



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Expressão de GFP em
***Bacillus thuringiensis* S76 uma estirpe**
selvagem ativa para Lepidoptera

Ana Flávia Alves Parente

Brasília – DF
2007



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular

Expressão de GFP em *Bacillus thuringiensis* S76 uma estirpe selvagem ativa para Lepidoptera

Ana Flávia Alves Parente

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ildinete Silva Pereira

Co-orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marlene Teixeira De-Souza

**Brasília – DF
2007**

Dedico esse trabalho ao meu pai, José da Guia Parente, meu grande exemplo de vida que sempre me ensinou a importância de buscar o conhecimento.

Agradeço...

Em primeiro lugar agradeço à Dr^a. Marlene Teixeira De-Souza, que representa muito mais que orientadora deste trabalho científico, uma grande amiga que me ensinou a ter perseverança mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada por estar ao meu lado nesses momentos, não apenas no laboratório mas também na minha vida pessoal.

Agradeço a Dr^a. Ildinete Silva Pereira pela valiosa orientação e total apoio a esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia da UnB, professores, alunos e equipe técnica, obrigada pelos momentos de descontração e pelos valiosos conselhos.

Aos professores do Laboratório de Biologia Molecular por estarem sempre prontos a colaborar com empréstimo de equipamentos, cedendo materiais e compartilhando experiência.

À Dr^a. Sônia Nair Bão e Vítor pela valiosa colaboração na parte de fotodocumentação, por ceder equipamentos e conhecimentos técnicos durante a realização desse trabalho.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular pelo empenho, pelas disciplinas oferecidas e por sempre estarem de portas abertas para os alunos.

Aos amigos de bancada Bruna, Graziela, Breno e Thiago pela amizade e carinho.

Agradeço aos meus pais e exemplo de vida, Ana Izeila Alves e José da Guia Parente meus eternos incentivadores, pelo apoio incondicional, pelo carinho e amor que foram tão importantes para realização desse trabalho. Obrigada por terem acreditado em mim e me apoiado sempre que precisei.

Às minhas irmãs Juliana e Tatiana pelo carinho e preocupação, vocês são para mim o maior exemplo de fraternidade.

Agradeço a minha segunda família, Beth, Jorge e Fernando, que me adotaram em Brasília e me mostraram que não são somente os laços de sangue que fazem uma família.

Ao meu companheiro Jorge, por estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por dividir comigo as dificuldades e alegrias durante esse período. Sua alegria, amor e compreensão foram imprescindíveis. Te amo.

À todos que participaram desse trabalho direta ou indiretamente.

Muito Obrigada!!!

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de abreviaturas	v
1.Introdução	1
1.1. <i>B. thuringiensis</i>	3
1.1.1. Toxinas Cry: estrutura, modo de ação e potencial entomopatogênico ...	7
1.1.2. Localização e organização estrutural dos genes <i>cry</i>	13
1.1.3. Esporulação e Síntese de proteínas Cry	15
1.2. Bactérias endofíticas	35
1.3. <i>Green fluorescent protein</i> (GFP)	41
2. Objetivos	55
2.1. Objetivos gerais	55
2.2. Objetivos específicos	55
3. Material e métodos	56
3.1. Estirpes e crescimento	56
3.2. Plasmídeos	56
3.3. Eletrotransformação de <i>B. thuringiensis</i>	58
3.4. Seleção de clones recombinantes	59
3.5. Análise de emissão de fluorescência	59
3.6. Perfil protéico	60
3.7. Perfil plasmidial e de restrição	60
3.8. Curva de crescimento	61
3.9. Análise morfológica das colônias	62
3.10. Análise morfológica das células	62
3.11 Meio de cultura e soluções	63

Resumo

B. thuringiensis é um importante entomopatógeno amplamente estudado e empregado como agente de controle biológico, ainda assim, a ecologia desse microrganismo é pouco explorada. Apesar da crescente utilização na agricultura desse agente, as interações com plantas são pouco conhecidas. Com o intuito de construir uma ferramenta eficaz para o rastreamento dessa bactéria, foi desenvolvida a estirpe S76GFP⁺ a partir de uma estirpe brasileira selvagem de *B. thuringiensis*. O vetor de expressão pAD43-25 contendo o gene *gfpmut3a* funcional, além do vetor parental, pAD123, contendo o mesmo gene, porém sem promotor foram transferidos para a estirpe S76, permitindo no primeiro caso a expressão constitutiva do gene durante o crescimento vegetativo. Adicionalmente, como controle, ambos vetores foram transferidos para uma estirpe acristalífera (Cry⁻). Células verdes brilhantes foram detectadas por microscopia de fluorescência, em ambas hospedeiras transformadas com o vetor pAD43-25, a partir de duas horas após a inoculação em meio líquido e que puderam ser observadas pelo restante do tempo de cultivo até o fim da esporulação. A estirpe S76GFP⁺ apresentou um discreto acréscimo no tempo de geração, embora não tenham sido observadas alterações morfológicas das colônias e células. Análises dos perfis protéico e plasmidial indicaram, respectivamente, a manutenção da expressão das proteínas Cry e do elenco dos plasmídeos residentes. Do nosso conhecimento, não apenas é o primeiro relato de visualização da emissão de fluorescência pela expressão de GFP em *B. thuringiensis*. Igualmente, é o primeiro relato de expressão de GFP em uma estirpe de *B. thuringiensis* selvagem.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, GFP, proteínas Cry, controle biológico

Abstract

Although extensively studied by its recognized potential as bioinsecticide, *B. thuringiensis* ecology is poorly understood, and despite its increasing use, little is known regarding interactions between this microorganism and plants. Thus, a tractable marker for detection of this bacterium under specific environment and physiological conditions is a valuable tool. A plasmid (pAD43-25) bearing a functional *gfp* gene and the parental vector, bearing the promoterless *gfp* gene, were introduced in the Brazilian wild-type strain *B. thuringiensis kurstaki* S76, allowing, in the first case, the constitutive synthesis of GFP during vegetative growth. Additionally, both vectors were transferred to a Cry- *B. thuringiensis* host. Green bright cells could be detected, by fluorescence microscopy and in both hosts, since 2h after inoculation in liquid medium and could be seen throughout remaining cultivation time, until complete sporulation was accomplished. Strain S76GFP+ seems to grow slower than the remaining recombinants and parental cells, whereas no perceptible change in cell or colony morphologies was observed. Protein profile and plasmidial DNA analyses indicate, respectively, that this recombinant maintained Cry proteins expression and resident plasmid outline. To our knowledge, it is the first time fluorescence is detected in a *B. thuringiensis* strain, as well as, that GFP is expressed in a wild-type *B. thuringiensis*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, GFP, Cry protein, biological control.

Lista de figuras.

Figura 1. <i>B. thuringiensis</i>	03
Figura 2. Modo de ação das proteínas Cry	08
Figura 3. Estrutura tridimensional da porção N-terminal da proteína Cry3A ..	11
Figura 4. Ciclo celular de <i>Bacillus subtilis</i>	16
Figura 5. <i>Aequoria victoria</i>	41
Figura 6. Representação da interação entre GFP, aquarina e emissão de fluorescência em <i>A. victoria</i>	42
Figura 7. Estrutura tridimensional da GFP	44
Figura 8. Esquema do processo de formação do cromóforo da GFP	46
Figura 9. Padrão de cores das diferentes proteínas fluorescentes conhecidas	47
Figura 10. Mapa físico dos plasmídeos portadores do gene <i>gfpmut3a</i>	57
Figura 11. Varredura da emissão de fluorescência	69
Figura 12. Análise da expressão de GFPmut3a pelas estirpes recombinantes S76GFP ⁺ e Cry ⁻ GFP ⁺	72
Figura 13. Emissão de fluorescência pelas células de <i>B. thuringiensis</i> S76GFP ⁺ e Cry ⁻ GFP ⁺	74
Figura 14. Emissão de fluorescência pelas células de <i>B. thuringiensis</i> S76GFP ⁺ e Cry ⁻ GFP ⁺	75
Figura 15. Emissão de fluorescência pelas células de <i>B. thuringiensis</i> S76GFP ⁺ e Cry ⁻ GFP ⁺	76
Figura 16. Análise da expressão de proteínas Cry	80
Figura 17. Curvas de crescimento de S76 (A), Cry ⁻ (B) e derivadas	83
Figura 18. Morfologia das colônias de S76 e Cry ⁻ parentais e recombinantes ..	84
Figura 19. Morfologia das células de S76 e Cry ⁻ parentais e recombinantes ..	85
Figura 20. Morfologia das células de S76 e Cry ⁻ parentais e recombinantes ..	86
Figura 21. Morfologia das células de S76 e Cry ⁻ parentais e recombinantes ..	87

Lista de abreviaturas

A_{600} - absorvância em 600 nanometros
ACB- agente de controle biológico
APS- persulfato de amônia
 α - alfa
BFP- *blue fluorescent protein* (proteína de fluorescência azul)
 β - beta
CADR- caderina
CFP *cyan fluorescent protein* (proteína de fluorescência azul)
cm- centímetros
Cyt- endotoxinas citolíticas
 λ - comprimento de onda
 λ_{\max} - comprimento de onda máximo
Da- dälton
DO- densidade ótica
 δ - delta
DsRed- proteína de fluorescência vermelha
ECFs- fatores sigma extra-citoplasmáticos
EDTA- ácido etilediamino tetracético
EGFP- *Enhanced green fluorescent protein* (proteína de fluorescência verde mutante)
GFP- *green fluorescent protein* (proteína de fluorescência verde)
GPI- glicosilfosfatidil-inositol
h- horas
HCT- meio de cultura próprio para esporulação de *B. thuringiensis*
°C- graus Celsius ou centígrados
k- kilo
kb- kilobase
kDa- kilodältons
LB- meio de crescimento "Luria – Bertani"
LC₅₀- concentração letal para 50% da população
M- molar ou molaridade (mol/L)
mA- miliampères
Mb- mega base
MDa- mega dältons
MEV- microscopia eletrônica de varredura
Mg- miligrama
mL- mililitro
mm- milímetro
mM- milimolar
min- minutos
 μ g- micrograma
 μ L- microlitro

nm- nanômetro
OGM- organismo geneticamente modificado
PCR- reação em cadeia da polimerase
PG- peptideoglicano
pH- potencial hidrogeniônico
rpm- rotações por minuto
SASPs- proteínas ácido-solúveis
SDS- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE- gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
 σ - sigma
Tris- tris (hidroximetil) aminometano
VIP- *vegetative insecticidal protein* (proteína inseticida de fase vegetativa)
YFP- *yellow fluorescent protein* (proteína de fluorescência amarela)

1. Introdução

Desde o surgimento da agricultura o homem enfrenta problemas com os insetos-praga que causam danos, diretos e indiretos, às plantações. Por esse motivo, tornou-se indispensável o controle das populações de insetos, promovendo o aumento da produção agrícola e proteção de culturas e florestas. Com essa finalidade, a aplicação de inseticidas químicos é uma estratégia amplamente difundida. No entanto, apresenta desvantagens principalmente quanto ao aspecto ambiental, provocando contaminação da água e alimentos, intoxicação de organismos não-alvos, concentração ao longo da cadeia alimentar e indução de resistência dos insetos-praga ao inseticida químico. O potencial de efeitos adversos ao meio ambiente associado à utilização indiscriminada de inseticidas químicos torna importante a busca de métodos alternativos para o controle de pragas, uma dessas alternativas é o controle biológico.

O controle biológico consiste no emprego de um organismo atuando como predador, parasita, patógeno, ou ainda um produto desses organismos, no controle de populações insetos. Essa é uma estratégia muito utilizada tanto em sistemas agroecológicos como na agricultura convencional. Dentre as estratégias de controle biológico adotadas atualmente, a aplicação de inseticidas microbianos se destaca. A ampla utilização de agentes microbianos no controle de insetos ocorre, principalmente, pelo menor custo desses em relação aos demais bioinseticidas.

Diversas espécies de microrganismos, incluindo fungos e bactérias, são conhecidos agentes causadores de doenças em insetos, dentre esses, as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* são as mais difundidas, sendo o *B. thuringiensis* o mais utilizado (Szewczyk, *et al.*, 2006). Com a otimização das formulações, a

comercialização se intensificou surgindo diversos produtos, utilizando diferentes subespécies de *B. thuringiensis*. Desde então esse microrganismo tem sido o mais importante agente de controle biológico (ACB) comercializado, com cerca de 200 produtos registrados nos EUA, sendo responsável por 2% do mercado mundial de inseticida, e mais de 90% do faturamento com bioinseticidas (Szewczyk, *et al.*, 2006; Glare e O'Callaghan, 2000; Beegle e Yamamoto, 1992).

