na fisiologia da planta. Na literatura, há muitos relatos sobre espécies de *Bacillus* endofíticos, no entanto, poucos se referem a espécie *B. thuringiensis* (Bt). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi isolar, identificar e caracterizar Bt de mandioca. Todos os isolados identificados como Bt produziram cristais pontuais e apenas um isolado, IIRAC22, produziu cristais amorfos maiores. Esse isolado apresentou genes *cry4A*, *cry4B* e *cry10* e toxicidade a larvas de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, evidenciando ser Bt var. *israelensis*. Todos os isolados produziram quitinase, sugerindo que elas podem ter ação controladora sobre fungos fitopatogênicos e insetos. Houve também produção de pectinase, enzimas envolvidas na penetração de planta hospedeira e estabelecimento como endófito. Esses Bt endofíticos podem levar ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos para controle de insetos.

Palavras chave: Microrganismo Endofítico, Controle Biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Manihot esculenta* Crantz, Perfil de Ácidos Graxos, genes *cry*

ABSTRACT

SUZUKI, M.T. Isolation, identification and characterization of endophytic strains of *Bacillus thuringiensis* from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). 2006. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2006.

Endophytic bacteria probably developed a relationship with their plant host through coevolutionary processes what could influence in the physiology of the plant. In the literature, there are many reports about endophytic *Bacillus* species, however, few reports cite endophytic *B. thuringiensis* (Bt). Thus, the aim of the present work was to isolate, identify and characterize Bt from cassava. All the isolates identified as Bt were able to produce punctual crystals, but only one isolate, IIRAC22, produced large amorphous crystals. This isolate presented *cry4A*, *cry4B* and *cry10* genes and toxicity against larvae of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*, evidencing to be Bt var. *israelensis*. All the isolates produced quitinase, suggesting that they can control phytopathogeni fungi and insects. There was also pectinase production, enzyme involved in the penetration of plant hosts and establishment as endophytes. These endophytic Bt can take to the development of biotechnological products for the control of insect.

Key-words: Endophytic Microorganism, Biological Control, *Bacillus thuringiensis*, *Manihot esculenta* Crantz, Fatty Acids Profile, *cry* genes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PÁGINAS

Figura 1– Processo inicial de esterilização superficial, em banhos sucessivos em álcool 70% e hipoclorito de sódio 2% e água destilada esterilizada	22
Figura 2– Isolamento por fragmentação de bactérias endofíticas de maniva de mandioca.....	23
Figura 3– Microscopia eletrônica de varredura dos esporos e cristais das linhagens endofíticas IIRAC22 e <i>B. thuringiensis</i> var <i>israelensis</i>	42
Figura 4– Microscopia eletrônica de varredura de cristais em forma de pontos do isolado endofítico MB3.2CR4b de <i>B. thuringiensis</i> obtidos de mandioca.....	43
Figura 5– Detecção, através de PCR, dos genes <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> endofítico isolado de mandioca (IIRAC22).	44
Figura 6– Atividade tóxica de isolados de <i>B. thuringiensis</i> endofíticos após 24 horas para larvas da ordem Diptera e 48 horas para ordem Lepidóptera	46
Figura 7– Halo de degradação para atividade pectinolítica em pH 5 de <i>B. thuringiensis</i>	47
Figura 8– Halo de degradação para atividade pecnolítica em pH 8 de <i>B. thuringiensis</i>	48

LISTA DE TABELAS

PÁGINAS

Tabela 1– Pontos de coleta das plantas de mandioca nos estados de São Paulo, Bahia e Amazonas	21
Tabela 2– Característica geral dos primers para o gene <i>cry3</i> , <i>cry4A</i> , <i>cry4B</i> e <i>cry10</i>	31
Tabela 3– Identificação, através de perfil de ácidos graxos, de bactérias endofíticas do gênero <i>Bacillus</i> isoladas de mandioca.....	37
Tabela 4– Detecção de atividade tóxica de cristais protéicos sintetizados por Bt endofíticos de mandioca contra larvas da ordem Diptera e Lepidoptera.....	45
Tabela 5– Quantificação da atividade pectinolítica por <i>B. thuringiensis</i> endofíticas de mandioca	47
Tabela 6– Quantificação da atividade quitinolítica por <i>B. thuringiensis</i> endofíticas de mandioca	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.1.1 Características Gerais	3
2.1.2 Distribuição, Dispersão e Persistência de <i>B. thuringiensis</i> no Ambiente	5
2.1.3 Utilização de <i>B. thuringiensis</i> na Agricultura	7
2.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	9
2.3 CULTURA DA MANDIOCA	15
3 OBJETIVOS	19
3.1 GERAL	19
3.2 ESPECÍFICO	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 COLETA DE MATERIAL VEGETAL	20
4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	21
4.2.1 Desinfestação Superficial dos Tecidos Vegetais	21
4.2.2 Isolamento por fragmentação	22
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO <i>Bacillus</i>	24
4.3.1 Coloração de Gram	24
4.3.2 Análise do Perfil de Ácidos Graxos da Membrana Celular (FAMES– Fatty Acid Methyl Ester)	25
4.4 CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>B. thuringiensis</i> ENDOFÍTICOS DE MANDIOCA	27
4.4.1 Caracterização Morfológica	27

4.4.1.1 Microscopia ótica por contraste de fase.....	27
4.4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	28
4.4.2 Caracterização Molecular.....	29
4.4.2.1 Extração de DNA	29
4.4.2.2 Amplificação do gene <i>cry</i>	30
4.4.3 Caracterização Toxicológica	32
4.4.3 Caracterização Fisiológica	33
4.4.3.1 Determinação da atividade pectinolítica.....	33
4.4.3.2 Determinação da atividade celulolítica.....	34
4.4.3.3 Determinação da atividade quitinolítica	35
5 RESULTADO.....	36
5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE MANDIOCA	36
5.2 CARACTERIZAÇÃO DE <i>B. thuringiensis</i> ENDOFÍTICO ISOLADOS DE MANDIOCA.....	40
5.2.1 Caracterização Morfológica	41
5.2.2 Caracterização Molecular.....	43
5.2.3 Caracterização Toxicológica	44
5.2.4 Caracterização Fisiológica	46
6 DISCUSSÃO.....	51
7 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICE 1 – MEIOS DE CULTURA.....	78
1.1 Meio TSA 10%.....	78
1.2 Meio Amido–Caseína–Ágar (ACA)	78
1.3 Meio TSBA®BBL	78
1.4 Meio Bacto–Peptona (BP)	78
1.5 Meio Luria e Bertani (LB)	80

1.6 Meio MP	80
1.7 Meio Carboximetilcelulose agar 1%.....	81
1.8 Meio TS 10%	81
APENDICE 2 – SOLUÇÕES, TAMPÕES E REAGENTES	82
2.1 Solução de Benomyl	82
2.2 Cristal Violeta (Reagente de Hucker)	82
2.3 Solução de Iugol.....	82
2.4 Solução de Etanol 95%.....	83
2.5 Solução de Safranina (contra corante)	83
2.6 Reagente de saponificação	83
2.7 Reagente de metilação	83
2.8 Reagente de extração	84
2.9 Reagente de lavagem	84
2.10 Tampão TE.....	84
2.11 Solução de Tris-HCl 1M.....	84
2.12 Solução de EDTA 0,5 M (pH 8,0)	85
2.13 Solução de NaCl 5M	85
2.14 Solução estoque de dNTP's.....	85
2.15 Gel de agarose 1,0 %.....	85
2.16 Solução estoque de brometo de etídio.....	86
2.17 Solução de vermelho congo	86
2.18 Solução de NaCl 1M.....	86

1 INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) representa o principal agente de controle biológico, sendo responsável por 95% do mercado mundial de biopesticidas. A sua atividade entomopatogênica está relacionada à produção de corpos de inclusão cristalinos, compostos por uma ou mais proteínas conhecidas como δ -endotoxina, altamente específicas para larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera, Diptera, Homoptera e outros invertebrados. Além da alta especificidade, essa bactéria é inócua à maioria dos animais e não poluente, pois não atinge a fauna e nem a flora.

O constante isolamento de *B. thuringiensis* a procura de toxinas é devido ao significativo número de pragas ainda não controlado pela proteína Cry, bem como pela possibilidade de resistência de insetos alvos às linhagens utilizadas como bioinseticida.

Isolar linhagens endofíticas de Bt tem especial atenção devido à sua capacidade de atuar no controle de larvas de insetos que se alimentam e/ou colonizam o interior de plantas, aumentando o potencial de utilização deste microrganismo dentro do contexto do Manejo Integrado de Pragas, além de poder atuar na proteção da planta contra patógenos, na aceleração da emergência de plântulas e aumento do seu crescimento e desenvolvimento, na produção de fitormônios e outros compostos de interesse biotecnológico.

Sabe-se que a distribuição de *B. thuringiensis* é bem ampla, podendo ser encontrado em insetos mortos e vivos, detritos, solos, superfície foliar, produtos estocados, entre outros. No entanto, relatos na literatura sobre a presença dessa bactéria no interior de tecidos vegetais têm sido poucos. Por tanto, o presente trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar linhagens de Bt endofíticos de variedades comerciais e etnovariedades de mandioca mantidas por pequenos agricultores e tribos indígenas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus thuringiensis*

2.1.1 Características Gerais

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, mesófila e quimioheterotrófica. Possuem forma de um bastonete com dimensões que se aproximam de 1,1µm de largura por 4,0µm de comprimento, sendo capazes de se movimentar devido à presença dos flagelos peritríquios.

Quando em condições ambientais desfavoráveis, a divisão celular de Bt é interrompida. Inicia-se o ciclo de esporulação típico dos bacilos, gerando esporos elipsoidais localizados na região central ou paracentral da célula. Simultaneamente ao processo de esporulação, ocorre produção de uma inclusão cristalina (característica de cada variedade de Bt) a qual é tóxica a larvas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e ainda nematóides e ácaros (FEITELSON *et al.*, 1992 e FEITELSON, 1994). Essa inclusão cristalina também pode ser chamada de proteína Cry formada por polipeptídios denominados de δ -endotoxina (DEAN, 1984 E HANNAY & FITZ-JAMES, 1995) que é liberada com o esporo no momento da lise celular.

Segundo ARANTES *et al.* (2002), *B. thuringiensis* apresenta, na maioria das subespécies, um conjunto de plasmídios que varia em número e tamanho. Com

relação ao tamanho, este pode ser dividido em 2 grupos: grandes plasmídios (30MDa) e pequenos plasmídios (<10MDa).

O cristal protéico, quando sintetizado, apresenta-se na forma não patogênica (inativa) e é denominado de pró-toxina. Para torná-lo tóxico é necessário ativá-lo. SCHNEPF *et al.* (1998) ressaltam que o modo de ação das proteínas Cry depende de algumas fases. Inicialmente, a larva do inseto suscetível deve ingerir o cristal protéico para que este, em seguida, seja solubilizado no intestino médio. Esta solubilização é decorrente do pH alcalino do intestino do inseto. Após a solubilização, as proteínas são digeridas pelas proteases do intestino médio, principalmente por tripsinas, liberando a toxina na forma ativa que se liga com alta afinidade aos receptores na membrana apical das células do intestino do inseto suscetível. A toxina ativa, por inserção na bicamada lipídica da célula alvo, induz à formação de poros inespecíficos ou canais iônicos, provocando uma quebra no balanço osmótico da célula levando à lise da mesma e paralisia do intestino.

Segundo CRICKMORE *et al.* (1998), houveram duas propostas para classificação do gene *cry* de *B. thuringiensis*. A primeira classificação, organizada através de algarismos romanos, era baseada na seqüência de aminoácidos dos seus produtos e na sua especificidade de ação, sendo então, dividido em quatro grupos: *cryI* (proteína tóxica a Lepidoptera), *cryII* (proteína tóxica a Lepidoptera e Diptera), *cryIII* (proteína tóxica a Coleoptera) e *cryIV* (proteína tóxica a Diptera).

A segunda classificação ocorreu devido ao avanço da biologia molecular, quando houve o aparecimento de vários outros genes *cry*, gerando muitas exceções na classificação. Esta nova classificação (organizada em números arábicos) é baseada somente na homologia da sequência de aminoácidos codificados pelos genes, e assim a proteína é definida quando a inclusão protéica parasporal é tóxica a um organismo alvo, ou quando a proteína possui similaridade de sequência com as proteínas Cry já descritas (CRICKMORE *et al.*, 1998). Atualmente há mais de 250 genes *cry* identificados, em 40 classes com subdivisões (<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/>).

2.1.2 Distribuição, Dispersão e Persistência de *B. thuringiensis* no Ambiente

A distribuição de *Bacillus thuringiensis* é bem ampla, ocorrendo em locais como solo, produtos estocados, plantas, alguns lugares mais raros como pássaros, morcegos e lagoas. (BERNHARD *et al.*, 1997), insetos mortos e vivos (VILAS-BÔAS *et al.*, 1998; SUZUKI, *et al.*, 2004) e no interior de plantas (MONNERAT *et al.*, 2003).

Através dos estudos de prospecção de linhagens, MEADOWS (1993) formulou três hipóteses para explicar a distribuição cosmopolita de *B. thuringiensis* e seu habitat. Na primeira hipótese, essa bactéria seria um entomopatógeno. Ser

natural do filoplano de árvores decíduas e coníferas reforça a segunda hipótese. A terceira está na expectativa de que esta bactéria seja um microrganismo de solo.

De acordo com a primeira hipótese, seria improvável a utilização de grandes quantidades de energia e nutrientes durante a esporulação para a formação de um cristal que não apresentasse um grande valor adaptativo. Como o esporo e o cristal liberados por uma única célula tendem a permanecer juntos no ambiente, após a ingestão por uma larva de inseto susceptível, haveria a ativação de δ -endotoxina, levando o inseto à morte. Tal fato proporcionaria a germinação do esporo e conseqüente multiplicação das células vegetativas e troca de material genético, desde que haja especificidade de hospedeiro (THOMAS *et al.*, 2000, VILAS-BÔAS *et al.*, 2000 e SUZUKI *et al.*, 2004).