1.1. *B. thuringiensis*

B. thuringiensis (figura 1) é uma bactéria Gram positiva, esporulante, pertencente ao grupo filogenético do *B. cereus* e foi isolada, pela primeira vez, em 1901 por S. Ishiwata. O microrganismo estava associado a uma doença do bicho-da-seda (*Bombix mori*), onde a lagarta adquire um aspecto flácido, e por esse motivo, foi denominado *B. sotto* (*sotto* significa flácido em japonês). Em 1911, um *Bacillus* similar foi re-isolado por E. Berliner, a partir de lagartas de *Anagasta kiihniella* mortas e foi denominado *B. thuringiensis* (Glazer e Nikaido, 1995; Berliner, 1915)

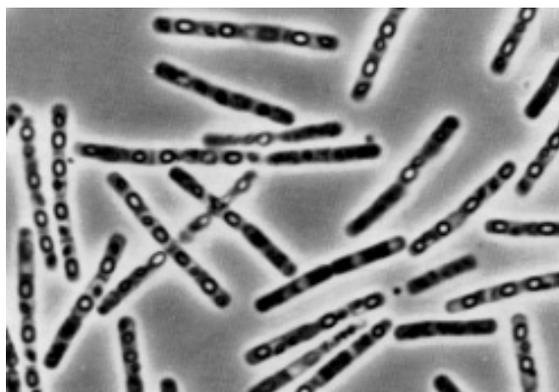


Figura 1. *B. thuringiensis*. Microscopia de contraste de fase, aumento 1000x.
Fonte: <http://textbookofbacteriology.net/Anthrax.html>

Baseado em análise filogenética de sequência de rDNA 16S, a bactéria Gram positiva *B. cereus* está situada no *Phylum Firmicutes*, onde é subsequentemente agrupado com outras formadoras de endósporos, contendo baixo teor de G+C. Por sua vez, o grupo filogenético de *B. cereus* inclui além dessa, as espécies *weihenstephanensis*, *mycoides*, *pseudomycoides*, *anthracis* e *thuringiensis* (Onyenwoke *et al.*, 2004). Tradicionalmente, essas bactérias têm sido diferenciadas por características fenotípicas e potencial patogênico. Os membros mais estudados são

o *B. cereus*, conhecido pela habilidade de causar intoxicação alimentar provocando gastroenterite em humanos, além de outras doenças, incluindo oftalmite e periodontite. O *B. anthracis* constitui um notório e potente patógeno de animais, agente etiológico do antraz, potencial arma biológica e o *B. thuringiensis* sintetiza inclusões cristalinas letais para larvas de insetos utilizadas com muito êxito como ACB.

Alinhamento de seqüências de rDNA 16S ou de seqüências espaçadoras entre seqüências de rDNA 16S e 23S, além da caracterização de outras biomoléculas não tem se mostrado suficiente para distinguir entre esses membros. Assim, não há consenso se essas bactérias deveriam ser separadas como espécies ou se o *B. thuringiensis* e *B. anthracis* deveriam ser consideradas um subgrupo de *B. cereus*. Recentes análises de genômica e de proteômica comparativas apontaram que os cromossomos do *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* exibem altos níveis de sintonia, com uma limitada diferença em conteúdo gênico (Rasko, *et al.* 2005). Também foi observada similaridade de perfil protéico de três estirpes, uma representante de cada espécie e curadas de seus plasmídeos (Gohar, *et al.* 2005). Esses últimos dados complementam e corroboram os anteriores, contribuindo para avançar na discussão sobre a especiação desse grupo. Por outro lado, apesar dessas similaridades, essas três espécies ocupam diferentes nichos ecológicos apresentando especificidade por hospedeiros e um diferente potencial patogênico, papel que pode ser mediado por informação plasmidial. O complexo perfil plasmidial dessas três espécies varia grandemente, em número e tamanho.

Segundo de Maagd *et al.* (2003) a ecologia de *B. thuringiensis* ainda é muito pouco conhecida, sendo um organismo ubíquo, podendo ser isolado do solo, larvas mortas, grãos estocados, superfícies de plantas, água, dentre outros. *B. thuringiensis* é descrito como um patógeno oportunista de insetos e é encontrado na natureza predominantemente na forma de esporos, que podem disseminar amplamente pelo ambiente, uma vez que esses esporos podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo. A epizootia causada por *B. thuringiensis* ocorre raramente (Aronson *et al.*, 1986) e apenas em algumas situações específicas no campo, ou em casos especiais, como aglomerados de insetos, comuns em espécies sociais, criatórios ou em locais de armazenamento de grãos.

De acordo com Rajanmohan *et al.* (1998) o *B. thuringiensis* apresenta atividade tóxica contra pragas importantes da agricultura, além de insetos vetores de doenças em humanos, como por exemplo os mosquitos dos gêneros *Aedes* e *Culex*. Formulações à base dessa bactéria são aplicadas no ambiente desde 1933, se destacando no mercado mundial desde o lançamento do primeiro produto a partir desse microrganismo, na França em 1938. Entretanto, o sucesso comercial desse agente entomopatogênico deu-se após 1950, quando foi desenvolvido um método de fermentação aeróbia em tanques. Com a otimização das formulações, a comercialização se intensificou surgindo diversos produtos baseados em diferentes subespécies de *B. thuringiensis*. Desde então, esse microrganismo tornou-se o mais importante ACB comercializado, sendo responsável por mais de 90% do faturamento mundial com bioinseticidas (Glare e O'Callaghan, 2000; Beegle e Yamamoto, 1992)

A eficácia das formulações à base de *B. thuringiensis* e as vantagens da utilização em relação aos agentes químicos sintéticos, minimizando a contaminação da água e alimentos, a intoxicação de organismos não-alvos, a concentração ao longo da cadeia alimentar e a seleção de insetos-praga resistentes, fazem com que este se torne uma alternativa promissora para o controle de insetos (Jung e Côté, 2000). Embora após aplicações de formulações comerciais, esporos de *B. thuringiensis* sejam encontrados no solo por vários anos, observa-se declínio na população e na toxicidade.

Outra importante utilização do *B. thuringiensis* consiste na expressão heteróloga da atividade entomopatogênica, essa estratégia se tornou importante na agricultura mundial. James (2004) relatou que a utilização de milho e algodão recombinantes abrange 22,4 milhões de hectares por todo o mundo em 2004, um aumento de 25% em relação ao ano anterior. Segundo Shelton *et al.* (2002), a grande vantagem da utilização de plantas transgênicas inseto-resistentes é a redução do uso de inseticidas convencionais. Nos Estados Unidos, o número de aplicações de inseticidas contra o complexo de pragas do algodão diminuiu de 4,6 aplicações anuais entre os anos de 1992 e 1995 para 0,8 aplicações anuais entre 1999 e 2001 com a introdução do algodão transgênico. Na China, o uso dessa tecnologia proporcionou um decréscimo no uso de inseticidas foliares entre 60 e 80% (Romeis, *et al.*, 2006).

1.1.1. Toxinas Cry: estrutura, modo de ação e potencial entomopatogênico

A atividade entomopatogênica de *B. thuringiensis* ocorre, principalmente, pela ação das δ -endotoxinas, ou proteínas Cry, depositadas em forma de inclusões cristalinas, no citoplasma da célula-mãe durante a fase estacionária. São conhecidos isolados de *B. thuringiensis* ativos para larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Mallophaga, Hymenoptera, Orthoptera e Homoptera, além de algumas espécies de Nematoda, Protozoa e Acarinae. É importante ressaltar a alta especificidade das toxinas que, em muitos casos, é eficaz apenas para determinada espécie, não sendo ativa para outros invertebrados, para animais e para plantas (Schnepf *et al.*, 1998).

Höfte e Whiteley (1989) propuseram uma nomenclatura para as proteínas Cry baseada na estrutura primária, relacionado à ordem do inseto-alvo, bem como a morfologia do cristal protéico. No entanto, segundo Crickmore *et al.* (1998), essa nomenclatura apresentava-se inadequada, principalmente nos casos de toxinas com atividade para mais de uma ordem de insetos. A nomenclatura atual é baseada apenas em relações moleculares entre as cadeias primárias das proteínas. O sistema, adiciona à raiz monomérica **Cry**, números e letras ordenados em hierarquias indicando o grau de divergência filogenética. As superfamílias, indicadas por números, como em Cry1 apresentam até 45% de identidade. Os holótipos, designados por letras maiúsculas (Cry1**A**), denotam até 78%. A terceira categoria indicada por letra minúscula (Cry1**Aa**), denota identidade de até 95%. A quarta categoria indicada por números, representa identidade superior a 95% (Cry1**Aa1**). Até a última atualização do banco de dados (26/04/2006) foram depositadas 463 seqüências de genes *cry*, que codificam

essas toxinas, cujas seqüências de aminoácidos deduzidas permitiu um agrupamento em 51 superfamílias e 156 holótipos (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

As proteínas Cry são sintetizadas sob a forma de protoxinas e, quando ingeridas por larvas susceptíveis, é solubilizada no ambiente alcalino do intestino médio (típico de larvas pertencentes às ordens Lepidoptera e Diptera) e processadas pela ação de proteases locais. A toxina atravessa a membrana peritrófica e liga-se a receptores de células epiteliais do intestino, insere-se na membrana apical das células colunares, formando canais iônicos inespecíficos, o que resulta na perda do potencial transmembrânico ocasionando um aumento na absorção de água e provocando a lise osmótica da célula (Aronson e Shai, 2001; figura 2). A larva também pode sofrer de inanição, uma vez que a ingestão da toxina provoca paralisa da peça bucal até o intestino médio, poucos minutos após a ingestão (de Maagd *et al.*, 2003, Copping e Menn, 2000).

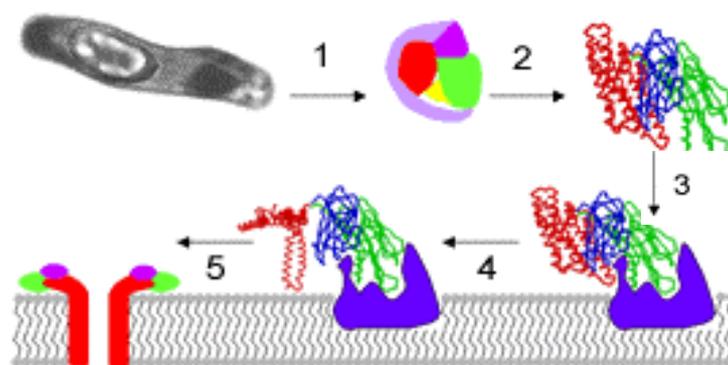


Figura 2. Modo de ação das proteínas Cry. 1. ingestão e solubilização da protoxina. 2. ativação por proteólise das extremidades. 3. interação com os receptores da superfície do epitélio intestinal. 4 e 5. inserção na membrana e formação de poros. (Crickmore)

Em larvas de Lepidoptera são conhecidas, no mínimo, quatro proteínas receptoras diferentes, situadas na superfície das células intestinais e que interagem com proteínas Cry. Foram descritas: uma N-aminopeptidase ancorada à glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (Knight *et al.*, 1994), uma proteína semelhante a caderina (CADR), (Nagamatsu *et al.*, 1999), uma proteína de 270 kDa glicoconjugada (Valaitis *et al.*, 2001), e uma fosfatase alcalina ancorada à GPI (Jurat-Fuentes e Adang, 2004).

Além das proteínas Cry, vários isolados de *B. thuringiensis* produzem endotoxinas menores (25-28 kDa) denominadas endotoxinas citolíticas (Cyt), pois possuem ação citolítica *in vitro* (de Maagd *et al.*, 2003). Estudos com *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, com conhecida atividade entomopatogênica para insetos da ordem Diptera, detectaram as proteínas Cry11, Cry4B, Cry4A e Cyt1A atuando sinergisticamente. Foram analisadas as concentrações letais médias (LC₅₀) das toxinas expressas isoladamente e em diversas combinações. A toxicidade de complexo nativo é consideravelmente maior que as toxinas individuais, porque existe um sinergismo entre os componentes, particularmente entre Cyt1A e as proteínas Cry, em *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. Foi proposto também que a combinação nativa provavelmente facilita a ingestão e solubilização do cristal (Poncet, *et al.*, 1997; Crickmore *et al.*, 1998).

De acordo com Knowles (1994), o intestino das larvas de Lepidoptera suscetíveis, geralmente, possui pH alcalino, evitando assim a germinação dos esporos ingeridos. No entanto, esse modo de ação, ao causar paralisia do intestino, retém os

esporos e disponibiliza nutrientes para iniciar a germinação, causando morte por septicemia. O tecido da larva, então, é utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento vegetativo da bactéria. Assim, o potencial entomopatogênico desse microrganismo é também ampliado pela presença de outros fatores, não formadores de inclusões cristalinas, tais como a β -exotoxina, toxinas VIPs (*vegetative insecticidal protein*), fosfolipases, quitinases, toxinas termolábeis e antibióticos (Glare e O'Callaghan, 2000). Dessa forma, esses produtos de crescimento vegetativo atuam sinergisticamente nesse processo infectivo como a importância das fosfolipases no processo de infecção em larvas *Trichoplusia ni* por *B. thuringiensis* (Zhang *et al.*, 1993), demonstrando a importância dessas enzimas na virulência da bactéria. Lertcanawanichakul *et al.* (2004), descreveram aumento da toxicidade de mutantes de *B. thuringiensis* expressando quitinases em larvas de *Lymantria dispar*.

De acordo com de Maagd *et al.*, (2003), as δ -endotoxinas são depositadas em forma de inclusões cristalinas insolúveis. A morfologia variada, depende da composição da porção C-terminal das protoxinas, região provavelmente relacionada com a promoção de cristalização. Por outro lado, a região N-terminal está relacionada com a toxicidade (Li *et al.*, 1991). A deposição de inclusões insolúveis é importante para diminuir a digestão proteolítica, impedindo a degradação prematura da protoxina, além de proteger a própria célula da ação tóxica da porção N-terminal. Vazquez-Padron *et al.* (2004) observaram que além de atuar como entomotoxina, essa região da cadeia primária também provoca efeitos letais no crescimento de *B. thuringiensis* quando expressa destituída da porção C-terminal.

Baseado na comparação da seqüência primária de aminoácidos, essas protoxinas podem ser reunidas em dois grupos, sendo que o primeiro compreende estruturas com 130-135 kDa e o segundo compreende proteínas, naturalmente truncadas, com 70-73 kDa. Independente do tamanho, a digestão proteolítica é indispensável para a toxicidade.

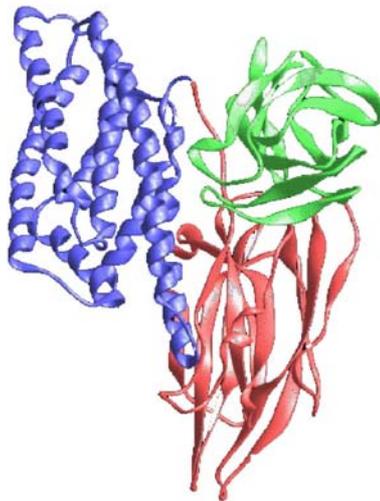


Figura 3. Estrutura tridimensional da porção N-terminal da proteína Cry3A. Ilustração da estrutura ressaltando a divisão em três domínios. Em azul domínio I, em verde domínio II e em vermelho domínio III.

Fonte: http://www.nal.usda.gov/bic/BTTOX/cry3a_side.gif

A porção N-terminal da proteína Cry3A (Li *et al*, 1991), Cry1Aa (Grochulski *et al*, 1995) e Cry2A (Morse *et al*, 2001) tiveram sua estrutura tridimensional resolvidas por cristalografia de difração de raios X. As estruturas tridimensionais descritas são similares e são formadas por três domínios conservados (figura 3). Cada um desses domínios é constituído por cerca de 200 resíduos de aminoácidos. O domínio I está envolvido no processo de inserção da toxina na membrana, os domínios II e III, aparentemente, promovem a ligação da toxina ao receptor da membrana epitelial. O domínio III também protege a toxina de proteólises adicionais mantendo a estrutura

tóxica intacta. Em adição, o processo da formação dos canais iônicos envolve interações entre funções dos três domínios (de Maagd *et al.*, 2003; Yamamoto e Dean, 2000).

1.1.2. Localização e organização estrutural dos genes *cry*.

B. thuringiensis possui um genoma de 2,0 a 5,7 Mb e contém cerca de 34% de G+C (Schnepf *et al.*, 1998). Até 20% desse material genético pode se apresentar em forma de elementos extracromossomais. Grande parte desses elementos são plasmídeos que variam, consideravelmente, em número de cópias e massa molecular de uma subespécie para outra, podendo apresentar cerca de 4-6 MDa até mais de 300 MDa (Aronson *et al.*, 1986) isto é, cerca de 2 a 600 kb. Assim como em outras bactérias Gram positivas, os plasmídeos podem ser classificados em duas categorias: os de massa molecular inferior a 15 MDa, que replicam com um baixo número de cópias pelo mecanismo do círculo rolante, e aqueles com massa molecular superior a 15 MDa, que replicam com alto número de cópias, via mecanismo teta (Schnepf *et al.*, 1998; Lereclus *et al.*, 1982). A relação molecular entre os dois grupos é baixa, embora exista conservação parcial da seqüência de DNA no interior de cada um dos grupos.

Os genes *cry* estão localizados em plasmídeos grandes, muitos desses conjugativos. Com raras exceções, esses genes podem estar localizados no cromossomo (Rajamohan *et al.*, 1998). A maioria dos plasmídeos de *B. thuringiensis* é considerada críptica, pois além de portarem os genes *cry*, pouco se conhece sobre a biologia desses.

As diferentes subespécies de *B. thuringiensis* apresentam de um a vários genes *cry* que podem estar localizados em um mesmo ou em diferentes replicons (Schnepf *et al.*, 1998). É comum a ocorrência de dois ou mais genes *cry* adjacentes em plasmídeos com massa molecular superior a 100 MDa e um gene *cry* em um plasmídeo com 40-50 MDa (Aronson, 1994). Dentre as estirpes que possuem esse padrão estão as

pertencentes à subespécie *kurstaki*, sendo que a maioria contém cinco genes, três do tipo *cry1* e dois do tipo *cry2*. Dois dos genes do tipo *cry1* (*cry1Aa* e *cry1Ac*) e os dois genes do tipo *cry2* estão localizados no mesmo replicon, enquanto que o gene *cry1Ab* está localizado em um plasmídeo de cerca de 44 MDa.

De acordo com Mahillon *et al.* (1994), várias estirpes de *B. thuringiensis* possuem seqüências de genes *cry* flanqueadas por elementos móveis, incluindo seqüências de inserção das famílias *IS231*, *IS232* e *IS240*, em adição a classe II de transposons, *Tn4430*. Sugere-se que estes elementos em associação com a conjugação podem colaborar na disseminação horizontal entre as subespécies mediando a alta diversidade desses genes. Segundo Schnepf *et al.* (1998), essas características são convenientes para o desenvolvimento de novas estirpes, permitindo a ampliação do espectro de atividade, ou sinergismo, pela coexpressão de múltiplas toxinas, assim como mutações nos genes *cry*. Estudos indicam a capacidade de transferência de plasmídeos entre diferentes estirpes de *B. thuringiensis*, durante a colonização de larvas de *Spodoptera frugiperda* e *Galleria mellonella* (Jarrett e Stephenson, 1990). Essa transferência ocorre em níveis semelhantes aos obtidos em culturas laboratoriais. Transferência de plasmídeos também foi observada em bactérias do solo (Thomas *et al.*, 2000; Vilas-Bôas *et al.*, 1998).

1.1.3. Esporulação e síntese de proteínas Cry

A síntese do cristal tóxico está relacionada com a expressão das proteínas Cry durante a fase estacionária (Agaisse e Lereclus, 1995). A expressão, em elevadíssimos níveis, pode representar de 25 a 30% das proteínas totais das células em esporulação (Du *et al.*, 1994). Ainda que a formação do esporo possa ser ativada, principalmente, por carência nutricional esse é um processo dispendioso do ponto de vista energético, no entanto a produção de δ -endotoxinas prossegue em paralelo.

Esporos são tipos celulares metabolicamente dormentes, altamente especializados e estabelecidos para sobreviver em condições adversas, incluindo carência nutricional, altas temperaturas, radiações ionizantes, agentes químicos variados tais como solventes e detergentes, enzimas hidrolíticas, dessecação, pHs extremos, presença de antibióticos etc. O esporo maduro e a célula vegetativa de microrganismos são estrutural, fisiológica e bioquimicamente diferentes (figura 4).

Graças à dormência, os esporos bacterianos não requerem fontes de nutrientes ou energia para persistirem. A dormência combinada com a resistência permite uma sobrevivência extrema. Certamente, os esporos bacterianos estão entre os de maior prevalência no ambiente, podendo permanecer dormentes por até milhões de anos. Uma estirpe de *B. sphaericus*, isolada em 1995 (Cano e Borucki) a partir de um fóssil de abelha e uma estirpe halotolerante de *Salibacillus* sp., isolada, em 2000, de uma salina por Vreeland e colaboradores, foram datadas de 25-40 milhões de anos e de 250 milhões de anos, respectivamente. Ambos isolados foram capazes de germinar quando inoculados em meio apropriado. Entretanto, esses e outros resultados semelhantes são

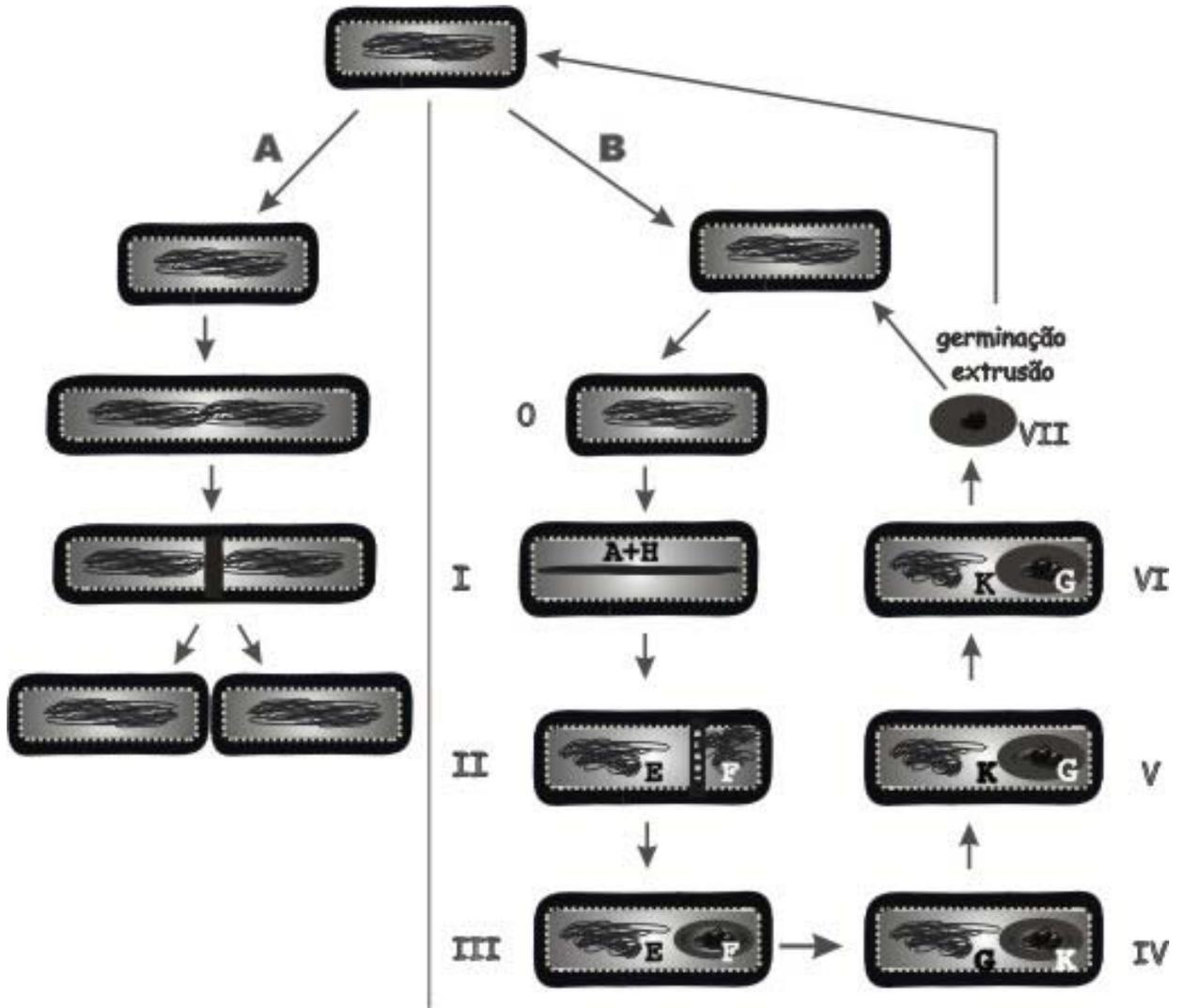


Figura 4. Ciclo celular de *B. subtilis*. A) **Crescimento vegetativo.** Após a replicação do DNA as duas cópias do genoma são separadas e arrastadas em direção aos polos opostos da célula. Os demais componentes celulares são também duplicados. Um septo simétrico é formado dando origem a duas células-filhas idênticas entre si e à célula parental (fissão binária). B) **Esporulação.** **Estágio 0:** célula em fim de crescimento vegetativo. **Estágio I:** no início do processo de diferenciação, ao invés de serem segregadas, as duas cópias do genoma formam um longo filamento axial de DNA, que estende-se por todo o esporângio, aumentando o comprimento da célula pré-divisional. **Estágio II:** Em contraste com a fissão binária, a septação é deslocada para um dos polos do esporângio, dando origem a dois tipos de células, o pré-esporo e outra maior, a célula-mãe. O septo separa as duas cópias do genoma e a porção restante, cerca de 70%, é arrastada para o interior do compartimento do pré-esporo. **Estágio III:** engolfamento. **Estágio VI:** deposição do córtex. **Estágio V:** formação das capas. **Estágio VII:** maturação do esporo. **Estágio VII:** a lise da parede celular da célula-mãe permite a liberação do esporo maduro para o meio. Com a formação do septo a esporulação torna-se irreversível e apenas após a **germinação e a extrusão**, a célula vegetativa formada pode iniciar novo ciclo de fissão binária ou reiniciar a formação de um esporo. As letras A, H, E, K, F e G indicam os respectivos fatores sigma em atividade durante os estágios e compartimentos mostrados.

temas de um amplo debate e estão aguardando validação.