A segunda hipótese é sustentada por um estudo realizado por SMITH & COUCHE (1991), que encontraram grandes quantidades de *B. thuringiensis* em uma série de espécies arbóreas, em frequências bastante altas para serem decorrentes apenas da disseminação pelo vento ou pela chuva. De acordo com estes autores, o solo seria apenas um reservatório durante o inverno quando as chuvas caem, sendo o filoplano o verdadeiro habitat natural de Bt.

A terceira hipótese considera que o habitat natural de Bt seja o solo. Germinação dos esporos é descrita por vários autores (PETRAS & CASIDA, 1985 e AKIBA, 1986), mas apenas em solo esterilizado. Em todos os casos a germinação foi dependente de umidade, adição de nutrientes e neutralidade do pH, além do tipo de

solo e linhagem. No entanto, trabalhos recentes têm mostrado que os esporos de Bt não podem germinar em solo não esterilizado (VILAS-BÔAS *et al.*, 1998, 2000) e que em solo não esterilizado a morte de células vegetativas inoculadas é maior do que em solo esterilizado (THOMAS *et al.*, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003). Esta queda pode ser devido à inabilidade de *B. thuringiensis* se multiplicar, provavelmente por não ser adaptado a sobreviver como um membro ativo de comunidades microbianas de solo, permanecendo somente na forma de esporos (ARANTES *et al.* 2002) ou segundo OHANA *et al.* (1987), essa baixa persistência do *B. thuringiensis* é devida à adsorção da suspensão esporo-cristal nas partículas de silte. Nesse caso, o solo atuaria como um reservatório natural dos esporos.

2.1.3 Utilização de *B. thuringiensis* na Agricultura

B. thuringiensis foi descoberto no início do século XX e a partir da década de 20 começou a ser produzido em grandes quantidades visando o controle de insetos (VAN FRANKENHUYSEN, 1993).

A eficácia e a especificidade das cepas de Bt e suas toxinas no controle de insetos praga, favoreceram a formulação de biopesticidas à base deste patógeno e, desde o primeiro produto lançado da França em 1938, mais de 100 formulações foram colocadas no mercado mundial, sendo atualmente responsáveis por mais de 90% do faturamento do bioinseticidas (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Na América do Norte, produtos a base de Bt são muito utilizados para o controle de pragas florestais, principalmente: *Lymantria díspar*, *Choristoneura fumiferana* e *C. occidentalis*. Na Austrália, esse bioinseticida controla pragas das culturas de algodão, plantas frutíferas, ornamentais, fumo, entre outras (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000; VAN FRANKENHUYZEN, 2000). Produtos formulados com Bt são muito utilizados em cerca de um milhão de hectares contra pragas de grandes culturas, florestas e hortaliças na China. No Egito, essa bactéria controla principalmente pragas do algodão (SALAMA & MORRIS, 1993).

América Latina, Cuba e México lideram a utilização dos bioinseticidas a base de Bt, especialmente para o controle de pragas nas culturas do algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho e pastagens. No Brasil, cerca de 30 pragas de importância agrícola e mosquitos vetores de doenças são controlados por Bt (POLANCZYK & ALVES, 2003).

Até os dias atuais, a aplicação direta dos cristais e esporos de Bt representa a principal forma de utilização das proteínas Cry. Apesar da crescente utilização de forma direta desta bactéria como agente de controle biológico, GELERNTER & SCHWAB (1993); VAN FRANKENHUYSEN (1993) e NAVON (2000) afirmam que diversos fatores limitam a utilização dos referidos biopesticidas: o seu custo, que na maioria das vezes é superior aos dos inseticidas químicos; a baixa persistência em campo da maioria das formulações; o baixo espectro de ação; dificuldade na

determinação da época correta de aplicação desse bioinseticida e incapacidade dos cristais de δ -endotoxina penetrarem no interior das plantas ou de raízes.

As desvantagens da aplicação direta de Bt levaram ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos obtidos a partir da transferência de genes *cry* para plantas ou outros microrganismos (SALLES & BALDANI, 1998).

2.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Embora tenham sido descritos a partir do século XIX, os microrganismos endofíticos só receberam atenção há pouco mais de 20 anos, quando verificou-se que eles possuem capacidade de proteger seus hospedeiros contra pragas e até herbívoros domésticos, como, por exemplo, ovinos e bovinos (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Endófitos são todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, tecidos vegetais das partes aéreas, sem causar danos à planta hospedeira (PETRINI, 1991) ou de forma mais prática, microrganismos isolados de tecidos vegetais desinfestados superficialmente ou isolados de partes internas das plantas (HALLMANN *et al.*, 1997), e que não causam danos ao seu hospedeiro. Mais recentemente, endófitos foram definidos como sendo todo

microrganismo capaz de colonizar internamente os tecidos da planta hospedeira, sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis (AZEVEDO *et al.*, 2000).

A origem, forma de penetração, colonização e transmissão de bactérias endofíticas são muito discutidas. Elas podem ser provenientes de sementes, da rizosfera, do filoplano e de material propagado vegetativamente (MCINROY & KLOPPER, 1995; HALLMANN *et al.*, 1997; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998). Sua penetração pode ocorrer pelos estômatos, ferimentos, áreas de emergência laterais das raízes e podem produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos vegetais, sendo este um possível mecanismo de penetração (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997; SHISHIDO *et al.*, 1999 e MCCULLY, 2001). Após a sua entrada, podem se estabelecer em tecidos específicos ou colonizar sistematicamente a planta hospedeira (HUREK *et al.*, 1994; QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997).

O fato dessas bactérias serem capazes de colonizar os tecidos internos das plantas, confere vantagens sobre outros microrganismos por poderem sobreviver em um ambiente mais uniforme onde são menos afetadas pela temperatura, potencial osmótico e radiação ultra violeta (LODEWYCKX *et al.*, 2002).

As interações endófitos/plantas ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que

podem conferir diversas vantagens às plantas tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993). Em alguns casos, eles também podem acelerar o aparecimento da muda e promover o estabelecimento da planta sobre diversas condições (CHANWAY, 1997), além de aumentar o crescimento e desenvolvimento da planta (BENT & CHANWAY, 1998).

Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos, as bactérias endofíticas apresentam grande potencial para o controle biológico (HALLMANN *et al.*, 1997). Este controle pode ser resultante de diversos mecanismos: competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira; produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN *et al.*, 1997; BACON & HILTON, 2002 e TAECHOWISAN *et al.*, 2003); indução de resistência sistêmica (M'PIGA *et al.*, 1997; BENHAMOU *et al.*, 1998; LODEWYCKX *et al.*, 2002) ou produzindo enzimas (quitinases ou celulases) que degradam a parede celular de fungos patogênicos (PLEBAN *et al.*, 1997; EL-TARABILY, 2003).

Atualmente, diversas espécies de plantas tiveram sua microbiota endofítica estudada e os gêneros mais comumente isolados incluem: *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Xanthomonas* e *Enterobacter* (HALLMANN *et al.*, 1997). O gênero *Bacillus* também foi isolado de raiz, caule e folha de mandioca (TEIXEIRA, 2004), de plantas de citrus cultivadas no estado de São Paulo e Minas Gerais (ARAÚJO

et al., 2002), de xilema de raízes de *Citrus jambhrii*, vulgarmente conhecido como limão (GARDNER *et al.*, 1982; GARDNER *et al.*, 1985; LIMA *et al.*, 1994; ARAÚJO *et al.*, 2001), de raízes de beterraba açucareira (JACOBS *et al.*, 1985), de raízes, caule e flores de plantas de algodão (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990; MONNERAT *et al.*, 2003), hastes de milho (MCINROY & KLOEPPER, 1995), de raiz e caule de café (NUNES, 2004), entre outros.

Em mandioca, TEIXEIRA (2004) observou que o gênero *Bacillus* representou mais de 57% no estado de São Paulo, 25% no Amazonas e 39% na Bahia do total de bactérias endofíticas identificadas. Do total de isolados do gênero *Bacillus*, 60% foram pertencentes ao grupo *B. cereus*, 16,3% à espécie *B. pumilus* e 9,0% à espécie de *B. megaterium*. Os outros 18,4% foram distribuídos, com pequenas diferenças, entre as espécies *B. lentimorbus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus* e *B. atrophaeus*.

Apesar de muitas bactérias do gênero *Bacillus* terem sido isoladas, relatos na literatura sobre a presença de Bt em tecidos vegetais são poucos. TEIXEIRA (2004), ao estudar a diversidade de bactérias endofíticas em mandioca de diferentes regiões do Brasil, identificou 15 isolados de *B. thuringiensis*. BAI *et al.* (2002) encontraram apenas uma cepa de Bt em nódulo de soja e MCINROY & KLOEPPER (1995) detectaram a presença de 11 em algodão e milho. MONNERAT *et al.* (2003) isolaram 15 estirpes de *B. thuringiensis*, dentre elas, 6 se mostraram tóxicas a larvas de *Anticarsia gemmatilis* e *Spodoptera frugiperda*. Ao determinar o peso molecular de

proteínas através de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), encontraram-se proteínas do tamanho compatível com as toxinas efetivas a lepidópteros (130kDa) e a análise molecular confirmou a presença dos genes do grupo *cryI*, codificadores das toxinas ativas a lepidópteros.

Com o auxílio da engenharia genética, novas formas de controle biológico vêm sendo desenvolvidas. Atualmente, dentro da linha de bactérias geneticamente modificadas, vêm sendo realizados estudos para a transferência e expressão do gene *cry* de *B. thuringiensis* para bactérias endofíticas. O exemplo clássico da utilização de microrganismos alterados geneticamente no controle de pragas é o da bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, na qual foi introduzido o gene da endotoxina tóxica a broca do milho (*Ostrinia nubilalis*). A bactéria com o gene de interesse foi eficiente no controle da praga, não alterou as qualidades químicas e agronômicas da planta hospedeira e não reduziu a capacidade da bactéria em colonizar hastes de milho (FAHEY *et al.*, 1991; TOMASINO *et al.*, 1995). Foi constatado também que este endófito engenheirado não foi capaz de sobreviver no solo, aumentando a possibilidade de sua utilização, visto que reduz riscos ambientais (TESTER, 1992).

Um outro exemplo é a utilização de *Pseudomonas fluorescens* e *Herbaspirillum seropedicae* endófito de cana-de-açúcar para o controle da broca da cana-de-açúcar (*Eldana saccharina*). Nesse experimento, foi verificado que o controle dessa broca foi mais eficiente quando duas espécies de bactérias

endofíticas foram introduzidas na planta hospedeira, uma espécie com o gene *cry1Ac7* de Bt e outra bactéria com o gene *chiA* que expressa uma enzima que degrada o exoesqueleto da lagarta, composto de quitina (DOWNING *et al.*, 2000).

Existem também bactérias diazotróficas como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* que colonizam os tecidos das raízes e parte aérea da cana-de-açúcar (SALLES, 1998). Essas espécies possuem características que favorecem o seu uso como vetores, como a capacidade de colonizar endofiticamente os tecidos de plantas, permitindo o controle de pragas que se alimentam dos tecidos internos; a baixa taxa de sobrevivência no solo, que dificulta a transferência dos genes introduzidos para outros microrganismos; e a faixa restrita de hospedeiro (BALDANI *et al.*, 1997).

Pragas como *o Migdolus fryanus*, um coleóptero de ocorrência restrita à América do Sul e que foi responsável por prejuízos na ordem de U\$45 milhões de dólares em 1992 (BENTO *et al.*, 1995) e *Diatraea saccharalis*, um lepidóptero que também tem causado grandes prejuízos à lavoura canavieira, são exemplos de insetos de difícil controle e que podem ter sua população diminuída pelo uso de bactérias endofíticas transgênicas.

2.3 CULTURA DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

A mandioca é uma planta dicotiledônea da família *Euphorbiaceae* e do gênero *Manihot*. Este gênero compreende várias espécies, das quais se destacam, do ponto de vista econômico, a *M. utilissima* Pohl (sinonímia da espécie *M. esculenta* Crantz) e a *M. dulcis* Pax. A principal diferença botânica existente entre estas duas espécies parece residir no fruto que, na primeira, é alado e na segunda, é liso.

Segundo dados da Food and Agriculture Organization (FAO), em 2003, a produção mundial de mandioca foi de aproximadamente 187 milhões e 700 mil toneladas ocupando uma área de 17 milhões e duzentos mil hectares, sendo que no Brasil, a produção foi de aproximadamente 22 milhões e 350 mil toneladas numa área de 1 milhão e 665 mil hectares. Este montante de produção faz com que o Brasil seja um dos principais produtores mundiais da cultura, perdendo em termos de produção apenas para a Nigéria. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostram que em 2002, o estado do Pará foi o maior produtor nacional de mandioca com uma produção de 17,90%, seguido da Bahia (17%), Paraná (14,98%), Rio Grande do Sul (5,53%) e Maranhão (4,57%) (EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL, 2004).

A importância econômica da cultura está na produção de raízes tuberosas e feculentas que são utilizadas na alimentação de humanos e animais, na

fabricação de produtos alimentícios diversos e na produção de álcool. Hoje em dia, esta cultura é explorada em todo o território brasileiro, em todos os países sul e centro-americanos e nas Antilhas. A mandioca é também cultivada em Java, Filipinas, Ceilão, Tailândia, em grande parte da África e em Madagascar, onde esta cultura é a base alimentar para cerca de 500 milhões de pessoas (COSTA *et al.*, 2003).

Além da reconhecida importância social e econômica como cultura alimentar e de aplicação industrial, o Brasil é considerado o principal centro de diversidade (ROGERS & APPAN, 1973) e a Amazônia, o provável centro de origem da espécie (ALLEM, 1994). Os índios já cultivavam a mandioca por ocasião do descobrimento do Brasil.