O processo de esporulação é melhor conhecido em formadoras de endósporos (a partir desse ponto, referidos apenas como esporos) dos gêneros *Clostridium*, que compreende bactérias anaeróbias e *Bacillus*, que compreende bactérias facultativas. Esse complexo processo foi amplamente revisado em recentes artigos (Errington, 2003; Aronson, 2002; Stephenson e Lewis, 2005; Moir *et al.*, 2002; Phillips e Strauch, 2002; Stephens, 1998 e Grossman, 1995) está esquematizado na figura 4 e resumido abaixo.

A formação do esporo (figura 4) ocorre no esporângio, uma estrutura em diferenciação, que consiste de dois compartimentos celulares diferentes: o compartimento da célula-mãe, de maior tamanho, e o compartimento do pré-esporo. O processo de diferenciação termina com a lise da célula vegetativa, que deu origem a uma única estrutura de resistência - o esporo maduro que é liberado para o meio externo. Logo, a esporulação promove mudanças morfológicas e fisiológicas radicais ao fazer uma remodelagem de duas células, a inibição da atividade metabólica na célula-filha (o esporo) e a destruição da célula-mãe.

Esses esporos são estruturas altamente refratáveis, vista com um destacado brilho ao microscópio ótico de contraste de fase. Essas estruturas consistem de um núcleo central envolvido por cinco camadas: membrana plasmática (interna e externa), parede celular da célula germinativa, córtex, capas (interna e externa) e o exosporo. O núcleo, a membrana plasmática, a parede celular da célula germinativa formam uma estrutura

condensada envolvida e protegida pela capas. A complexidade das capas, assim como a ocorrência ou não do exosporo variam entre as diferentes espécies. Cada um desses componentes tem um papel bem definido na dormência, resistência e germinação. Uma exceção é o exosporo. Essa delgada camada que envolve os esporos é quimicamente complexa e não estabelece contato físico com as proteínas da capa. Há um grande espaço vazio entre as duas estruturas. Até o momento, não há função essencial descrita para o exósporo. Em algumas espécies há sugestões que, por ser uma estrutura hidrofóbica, poderia auxiliar na dispersão do esporo. Entretanto, em espécies de *Bacillus* onde a estrutura não está ausente, como por exemplo em *B. subtilis*, não pode ser constada diferenças importantes entre dormência e resistência.

A formação do esporo requer uma intrincada rede de regulação temporal e espacial e, em *B. subtilis*, certamente a formadora de esporo mais estudada, requer mais de 150 produtos gênicos exclusivamente devotados ao processo, dos quais 75 devem agir seqüencialmente, sob pena de interrupção prematura da formação do esporo. Embora em *Bacillus* a esporulação seja induzida por depleção de nutrientes, esse programa de diferenciação celular não é iniciado imediatamente após o retardo no crescimento induzido por essa limitação. As células cessam o crescimento exponencial típico e entram na fase estacionária. Durante a transição para a fase estacionária, as células iniciam um vasto repertório de eventos em resposta a crescente adversidade ambiental. Essa diversidade de respostas alternativas inclui a ativação da motilidade flagelar, que permite, por quimiotaxia, buscar novas fontes de nutrientes; a produção de antibióticos para inviabilizar ou inibir o crescimento de microrganismos competidores no solo; a secreção de enzimas hidrolíticas, que permitem processar

proteínas e polissacarídeos extracelulares viabilizando a importação e utilização como nutrientes alternativos. A indução do estado de competência permite a importação de DNA exógeno que pode ser incorporado *de novo* ou, eventualmente, é integrado de maneira estável, mediado por recombinação homóloga, e adicionando informação ao genoma. As estratégias utilizadas por *B. subtilis* para a tomada de decisão entre permanecer em crescimento vegetativo ou entrar em dormência é hoje um modelo que tem ajudado na elucidação dos princípios envolvidos na tomada de decisão de processos de diferenciação celular em eucariotos.

Com essa diversidade de possibilidades, o energeticamente dispendioso e extremamente complexo processo de esporulação é o último recurso utilizado em resposta a escassez de nutrientes e é inibido até que as demais alternativas de crescimento e sobrevivência tenham sido exauridas. Ainda assim, nesse momento, algumas condições devem ser atingidas para a instalação do processo como, por exemplo, a alta densidade celular. Antes de iniciar a esporulação, os *Bacillus* também monitoram várias condições internas, tais como integridade e estado da replicação do cromossomo e a integridade do ciclo de Krebs. Este controle estridente provavelmente assegura que, uma vez iniciada, a formação do esporo seja bem sucedida, pois a esporulação, além de complexa, é irreversível. Se houver falha na produção do esporo, essa célula perde, para sempre, a possibilidade de propagar sua informação genética. Apenas a germinação do esporo maduro leva a restauração da célula vegetativa, estrutura capaz de se duplicar por fissão binária.

Após a dormência, em condições físico-químicas apropriadas, a germinação é rapidamente disparada em resposta a sinais ambientais, levando a uma rápida

degradação da estrutura do esporo, ativação do metabolismo e perda de resistência. O evento seguinte, denominado extrusão, envolve crescimento e é seguida pela divisão celular. Esses eventos provocam mudanças na permeabilidade da membrana, no fluxo de íons e ativam enzimas degradativas. A eficiência na germinação, conhecida como ativação, pode ser aumentada, em laboratório, por diversos tratamentos incluindo calor, tempo e agentes químicos e é mediada por mecanismos ainda desconhecidos. Um grande número de componentes é necessário para iniciar o processo com destaque para os germinantes, pequenas moléculas, notadamente aminoácidos, açúcares ou purinas. Os agentes germinantes atuam individualmente ou como mistura, por exemplo, asparagina, glicose, frutose e íons potássio atravessam as camadas mais externas se ligam a receptores localizados na membrana do esporo, disparando uma via de transdução de sinal que ativa o processo. Assim, a viabilidade de espécies endoesporulantes pode ser mantida, quase que permanente, pela transição entre células vegetativas e esporuladas (figura 4).

As espécies *B. subtilis* e *B. anthracis* foram as primeiras bactérias formadoras de esporos descritas em dois artigos independentes, publicados em 1876 no mesmo volume da revista *Beitr. Biol. Pflanz* por Ferdinand Cohn e Robert Koch, respectivamente. A importância dessas publicações pode ser observada ainda nos dias de hoje, pelo volume de artigos disponíveis e, conseqüentemente, o conhecimento gerado em diversas áreas da microbiologia e disciplinas afins, com um grande destaque para o *B. subtilis*. Nesse contexto, essa espécie constitui o paradigma de diferenciação celular em procariotos. Grande parte do que se conhece sobre a esporulação de *B. thuringiensis* e espécies relacionadas vem de dados obtidos nesse

modelo. Seguramente, esse processo é extremamente semelhante entre as espécies desse gênero.

Em *B. subtilis*, assim como em outras bactérias formadoras de endósporos, a diferenciação celular é dividida, até certo nível de maneira arbitrária, em seis a sete estágios (I-VII) como descritos na figura 4. É importante ressaltar que, o tempo necessário para que cada um desses estágios ocorra, e conseqüentemente, o tempo de produção e de liberação do esporo maduro é característico de cada espécie. O tempo é referido como t_n , onde n é o número de horas necessário para início de um evento particular. Desse modo, t_0 indica o início do processo que, em condições de laboratório ocorre em 8-9 e 48 horas, para *B. subtilis* e *B. thuringiensis*, respectivamente. Alternativamente, tempos negativos, t_{-n} , indica eventos anteriores à entrada na fase estacionária.

A série de mudanças bioquímicas e morfológicas complexas e bem definidas que caracteriza a esporulação ilustra um verdadeiro processo de diferenciação dentro do ciclo celular de procariotos e é delineada por eventos que culminam com a formação do esporo maduro (figura 4). Assim, esse processo de diferenciação envolve três tipos de células: a pré-divisional; a célula-mãe e o pré-esporo. No estágio zero, que antecede a esporulação, as células ainda estão em fase vegetativa e replicando DNA. O processo tem início na fase estacionária com os eventos típicos do **estágio I**, a formação do filamento axial, isto é, a formação de um longo filamento de DNA que estende por toda a célula pré-divisional, onde os dois genomas estão organizados do centro para os pólos do esporângio, sendo a origem de replicação cromossomal voltada para os pólos. Ainda se observa a excreção de exoenzimas, incluindo proteases. No

estágio II, ocorre a formação do septo assimétrico, isto é, em um dos pólos do esporângio, levando a delimitação de dois compartimentos de tamanhos distintos. Essa é a primeira mudança morfológica dramática e é acompanhada da segregação do material genético. Esse material é resultado do último ciclo de replicação da célula vegetativa, e até o final do processo permanecerá ativo nos dois compartimentos formados: o do pré-esporo, a célula germinativa e o da célula-mãe, onde ocorre a montagem do esporo. Uma vez que o septo é formado, a esporulação é irreversível. O marco do **estágio III** é a formação do protoplasto (futuro núcleo do esporo) via engolfamento do pré-esporo pela membrana citoplasmática da célula-mãe e mediado por um mecanismo semelhante à fagocitose. Esse evento é acompanhado do aumento na expressão das enzimas dos ciclos de ácido tricarbóxico e do glioxilato. O aspecto brilhante visto ao microscópio de contraste de fase se inicia no **estágio IV** com a formação do córtex, onde também é iniciada a desidratação do núcleo. O **estágio V** marca a formação do revestimento protéico do esporo, as capas interna, que é mais delgada, e externa, com maior espessura. O **estágio VI** inaugura a maturação do esporo, onde há modificação cortical da peptídeoglicana (PG), absorção de ácido dipicolínico (específico de endósporo) e cálcio, além da expressão de pequenas proteínas ácido-solúveis (SASPs – com 75 resíduos de aminoácidos). Observa-se também um aumento na desidratação, pelo menos em parte, pela substituição de água por dipicolinato de cálcio. Esses eventos levam ao desenvolvimento de resistência aos agentes físicos e químicos. Finalmente, no **estágio VII**, quando a nova estrutura, de morfologia arredonda a ovalada, bem definida e com elevada refratibilidade, pode ser observada dentro do esporângio, é o fim da maturação. A localização do esporo no

citoplasma da célula-mãe pode ser central como em *B. subtilis*, subterminal como em *B. thuringiensis* ou terminal como em *Clostridium ssp.* A liberação do esporo ocorre em algumas espécies produtoras de autolisinas, enzimas capazes de hidrolisar ligações beta (1-4), essas últimas típicas da estrutura da parede celular bacteriana, provocando a lise e liberação do esporo maduro para o meio.

O citoplasma do núcleo do esporo apresenta pH entre 5,5-6; cerca de uma unidade abaixo do pH citoplasmático da célula vegetativa, consequência da alta concentração das SASPs (cerca de 5%) complexada com o material genético. Essa associação previne diversas lesões no DNA durante a dormência. De fato, o maior fator de proteção conferido ao DNA durante a dormência é a saturação do material genético com essas proteínas. Essa ligação altera de maneira dramática a química do DNA e a atividade enzimática relacionada. A ligação dessas proteínas também é fundamental para a resistência a radiação UV, dessecação, calor, agente oxidantes etc. Essas proteínas são imediatamente degradadas, por proteases específicas também contidas no núcleo do esporo, no início da germinação, visando disponibilizar os primeiros aminoácidos utilizados pela nova célula em formação, durante a extrusão. O núcleo ainda contém 10-15% de cálcio, quelado por ácido dipicolínico (dipicolinato de cálcio, 1:1), assegurando que esse cátion divalente não vaze para o meio externo. Esses componentes, em adição a ribossomos, estão incluídos dentro uma membrana citoplasmática modificada (membrana interna), que delimita o núcleo do esporo. Uma fina camada de PG, remanescente da célula vegetativa durante a formação do septo cerca a membrana interna. Durante a germinação, essa camada fornece os primeiros monômeros para o início da formação de novas camadas de PG. A camada de PG

remanescente é circundada por uma espessa camada denominada córtex, composta por um tipo incomum de PG. No córtex, ao contrário do que acontece em paredes celulares típicas de células vegetativas, resíduos de aminoácidos são projetados por camadas adjacentes e estão frouxamente ligados. O córtex é rapidamente degradado no início da germinação. Finalmente, o revestimento do esporo é composto por cerca de trinta proteínas, sintetizadas e depositadas em uma precisa hierarquia, dando origem as capas interna e externa. Eventualmente, a capa pode estar contida numa estrutura extremamente delgada (exosporo). Durante a formação do esporo, o núcleo é desidratado, restando entre 20-30% do volume de água contido na célula vegetativa. O esporo se torna refringente e resistente aos agentes físicos e químicos descritos, sendo estas propriedades também correlacionadas com a PG cortical e a presença de grande quantidade de dipicolinato de cálcio.