No Brasil, a mandioca está distribuída em sete bancos ativos de germoplasma, demonstrando a grande diversidade genética desta cultura (COSTA *et al.*, 2003). A biodiversidade representa um importante bem socioeconômico e, dentro deste contexto, a Amazônia configura-se como um grande depositário de recursos genéticos de mandioca. Nos últimos 25 anos, tem se intensificado a preocupação com a conservação de recursos genéticos *in situ* manejados por populações ou comunidades tradicionais e indígenas no mundo. Isto se deve ao potencial que as espécies e variedades locais possuem para a indústria e agricultura, sendo atualmente de importância estratégica para todos os países do mundo (MARTINS, 1994).

Mandarová, ácaros, percevejo de renda, mosca branca, mosca do broto, broca do caule, cupins e formigas são algumas das pragas mais comuns encontradas na cultura da mandioca. Mandarová, cientificamente denominado de *Erinnyis ello* (L., 1758) e *E. alope* (DRURY, 1773), são pragas de maior importância para a cultura de mandioca por causar severo desfolhamento, podendo ocasionar a morte das plantas jovens. Esse inseto é da ordem Lepidoptera e pode ser controlado por meio de aplicações de inseticidas à base de Bt ou então, *Baculovirus erinnyis*. Os ácaros, *Mononychellus tanajoa* (BONDAR, 1938) e *Tetranychus cinnabarinus* (BOISDUVAL, 1867), também são considerados pragas severas na cultura da mandioca. Geralmente são controlados por insetos da ordem Coleoptera, diversos ácaros benéficos da família *Phytoseiidae* e pelo fungo *Neozygites* sp. (CONCEIÇÃO, 1981).

Relatos sobre a presença de microrganismos na cultura de mandioca é muito restrito. HOWELER *et al.* (1987) e BALOTA (1994) acreditam que fungos micorrízicos arbusculares associados a raízes e bactérias diazotróficas ou promotoras do crescimento de plantas podem estar associados ao fato da mandioca apresentar baixa eficiência na absorção de nutriente quando cultivadas em solução nutritiva se comparado a condições de campo.

TEIXEIRA (2004), ao avaliar a diversidade bacteriana endofítica de variedades comerciais e etnovariedades de mandioca mantidas por pequenos agricultores e tribos indígenas, encontrou 48 espécies bacterianas endofíticas pertencentes a 27 gêneros. *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*,

Salmonella, *Stenotrophomonas* e *Serratia* foram os gêneros identificados mais freqüentes. Nesse mesmo trabalho, TEIXEIRA (2004) verificou que as bactérias endofíticas de mandioca colonizam em todos os tecidos da planta (42,4% do tecido radicular, 43% de caule e 14,6% de folhas).

A mandioca tem evoluído primariamente em adaptação aos sistemas de cultivo de subsistência onde o rendimento por unidade de área não é a maior preocupação; mesmo neste sistema a mandioca está se tornando uma cultura de grande importância comercial. Tal fato exige a presença de novos genótipos com a expectativa de maior produtividade, aumento no controle de pestes e doenças, que podem resultar de um cultivo intensivo e a necessidade de novas características em termos de qualidade para atender as demandas do mercado (WENHAM, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar a diversidade de *B. thuringiensis* nos tecidos internos de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) coletadas de áreas comerciais no estado de São Paulo (SP) e de etnovariedades provenientes dos estados do Amazonas (AM) e Bahia (BA).

3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias endofíticas em variedades comerciais e etnovariedades de mandioca mantidas por agricultores e índios dos estados de São Paulo, Amazonas e Bahia.
- Identificar bactérias do gênero *Bacillus* isolados de mandioca entre os isolados endofíticos.
- Caracterizar morfológica, molecular e fenotipicamente isolados com alta similaridade no perfil de ácidos graxos da membrana bacteriana a *B. thuringiensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE MATERIAL VEGETAL

No estado de São Paulo, as coletas foram realizadas em Araras e Iêpe, áreas consideradas importantes na produção da mandioca (Dados fornecidos pelos técnicos da CATI–Campinas). No primeiro município, as plantas se destinam ao consumo humano enquanto que no segundo a finalidade de produção é a industrialização. As variedades coletadas foram IAC 12.829 e IAC 576–70.

No estado da Bahia, plantas de etnovariedades selvagens foram coletadas no Parque Nacional Monte Pascoal localizado no município de Porto Seguro. Nesta região não é utilizado nenhum tipo de agrotóxico no cultivo da mandioca, embora no preparo da terra as queimadas ainda façam parte da rotina agrícola.

As coletas no estado do Amazonas foram realizadas na região de Autazes, em quatro pontos diferentes, sendo que em dois deles foram coletadas etnovariedades de mandioca mansa conhecida popularmente por maca e nos outros a variedade de mandioca brava.

Os pontos de coleta nos diferentes estados são apresentados na Tabela 1.

As plantas foram mantidas a baixa temperatura e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente–Jaguariúna (SP).

Tabela 1 – Pontos de coleta das plantas de mandioca nos estados de São Paulo, Bahia e Amazonas.

Local de coleta	Ponto do GPS	Latitude	Longitude
Araras – SP	S – 22°25'14,0"	22 21' 26,7	47 23' 04,4
	W – 047°15'52,3"		
Iepê – SP	S – 22°39'09,4"	22 39' 39,6	51 04' 35,5
	W – 51°03'24,7"		
Aldeia Boca da Mata – BA	S – 16°50'40,9" W – 039°20'39,9"	16 27' 26,7	39 03' 54,1
Aldeia Barra Velha – BA	S – 16°51'29,0" W – 39°10'28,9"	–	–
Aldeia Imbiriba – BA	S – 16°39'30,4" W – 39°09'01,0"	–	–
Manacapuru – AM	–	03 18'00,3	60 37' 15,5

4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

4.2.1 Desinfestação Superficial dos Tecidos Vegetais

O processo de eliminação da população epifítica e de outros microrganismos iniciou-se com a lavagem de todo o material coletado com bucha e sabão. Raízes, caules e folhas foram desinfestados superficialmente utilizando os seguintes produtos químicos nessa ordem: álcool 70% (1min), hipoclorito de sódio

2% (6 min) e álcool 70% (30 seg). Finalmente, os tecidos vegetais foram lavados em água destilada esterilizada, por três vezes (Figura 1).

A eficiência do processo de desinfecção foi confirmada pela ausência de colônias do plaqueamento de uma alíquota da última água utilizada para a lavagem feito no mesmo meio de cultura do isolamento.

Figura 1. Processo de esterilização superficial, por meio de banhos sucessivos em álcool 70 %, hipoclorito de sódio 2 % e água destilada esterilizada.

4.2.2 Isolamento por Fragmentação

Do material desinfestado foram retiradas as extremidades e o restante foi cortado em pequenos pedaços (0,5–0,7 cm), que foram distribuídos por toda superfície dos meios de cultura Tryptona Soy Ágar 10%–TSA (Apêndice 1.1) e Amido Caseína Agar–ACA (Apêndice 1.2), como ilustrado na Figura 2. Ambos os meios de cultura foram suplementados com 2ml da solução do fungicida Benomyl

(Apêndice 2.1) por litro de meio de cultura. Para cada parte da planta (raiz, caule e folha) e para cada planta foram feitas três placas de cada meio de cultura, cada uma com sete pedaços do tecido vegetal (Figura 2). As placas foram incubadas em sala com temperatura controlada entre 25° C e 27° C.

A avaliação do crescimento bacteriano foi realizada a cada 48 horas por um período de dez dias. Colônias individuais foram purificadas por esgotamento (estrias), transferidas para vidros de penicilina contendo meio TSA (Apêndice 1.1) inclinado, conservadas em óleo mineral e por fim, estocados na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP).

Figura 2. Isolamento de bactérias endofíticas de maniva de mandioca por fragmentação. (A) Fragmentos de maniva; (B) Remoção da primeira casca; (C) maniva sem a primeira casca; (D) Remoção da segunda casca; (E) Cortes de pedaços de 0,5–0,7 cm; (F) Distribuição de 7 pequenos pedaços na placa de Petri com meio de cultura.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO *Bacillus*

4.3.1 Coloração de Gram

Bactérias do gênero *Bacillus* são Gram-positivas, com formas de bastonetes e apresentam formação de esporos. Células com qualquer outra combinação destas 3 características, foram descartadas desse trabalho.

O esfregaço da cultura sobre uma lâmina foi submetido à fixação, seguida de coloração com cristal violeta (Apêndice 2.2) e lugol (Apêndice 2.3), lavagem com etanol 95% (Apêndice 2.4) e por fim, corada com o contra corante denominado safranina (Apêndice 2.5), seguida de secagem à temperatura ambiente.

A lâmina foi levada ao microscópio óptico com objetiva de imersão para ser examinada. As células Gram-positivas apresentam coloração violeta e as Gram-negativas apresentam-se rosa-vermelhada, devido à coloração de contraste com safranina (ARAÚJO *et al.*, 2002). Além de determinar a coloração de Gram, também foi observado o formato da célula e formação ou não de esporos, utilizando a mesma lâmina e microscópio.

4.3.2 Análise do Perfil de Ácidos Graxos da Membrana Celular (FAMES– Fatty Acid Methyl Ester)

Para esse trabalho, ao invés de identificar Bt através da presença da produção de cristal nos isolados, foi utilizada uma sofisticada e eficiente metodologia para a identificação de microrganismos, análise do perfil de ácidos graxos presentes na membrana bacteriana. A possibilidade do gene *cry* estar perdendo a capacidade de se expressar, foi um dos motivos pelo qual foi utilizada essa técnica. Esse evento pode ocorrer devido ao fato dessa bactéria estar em ambiente favorável para o seu desenvolvimento (célula vegetativa), não havendo necessidade de esporular e conseqüentemente, de produzir a proteína Cry.

Apenas os isolados do gênero *Bacillus* (selecionados no item anterior) foram submetidos à análise de ácidos graxos.

As bactérias a serem identificadas foram cultivadas em meio TSBA® BBL (Apêndice 1.3), pelo método de estrias cruzadas e incubadas a 28°C por 24 horas. Decorrido este tempo, foram coletados, aproximadamente, 40 mg (quatro a seis alças com capacidade para 10 µL) da cultura no 3º quadrante e transferidas para tubos *Kimax* (100 x 13 mm). Após a coleta da amostra, foram executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares: saponificação, metilação, extração e lavagem.

A primeira etapa consistiu na lise da parede celular. Foi adicionado 1 ml do reagente de saponificação (Apêndice 2.6) na amostra no tubo *KIMAX*. Em seguida, o tubo foi agitado em vortex e posteriormente, levado ao banho-maria à uma temperatura entre 95°C e 100°C. Antes de iniciar a segunda etapa, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente.

Na metilação, ocorreu a formação de éstermetílico de ácidos graxos, necessário para a extração. Dois ml do reagente de metilação (Apêndice 2.7) foram acrescentados na amostra da etapa anterior, sendo então agitados no vortex por 5–10 seg. e levados ao banho-maria (80°C por 10 min tempo).

Na terceira etapa, o éstermetílico de ácidos graxos formado na etapa anterior, migrou-se para a fase orgânica. Para ocorrer essa migração, foi adicionado 1,25ml do reagente de extração (Apêndice 2.8) e em seguida, levado ao rotator clínico numa agitação bem lenta durante 10 min.

A lavagem consistiu na adição de 3ml do reagente de lavagem básica (Apêndice 2.9) na amostra da etapa anterior, e agitação bem lenta, em rotator clínico, durante 5 min. Após esse processo, 0,5 ml do volume da fração superior do tubo *KIMAX* foram transferidos para o vial. Essa etapa tem por função separar a fase ácida da orgânica, ou seja, todas as impurezas ficam na fase aquosa e o éster fica na fase orgânica.

As amostras assim preparadas foram analisadas em cromatógrafo gasoso Hewlett Packard 5890A (Agilent GC System Serie 6850) com detector de ionização de chama (Flame Ionization Detector–FID, modelo 7683, Agilent).

Os isolados foram identificados por meio do “Software” de Identificação Microbiana (MIDI, Biblioteca Sherlock® TSBA versão 5.0, Microbial ID, Newark, DE, USA). O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contêm comprimento, área de picos e tempo de retenção nomeado. O resultado final é apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microrganismo em questão. Foram positivamente identificados aqueles que obtiveram o índice de similaridade do perfil de ácidos graxos (IS) de 0,6 ou maior e com diferença de 0,1 entre uma espécie e outra.

Isolados identificados como *B. thuringiensis* através do perfil de ácidos graxos foram submetidos à sua caracterização.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE MANDIOCA.

4.4.1 Caracterização Morfológica

4.4.1.1 Microscopia óptica por contraste de fase

Os isolados endofíticos foram cultivados separadamente em 10ml de meio líquido BP (Apêndice 1.4) até completa esporulação e, no caso das linhagens cristalíferas, até a formação do cristal protéico. Este monitoramento foi feito ao microscópio óptico por contraste de fase num aumento de 1000x.

4.4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As linhagens foram cultivadas em meio BP (Apêndice 1.4) líquido durante 3 dias numa agitação de 128 rpm à 30°C. Depois de observada a completa esporulação e formação de cristal das bactérias, uma alíquota de 1,5 ml das culturas foram centrifugadas durante 10 min a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e as massas celulares foram lavadas com água destilada esterilizada por 3 vezes. Após a última lavagem, os pellets foram ressuspensos com 1,5 ml de água destilada esterilizada.

Um volume de 7 µL das amostras foi espalhado numa lamínula de vidro e em seguida seco à temperatura ambiente. Para o manuseio da amostra no metalizador e microscópio eletrônico de varredura foi necessário preparar a lamínula, colando-a num suporte, denominado “stub”.

Antes de serem metalizadas, as amostras foram colocadas no dessecador num tempo mínimo de 2 horas para o término da secagem. Utilizando o metalizador Emitech, esporos e cristais foram metalizados com ouro em 3 ciclos de 3 min com 12 mA formando uma espessura média de 20 nm. Por fim, essas

amostras foram observadas em um microscópio eletrônico “field emission” de varredura Gemini Leo 982 Leica Zeiss do laboratório de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA Meio Ambiente.

4.4.2 Caracterização Molecular

Para identificar a presença dos genes codificadores de toxinas de *B. thuringiensis* foram realizados reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando diferentes oligonucleotídeos (CÉRON *et al.*, 1995; IBARRA *et al.*, 2003).

PCR é o método mais amplamente usado como primeiro passo na caracterização molecular, sendo altamente eficiente para a identificação dos genes *cry* presentes em linhagens de Bt. Por outro lado, a expressão relativa a cada gene, como também as interações (ambos sinergismo ou antagonismo) do cristal protéico, podem ser limitadas, ou seja, o método PCR não é capaz de distinguir entre genes silenciados ou expressados (BRAVO *et al.*, 1998; MARTÍNEZ & CABALLERO, 2000).

4.4.2.1 Extração de DNA

Os isolados foram inoculados em 5 ml de LB (Apêndice 1.5) e incubados por 18 horas à 28°C. Após esse período, cada cultura bacteriana foi colocada em tubos de 1,5 ml, centrifugada por 5 min a 13000 rpm, e em seguida o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 500 µl de TE

(Apêndice 2.10) e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e novamente o pellet foi ressuspensionado em 500 µl de TE (Apêndice 2.10) sendo adicionados 30 µl de SDS 10% e 0,5 g de sílica com agitação no “bead beating” (Biopec products) por 30 seg a 4500 rpm. Após a agitação foram adicionados 500 µl de fenol saturado, homogeneizado e centrifugado (13000 rpm por 10 min). A fase superior foi transferida para um novo tubo e acrescido de 6 µl de RNase (RNase 10mg/ml em 10mM TRis-HCL pH 8,0; 15mM NaCl) sendo incubado por 30 min a 37°C. a esta suspensão foram adicionados 200 µl de fenol e 200 µl clorofórmio, a solução foi homogeneizada por inversão e, posteriormente, centrifugada a 13000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 0,1 volume de NaCl 5M (Apêndice 2.13) e 0,6 volume de isopropanol, incubado por 5 min a temperatura ambiente e em seguida centrifugado por 10 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o DNA foi lavado com 400 µl de etanol 70% e centrifugado por 2 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi removido, o DNA foi seco a 37°C por 1 hora e então, ressuspensionado em 50µl de água Milli-Q autoclavada e estocado a -20°C.

4.4.2.2 Amplificação do gene *cry*

Após extraído, o DNA foi amplificado por PCR. As reações de amplificação foram conduzidas em um volume total de 25µl contendo: 30ng de DNA molde; 250µM de solução de dNTP's (Apêndice 2.14); 1,5mM de MgCl₂, 0,2µM do

iniciador, solução tampão para a reação de PCR 1x concentrada (Invitrogen); 2,5U da enzima Taq polimerase (Invitrogen), como descrito previamente por CERÓN, *et al.* (1995) e BRAVO *et al.* (1998). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada no termociclador Perkin–Elmer 480 com os seguintes ciclos: 2 min à 95°C, 30 ciclos de 1 min à 95°C, 1 min para o anelamento e 72°C por 1 min; 72°C por 5 min. A temperatura de anelamento foi 48°C para os primers referentes ao gene *cry3* e 51°C para os primers específicos aos genes *cry4A*, *cry4B* e *cry10*. O DNA amplificado foi visualizado por eletroforese em géis de agarose 1% (Apêndice 2.15), corados com o brometo de etídio (Apêndice 2.16). Como controle para a amplificação dos genes *cry3*, foi utilizado *B. thuringiensis* subsp. *tenebriones* LM79 e *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* H14 foi utilizado como controle para os genes *cry4A*, *cry4B* e *cry10*. A tabela 2 mostra as seqüências dos primers, o tamanho esperado dos produtos de PCR, a posição e a sua referência.

Tabela 2– Característica geral dos genes *cry3*, *cry4A*, *cry4B* e *cry10*.

Primers	Seqüência	Genes	Posição	Tamanho (pb)	Referência
CJIII20	5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA	<i>Cry3</i>	diversos	652–733	Céron <i>et al.</i> , 1995
CJIII21	5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG				
<i>cry4A</i> spe	5'TCAAAGATCATTTCAAATTACATG(d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)	<i>Cry4A</i>	1706–2165	459	Ibarra <i>et al.</i> , 2003
<i>cry4B</i> spe	5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC (d) 5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)	<i>Cry4B</i>	1868–2189	321	Ibarra <i>et al.</i> , 2003
<i>cry10</i> spe	5'TCAATGCTCCATCCAATG(d) 5'CTTGATAGGCCTTCCTCCG(r)	<i>cry10</i>	978–1326	348	Ibarra <i>et al.</i> , 2003

(d) direto; (r) reverso; (pb) pares de bases.

4.4.3 Caracterização Toxicológica

Com a finalidade de detectar a toxicidade dos cristais protéicos produzidos pelos isolados de Bt endofíticos foram utilizados 4 espécies de larvas de insetos: *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* da ordem Lepidóptera (insetos pragas da agricultura) e *Aedes Aegypti* e *Culex quinquefasciatus* da ordem Diptera (insetos vetores de doenças). Vinte larvas do terceiro instar foram tratadas com uma única dose de suspensão de esporo cristal de cada isolado. Todas as larvas foram mantidas a 28°C e com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro) durante os testes. Como controle negativo em cada teste, foi incluída água destilada esterilizada, tanto na dieta para Lepidópteros quanto na água destilada para Dípteros.

Larvas da ordem Lepidoptera receberam uma dieta artificial com uma dose de 10^8 esporos/ml de dieta. *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 foi usado como linhagem padrão no teste de toxicidade contra *A. gemmatalis* e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* H9 foi a linhagem padrão para *S. frugiperda*. A mortalidade das larvas foi avaliada após 48h.

Para as duas espécies da ordem Diptera foram inoculadas 10^7 esporos/ml de água destilada em copos plásticos descartáveis. *B. thuringiensis* var. *israelensis* H14 foi a linhagem padrão utilizada como controle positivo nesse teste de toxicidade. A mortalidade das larvas foi avaliada após 24h.

4.4.4 Caracterização Fisiológica

4.4.4.1 Determinação da atividade pectinolítica

Quanto à atividade pectinolítica, foram testados *B. thuringiensis* endofíticos identificados através do perfil de ácidos graxos, utilizando-se pectina cítrica como substrato e em dois pHs diferentes (pH 5 e pH 8). O substrato em pH 8 é usado para detecção da enzima pectato liase e o substrato em pH 5 é usado para detectar a atividade da poligalacturonase.

Aproximadamente 10 mg (uma alçada cheia) das colônias bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo o meio MP (Apêndice 1.6) em dois pHs diferentes (pH 5 e 8), incubadas a 28°C, por 5 dias. Após o crescimento das colônias, o meio foi coberto com solução de lugol (Apêndice 2.3) por um a dois min. A atividade pectinolítica foi evidenciada pelo aparecimento de uma zona esbranquiçada ao redor da colônia (halo) em contraste com a cor marrom escuro do restante do meio e a medida do diâmetro do halo foi feita por meio de uma régua. *Bacillus subtilis* foi utilizado como controle positivo nesse experimento.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de HANKI & ANAGNOSTAKIS (1975), através da relação entre o diâmetro do halo de degradação e diâmetro da colônia, como demonstrado na fórmula abaixo:

$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Os valores foram expressos como índice enzimático (IE).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), sendo as comparações das médias realizadas através do teste Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS– The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary. NC. USA).

4.4.4.2 Determinação da atividade celulolítica

Aproximadamente 10 mg (uma alçada cheia) das colônias bacterianas foram semeadas em placas de Petri com o meio CMC 1 % (Apêndice 1.7), incubadas a 28°C, por 4 dias. Após o crescimento das colônias, o meio foi coberto com solução de vermelho congo (Apêndice 2.17) por 15 min. Em seguida, o excesso do corante foi retirado e o meio recoberto com solução de NaCl 1M (Apêndice 2.18) por 15 min. A atividade celulolítica foi evidenciada pelo aparecimento de uma zona amarela ao redor das colônias (halo), em contraste com a cor vermelha do corante e a medida do diâmetro do halo foi feita por meio de uma régua.

A atividade enzimática foi determinada pelo método de HANKI & ANAGNOSTAKIS (1975), através da relação entre o diâmetro do halo de degradação e diâmetro da colônia, como demonstrado na fórmula abaixo:

$$IE = \frac{\text{Diâmetro do halo}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

Os valores foram expressos como índice enzimático (IE).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), sendo as comparações das médias realizadas através do teste Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS– The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary. NC. USA).

4.4.4.3 Determinação da atividade quitinolítica

Para a atividade quitinolítica, os isolados foram cultivados em meio TS 10% (Apêndice 1.8) acrescido de 0,5 % de quitina por 4 dias a 28°C, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 5 min (13000 rpm) a 4°C. O sobrenadante 25 µL foi incubado com o substrato CM–Chitin–RBV (Loewe) (25 µL) e 50 µL de tampão Tris–HCl (Apêndice 2.11) por 2 horas a 45°C, sendo adicionado HCl 2N (50 µL) para a interrupção da reação. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 550 nm.

O Índice de Atividade Enzimática foi obtido através da relação:

$$IE = \frac{\text{absorbância 550 nm}}{\text{substrato enzimático/tempo de incubação}}$$

$\frac{\text{Abs}}{\text{ml.2h}^{-1}}$
--

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ($P \leq 0,05$), sendo as comparações das médias realizadas através do teste Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o programa SAS – The SAS System for Windows V8 (SAS Institute Inc., Cary. NC. USA).

5 RESULTADO

5.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE MANDIOCA

Um total de 482 bactérias endofíticas foi isolado de plantas saudáveis de mandioca selvagem mantidas por agricultores ou cultivadas para a indústria. Os isolados foram armazenados na coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP). Esse número de isolados foi obtido após o agrupamento das bactérias, levando-se em consideração suas características macroscópicas e microscópicas.

Para esse trabalho, foram recuperadas da coleção de culturas 140 bactérias. Sessenta e uma bactérias foram consideradas do gênero *Bacillus* por serem Gram-positivo, apresentarem células em forma de bastonete e serem esporogênicas. Cepas que apresentavam as características acima foram utilizadas no trabalho e cepas sem essas características foram descartadas.

Quando submetidas à análise do perfil de ácidos graxos, essas bactérias foram identificadas em nove espécies: *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*, *B. agardhaerens*, *B. atrophaeus*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (Tabela 3).

Tabela 3– Identificação, através de perfil de ácidos graxos, de bactérias endofíticas do gênero *Bacillus* isoladas de mandioca.

Isolados	Estado	Tecido Vegetal	Identificação (TSBA 50)	Índice de Similaridade
AMRTSA 03	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus pumilus</i>	0,915
AMCAC 12c	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,781
AMCTSA 36 b	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,859
AMCAC 11	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,894
AMCTSA24	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,858
AMRCA 21b	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus pumilus</i>	0,860
AMCCA 13	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,863
IIRAC 14b	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus pumilus</i>	0,657
IIRTS24	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus pumilus</i>	0,889
AMCTSA 28	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,783
AMRTSA 18	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus pumilus</i>	0,915
MB4BR4b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus pumilus</i>	0,780
MAIIM4a	Amazonas	Maniva	<i>Bacillus pumilus</i>	0,938
IIRTS21	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,839
IIRAC10	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,954
IICTSA13	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus megaterium</i>	0,963
IIRAC11	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,902
IIRAC28	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,610
IIRTS19	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,785
II RSTA20	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,945
MB3.2 AR1a	Bahia	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,897
MB3.2AR2b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus megaterium</i>	0,881
AMRTSA 31	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	0,754
AMCAC 29	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus subtilis</i>	0,839
AMCCA 05	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus subtilis</i>	0,844
IIRAC 13	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	0,675
II RAC 30	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus subtilis</i>	0,638
AMCTSA 04	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus lentimorbus</i>	0,739
AMRTSA 10	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus sphaericus</i>	0,632
AMCCA 10	São Paulo	Maniva	<i>Bacillus agaradhaerens</i>	0,863
MB21AM1a	Bahia	Maniva	<i>Bacillus atrophaeus</i>	0,745
AMRTSA17	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,659
MB3ER2b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,663
MB4CF2b	Bahia	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	0,591
MB2.2CF3b	Bahia	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	0,848
MB3.2CF1b	Bahia	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	0,678
MB4AM3b	Bahia	Maniva	<i>Bacillus cereus</i>	0,718
MB2.1AM5a	Bahia	Maniva	<i>Bacillus cereus</i>	0,694

MB3.1CR2a	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,789
MB3.2BR1a	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,827
MB1.2BR1a	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,837
MB1.1BF1b	Bahia	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	0,942
MAIR1a	Amazonas	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,895
MAIF2b	Amazonas	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	0,846
IIRAC12	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,808
IIRTSA27	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,892
IIRTSA 26	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,921
			<i>Bacillus cereus</i>	0,879
IIRTSA22	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,911
		Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,850
IIRAC22	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,942
			<i>Bacillus cereus</i>	0,869
IIRTSA 23	São Paulo	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,936
			<i>Bacillus cereus</i>	0,877
MB3.2 BR1b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,907
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,851
MB4AR1b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,759
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,726
MB2.3CR4b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,919
			<i>Bacillus cereus</i>	0,866
MB1.2BR1b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,883
			<i>Bacillus cereus</i>	0,866
MB3DM2b	Bahia	Maniva	<i>Bacillus cereus</i>	0,893
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,870
MB3EM1b	Bahia	Maniva	<i>Bacillus cereus</i>	0,865
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,775
MB3.2BR2a	Bahia	Raiz	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,901
			<i>Bacillus cereus</i>	0,858
MB3.2AR1b	Bahia	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,859
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,787
MAIVR1b	Amazonas	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,842
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,806
MAIIR1b	Amazonas	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,910
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,851
MAIR1b	Amazonas	Raiz	<i>Bacillus cereus</i>	0,867
			<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,784

Como se observa na tabela 3, 16 isolados apresentaram alta similaridade no perfil de ácidos graxos da membrana bacteriana a *B. thuringiensis*,

sendo 5 do estado de São Paulo, 8 do estado da Bahia e 3 do estado do Amazonas. Entre esses isolados, 2 do estado do AM não puderam ser recuperados. Essas linhagens foram primordialmente isoladas de raízes, exceto as linhagens MB3DM2b e MB3EM1b que foram isoladas de manivas.