A nomenclatura de genes de esporulação, em geral, utiliza o monômero *spo* e adiciona algarismos romanos, correspondentes ao estágio da formação do esporo onde mutações nas seqüências desses genes provocam a interrupção prematura do processo. Por exemplo, mutação em genes do tipo *spoII*, interrompe a formação do septo e não permite a passagem para o estágio III, enquanto que os genes que codificam produtos necessários ao início da esporulação são do tipo *spo0*. Os diferentes operons são distinguidos pela adição de uma letra maiúscula, como por exemplo, *spoIIA*, *spoIIB* etc. Os diferentes cístrons, dentro de um dado operón, são representados por novas letras maiúscula (*spoIIAA*, *spoIIAB* etc). Por sua vez, e seguindo a nomenclatura padrão adotada para produtos gênicos de procariotos, as respectivas proteínas são designadas pela mesma nomenclatura, no entanto sendo a primeira letra maiúscula e

sem o itálico (SpoIIAA, SpoIIAB etc.). Entretanto, nem todos os genes e produtos envolvidos na endoesporulação são designados segundo essas regras. Muitos genes foram nomeados segundo a função bioquímica dos produtos, a exemplo do gene *spoOH*, que codifica um fator sigma e foi renomeado *sigH* (σ^H), além de outros exemplos descritos abaixo.

A iniciação da transcrição é o evento mais importante na regulação da expressão gênica em procarionotos. A RNA polimerase de bactérias consiste de cinco subunidades ($\alpha_2\beta\beta'\omega$), mas essa estrutura, denominada núcleo da enzima (RNAP), não é capaz de iniciar a transcrição a partir de seqüências promotoras. Por essa razão, a RNAP necessita associar-se a pequenas proteínas, conhecidas como fatores sigma (σ), formando a RNA polimerase holoenzima (RNAP σ). Esse complexo de seis subunidades pode reconhecer seqüências promotoras. Além de promover especificidade a RNAP, os fatores sigma contribuem para a separação das fitas de DNA e, depois do início da transcrição, se dissociam do núcleo (escape do promotor), podendo ser novamente recrutado para iniciar novo ciclo de iniciação. A maioria das bactérias sintetiza diferentes fatores sigma que, por sua vez, reconhecem diferentes seqüências consenso. Essa variedade de fatores sigma permite a bactéria manter a expressão gênica basal e, ao mesmo tempo, regular a expressão em resposta a um estímulo ambiental específico. Células de *B. subtilis* induzidas à fase estacionária por carência nutricional possuem uma diversidade de opções. Circuitos de regulação, altamente complexos e interconectados, dirigem a expressão gênica diferencial e permitem que a população opte por uma estratégia de sobrevivência. A decisão depende do resultado de uma elaborada rede de transdução de sinal designada, pelos

autores que descreveram o modelo, de *phosphorelay*. Essa via, composta por diversas quinases e fosfatases, afeta, em última instância, a atividade dos fatores-chaves da transcrição, Spo0A e AbrB. Se a decisão for entrar em esporulação, uma cascata temporal e espacial de regulação controlada por fatores sigmas, ligados ao núcleo da RNA polimerase, promove a formação do esporo.

O genoma de *B. subtilis* codifica pelo menos dezessete fatores sigma, incluindo sete fatores sigma extra-citoplasmáticos (ECFs). Os ECFs ativam a expressão gênica em resposta a uma diversidade de sinais de estresse, sendo a maioria co-transcrita com um ou mais reguladores negativos. Em geral, esses reguladores incluem uma proteína transmembrânica com um domínio extra-citoplasmático, o sensor do sinal e um domínio inibitório intracelular, que funciona como um fator anti-sigma ao se ligar e inibir o respectivo ECF até o momento de entrar em atividade. Dentre os dezessete fatores sigma dessa Gram positiva, nove são fatores sigma primários, e reconhecem seqüências promotoras de genes cujos produtos estão envolvidos no metabolismo basal (σ^A); de genes de resposta ao choque térmico (σ^B); de genes cujos produtos estão relacionados com flagelo e quimiotaxia (σ^D), além de sete ECF (SigV, SigW, SigX, SigY, SigZ, SigM e YlaC), que são co-transcritos com seus respectivos operons. Outros cinco fatores sigma primários são relacionados com a esporulação (σ^H , σ^F , σ^E , σ^K e σ^G).

O σ^H , que é observado em baixas concentrações durante o crescimento vegetativo, funciona primariamente na transição para a fase estacionária até a formação do septo. Em conjunto com Spo0A fosforilado, é o elemento chave na

regulação do início da formação do esporo. Os outros quatro (σ^F , σ^E , σ^K e σ^G) são exclusivos desse processo. Em adição aos dezesseis fatores sigma primários pertencentes à família σ^{70} , o σ^L participa na síntese dos produtos do operón *levanase* e pertence à família σ^{54} .

Desse modo, a profunda mudança morfológica que ocorre durante a esporulação é acoplada a uma mudança global na expressão gênica que, por sua vez, é mediada por sucessivas ativações de fatores sigmas alternativos. A elevação no nível de σ^H , em conjunto com a ativação do regulador de resposta *Spo0A*, na célula pré-divisional permite disponibilizar produtos importantes para a formação do filamento axial, divisão assimétrica e compartimentalização da expressão gênica. Imediatamente após a divisão assimétrica, σ^F se torna ativo exclusivamente no compartimento do pré-esporo e σ^E é ativado exclusivamente no compartimento da célula-mãe. As duas linhas separadas de expressão gênica dirigem o engolfamento do pré-esporo, pela célula-mãe, e resultam na ativação dos fatores sigmas tardios, específicos de cada um dos compartimentos. Após o engolfamento, o fator σ^G é ativado no compartimento do pré-esporo e o fator σ^K é ativado no compartimento da célula-mãe. As sínteses do córtex e das capas, a maturação do esporo e a lise da célula-mãe são mediadas pelas atividades dos fatores sigmas especificamente ativados nos dois compartimentos em estágios tardios. Cada passo é dependente da conclusão do anterior.

Provavelmente, a esporulação é idêntica em *B. thuringiensis* e *B. subtilis*, com a adicional produção de δ -endotoxinas, no citoplasma da célula-mãe de *B. thuringiensis*. A diferenciação é disparada por depleção de nutrientes e ainda assim a intensidade na

produção e o processo de esporulação, associado a todas as mudanças fisiológicas e morfológicas, prosseguem em paralelo. Dessa maneira, o empacotamento das toxinas, em cristais insolúveis, está relacionado com a expressão dessas proteínas durante a fase estacionária (Agaisse e Lereclus, 1995). Em condições laboratoriais, as células de *B. thuringiensis* em esporulação sintetizam cerca de 0,5 mg de proteínas Cry por mL de meio (cerca de 10^8 células/mL), acumuladas em estruturas com tamanho compatível com a presença de 10^6 moléculas de proteínas de 130 kDa por cristal. Essa relação corresponde, tipicamente, de 25 a 30% das proteínas totais das células em esporulação (Du *et al.*, 1994). Essa premente expressão, a partir de genes presentes em baixo número de cópias, só pode ser explicada pela intervenção de elementos genéticos que atuam na síntese e cristalização dessas toxinas e envolvem mecanismos extremamente eficazes. Dessa maneira, além do interesse em estudar essa bactéria com objetivos de otimização como ACB, o *B. thuringiensis* é um atraente modelo de estudo do ponto de vista da interação entre a síntese de δ -endotoxinas, codificadas por plasmídeos, e a esporulação.

Segundo Aronson (2002), aparentemente os genes *cry* evoluíram, ou estão evoluindo, para assegurar a coordenação com a esporulação, a partir da transferência de seqüências plasmídeais, flanqueadas por elementos móveis. Após essa transferência, um ancestral, muito provavelmente o *B. cereus*, incorporou essas informações ao repertório genético estável, algum tempo depois da aparição dos insetos.

De fato, a expressão dos genes *cry* em sua maioria é dirigida pelos dois fatores sigmas específicos do compartimento da célula-mãe. Essa estratégia permite a ativação

da síntese ainda nos estágios iniciais, permanecendo eficiente até estágios tardios da esporulação. Dois pontos de iniciação da transcrição sobrepostos foram mapeados definindo dois promotores, *BtI* e *BtII*, com estruturas sobrepostas e que podem ser ativados de maneira seqüencial (Wong *et al.*, 1983). O promotor *BtI* entra em atividade a partir do estágio II (t_2) com a transcrição dirigida por um homólogo funcional de σ^E , prosseguindo até t_5 , então no estágio III. A partir desse momento, a continuidade da expressão é garantida pelo reconhecimento de *BtII* por um homólogo de σ^K . Essa arquitetura rara de seqüências promotoras, que controla a transcrição em níveis semelhantes durante todo período de expressão, é reconhecida pelas RNAP σ^{35} (Brown e Whiteley, 1988) e RNAP σ^{28} (Brown e Whiteley, 1990), respectivamente. A seqüência de aminoácidos deduzida revelou 88 e 85% de identidade desses fatores sigma como os homólogos funcionais σ^E e σ^K de *B. subtilis*, respectivamente (Adams *et al.*, 1991). Do mesmo modo, o controle temporal da transcrição no compartimento da célula-mãe, pela ativação sucessiva de σ^{35} e σ^{28} , ao mesmo tempo assegura a formação do esporo e produção do cristal. A transcrição de genes que ocorre no compartimento do pré-esporo é dependente dos homólogos funcionais de σ^F e σ^G , respectivamente, ainda não caracterizados em *B. thuringiensis*.

Outra variação no sistema dual de expressão das toxinas Cry, foi relatada para os genes *cry4A*, *cry4B* e *cry11A* de *B. thuringiensis israelensis* (Poncet *et al.*, 1997), transcritos em baixos níveis durante o final da fase exponencial, a partir de uma seqüência promotora reconhecida por σ^H . Essa seqüência promotora sobrepõe uma seqüência de DNA reconhecida por σ^E . Dessa forma, os respectivos transcritos estão

presentes no final da fase do crescimento exponencial, produto de σ^H , mas não podem ser observados no início da fase estacionária, graças a repressão mediada pela interação de Spo0A com a seqüência alvo (Spo0A *box*), também presentes na região 5' UTR desse gene. Entretanto, um novo ciclo de transcrição pode ser observado entre t_4 e t_6 , a partir de seqüências promotoras reconhecidas por σ^E .

Aparentemente, a sobreposição de promotores é uma importante modificação da utilização de fatores de transcrição da esporulação empregada para a expressão de genes *cry* e para a montagem das protoxinas em inclusões (ver abaixo). Apesar disso, uma surpreendente exceção nesse padrão de expressão foi observada em 1993 por De-Souza e colaboradores. Nesses estudos sobre regulação, foi observada a presença de mensageiros do gene *cry3A* a partir de t_2 , ou seja, duas horas antes do início da fase estacionária. O ponto de iniciação da transcrição foi mapeado 558 pb acima do ATG iniciador (De-Souza *et al.*, 1996; Agaisse e Lereclus, 1994a), mas o mensageiro é imediatamente processado dando origem a uma forma mais estável (ver abaixo). Análise da seqüência promotora revelou alta homologia com a seqüência canônica reconhecida por σ^A de *B. subtilis* (De-Souza *et al.*, 1996; Agaisse e Lereclus, 1994b). Dessa maneira, é apropriado dividir os genes *cry* em dependentes da esporulação, como é o caso da maioria e, com poucas exceções, independentes desse processo.

Parece óbvio que proteínas expressas em altos níveis, como as δ -endotoxinas, sejam codificadas por mensageiros estáveis. Entretanto, os mRNAs são moléculas com meias-vidas curta quando comparadas com outras biomacromoléculas, como proteínas ou DNA. Apesar disso, os transcritos de bactérias tem uma ampla variação na

estabilidade, podendo permanecer funcional desde 0,5 até 50 minutos, com meia-vida média de três minutos (Takayama e Kjelleberg, 2000). Em 1972, Glatron e Rapoport demonstraram que os mensageiros de gene *cry* permanecem ativos por cerca de dez minutos. Resultados posteriores apontaram que, a maioria dos genes *cryI* está organizada em unidades monocistrônicas, com ponto de iniciação da transcrição situado tipicamente acima do ATG iniciador, cerca de 100-150 pb, e seqüência de terminação da transcrição situada próxima do códon de terminação da tradução (Schnepf *et al.*, 1998; Agaisse e Lereclus, 1995; Baum e Malvar, 1995). A terminação da transcrição de *cryIA* é independente de Rho e a estrutura terminadora é caracterizada por grandes seqüências invertidas e repetidas (IRs), potenciais formadoras de estruturas em alça e que, possivelmente funcionam como retroreguladores positivos, protegendo esses mensageiros contra o ataque de exonucleases com atividade 3'→5' (Wong e Chang, 1986).

A análise estrutural da região 5' UTR do gene *cry3A* (De-Souza *et al.*, 1993 e 1996; Agaisse e Lereclus, 1994a) sugere que o mensageiro, com ponto de iniciação da transcrição mapeado no nucleotídeo -558, é processado postranscionalmente, dando origem a um mRNA mais estável e com extremidade 5' mapeada em -129. O elemento estabilizador foi atribuído a uma seqüência similar à seqüência consenso Shine-Dalgarno (SD) consenso, localizada na extremidade 5' UTR do gene. Mutações nessa região mostram que essa SD adicional não é funcional, do ponto de vista traducional, mas media a ligação da extremidade 3' do rRNA 16S a região. Por sua vez, a ligação da subunidade ribossomal 30S estabiliza o transcrito correspondente. Outros genes *cry3* apresentam mecanismo semelhante (Schnepf *et al.*, 1998).

Os genes *cry* são transcritos em diferentes níveis, resultando em quantidades desiguais de protoxinas dentro de uma mesma inclusão (Aronson, 2002). Diversos fatores podem explicar esse aparente paradoxo: o número de cópias dos diferentes plasmídeos portadores dessas informações numa dada estirpe, as diferenças em estabilidade inerentes a cada produto e diferenças no nível de transcrição, ainda que esse evento seja mediado por regiões promotoras idênticas. Essas diferenças, até o momento pouco dissecadas, podem ser mediadas por informações contidas em seqüências que flanqueiam a extremidade 5' UTR do gene, situadas anteriormente à região promotora. O seqüenciamento de genes *cry*, de uma maneira geral, se limita a pequenos fragmentos que flanqueiam a região codante, fornecendo pouca ou quase nenhuma informação adicional a respeito da regulação da expressão.

As inclusões compostas por protoxinas variam em tamanho e forma (Aronson, 2002). A estrutura e solubilidade do cristal dependem da energia necessária para o rompimento das inúmeras pontes dissulfeto e de componentes adicionais. Essas morfologias refletem a porção C-terminal das respectivas cadeias primárias. A extremidade C-terminal das proteínas de 130-140 kDa é rica em resíduos de cisteína (entre 16 e 19) interligados por pontes S-S intracadeia. As proteínas naturalmente truncadas, como as do tipo Cry3, não possuem esse alto número de resíduos de cisteína, aparentemente envolvidos na formação do cristal bipiramidal. A estrutura dessa protoxina provavelmente é empacotada por interações iônicas intermoleculares (Li *et al.*, 1991), num citoplasma com características redutoras, próprias da fase de crescimento vegetativo. Por outro lado, o ambiente oxidante do compartimento da célula-mãe é mais apropriado para a formação de pontes S-S.

Diversos elementos que aumentam a síntese e empacotamento de proteínas naturalmente truncadas como Cry2A e Cry11A, foram identificados. Esses elementos incluem duas proteínas que otimizam a tradução e/ou a cristalização dessas protoxinas. Uma proteína de 20 kDa, codificada pelo gene *orf3* do operon de *cry11A* e uma de 29 kDa, codificada pelo gene *orf2* do operon de *cry2A*, aparentemente atuam de modo semelhante à chaperonas e facilitam a cristalização. Diversos estudos mostraram que esses elementos isolados, em combinação ou em associação com outros elementos genéticos, podem ser manipulados para aumentar a produção de proteínas Cry.

A limitação do conhecimento da ecologia de *B. thuringiensis*, assim como o benefício de acumular uma grande diversidade de toxinas em altos níveis dificulta ainda mais especular sobre a regulação dos genes de δ -endotoxinas. Em adição ao que foi resumido acima, provavelmente existem outros eventos menos óbvios relacionados com a regulação da expressão dessas toxinas, muitos desses mediados por informações contidas em plasmídeos de *B. thuringiensis*, a exemplo das exotoxinas e VIPs. Assim, para o melhor conhecimento da biologia molecular dessa bactéria, o potencial de atividades codificado por plasmídeos, que representa até 20% do genoma, deve ser analisado em conjunto com aqueles contidos no cromossomo.

Apesar da alta eficiência dessas toxinas, o *B. thuringiensis* apresenta algumas limitações como ACB. Nos casos onde a cultura é atingida por um complexo de pragas, a alta especificidade desse microrganismo compromete a utilização desse agente. Por outro lado, existem casos onde a própria ecologia da praga dificulta esse tipo de controle, quando as larvas se alimentam de tecidos internos ou de raízes, conseqüentemente impossibilita o acesso do *B. thuringiensis*. Além disso, os cristais

de *B. thuringiensis* apresentam baixa persistência no campo, pois podem ser degradados pela ação de raios ultravioleta ou lavados por fatores ambientais, como água da chuva ou orvalho. Entretanto, essas restrições tem sido superadas com o desenvolvimento de estratégias mais eficientes, por meio de processos biotecnológicos. Técnicas como a do DNA recombinante e outras manipulações gênicas têm proporcionado alternativas, tanto pela otimização dos formulados a base de *B. thuringiensis*, quanto pela expressão transgênica (Valadares-Inglis *et al.*, 1998).

Nesse sentido, a compreensão da ecologia de *B. thuringiensis*, bem como a interação dessa bactéria com outros organismos, pode proporcionar uma melhor exploração do potencial como ACB, inclusive, permitindo a exploração de recentes relatos que apontam para a interação de *B. thuringiensis* com plantas, por um tipo de colonização característico de endofíticas (Bai *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2006). Por esse motivo, o esclarecimento dessas interações são importantes para, eventualmente, promover maior versatilidade no controle microbiano de insetos.

1.2. Bactérias endofíticas

Os microrganismos são encontrados colonizando os mais diversos *habitats*, como o sistema digestório de animais superiores, a superfície e o interior de plantas, a matéria orgânica morta, a água doce e salgada etc. Sua capacidade de adaptação permite que estejam presentes mesmo em ambientes considerados inóspitos para outros seres vivos, tais como fontes termais submarinas e interior de rochas e geleiras (Newman & Banfield, 2002).

Tecidos de plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano. No interior das plantas hospedeiras, os microrganismos podem ocupar diferentes nichos e, por esse motivo, podem ser relacionados em classes distintas. Aqueles classificados como epífitos são encontrados na superfície de plantas, os fitopatógenos são agentes causadores de doenças e os endofíticos colonizam os tecidos internos da hospedeira, estabelecendo associações duradouras e naturais, sem que essa relação cause danos substanciais à hospedeira, podendo, em muitos casos, estabelecer uma relação benéfica (Azevedo *et al.*, 2000; Hallmann *et al.* 1997).

A distinção entre os microrganismos colonizadores de tecidos de plantas foi proposta em 1866 por Bary. Em alguns casos, o tipo de relação, benéfica ou patogênica, depende de fatores como condições ambientais ou equilíbrio com as comunidades microbianas. Sendo assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições, comportar-se como patógeno. Ou ainda, uma epífita pode colonizar tecidos internos da planta, atuando como endofítica ou patogênica (Sabaratnam e Beattie, 2003; Andrews e Harris, 2000). Entretanto, microrganismos que estabelecem infecções dormentes, ou latentes, não são considerados endofíticos, uma vez que essa

relação não é duradoura (Bacon e Hinton 1997). Assim, a distinção entre endofíticos, epifíticos e fitopatógenos tem proposição apenas didática, pois a interação entre microrganismos e plantas pode variar, tornando-se difícil estabelecer um limite para discriminar cada uma dessas classes (Baldani *et al.*, 1997). Dentro dessa dinâmica, Azevedo *et al.* (2000) acrescentam que, mais recentemente, Baldani e colaboradores sugeriram o termo “endofítico associativo ou facultativo” para denominar as estirpes capazes de colonizar a superfície e interior da raiz e sobreviver bem no solo. Por outro lado, “endofítico obrigatório” denominaria as estirpes que são incapazes de sobreviver bem no solo, mas são capazes de colonizar o interior da raiz e as partes aéreas da planta.

Dessa maneira, são considerados endofíticos os microrganismos encontrados colonizando tecidos vegetais por, ao menos, uma parte de seu ciclo de vida. Esses podem ser isolados a partir de tecidos de plantas com superfície descontaminada ou diretamente dos tecidos internos (Hallmann *et al.*, 1997). O interesse no emprego de endofíticas no controle biológico de pragas agrícolas e patógenos de plantas surgiu somente após 1980, com a descoberta desse potencial de utilização (Azevedo *et al.*, 2000; Jacobs, *et al.* 1985). Esses microrganismos também podem induzir alterações fisiológicas em plantas tornando as hospedeiras mais resistentes ao estresse hídrico (Azevedo *et al.*, 2000).

Desde então, o crescente entendimento da interação planta-endófito e o relato de funções importantes desses microrganismos com as hospedeiras viabilizaram a utilização de bactérias endofíticas no controle biológico de patógenos (Hallmann *et al.*, 1997), na indução de crescimento vegetal (Bent e Chanway, 1998; Hallmann *et al.*,

1997; Hoflich *et al.*, 1994), na biorremediação de áreas poluídas (Newman e Reynolds, 2005), na fixação do nitrogênio atmosférico e na síntese de fitormônios e enzimas (Lambert e Joos, 1989).

Diversos microrganismos endófitos possuem a capacidade de produzir fitormônios, como as auxinas, as citocininas, as giberelinas, o ácido abscísico e o etileno, que proporcionam a estimulação do crescimento vegetal. Essa característica foi relatada em espécies de bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Lee *et al.* 2002).

Os microrganismos endofíticos podem atuar, em certos casos, no controle biológico de pragas e patógenos antagonizando os agentes causadores de doenças. Os endófitos ainda podem competir por nutrientes ou ainda liberar compostos capazes de inibir o crescimento de patógenos (Azevedo *et al.*, 2000), como é o caso de uma estirpe endofítica de *B. subtilis*, que atua no controle do fungo *Fusarium moniliforme*, patógeno de milho (Bacon *et al.* 2001).

Um dos primeiros relatos do controle biológico de pragas por endófitos descreve um metabólito secundário sintetizado pelo fungo *Phomopsis oblonga* ativo para larvas do besouro *Physocnemum brevilineum*, conhecido vetor do patógeno *Ceratocystis ulmi*, impedindo assim a propagação da doença em olmo (Claydon *et al.*, 1985).

Estudos demonstraram que algumas endofíticas são diazotróficas, ou seja, são capazes de fixar nitrogênio (Engelhard *et al.*, 2000; Olivares *et al.*, 1996; Ureta *et al.*, 1995). A fixação do nitrogênio é o processo de conversão de N₂, um gás inerte que

representa 70% da composição da atmosfera, à formas mais reduzidas e mediado exclusivamente por bactérias. A obtenção do nitrogênio em formas reduzidas é indispensável pois fornece compostos nitrogenados diretamente para as plantas por meio de associações. A outra forma de obtenção do nitrogênio ocorre apenas pela decomposição de organismos mortos e liberação dos mesmos no ambiente, disponibilizando o nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal. Gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras foram identificadas como hospedeiros de diversas espécies de bactérias endofíticas diazotróficas, sendo as principais *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum* spp (Boddey *et al.* 2003; James 2000; Baldani *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997).

A principal via de penetração de endófitos na planta é a raiz da hospedeira. No entanto, essa penetração também pode ocorrer, em regiões aéreas como flores, caules, folhas, por meio de aberturas naturais como lenticelas, hidatódios ou por ferimentos nos tecidos (Hallmann *et al.*, 1997; Roos e Hattingh, 1983). Outra estratégia de entrada é pela degradação da parede celular da planta por atividades celulolíticas e pectinolíticas microbianas, permitindo o acesso para os tecidos internos (Azevedo, 2000).

Após a penetração os microrganismos endofíticos podem se fixar no ponto de entrada ou se difundir pela planta, colonizando células, espaços intercelulares, ou o sistema vascular (Bell *et al.*, 1985; Jacobs *et al.*, 1985; Patriquin *et al.*, 1978).

Com o intuito de monitorar a colonização de plantas hospedeiras e, conseqüentemente, compreender melhor a relação entre microrganismos e plantas, estudos utilizando a expressão heteróloga de GFP tem sido realizados, permitindo,

avaliar o tipo de colonização das hospedeiras tanto por endofíticos quanto por patógenos (Hallmann, 1997).

A elucidação das interações entre bactérias e plantas é essencial, não apenas para o entendimento ecológico incluído as relações entre os microrganismos e suas hospedeiras, mas também pelas aplicações biotecnológicas tanto na medicina, quanto na agricultura e na indústria, pela prevenção da invasão por patógenos, pela produção de hormônios, pela expressão heteróloga por endofíticas, dentre as diversas outras aplicações até então descritas. Apesar dessa importância os microrganismos endofíticos são relativamente pouco estudados (Strobel e Daisy, 2003; Bloemberg e Lugtemberg, 2001; Azevedo *et al.*, 2000).

Baseado em relatos anteriores, as espécies dos gêneros *Bacillus*, estão entre as endofíticas predominantes isoladas nas diferentes hospedeiras estudadas (Araújo, 2002; Hallmann *et al.*, 1997). Dentre as bactérias do gênero *Bacillus* encontradas em tecidos vegetais, a espécie *B. thuringiensis*, conhecida pelo seu potencial entomopatogênico, foi descrita colonizando raízes de soja o que levou estimulação do crescimento de tecido, além de produzirem biocinas, atuando então como microrganismos endofíticos (Gray *et al.*, 2006). De acordo com Bai *et al.* (2002), dentre quatorze isolados de bactérias, possivelmente endofíticas e isoladas de raízes de soja, três pertencem ao gênero *Bacillus*. Duas dessas foram identificadas, por análise filogenética da subunidade ribossomal 16S, como *B. subtilis* e uma de *B. thuringiensis*.

O *B. thuringiensis* é uma bactéria amplamente estudada. No entanto, sua ecologia ainda é pouco conhecida, uma vez que a maioria dos trabalhos descritos está

relacionada ao seu potencial entomopatogênico (de Maagd *et al.*, 1997). O uso da GFP como ferramenta de monitoramento pode facilitar o estudo da ecologia dessa bactéria, bem como sua interação com a hospedeira. A elucidação de genes envolvidos nesses processos permitirá também a construção de recombinantes otimizados para a utilização como ACB, além de possibilitar a rastreabilidade desses OGMs.