Das 16 linhagens selecionadas como Bt, apenas IIRTSA27 teve o índice de similaridade (IS) acima de 0,6 e com mais de 0,1 de diferença entre outras linhagens, inferindo que essa bactéria pode ser considerada *B. thuringiensis*.

Outras linhagens tiveram seus índices de similaridade acima de 0,6 no perfil de ácidos graxos mas não houve diferença de 0,1 entre a primeira e segunda espécie identificada. A linhagem IIRTSA26 teve como primeira opção *B. thuringiensis* com IS de 0,921 e como segunda opção, *B. cereus* apresentando IS de 0,879. Já a linhagem MB3.2BR1b, teve como primeira opção com IS de 0,907 a espécie *B. cereus* e como segunda opção *B. thuringiensis* com IS de 0,851. A diferença dos IS entre as espécies apresentadas pelo “Software” de Identificação Microbiana foi de 0,042 e 0,056 para as linhagens IIRSTA26 e MB3.2BR1b, respectivamente, inferindo que essas linhagens podem ser *B. thuringiensis* ou *B. cereus* (tabela 3) .

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* ENDOFÍTICO ISOLADO DE MANDIOCA

A caracterização de Bt pode ajudar no entendimento do papel dessa bactéria no ambiente e a distribuição de genes *cry*.

Segundo EJIOFOR & JOHNSON (2002) muitos pesquisadores têm utilizado ampla variedade de técnicas para detectar e caracterizar genes *cry* de Bt. Recentemente, muitos trabalhos têm aplicado PCR (BEN-DOV *et al.*, 1997; CERÓN *et al.*, 1994) ou a combinação dessa técnica com outros métodos como sorologia (KIM, 2000), atividade inseticida (PORCAR & CABALLERO, 2000; MONNERAT *et al.*, 2003) e SDS-PAGE (MONNERAT *et al.*, 2003) para a detecção e caracterização de Bt e dos genes *cry* dos seus isolados. HANSEN *et al.* (1998) combinaram caracterização molecular e fenotípica no estudo de isolados de folhas e insetos. Para o estudo de Bt isolados de solo, grãos estocados e endofíticos de algodão foram utilizados para a caracterização molecular e fisiológica (EJIOFOR & JOHNSON, 2002; MONNERAT *et al.*, 2003).

Nesse trabalho, buscou-se complementar técnicas morfológicas, moleculares, toxicológicas e fisiológicas para caracterizar as linhagens endofíticas isoladas de mandioca.

5.2.1 Caracterização Morfológica

Os isolados com alta similaridade no perfil de ácidos graxos a *B. thuringiensis* foram analisadas morfológicamente quanto à presença de cristais, por microscopia óptica de contraste de fase e microscopia eletrônica de varredura.

De todas as linhagens analisadas em microscopia óptica de contraste de fase (aumento de 1000x), apenas foi possível visualizar a forma do cristal protéico na linhagem IIRAC22. Por outro lado, a microscopia eletrônica forneceu maiores detalhes sobre a proteína Cry sintetizada pela linhagem endofítica. Foi possível observar que no aumento de 9.000x (Figura 3A), além de produzir cristais grandes ($> 1\mu\text{m}$ de diâmetro), também sintetiza cristais esféricos regulares pequenos ($< 0,5\mu\text{m}$ de diâmetro). Em maior magnificação, notou-se que o cristal grande (detectado em microscopia por contraste de fase), não é um cristal único. Essa inclusão cristalina é composta pelo encaixe de vários cristais amorfos (aproximadamente 4) e um ou 2 cristais esféricos pequenos (Figura 3B), semelhante ao cristal sintetizado pela linhagem padrão de *B.t.* subsp. *israelensis* H14 (Figura 3C e D).

Nos demais isolados obtidos neste trabalho, o aumento utilizado na microscopia por contraste de fase (1.000X) foi insuficiente para visualizar com clareza a forma dos cristais, sendo que esta se assemelhava a “pontos” ou segundo BERNHARD *et al.* (1997), cristais secundários. Com o auxílio da microscopia eletrônica

Figura 3. Microscopia eletrônica de varredura dos esporos e cristais das linhagens endofítica IIRAC22 (A e B) e *B. thuringiensis* var *israelensis* (C e D). A e C= esporos e cristais esféricos irregulares e cristais pequenos. B e D= cristal num aumento de 42000x. esp= esporo; cr= cristal. Gemini Leo 982 Leica Zeiss.

de varredura, foi possível definir que esses “pontos”, presentes na linhagem endofítica MB3.2CR4b, têm a forma arredondada e possuem aproximadamente 0,5µm de diâmetro, como mostra a Figura 4.

Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de cristais em forma de pontos do isolado endofítico MB3.2CR4b de *B. thuringiensis* obtidos de mandioca. esp= esporo; cr= cristal. Gemini Leo 982 Leica Zeiss.

5.2.2 Caracterização Molecular

Das 14 linhagens testadas, apenas a linhagem IIRAC22 amplificou fragmentos de DNA similares aos genes *cry*. Os genes amplificados foram: *cry4A*, contendo um fragmento de 459 pb; *cry4B*, com 321 pb e por último, contendo 348

pb, o gene *cry10*. Esse isolado endofítico contém os mesmos genes *cry* presentes na linhagem padrão *B.t.* subsp. *israelensis* (Figura 5).

Figura 5. Detecção, por PCR, de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* endofítico isolado de mandioca (IIRAC22). Linhas 1 e 6, marcador de peso molecular (1kb). Linhas 5 e 10, controle negativo. Linhas 2 e 7, amplificação do gene *cry4A*. Linhas 3 e 8, amplificação do gene *cry4B*. Linhas 4 e 9, amplificação do gene *cry10*. Bti, controle positivo.

Com relação ao gene *cry3*, gene que codifica o cristal de forma cubóide, não houve amplificação desse fragmento de DNA nas 14 linhagens estudadas.

5.2.3 Caracterização Toxicológica

Todos os endofíticos identificados como Bt foram testados contra *A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *A. gemmatilis* e *S. frugiperda*. Como mostra a tabela 4, dos 14 isolados testados, apenas os cristais de um isolado, IIRAC22, tiveram um efeito tóxico à ordem Diptera. Nenhum isolado endofítico

de mandioca mostrou atividade tóxica às larvas de Lepidoptera, somente as linhagens controles *B.t.* subsp. *tolworthi* e *B.t.* subsp. *kurstaki* apresentaram toxicidade (Figura 6).

Tabela 4– Detecção da atividade tóxica de cristais protéicos sintetizados por Bt endofíticos de mandioca contra larvas da ordem Diptera e Lepidoptera.

Isolados	Diptera		Lepidoptera	
	<i>A. aegypti</i>	<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>A. gemmatalis</i>	<i>S. frugiperda</i>
MA IIR1b	-	-	-	-
II RTSA22	-	-	-	-
II RTSA 23	-	-	-	-
II RTSA 26	-	-	-	-
IIR TSA 27	-	-	-	-
II RAC 22	+	+	-	-
MB 3.3 CF1b	-	-	-	-
MB 3DM2b	-	-	-	-
MB 1.2BR1Bb	-	-	-	-
MB 3.2BR2a	-	-	-	-
MB 4AR1b	-	-	-	-
MB 2.3 CR4b	-	-	-	-
MB 3.2 AR1b	-	-	-	-
MB .2BR1b	-	-	-	-
<i>Bt israelensis</i>	+	+	-	-
<i>Bt kurstaki</i>	-	-	+	-
<i>Bt tolworthi</i>	-	-	-	+

B.t. israelensis= controle positivo para as larvas da ordem Diptera; *B.t. kurstaki*= controle positivo para *A. gemmatalis*; *B.t. tolworthi*= controle positivo para *S. frugiperda*. (-) ausência de toxicidade; (+) presença de toxicidade.

Figura 6. Atividade tóxica de isolados de *B. thuringiensis* endofíticos após 24 horas para larvas da ordem Diptera e 48 horas para ordem Lepidoptera. (A, C e E) Ação da toxina sintetizada pelo isolado IIRAC22 em larvas de *C. quinquefasciatus*, por *B.t.* var. *tolworthi* H9 em larvas de *S. frugiperda* e por *B.t.* var. *kurstaki* HD1 em larvas de *A. gemmatilis*. (B, D e F) controle negativo para *C. quinquefasciatus*, *S. frugiperda*, *A. gemmatilis*. (G) detalhe das larvas de *C. quinquefasciatus* mortas.

5.2.3 Caracterização Fisiológica

Bactérias endofíticas de mandioca (14 linhagens) foram testadas quanto à produção de atividade pectinolítica (Poligalacturonase em pH 5 e Pectato

Liase em pH 8) em placas de Petri. A enzima denominada poligalacturonase quebra as ligações glicosídicas por hidrólise e enzimas chamadas de liases atuam por transeliminação.

Foram observadas zonas claras amareladas em volta das colônias em contraste com a cor marrom do meio, que indicam degradação de pectina presente no meio de cultura (Figura 7 e 8).

No experimento para produção da poligalacturonase (pH 5), observou-se um baixo índice enzimático (IE), variando de 1,24 a 1,72, quando comparado ao controle, com atividade enzimática de 3,54 (Tabela 5). Houve também 3 linhagens (IIRSTA27, MB3.3CF1b e MB3.2CR4b) que não produziram essa enzima (Figura 7).

Figura 7. Halo de degradação para atividade pectinolítica em pH 5 de *B. thuringiensis*. (a) linhagens endofíticas com atividade enzimática; (b) linhagem sem atividade enzimática; (c) controle positivo (*B. subtilis*).

A análise de produção da enzima pectina liase no meio MP em pH 8 mostrou variação no IE de 1,18 a 5,18, sendo que o microrganismo controle, *B. subtilis*, apresentou um IE de 3,06 (figura 8).

Figura 8. Halo de degradação para atividade pectinolítica em pH 8 de *B. thuringiensis*. (a) MAIIIAR1b; (b) MB3DM2b; (c) controle positivo (*B. subtilis*).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que, entre as bactérias testadas, também existe uma variabilidade quanto à função do microrganismo em degradar a pectina. No entanto, ao comparar-se as linhagens endofíticas com a bactéria controle (*B. subtilis*), quanto à formação ou não de halo de degradação, pode-se inferir que 13 (92,86%) bactérias endofíticas produziram halo de degradação de pectina. Destes 13 isolados bacterianos que apresentaram atividade pectinolítica no pH 8, sete (53,85%) apresentaram a atividade enzimática igual ou

superior à média do controle. O isolado MB3.3CF1b foi o único a não produzir a enzima pectato liase (Tabela 5).

As linhagens endofíticas de *Bt* foram avaliadas quanto à atividade celulolítica, utilizando-se carboximetilcelulose como substrato e não foi observada a produção de celulase por nenhum desses isolados.

Tabela 5– Quantificação da atividade pectinolítica por *B. thuringiensis* endofíticos de mandioca.

Linhagens Endofítica	Atividade pectinolítica pH 5,0 (cm)	Atividade pectinolítica pH 8,0 (cm)
MA IIIIR1b	1,32 <i>de</i>	3,77 <i>bc</i>
II RTSA22	1,39 <i>cbd</i>	5,18 <i>a</i>
II RTSA23	1,63 <i>cb</i>	4,19 <i>b</i>
II RTSA26	1,40 <i>cbd</i>	1,74 <i>gf</i>
II RSTA27	– <i>e</i>	1,73 <i>gf</i>
II RAC22	1,62 <i>cb</i>	1,94 <i>efg</i>
MB 3.3CF1b	– <i>e</i>	– <i>h</i>
MB 3DM2b	1,30 <i>cd</i>	2,53 <i>def</i>
MB 1.2BR1b	1,30 <i>cd</i>	2,22 <i>ef</i>
MB 3.2BR2a	1,24 <i>d</i>	2,08 <i>ef</i>
MB 4 AR1b	1,72 <i>b</i>	2,70 <i>ed</i>
MB 2.3CR4b	– <i>e</i>	1,18 <i>g</i>
MB 3.2AR1b	1,63 <i>cb</i>	3,14 <i>cd</i>
MB 3.2BR1b	1,59 <i>cbd</i>	3,71 <i>cb</i>
Controle	3,54 <i>a</i>	3,06 <i>cd</i>

Controle= *B. subtilis*, Atividade Pectinolítica em pH 8,0 (Pectato Liase); Atividade Pectinolítica em pH 5,0 (Poligalacturonase).

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste Tukey (5%)

5.2.3.3. Determinação da atividade quitinolítica

No experimento para quantificação da atividade quitinolítica foi observado a produção dessa enzima por todos os isolados, no entanto, não houve diferença significativa na quantidade da produção dessa enzima (Tabela 6). Todos os isolados foram enquadrados no mesmo grupo estatístico, de acordo com a análise de Tukey (5%), mesmo o índice enzimático variando entre 2,97 e 4,03 absorbância/ml 2h⁻¹.

Tabela 6– Quantificação da atividade quitinolítica por *B. thuringiensis* endofíticos de mandioca.

Linhagens Endofíticas	Atividade quitinolítica (abs/ml 2h⁻¹)*
MA IIIR1 b	3,34 a
II RTSA22	3,31 a
II RTSA23	3,42 a
II RTSA26	3,22 a
II RSTA27	3,35 a
II RAC22	4,03 a
MB 3.3CF1b	3,38 a
MB 3DM2b	3,04 a
MB 1.2BR1b	3,56 a
MB 3.2BR2a	3,61 a
MB 4 AR1b	3,46 a
MB 2.3CR4b	3,37 a
MB 3.2AR1b	3,79 a
MB 3.2BR1b	2,97 a

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste Tukey (5%)

6 DISCUSSÃO

O número elevado de variedades de plantas existentes no mundo provê grande oportunidade de isolar novas cepas de *B. thuringiensis* úteis para o controle biológico de insetos, nematóides, ácaros, doenças de plantas, entre outros. A importância de se detectar novas toxinas é devida ao significativo número de pragas ainda não controladas pela proteína Cry (BRAVO *et al.*, 1998), bem como pela possibilidade de desenvolvimento de resistência de insetos alvos às linhagens utilizadas como bioinseticida (ARANTES *et al.*, 2002).

O isolamento dessas 482 bactérias endofíticas, provavelmente subestima a população total daqueles microrganismos, em termos de diversidade, uma vez que somente foram selecionadas bactérias capazes de se desenvolverem nos meio de cultura utilizados. Tais limitações se aplicam à maioria dos estudos baseados em métodos de plaqueamento, embora eles forneçam indicações relativas da estrutura da população microbiana (TEIXEIRA, 2004).

Entre os isolados endofíticos de mandioca identificados pelo perfil de ácidos graxos, estão as espécies freqüentemente relatadas como *B. cereus* (PLEBAN *et al.*, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2002; TEIXEIRA, 2004), *B. subtilis* (ARAÚJO *et al.*, 2001; BAI *et al.*, 2002; TEIXEIRA, 2004), *B. megaterium* (STURZ *et al.*, 1997; ELVIRA-RECUENCO & VAN VUURDE, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2001; TEIXEIRA, 2004) e

B. pumilus (ARAÚJO *et al.*, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2002). Além dessas espécies, também foram encontradas nesse trabalho, assim como no trabalho de TEIXEIRA (2004), *B. lentimorbus*, *B. sphaericus*, *B. agaradhaerens*, *B. atrophaeus* e *B. thuringiensis* (tabela 3). Espécies como *Bacillus lentus*, *B. insolitus* e *Bacillus brevis*, também são freqüentemente encontradas nos tecidos vegetais (STURZ *et al.*, 1997; ARAÚJO *et al.*, 2001), mas não foram encontrados no presente trabalho.

Ao invés de identificar Bt através da presença de cristal, foi utilizada nesse trabalho, a metodologia de perfil de ácidos graxos (FAMES) presentes na membrana bacteriana. A possibilidade dos genes *cry* estar perdendo a capacidade de se expressar foi um dos motivos pelo qual foi utilizada essa técnica. Esse evento pode ocorrer devido ao fato dessa bactéria estar em ambiente favorável para o seu desenvolvimento, não havendo, portanto, necessidade de iniciar o ciclo de esporulação e produção da proteína Cry.

Até o presente momento, não se sabe ao certo a confiabilidade dessa técnica para a identificação de *B. thuringiensis* e *B. cereus*. Na classificação tradicional, *B. thuringiensis* pode ser distinguido de *B. cereus* pela habilidade de produzir um cristal protéico na célula durante a esporulação (HENDERSON *et al.*, 1995). De acordo com os resultados desse trabalho, pode-se inferir que a análise do perfil de ácidos graxos utilizando o banco de dados na versão TSBA 5.0, não foi suficiente para distinguir com clareza quais isolados eram *B. thuringiensis*, mas

definiu quando não se tratava dessa bactéria. Quando o isolado era identificado como *B. cereus*, havia uma diferença no índice de similaridade de 0,1 entre primeira e a segunda espécie, mas ao identificar *B. thuringiensis* a diferença no índice de similaridade com relação à outra espécie era inferior a 0,1, ou seja, não era possível definir com clareza se era *B. cereus* ou *B. thuringiensis* (Table 2) . VÄISÄNEN *et al.* (1991), ao compararem linhagens padrão do grupo *B. cereus* (adquiridos de coleção de cultura) por meio de perfil de ácidos graxos e analisar pelo banco de dados TSBA 3.0, relataram que *B. thuringiensis*, *B. micoydes* e *B. cereus* não diferiram entre si.

Isolar linhagens endofíticas de Bt tem especial atenção, pois atualmente, para controlar lagartas que se alimentam e/ou colonizam o interior de plantas tem-se modificado geneticamente microrganismos endofíticos de outras espécies para a expressão do gene *cry* de *B. thuringiensis* (DOWING *et al.*, 2000).

Os relatos na literatura sobre a presença de Bt no interior de tecidos vegetais têm sido poucos. BAI *et al.* (2002) identificaram, através da homologia do DNA da região 16S, apenas uma cepa de *B. thuringiensis* em nódulos de soja. Através de perfil de ácidos graxos, MCINROY & KLOEPPER (1995) relataram a presença de 11 isolados de Bt em raiz de algodão e raiz e haste de milho dos 1076 isolados. MONNERAT *et al.* (2003) além de encontrarem 15 linhagens de Bt em algodão através da presença do cristal protéico, caracterizaram-nas por métodos morfológicos, moleculares e fenotípicos.

O número de colônias de Bt isolados, nesse trabalho, em mandioca pode ser considerado alto quando comparado a outros estudos feitos com tecidos vegetais (soja, algodão e milho). Mas, comparado ao número de colônia isolado de diversos habitats (água, solo, insetos, etc), o número utilizado nesse trabalho torna-se muito baixo. O número de Bt varia entre 10^2 e 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo, enquanto que em filoplano de plantas este número varia entre 0–100 UFC cm^{-2} (DAMGAARD, 2000).

O elevado número de Bt isolado de solo, água e filoplano deve-se a sua forma de distribuição. *B. thuringiensis* é encontrado nesses ambientes geralmente na forma de esporos e são dispersos de forma passivas, pelo vento, chuva e fezes de animais e de insetos (BENHARD *et al.*, 1997). Em cadáveres de insetos, o número de isolados também pode se tornar alto, devido ao fato de larvas de insetos mortos serem o ambiente natural em que essa bactéria se multiplica, desde que haja especificidade de hospedeiro (SUZUKI *et al.*, 2004).

Para a colonização dos tecidos vegetais, *B. thuringiensis* depende de ferimentos como porta de entrada, de ser absorvido pelas raízes, da abertura de estômatos ou da habilidade de produzir enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular para penetrar na planta (QUADT-HALLMANN, 1997; SHISHIDO 1999; MCCULLY, 2001). Devido a todos esses fatores citados, torna-se menor a possibilidade de encontrar essa bactéria no interior da planta.

Todas as linhagens com alta similaridade a Bt apresentaram cristais secundários. Ainda há poucos estudos sobre esses cristais secundários e não foi verificada qualquer relação entre a morfologia e atividade inseticida. PRAÇA *et al.* (2004) visualizaram cristais esféricos pequenos juntamente a cristais bipiramidais e cubóides de linhagens tóxicas a três ordens de insetos. BENINTENDE *et al.* (1999) ao caracterizar uma linhagem do sorovar. *kenyae* isolado do solo, encontraram cristais poliédricos. IRIARTE *et al.* (2000a), observaram cristais pequenos irregulares e quase esféricos de uma linhagem denominada *B.t.* subsp. *navarrensis*. LIMA *et al.* (2002) encontraram corpos cristalinos parasporais com aspecto amorfo.

Além de cristais secundários, foi verificada também a presença de cristais grandes ($> 1,0 \mu\text{m}$ de diâmetro) em apenas um isolado, IIRAC22. Esse cristal é descrito classicamente como esférico, ovóide ou redondo quando observado ao microscópio óptico. No entanto, diante das observações ultraestruturais, a melhor descrição para esse cristal é amorfo tendendo ao esférico ou apenas amorfo (Figura 1).

O fato de ter sido encontrado apenas um isolado de Bt produtor de cristal grande (típicos de Bt e com atividade tóxica), pode ser em decorrência da falta de expressão dos genes *cry*, pois essas bactérias podem também estar no interior da planta como um controlador de fitopatógenos ao invés de atuar como entomopatógeno. Uma vez a bactéria estabelecida no interior da planta, acredita-se

que a frequência de esporulação e produção de corpo cristalino parasporal seja esporádica, tornando os genes *cry* pouco expressos.

Devido a provável falta de expressão dos genes *cry*, foi realizada nesse trabalho, a busca desses genes por meio de PCR. Dos primers utilizados, foi amplificado o gene *cry4A*, *cry4B* e *cry10* num único isolado, IIRAC22.

Na tentativa de amplificar o gene *cry3* (gene que codifica o cristal de forma cubóide), nenhuma das linhagens testadas teve o gene amplificado. Esse mesmo resultado foi obtido por KIM *et al.* (1998) ao isolar Bt de solo na Coreia e MANDUELL *et al.* (2002) ao avaliar e caracterizar Bt de filoplano de várias espécies de pimenta do reino. MONNERAT *et al.* (2003) também não encontraram a presença do gene *cry3* nas cepas endofíticas isoladas de algodão. BERNHARD *et al.* (1997) ao analisar a distribuição mundial de Bt nos mais diversos habitats, verificou uma baixa frequência de cristais cubóides, indicando a pequena possibilidade de ser encontrado esse tipo de gene.

Atualmente, estão descritos mais de 250 membros da família de gene *cry*, classificados em mais de 40 famílias (<http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil-Crickmore/Bt/>). De acordo com a diversidade existente desse gene e o número de primers testados, não é possível afirmar que essas linhagens não possuem o gene *cry*. O que pode ser afirmado é a ausência dos genes *cry* nas famílias testadas através do PCR.

A presença de genes *cry4A*, *cry4B* e/ou *cry10* foi associada com a morfologia redonda do cristal e sua toxicidade a larvas de mosquitos *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*. CAROZZI *et al.* (1991) e LERECLUS *et al.* (1993) acreditam que realmente, o tipo de genes *cry* pode determinar a forma do cristal e sua toxicidade.

O isolado IIRAC22 se destacou das outras linhagens estudadas, pois se mostrou muito semelhante a *B.t.* subsp. *israelensis* tanto na morfologia dos cristais quanto na presença dos genes *cry* (Figura 1 e 3) e atividade tóxica. Essa linhagem foi isolada da raiz de mandioca coletada no estado de São Paulo e a cultura é direcionada a indústria. *B.t.* subsp. *israelensis* é uma bactéria que produz cristal protéico de forma redonda ou esférica cuja atividade tem sido explorada para desenvolver biopesticidas ambientalmente seguro no controle de larvas de mosquitos. Essa variedade de Bt possui 6 genes codificadores de proteína tóxica no plasmídio de 137 kDa, incluindo os genes: *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* e *cry11A* (antigamente, *cry4D*), *cyt1Aa* e *cyt2Ba* (BEN-DOV *et al.*, 1999).

Genes *cry* de *B.t.* subsp. *israelensis* têm sido encontrados em solos, grãos estocados e filoplano (EJIOFOR & JOHNSON, 2002; MANDUELL *et al.*, 2002; IBARRA *et al.*, 2003). IRIARTE *et al.* (2000b) analisando linhagens isoladas de habitat aquático da Espanha, não detectaram combinação de genes relativos à subespécie *B.t.* subsp. *israelensis*.

Resultados semelhantes ocorreram em trabalhos de isolamento e detecção de cristais. Cristal esférico tem sido isolado de produtos estocados, solo, insetos, filoplano, materiais diversos de plantas, águas de lagoa, ninhos e fezes de passarinho e de morcego. BERNHARD *et al.* (1997) mostraram que o habitat com maior frequência de isolamento de *B.t.* subsp. *israelensis* foi em materiais relacionados a planta, onde se enquadra: frutas, vegetais, fibras de coco, peles de cebola, folhas do chão da floresta, raiz e casca de árvore ao invés de lagoas ou rios. Dessa forma, não é surpreendente encontrar *B.t.* subsp. *israelensis* isolado de tecidos de mandioca.

Treze das 14 linhagens testadas produziram a enzima hidrolítica poligalacturonase e/ou pectina liase. Bactérias como *B. lentimorbus*, *Flavobacterium resinovorum*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pseudomonas chlororaphis* apresentaram alta produção de poligalacturonase (NUNES, 2004); *Pseudomonas marginalis* (HAYASHI *et al.*, 1997), *B. subtilis* (KASHYAP *et al.*, 2000; SORIANO *et al.*, 2000), *Paenibacillus amylolyticus* (SAKIYAMA *et al.*, 2001), *Bacillus spp.*, *F. resinovorum*, *S. maltophilia*, *P. chlororaphis*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Yersinia aldovae* e *Pantoea agglomerans* (NUNES, 2004) foram caracterizados como produtores de pectina liase extracelular.

Dos isolados testados, apenas MB3.3CF1b não produziu as 3 enzimas hidrolíticas testadas nesse trabalho. É provável que essa bactéria (MB3.3CF1b) não utilize essas enzimas (pectina liase, poligalacturonase e celulase)

como ferramenta para a penetração na planta. A sua penetração pode ocorrer pelos estômatos, ferimentos, áreas de emergências laterais das raízes e/ou podem produzir outras enzimas hidrolíticas (não testadas nesse trabalho) capazes de degradar a parede celular dos vegetais (QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997; SHISHIDO *et al.*, 1999; MCCULLY, 2001).

Enzimas celulolíticas e pectinolíticas são produzidas por microrganismos, tendo algumas funções como degradação da parede celular de vegetais superiores. Paredes celulares de plantas consistem principalmente de celulose, enquanto que na lamela média consistem principalmente de pectina. Além de permitir a entrada desses microrganismos, essas enzimas poderão induzir resistência sistêmica à planta contra fitopatógenos. Esta indução pode ser devido à síntese dessas enzimas por parte destes microrganismos endofíticos durante o processo de infecção, ativando assim o sistema de defesa da planta (HALLMANN *et al.*, 1997) limitando o desenvolvimento do patógeno.

Em estudos envolvendo o patógeno *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* em tabaco foi observado que esta bactéria produz várias pectinases e celulases durante o processo de infecção. Os autores observaram que o tratamento de plantas de tabaco com filtrado da bactéria aumentou a expressão local e sistêmica de genes envolvidos na resposta de defesa da planta, sendo sugerido que a ação sinérgica entre celulases e pectinases pode aumentar a indução do gene de defesa da planta (VIDAL *et al.*, 1988).

Essas enzimas são também secretadas para os espaços intracelulares das folhas durante as reações de hipersensitividade de algumas plantas para uma variedade de patógenos, sugerindo o envolvimento dessas enzimas na defesa da planta (VAN LOON, 1985).