1.3. *Green fluorescent protein (GFP)*

A proteína de fluorescência verde, *green fluorescent protein (GFP)*, foi relatada pela primeira vez em 1962 por Shimomura e colaboradores, durante experimentos que visavam identificar a molécula capaz de promover a emissão de bioluminescência em espécies de água-viva do gênero *Aequoria* (figura 5). O alvo do estudo era a proteína quimioluminescente aquarina, entretanto, uma outra proteína capaz de emitir forte fluorescência verde foi identificada como um subproduto do processo de purificação da aquarina. Essa proteína foi denominada *green protein* pois seu precipitado apresenta coloração verde mesmo em luz ambiente (Hastings e Morin, 1969). No entanto, essa nomenclatura foi considerada inadequada, e referindo-se à capacidade de emitir fluorescência verde, foi modificado para *green fluorescent protein* (Morin e Hastings, 1971).



Figura 5. *A. victoria*. Fotografia demonstrando a emissão de fluorescência por *A. victoria*.

Fonte: www.immunok.com/newsimages

Em 1974, Morise e colaboradores elucidaram a relação entre as proteínas aquarina e GFP na bioluminescência de *Aequorea* sp. A aquarina é responsável pelo fornecimento da energia necessária para a emissão de luz, que promove a excitação das moléculas de GFP, por um mecanismo do tipo Föster. A GFP absorve luz com uma excitação máxima em comprimento de onda (λ) de 395 nm, e no estado excitado dissipa a energia na forma de luz verde $\lambda_{\text{máx}}$ de 509 nm (figura 6). Na ausência de GFP, a aquarina emite luz azul com $\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm.

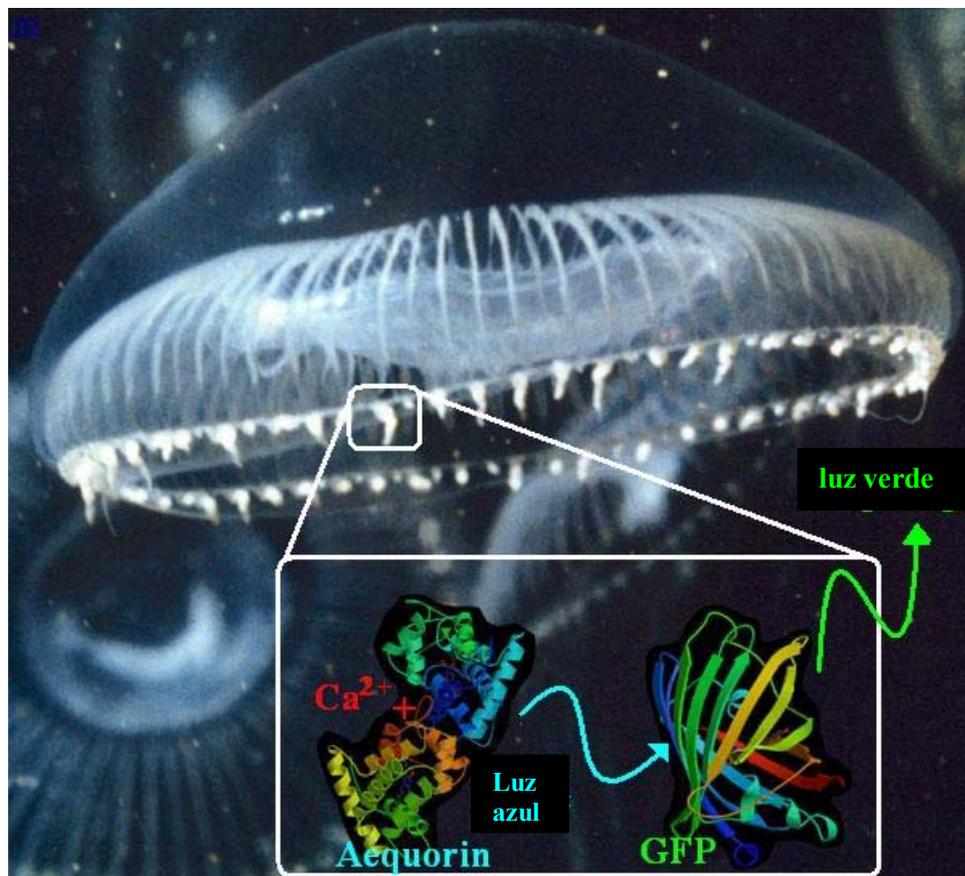


Figura 6. Representação da interação entre GFP, aquarina e emissão de fluorescência em *A. victoria*. Aquarina emite luz azul promovendo a excitação da GFP, resultando na emissão de luz verde. Fonte: <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP2.htm>

Inicialmente, ambas, aquarina e GFP, despertavam atenção pela sua forte capacidade de absorvência em luz visível, porém, não apresentavam nenhuma

importância particular que despertasse interesse em sua aplicação prática (Shimomura, 2005). Os subseqüentes estudos de caracterização da GFP possibilitaram a cristalização, em 1974, por Morise e colaboradores, e a resolução de seu padrão de difração por raio X, em 1988, por Perozzo e colaboradores.

A seqüência de aminoácidos da cadeia primária da GFP foi elucidada em 1992 po Prasher e colaboradores, por meio da clonagem e seqüenciamento do DNA genômico e complementar (cDNA) do gene correspondente, denominado *gfp*. Foi determinado que a proteína possui 238 resíduos de aminoácidos e massa molecular calculada de 26.888 Da.

A estrutura do cristal foi resolvida somente em 1996, por dois grupos independentes (Örmo *et al.*, Yang *et al.*), sendo uma estrutura composta por onze folhas β em formação do tipo barril, alinhadas por uma α -hélice no eixo do cilindro (figura 7A). O cromóforo, ou fluoróforo, encontra-se no interior do cilindro (figura 7B) sustentado pelas α -hélices. As estruturas estão depositadas no “Protein Data Bank” com o número de acesso 1EMA (Örmo *et al.*, 1996) e 1GFL (Yang *et al.*, 1996).

A fluorescência da GFP é explicada pela presença de um cromóforo denominado p-hidroxibenzilideneimidazolidinona formado pela ciclização e oxidação autocatalítica dos resíduos de aminoácidos Ser-Tyr-Gly (figura 8), nas posições 65-67 (Cody *et al.*, 1993). A formação do cromóforo ocorre independente da adição de co-fatores e com a proteína solubilizada, uma vez que em estado insolúvel a cadeia polipeptídica é incapaz de adquirir a conformação ativa (Reidi e Flynn, 1997). Durante a formação do cromóforo, a molécula de GFP assume uma conformação próxima à nativa, possibilitando a formação de uma imidazolinona por ataque nucleofílico do

carbonil Ser₆₅ à amida Gly₆₇, seguido pela desidratação. Finalmente, o oxigênio molecular desidrogeniza a ligação α - β do resíduo 66, conjugando o grupo aromático com a imidazolinona, tornando assim, a molécula capaz de emitir fluorescência (Reid e Flynn, 1997; Heim *et al.*, 1994).

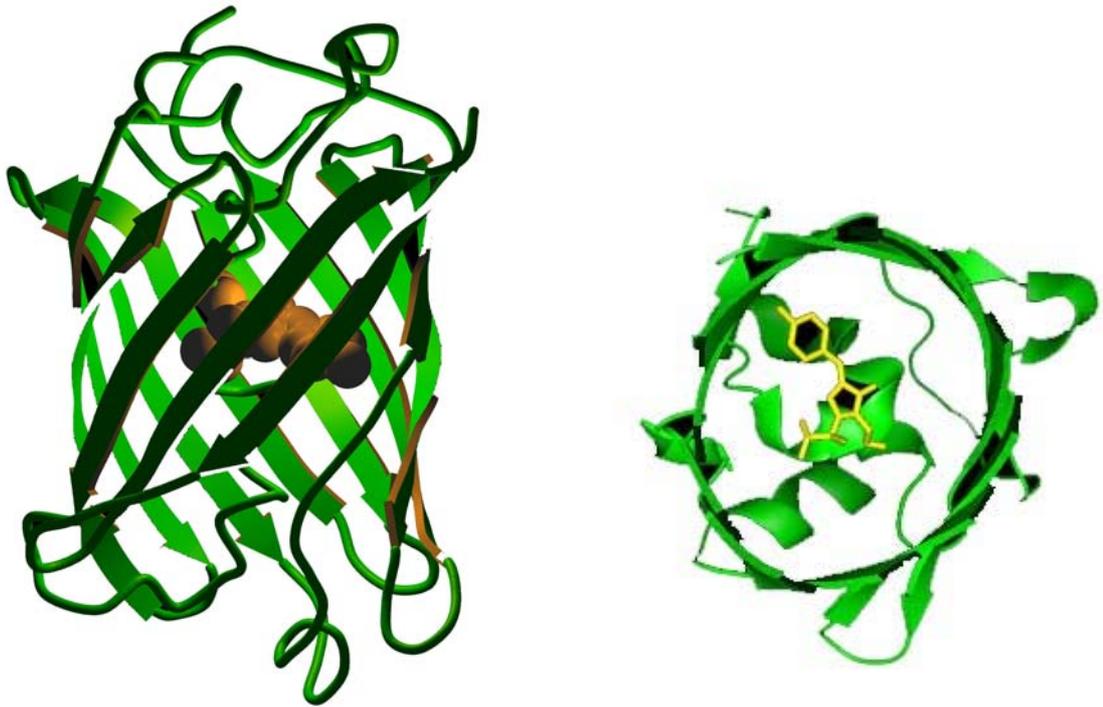


Figura 7. Estrutura tridimensional da GFP. Representação da estrutura tridimensional em forma de barril formada por onze folhas β (em verde), mostrando o cromóforo no interior do cilindro, ancorado pelas α hélices, ressaltando, em amarelo, a estrutura do cromóforo. **A)** vista pela parte frontal. Fonte: <http://www.tsienlab.ucsd.edu/Images.htm>. **B)** vista pela parte superior. Fonte: <http://thalamus.wustl.edu/nonetlab/ResearchF/GFPtags.html>

Para a correta formação do cromóforo apenas o resíduo de aminoácido Gly₆₇ é indispensável, pois substituições dos outros dois resíduos de aminoácidos presentes parecem não impedir a formação do cromóforo. Sendo assim, o grupo aromático do resíduo de aminoácido Tyr₆₆ pode ser substituído e a proteína se manter fluorescente (Remington, 2006). Essa característica permitiu o desenvolvimento das conhecidas

primeiras variantes de GFP, *blue fluorescent protein* (BFP) e *cyan fluorescent protein* (CFP, Tsien, 1998).

Dessa maneira, são conhecidas diversas outras proteínas que emitem fluorescência em diferentes cores e que também apresentam largo emprego em processos biotecnológicos (figura 9). Baseadas na maturação do cromóforo, as proteínas fluorescentes podem ser divididas em duas classes, (Remington, 2006). As proteínas capazes de emitir fluorescência entre as cores azul e verde, possuem mecanismo de maturação do cromóforo similar ao mecanismo da GFP, enquanto que aquelas emissoras de fluorescência entre as cores amarela e vermelha, a exemplo da proteína fluorescente DsRed, que emite de luz vermelha, apresentam uma reação de oxidação adicional no processo de maturação formando uma acilimina (Henderson e Remington, 2005; Gross *et al.*, 2000).

Com a expressão heteróloga de GFP ativa (Chalfie, 1994), as perspectivas de utilização dessa proteína como ferramenta para pesquisas *in vivo* se tornaram ilimitadas. As primeiras clonagens foram realizadas em células de *E. coli* e *Caenorhabditis elegans*, (Chalfie, 1994) e em *Drosophila melanogaster* (Wang e Hazelrigg, 1994), demonstrando a capacidade de expressão de GFP tanto em organismos procariotos como em eucariotos. Também foi possível confirmar que a formação do cromóforo não necessita de substrato ou de enzima específica de *A. victoria*, assim como nenhum cofator induz a fluorescência.