De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho da atividade pectinolítica e celulolítica, sugere-se que esses Bt endofíticos isolados de mandioca não utilizam a celulase para degradar a parede celular de vegetais superiores, mas lançam mão da produção de pectinase entre outras enzimas, não estudadas nesse trabalho, para essa função.

O isolamento de linhagens endofíticas de *B. thuringiensis* e produtoras de quitinase, poderá trazer novas estratégias na utilização de produtos a base de Bt para o Manejo Integrado de Pragas, como aplicação de Bt no controle de brocas que se alimentam no interior de plantas e aumento da sua atividade entomopatogênica devido à produção de quitinase.

Alguns trabalhos revelaram que a quitinase poderia aumentar o potencial entomopatogênico e poderia ser usado para potencializar a atividade pesticida de Bt (REGEV *et al.*, 1996; SAMPSON & GOODAY, 1998; WIWAT *et al.*, 2000) e controlar fungos fitopatogênicos (BARBOSA-CORONA *et al.*, 1999), mas a precisão do mecanismo pelo qual a quitinase mostra seus efeitos sobre patógenos de insetos nesse diferente sistema é desconhecida (REGEV *et al.*, 1996; SAMPSON & GOODAY, 1998).

Uma sugestão é que a quitinase microbiana digere parcialmente a membrana peritrófica, auxiliando o microrganismo ou sua toxina a penetrar na membrana peritrófica (SHAHABUDDIN & KASLOW, 1993). Evidências para essa hipótese inclui a observação de quitinases exógenas capazes de digerirem a membrana peritrófica de mosquitos *Aedes aegypti* (HUBER *et al.*, 1991).

SAMPSON & GOODAY (1998), observaram uma diminuição da atividade entomopatogênica de 1,3 e 1,4 vezes em larvas de *Culicoides nubelosus* e *Spodoptera littoralis*, respectivamente, quando inativaram a enzima quitinase através do inibidor Allosamidin (100µM). Utilizando a linhagem de *B. thuringiensis* DL5789 tóxica a larva de *S. exigua*, LIU *et al.* (2002) obtiveram um aumento na entomopatogenicidade de 2,35 vezes com a presença da quitinase.

Estratégia semelhante foi aplicada por DOWING *et al.* (2000) à broca da cana (*Eldana saccharina*), no entanto, para o sucesso do controle foi necessário transformar duas bactérias endofíticas. A primeira espécie, *P. fluorescens*, passou a carregar o gene *cry* de Bt e a segunda, *H. seropedicae*, teve o gene *chiA* (enzima que degrada a quitina presente no exoesqueleto da lagarta) inserido no seu genoma.

Enquanto mais estudos com relação à interação de *B. thuringiensis* e planta hospedeiras não são feitos, o que se tem são 2 hipóteses para justificar a presença dessa espécie de bactéria no interior da planta.

A primeira hipótese é atuar como um endófito, podendo apresentar relações neutras ou simbióticas com a planta. Nas interações simbióticas os

microrganismos produz ou induz a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (PEREIRA, 1993; ARAÚJO, 1996; RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996). Em alguns casos, eles também podem acelerar o aparecimento da muda e promover o estabelecimento da planta sobre diversas condições (CHANWAY, 1997), além de aumentar o crescimento e desenvolvimento da planta (BENT & CHANWAY, 1998). Nesse caso, *B. thuringiensis* está constantemente em divisão celular e conseqüentemente não produzirá o cristal protéico.

Atuar como entomopatógeno é a segunda hipótese. Mas para que haja com tal, essa bactéria provavelmente utilizará para se multiplicar, os nutrientes de larvas que se alimentam no interior da planta, ao invés de se alimentar da própria planta na qual se encontra hospedada. Ao esgotar os nutrientes da larva, inicia-se o ciclo de esporulação e produção dos cristais que ao serem liberados, permanecem no interior da planta. A larva que se alimenta no interior da planta ingere cristais e esporos de Bt causando lise celular (quando há especificidade de toxina), morte da larva e conseqüente liberação de nutrientes celulares para dar início à divisão celular da bactéria (quando há especificidade de hospedeiro). Nessa hipótese, o interior da planta está atuando apenas como um reservatório de esporos, assim como ocorre no solo (FERREIRA *et al.*, 2003).

MONNERAT *et al.* (2003) acreditam que *B. thuringiensis* endofíticos de algodão inoculadas no solo próximo a raiz da planta tenha sido absorvido pela planta e se proliferado no seu interior, protegendo-a contra insetos.

Caso se estabeleça à possibilidade dessas linhagens penetrarem e permanecerem no interior da planta produzindo as proteínas Cry inicia-se então, uma nova forma de utilização de Bt no controle de insetos que se alimentam e/ou colonizam o interior dessas plantas. Essas linhagens endofíticas poderão favorecer a manipulação genética e a expressão do gene *cry*, para ser utilizado como inoculante ou aplicado diretamente nas raízes da planta.

7 CONCLUSÃO

- Bactérias endofíticas de mandioca são capazes de colonizar todos os tecidos da planta.
- A análise de perfil de ácidos graxos sozinha, não é capaz de identificar Bt com clareza, mas define perfeitamente quando não se trata de Bt.
- É possível que a linhagem IIRAC22 seja um *B. thuringiensis* var. *israelensis*, pois esta linhagem sintetiza cristais do mesmo formato, possuir os mesmos genes *cry* e também tem toxicidade a larvas de insetos da ordem Diptera.
- Nenhuma das linhagens foi capaz de produzir celulase, mas produzem enzimas pectato liase e/ou poligalacturonase, as quais possivelmente poderão permitir que estas bactérias se estabeleçam como endófitos.
- A atividade quitinolítica esteve presente em todas as linhagens, sugerindo uma possível ação controladora sobre fungos fitopatogênicos e insetos.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AKIBA, YOSHIO. Microbial ecology of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Ent. Zool.**, v. 21, n.1, p. 76–80, 1986.
- ALLEM, A. C. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Gen. Res.Crop Evol.**, v. 41, p. 133–150, 1994.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.; Azevedo, J. L. Biotecnologia na agricultura e agroindústria. Vol. II. Editora Agropecuária, p.269–293, 2002.
- ARAÚJO, W. L. Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. 111 f. Dissertação (Mestrado), ESALQ. Piracicaba, São Paulo, 1996.
- ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR W.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Can. J. Microbiol.**, v. 47, p.229–236, 2001.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JR, W.; Van ELSAS, J. D.; Van VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and theirs interactions with *Xylella fastidiosa* in Citrus plants: **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68 , p.4906–4914, 2002.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, WALTER.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plantas. **J. Biotecnol.**, v. 3, p. 40–65, 2000.
- BACON, C. W. & HILTON, D. M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojaviensis* and related species. **Biological Control**, v. 23, p.274–284, 2002.

- BAI, Y.; DÁOUST, F.; SMITH, D. L.; DRISCOLL, B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, p. 230–238, 2002.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p.911– 922, 1997.
- BALOTA, E. I. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico vesículo-arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 281 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1994.
- BARBOZA-CORONA, J. E.; NIETO MZZOCCO, E.; VELAZQUEZ-ROBLEDO, R.; SALCEDOHERNANDEZ, R.; BAUTISTA, M.; JIMÉNEZ, E.; IBARRA, J. E. Cloning, sequencing and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 2, p.1023–1029, 2003.
- BEN-DOV, E.; NISSAN, G.; PELEG, N.; MANASHEROB, R.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. Refined circular restriction map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. **Plasmid**, v. 42, p.186–191, 1999.
- BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, A.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 12, p.4883–4890, 1997.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W.; TUZUM, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain. Ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Plant**, v.204, p.153– 168, 1998.
- BENINTENDE, G. B.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; COZZI, J. G. e IBARRA, J. E. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Letters in Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 151–155, 1999.

BENT, E. & CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Can. J. Microbiol.**, v.44:980–988, 1998.

BENTO, J.M.S. Migdolus: Biologia, Comportamento e Controle. 58p, 1995.

BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization and activity against insects pests. **J. Invert. Pathol.**, v. 70, n. 59. p. 56–68, 1997.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LAURA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUN~ES-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64 , p.4965–4972, 1998.

CAROZZI N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S. KOZIEL M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57 , p.3057–3061, 1991.

CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTÍZ, A.; ORTÍZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p.353–356, 1994.

CERÓN, J.; ORTÍZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p.3826–3831, 1995.

CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: Na emerging technology for reforestation. **Forest Sci.**, v. 43, p. 99–112, 1997.

CONCEIÇÃO, A. J. A mandioca. São Paulo: Nobel, p 382. 1983.

- COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciênc. Agrotec.**, v. 27, p. 158–164, 2003.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHENEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998.
- DAMGAARD. P. H. Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NILESEN–LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer academic Publishers, p.23–40, 2000.
- DEAN, D. H. Biochemical genetics of the bacterial insect control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnol. Genet. Eng. Ver .**, v.2, p. 341–363, 1984.
- DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* *cry1Ac7* and *Serratia marcescens* *chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2804–2810. 2000.
- EJIOFOR, A. O & JOHNSON, T. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 284 – 290. 2002.
- EL–TARABILY, K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal of Botany**, v.51, p.257–266, 2003.
- ELVIRA–RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J. W. L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p.1036–1041, 2000.

EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA TROPICAL. A cultura da mandioca. Disponível na Web: <<http://www.cnpmf.embrapa.br/mandioca.htm>>. Acesso em: 15 de abril de 2005.

FAHEY, J. W.; DIMOCK, M. B.; TOMASINO, S. F.; TAYLOR, J. M.; CARLSON, P. S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: A case study in industry. In: *Microbial Ecology of Leaves*, Springer-Verlag, New York. p. 401-411, 1991.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **BioTechnology**, v. 10, p. 271-275. 1992.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. Proceedings of XXVII Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Montpellier, France, p. 184, 1994.

FERREIRA, L. H. P. L.; SUZUKI, M. T.; ITANO, E. N.; ONO, M. A.; ARANTES, O. M. N. ECOLOGICAL ASPECTS OF *Bacillus thuringiensis* IN AN OXISOL. **Scientia Agricola**, v.60, n.1, p.19-22, 2003.

GARDNER, J. M.; FELDMAN, A. W.; ZABLOTOWICZ, M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 43, p. 1335-1342, 1982.

GARDNER, J.M.; CHANDLER, J.A.; FELDMAN, A.W. Growth response and vascular plugging of citrus inoculated with rhizobacteria and xylem-resident bacteria. **Plant Soil**, v.86, p. 996-1000, 1985.

GELERTER, W.; SCHWAB, G. E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. Chichester: John Wiley, cap.4, p. 89-104, 1993.

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

- 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.
- HALLMANN, J.; QUADT–HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p.895–914, 1997.
- HANKIN, L. e ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** v.67, p.597–607, 1975.
- HANNAY, C. L.; FITZ–JAMES, P. C. The protein–crystals of *Bacillus thuringiensis berliner*. **Can. J. Microbiol.**, v. 1, p. 694–710, 1995.
- HANSEN, B. M., DAMGAARD, P. H., EILENBERG, J. e PEDERSEN, J. C. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **J. Invertebr. Pathol.** 71: 106–114. 1998.
- HAYASHI, K.; INOUE, Y.; SHIGA, M. *et al.*, Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03–01173. **Phytochemistry**, v. 45, p. 1359–1363, 1997.
- HELGASON. E. O.; KSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 2627–2630, 2000.
- HOWELER, R. H.; SIEVERDING, E.; SAIF, R. S. Pratical aspects of mycorrhizal technology in tropical crops and pasture. **Plant Soil**, v. 100, p. 249–283, 1987.
- HUBER, M.; CABIB, E.; MILLER, L. Malaria parasite chitinase and penetrarion of the mosquito peritrophic membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 88, p. 2807–2810, 1991.
- HUREK, T., REINHOLD–HUREK, B., VAN MONTAGU, M., KELLEMBERGER, E. (1994). Root colonizing and systemic spreading of *Azoarcus* sp. Strain BH72 in glasses. **Journal of Bacteriology**, 176: 1913–1923.
- IBARRA, J. E.; RINCÓN, M. C. del; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D., BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M. F. de; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diverstity of *Bacillus thuringiensis* strains

from Latin América with insecticidal activity against different mosquito species. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69 (9), p. 5269–5274, 2003.

IRIARTE, J.; DUMANOIR, V. C.; BEL, Y.; PORCAR, M.; FERRANDIS, M. D.; LECADET, M. M.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Characterization of *Bacillus thuringiensis* ser. *balearica* (Serotype H48) and ser. *navarrensis* (Serotype H50): Two Novel Serovars Isolated in Spain. **Current Microbiology**, v. 40, p. 17–22, 2000a.

IRIARTE, J.; PORCAR, M.; LECADET, M. M.; CABALLERO, P. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. **Curr. Microbiol.** v.40, p. 402–408, 2000b.

JACOBS, M.J.; BUGDEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Can. J. Bot.**, v. 63, p.1262–1265, 1985.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 277–282, 2000.

KIM, H.S.; LEE, D. W.; WOO, S. D.; YU, Y. M.; KANG, S. K. Distribution, serologica identification, and PCR analysis of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Korea. **Curr. Microbiol.** 37, 195–200, 1998.

KIM, H. S.; Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and *cry* gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. **Curr. Microbiol.** v.41, p. 250–256, 2000.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. LECADET M–M. 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. Chichester: John Willey, cap.2, p. 37–69, 1993.

LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, v.25 (2), p.225–229, 2002.

- LIMA, G.; IPPOLITO, A.; NIGRO, F.; SALERNO, M. Attempts in the biological control of citrus mal secco (*Phoma tracheiphila*) using endophytic bacteria. **Dif. Piante**, v.17, p.43–49, 1994.
- LIU, M.; CAI, H. Z.; ZHANG, B. H.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. **Journal Applied Microbiology**, v. 93, p. 374–379, 2002.
- LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Science**. V. 21, p.582–606, 2002.
- M' PIGA, P., BÉLANGER, T. C. PAULITZ, BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-licopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63–28. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.50, p.301–320, 1997.
- MANDUELL, P.; CALLEJAS, R.; CABRERA, K. R.; ARMENGOL, G.; ORDUZ, S. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. **Microbiol. Ecol.** v. 44, p. 144–153, 2002.
- MARTÍNEZ, C. & CABALLERO, P. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 745–752, 2002.
- MARTINS, P. S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plant species. **An. Acad. Brás. Ciên.**, v. 66, p. 219–226, 1994.
- McCULLY, M.E, Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.983–990, 2001.
- McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Populations dynamics of endophytic bacteria in field growth sweet corn and cotton. **Can. J. Microbiol.**, v.41, p.895–901, 1995.

- MEADOWS, M. P. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. In: J. Wiley & Sons. *Bacillus thuringiensis* an environment biopesticide: theory and practice. Chichester. p. 193–220, 1993.
- MISHAGI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, v. 80 , p.808–811, 1990.
- MONNERAT, R.; SANTOS, R. C.; BAROS, P. C.; BATISTA, A. C.; BERRY, C. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 98).
- NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NILESEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer academic Publishers, p.355–367. 2000.
- NUNES, F. V. Isolamento e Identificação de Bactérias Endofíticas do Café (*Coffea Arabica* e *Coffea Robusta*) e suas Aplicações Biotecnológicas. Dissertação de mestrado, USP. São Paulo. 98p., 2004.
- OHANA, B.; MARGALIT, J.; BARAK, Z. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. subsp. *israelensis* under simulated field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 53, n. 4, p. 828–831, 1987.
- PEREIRA, J. O. **Fungos Endofíticos dos hospedeiros tropicais**. Teses de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p. 1993.
- PETRAS, S.F., AND CASIDA, L.E., Jr. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1496–1501. 1985.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). *Microbial Ecology of Leaves*. New York. Springer Verlag. p. 179–197, 1991.
- PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; SHET, I.; Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 25:284–288, 1997.

- POLANCZYK, R & ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, v.8 (2), p. 1–10. 2003.
- PORCAR, M.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, p. 309–316, 2000.
- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.39, n.1, p.11–16, 2004.
- QUADT–HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p.577–582, 1997.
- REGEV, A., KELLER, M., STRIZHOV, N., SNEH, B., PRUDOVSKY, E., CHET, I., GINZBERG, I., KONCZKALMAN, Z., KONCZ, C., SCHELL, J. & ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae . **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 3581. 1996.
- REINHOLD–HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 139–144, 1998.
- RODRIGUES, K. F.; DIAS–FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesq. Agropec. Bras.* 31 (12): 905–909, 1996
- ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. *Manihot* and *manihotoides* (Euforbiaceae): a computerassisted study. (Monografia) – New York: Hafner. 272p., 1973.
- SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E .M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 117–121, 2001.
- SALAMA, H. S. & MORRIS, O. N. The use of *Bacillus thuringiensis* in development countries. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed).

Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and practice. Chichester: John Wiley, cap.11, p.237–253, 1993.

SALLES, J. F. & BALDANI, J. I. *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico. Seropedia– RJ: Embrapa Agrobiologia, 33p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 54), 1998.

SALLES, J. F. **Uso de *Acetobacter diazotrophicus* como vetor para a expressão do gene *cry3a* de *Bacillus thuringiensis*, visando o controle de coleópteros na lavoura canvieira.** Rio de Janeiro: UFRJ, p. 64, Tese de mestrado, 1998.

SAMPSON, M. N. & GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insect. **Microbiology**, v. 144, p. 2189–2194. 1998.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins . **Microbiol. Mol. Rev.**, v. 62, n.3, p. 775–780, 1998.

SHAHABUDDIN, M. TOYOSHIMA, T.; AIKAWA, M.; KASLOW, D. C. Transmissionblocking activity if a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitinase by mosquito protease. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**. A90, p.4266–4270. 1993.

SHISHIDO, M., BREUIL, C., CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth–promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, 29: 191–196. 1999.

SMITH, R. A & COUCHE, G. A. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57: 311–315. 1991.

SORIANO, M.; BLAMCO, A.; DÍAZ, P.; PASTOR, F. I. J. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. **Microbiology**, v. 146, p. 89–95, 2000.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and

- foliage and their influence on host growth. **Biol. Fert. Soil**, v. 25, p. 13–19, 1997.
- SUZUKI, M. T.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N.; Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. **Can. J. Microbiol.**, 50(11): 973–975, 2004.
- TAECHOWISAN, T. PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology & biotechnology**, v. 19, p. 381–385, 2003.
- TEIXEIRA, M. A. **Diversidade de bactérias endofíticas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de diferentes regiões do Brasil**. 102 f. Tese (Doutorado), Unversidade de São Paulo, São Paulo, 2004
- TESTER, C. F. Influence of genetically modified endophytic bacaterium on composition and decompositions of corn residue. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 1107–1112, 1992.
- THOMAS, D. J. I.; ALUN, J.; MORGAN, W.; WHIPPS, J. M.; SAUNDERS, J. R. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in Lepidopteran and Coleopteran larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.1, p. 118–124, 2000.
- TOMASINO, S. F.; LEISTER, R. T.; DIMOCK, M. B.; BEACH, R. M.; KELLY, J.L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA* (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, v. 5, p. 442–448, 1995.
- VÄISÄNEN, O. M.; MWAISUMO, N. J.; SALKINOJA–SALONEN, M. S. Differentiation of dairy strains of the *Bacillus cereus* group by phage typing, minimum growth temperature, and fatty acid analysis. **J. Appl. Bact.**, v. 70, p. 315–324, 1991.
- VAN LOON, L. C. Pathogenesis–related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 4, p. 111–116, 1985.
- VAN FRANKENHUZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed). *Bacillus thuringiensis*, an

environment biotpesticide: theory and practice. Chichester: John Willey. cap 1. p. 1–35. 1993.

VAN FRANKENHUZEN, K. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. I CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NILESEN–LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer academic Publishers, p.371–381. 2000.

VIDAL, S.; ANDERS, E.R.B.; MONTESANO, M.; DENECKE, J. (1998). Cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora* cooperate in the salicylic acid-independent induction of a plant defense response. **Molecular Plant–Microbe–Interactions** 11: 23–32.

VILAS–BÔAS, G. F. L. T.; VILAS–BÔAS, L. A.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. **FEMS Microbiol. Ecol** ., v. 25, p. 369–374, 1998.

VILAS–BÔAS, L. A.; VILAS–BÔAS, G. F. L. T.; SARIDAKIS, H. O.; LEMOS, M. V. F.; LERECLUS, D.; ARANTES, O. M. N. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm . **FEMS Microbiol. Ecol** ., v. 31, p. 225–259, 2000.

WENHAM, J. E. Post-harvest deterioration of cassava a biotechnology perspective. Rome. 116p., 1995.

WIWAT, C.; LERTCANAWANICHAKUL, M.; SIWAYAPRA, P. PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A. Expression of chitinase encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas hydrophila* in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Gene**, v. 179, p.119–126, 1996.

APÊNDICE 1 – MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram autoclavado por 20 minutos a 121°C.

1.1 TRYPTIC SOY– AGAR (TSA) 10%

Meio TSA (Merck)	4g
Água Destilada	1000 mL
Ágar	15g

1.2 MEIO AMIDO–CASEÍNA–ÁGAR (ACA)

Amido	10 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2 g
<i>NaCl</i>	2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Ágar	16 g
H ₂ O destilada	1000 mL

1.3 TSBA® BBL (ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MEMBRANA CELULAR)

TSBA® BBL	30 g
Ágar	15 g
Água destilada	1000 mL

1.4 BACTO–PEPTONA (BP)

Bacto–peptona	7,0 g
---------------------	-------

Solução I	50,0 ml
Solução II	1,0 ml
Solução III	10,0 ml
Solução IV	10,0 ml
Glicose 30%.....	10,0ml
Água destilada	q.s.p 1000,0 ml

As soluções I, II e IV, foram autoclavadas separadamente. A solução III foi esterilizada em banho-maria por 5 minutos, à 100°C. A solução de glicose foi autoclavada por 20 minutos a meia atmosfera e adicionada ao meio somente no momento de uso.

O pH foi ajustado para 7,2 com KOH 2N.

– **Solução I**

KH_2PO_4	68 g
Água destilada.	q.s.p1000,0 ml

– **Solução II**

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12,3 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,17 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 g
Água destilada	q.s.p1000,0 ml

– **Solução III**

FeSO_4	2,0 g
-----------------------	-------

H₂SO₄ (1 N) 100,0 ml
 Água destilada q.s.p1000,0 ml

– **Solução IV**

CaCl₂.2H₂O..... 14,7 g
 Água destiladaq.s.p1000,0 ml

1.5 MEIO DE LURIA E BERTANI (LB)

Tryptona.....10,0 g
 Extrato de Levedura.....5,0 g
 NaCl.....5,0 g
 Água destilada q.s.p.....1000,0 ml

1.6 MEIO MP

Solução de sais minerais500 mL
Extrato de levedura 1 g
 Pectina cítrica..... 5 g
 Ágar 15 g
Água destilada500 mL

O pH foi ajustado para 7,0 e para 5,0 com KOH 2M e HCl

– ***Solução de sais minerais do meio MP***

(NH₄)₂SO₄ 2 g
 K₂HPO₄..... 4 g

Na ₂ HPO ₄	6 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	1 mg
H ₃ BO ₃	10 µg
MnSO ₄	10 µg
ZuSO ₄	70 µg
CuSO ₄	50 µg
MoO ₃	10 µg

1.7 MEIO CARBOXIMETILCELULOSE ÁGAR 1 % – Meio CMC

NaNO ₃	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Extrato de levedura	1,0 g
Carboximetilcelulose	10 g
Ágar	15 g
<i>Água destilada</i>	<i>1000 mL</i>

1.8 Meio TS 10 %

<i>Tryptona</i>	<i>1,5 g</i>
<i>Peptona de soja</i>	<i>0,5 g</i>
NaCl	1,5 g
Água destilada	1000 mL

APÊNDICE 2 – SOLUÇÕES, TAMPÕES E REAGENTES

2.1 SOLUÇÃO DE BENOMYL

Benomyl 0,5 g
Água destilada autoclavada 10 mL

A solução foi estocada à 4°C.

2.2 CRISTAL VIOLETA

– Solução A

Cristal violeta 2,0 g
Etanol 95 % 20,0 ml

– Solução B

Oxato de amônio 0,8 g
Água destilada 80,0 ml

Misturar as duas soluções. A mistura é estável e pode ser mantida à temperatura ambiente.

2.3 SOLUÇÃO DE LUGOL

A solução de lugol foi obtida dissolvendo-se 3 g de iodeto de potássio em 10 mL de água destilada. A esta solução foi adicionado 1 g de cristais de iodo. O volume foi completado para 100 mL, com água destilada.

2.4 SOLUÇÃO DE ETANOL 95%

Álcool etílico	95 ml
Água destilada	5 ml

2.5 SOLUÇÃO DE SAFRANINA (CONTRA CORANTE)

Safranina.....	0,25 g
Etanol 95%	10,00 ml
Água destilada	90,00 ml

2.6 REAGENTE DE SAPONIFICAÇÃO

NaOH	45 g
Metano padrão HPLC	150 mL
Água deionizada	150 mL

Foi misturados a água e o metanol, e depois adicionado o NaOH sob agitação constante.

2.7 REAGENTE DE METILAÇÃO

Ácido clorídrico 6 M	325 mL
----------------------------	--------

Metanol padrão HPLC275 mL

Foi adicionado o ácido sobre o metanol, sob agitação.

2.8 REAGENTE DE EXTRAÇÃO

Hexano padrão HPLC..... 200 mL

Metil-terc-butil-éter padrão HPLC..... 200 mL

O éter foi adicionado sob o hexano, sob alta agitação.

2.9 REAGENTE DE LAVAGEM

NaOH 10,8 g

Água deionizada900 mL

2.10 TAMPÃO TE

Tris HCl (1M) pH 7,5.....10 mM

EDTA (0,5M) pH 8,0.....1 mM

2.11 Solução Tris-HCl 1M

Tris base 12,11 g

Água Milli-Q80 mL

O pH foi ajustado para 7,5 com HCl concentrado, o volume completado para 100 mL com água Milli-Q, e autoclavado por 20 minutos a 121°C. A solução foi estocada em temperatura ambiente.

2.12 Solução de EDTA 0,5 M (pH 8,0)

NA₂EDTA.2H₂O 186,1 g

Água destilada800 mL

O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH sólido. Após a solubilização completa do EDTA, o volume foi completado para 1000 mL com água destilada. A solução foi autoclavada por 20 minutos a 121°C e estocada em temperatura ambiente.

2.13 SOLUÇÃO DE NaCl 5M

NaCl 292,2 g

Água destilada1000 mL

2.14 SOLUÇÃO ESTOQUE DE dNTP´s

Os dNTP´s (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) foram adquiridos (Life Technologies) numa concentração de 100 mM.

Para uso, foram misturados e diluídos em água Milli-Q, de modo a se obter uma concentração estoque de 2,5 mM de cada dNTP.

2.15 GEL DE AGAROSE 1 %

Agarose 1,0 g

Tampão TAE 1X.....100 mL

– Tampão TAE 50 X

Tris base 240 g

Ácido acético glacial.....	57 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0).....	100 mL

O volume foi completado para 1000 mL com água Milli-Q. O tampão foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. No momento do uso, o mesmo foi diluído com água destilada para a obtenção da concentração desejada.

2.16 SOLUÇÃO ESTOQUE DE BROMETO DE ETÍDIO

Brometo de etídio.....	100 mg
Água destilada	100 mL

2.17 SOLUÇÃO DE VERMELHO CONGO (TEATHER & WOOD, 1982)

Vermelho Congo	1 g
Água destilada	100 mL

2.18 SOLUÇÃO DE NaCl 1M

NaCl	58,44 g
Água destilada	1000 mL

A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C, por 15 minutos, a 1 atm.