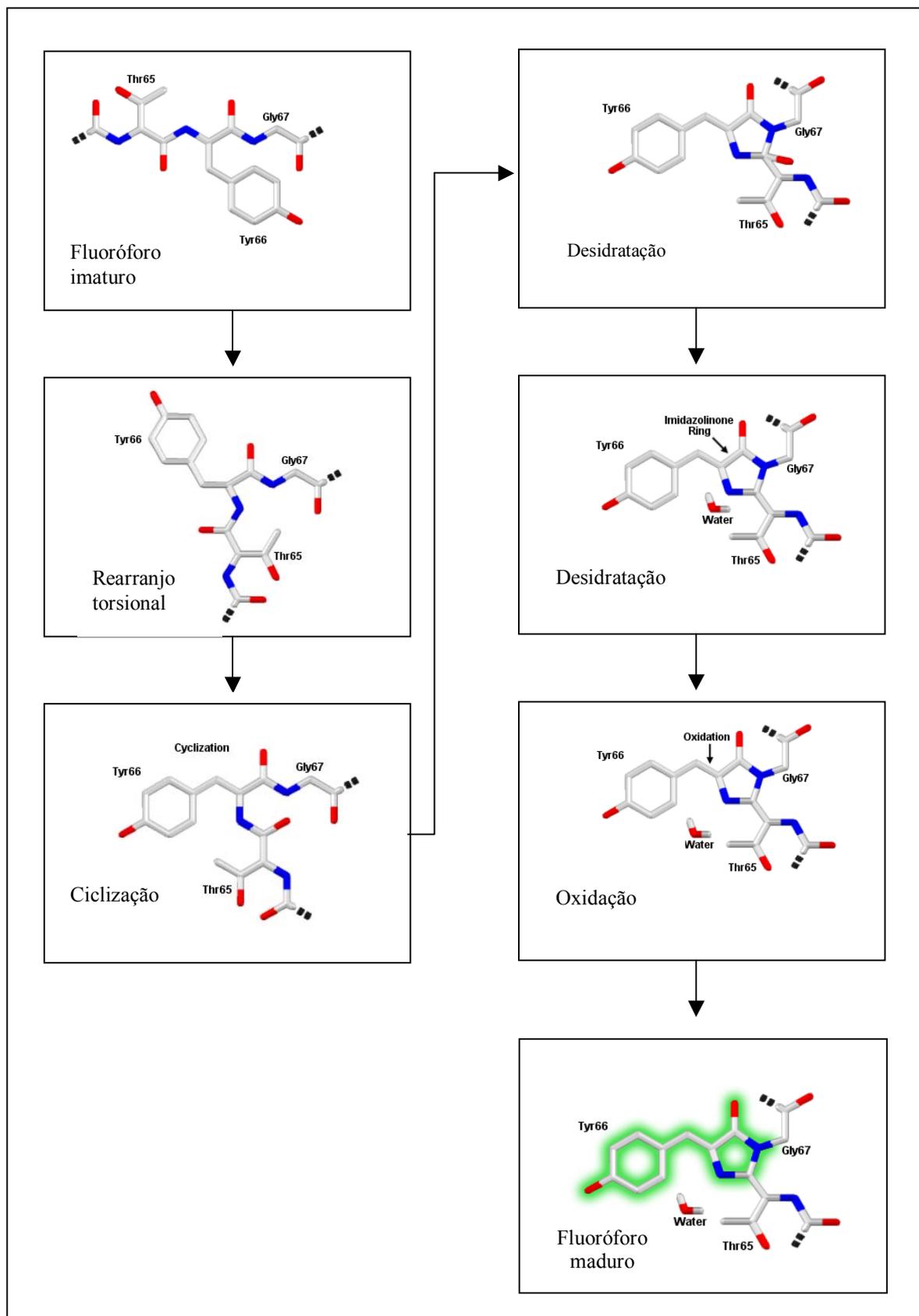


Figura 8. Esquema do processo de formação do cromóforo de GFP. Ciclização e oxidação dos resíduos de aminoácidos Thy₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ de uma proteína mutante de GFP (*Enhanced green fluorescent protein*), resultando na conformação do cromóforo maduro capaz de emitir fluorescência verde.

Fonte: <http://www.olympusconfocal.com/java/fpfluorophores/gfpfluorophore/index.html>

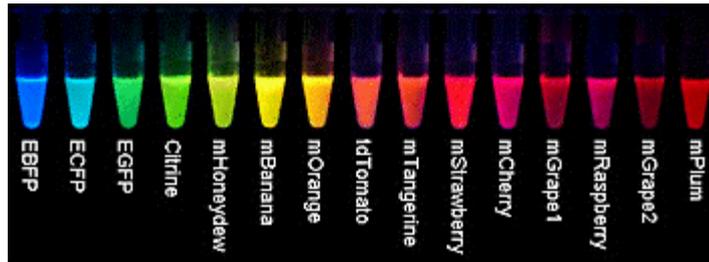


Figura 9. Padrão de cores das diferentes proteínas fluorescentes conhecidas.

Fonte:<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP2.htm>

Rizzuto *et al.* (1995) relataram a expressão de GFP fusionada à extremidade amino terminal da subunidade VIII da citocromo c oxidase em células de mamíferos. Apesar da extensa manipulação da extremidade amino-terminal, e do ambiente redutor da matriz mitocondrial, foi verificada a emissão de forte fluorescência, sem nenhuma alteração nas propriedades de emissão de luz ou nas características do espectro da proteína fluorescente. A possibilidade da GFP ser direcionada, *in vivo*, para qualquer compartimento subcelular, tornou a utilização dessa molécula ainda mais promissora. O direcionamento pode ser observado por fusões transcricionais da GFP com proteínas específicas, possibilitando a visualização de diferentes estruturas celulares pela excitação do cromóforo em comprimento de onda adequado.

O emprego de GFP tornou-se mais atraente graças ao sucesso na rastreabilidade genética de muitos organismos, além da maneira fácil e rápida que pode ser expressa nos diversos sistemas e condições biológicos. A utilização de GFP como molécula repórter teve um impacto comparável a aplicação de LacZ para o estudo de localização de macromoléculas *in vivo*, incluindo bactérias. Entretanto, é importante destacar que, a GFP tem a vantagem de ser mais sensível, além de não necessitar da adição de indutor ou substrato. Estudos de macromoléculas, até então por imunomarcção

utilizando ouro e por microscopia de imunofluorescência, eram limitados pois necessitavam de anticorpos diretos contra a proteína alvo e a fixação da amostra, impossibilitando a investigação em células vivas. A obtenção de anticorpos é um processo trabalhoso e com rendimento baixo, por esse motivo, o uso de uma proteína repórter de fácil visualização como a GFP proporcionou o rápido desenvolvimento no estudo dessas moléculas (Phillips, 2001).

Com o desenvolvimento das metodologias de monitoramento da expressão de GFP, diversos estudos sobre a localização, tanto de proteínas como DNA foram facilitados. Esses estudos proporcionaram o entendimento de uma variedade de processos como divisão celular, replicação e divisão de cromossomo, esporulação, transdução de sinais etc. Essa metodologia possibilitou, também, um grande avanço no esclarecimento da organização celular bacteriana (Phillips, 2001), o monitoramento da expressão gênica, do transporte de proteínas, perturbando minimamente as células, tecidos ou organismos (Heim *et al.*, 1994).

Estudos da expressão de genes específicos e localização sub-celular de proteínas ligadas a diferentes estágios de esporulação de *B. subtilis* tem empregado amplamente a GFP como repórter (Lewis e Errington, 1996). Além disso, o processo de divisão celular e septação foi melhor entendido com a utilização de GFP fusionada a proteínas envolvidas na divisão celular como DivIVA (Edwards *et al*, 2000), FtsH (Wehrl *et al*, 2000) e FtsL (Edwards *et al*, 2000). Assim como em *B. subtilis*, a GFP foi extensamente utilizada em estudos de proteínas relacionadas com a divisão celular em *E. coli*, como é o caso das proteínas FtsA (Ma *et al*, 1996), FtsI (Weiss *et al*, 1999), FtsK (Yu *et al*, 1998), FtsL (Ghigo *et al*, 1999), FtsQ (Chen *et al*, 1999), FtsZ (Ma *et*

al, 1996), MinC (Hu e Lutkenhaus, 2000), MinD (Raskin e Bôer, 1997), MinE (Raskin e Bôer, 1999; Fu *et al*, 2001) e ZipA (Hale e Bôer, 1999).

De acordo com Chalfie (1994), a utilização de microrganismos marcados com GFP é uma estratégia muito promissora em estudos sobre a interação de microrganismos e plantas. O padrão de colonização de *Pseudomonas chlororaphis*, bactéria utilizada no controle biológico do fungo *Drechslera teres* causador da doença das sementes em grãos de cevada, foi estudado utilizando estirpes recombinantes expressando GFP (Tombolini *et al.*, 1999). Em adição, a colonização de sementes de arroz pelas endofíticas *Pantoea* sp. e *Ochrobactrum* sp. (Verma *et al.*, 2004), a colonização epifítica e endofítica de videira por *Burkholderia* sp (Compant *et al.*, 2005) e a interação do microrganismo patógeno *Xulophilus ampelinus*, agente causador da necrose bacteriana em videiras (Grall e Manceau, 2003) são exemplos do emprego de GFP.

As proteínas fluorescentes representam uma poderosa ferramenta em estudos envolvendo biotecnologia de plantas. A conhecida facilidade de detecção da GFP aliada a aparente ausência de efeitos citotóxicos (Harper *et al.*, 1999) possibilitou a utilização dessa proteína na seleção de plantas recombinantes (Miki e Mchugh, 2003). A vantagem dessa técnica de seleção inclui a identificação de possíveis transformantes em menor tempo após a transformação, ou seja, antes da exposição à pressão de seleção por exposição a antibióticos ou herbicidas (Jordan, 2000; Harper *et al.*, 1999). Essa estratégia aumenta a eficiência de transformação, que é especialmente limitante no caso de cereais (Jordan, 2000). A utilização dessa técnica foi possível pelo desenvolvimento de mutantes de GFP que garantem a correta formação do cromóforo

quando essa proteína é expressa em plantas, além da seleção de moléculas com maior emissão de fluorescência, como é o caso das mutantes mGFP4, mGFP5 e sGFPS65T (Haseloff *et al.*, 1997; Chiu *et al.*, 1996). Outra importante utilização da GFP em plantas está relacionada ao monitoramento de OGMs, a expressão dessa proteína em tecidos vegetais possibilita o rastreamento desses organismos, sendo possível detectar fluorescência mesmo em tecidos jovens (Stewart, 2001).

A GFP, assim como outros sistemas de monitoramento, podem ser utilizados em estudos de colonização de tecidos de plantas por bactérias, incluindo aquelas utilizadas em controle biológico, sendo as hospedeiras geneticamente modificadas ou não (Amarger, 2002). Segundo Bloemberg e Lugtenberg (2001), estudos sobre comunidades microbiológicas e suas interações com plantas são facilitados pela utilização da GFP e suas variantes como, *yellow fluorescent protein* (YFP), CFP e *DsRed*. Atualmente, estão sendo construídos vetores estáveis no ambiente da rizosfera expressando essas proteínas (Heeb *et al.*, 2002). A utilização desses vetores, capazes de expressar proteínas de cores variadas (figura 9), possibilitam o estudo de diferentes populações bacterianas interagindo com a rizosfera (Stuurman *et al.*, 2000). Essa técnica foi utilizada em experimentos de colonização de bactérias do gênero *Pseudomonas*, empregando variantes de proteínas fluorescentes, enriquecendo o entendimento sobre as interações dessas bactérias durante o crescimento em raízes (Dekkers *et al.*, 2000).

A estratégia geral para construção de fusões do gene repórter *gfp* utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR), ou outras técnicas de clonagem, modificando sítios de restrição tanto na seqüência do gene *gfp*, quanto na seqüência do alvo. O gene

gfp repórter pode ser fusionado em ambas as extremidades da seqüência do gene alvo, gerando fusões traducionais amino ou carboxi-terminais. Essas fusões devem considerar a estrutura da proteína alvo, respeitando as condições para que esta permaneça funcional (Phillips, 2001).

Apesar das inúmeras vantagens da GFP nativa, sua utilização pode ser limitada pela formação lenta do cromóforo, que requer, em média, duas horas após a síntese para ser formado. Essa característica limita estudos que requerem monitoramento dentro desse intervalo de tempo, como é o caso da detecção de proteínas com meia-vida curta. A GFP selvagem tende a formar corpos de inclusão, principalmente quando em altas temperaturas (superiores à 37 °C), além da intensidade da fluorescência ser relativamente baixa, o que pode induzir a interpretação incorreta de resultados. Em algumas situações o monitoramento pode se tornar inviável caso a proteína híbrida seja expressa em níveis abaixo da sensibilidade da técnica (Heim *et al*, 1994; Phillips 2001).

Com objetivo de contornar as limitações da GFP selvagem, a otimização no tempo de formação do fluoróforo, o aumento da emissão de fluorescência (Cormack *et al*. 1996) e alteração das propriedades espectrais gerou proteínas variantes mais eficientes que a GFP nativa (Heim e Tsien, 1996). Cormack e colaboradores (1996) construíram três proteínas GFP mutantes que emitem fluorescência entre vinte e trinta e cinco vezes mais intensa por excitação em λ_{488} nm. Em bactérias durante o crescimento em fase logarítmica, cultivadas a 37 °C, a proteína selvagem dificilmente é detectada antes de uma a duas horas. Sob condições idênticas, a fluorescência das proteínas mutantes é detectável dentro de oito minutos. Estes estudos, juntamente com

a busca de novas proteínas fluorescentes em outras espécies de celenterados, ampliam as possibilidades de utilização dessa proteína complementando a atividade da GFP e suas variantes.

A expressão de GFP em *B. thuringiensis* fusionada a δ -endotoxinas tem sido utilizada, principalmente, para verificar a correta expressão dos genes e a capacidade da emissão de fluorescência nesse organismo, até onde conhecemos, apenas em estirpes acristalíferas (Cry⁻). A fusão da seqüência codante de *gfp*, tanto selvagem como mutante, na extremidade 5' do gene *cry1Ac* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, e expressão da proteína recombinante em *B. thuringiensis* Cry⁻ foi relatada. No entanto, apesar de confirmada a expressão por gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e *imunoblot*, a detecção de fluorescência não foi evidenciada, provavelmente pela instabilidade da molécula híbrida em *B. thuringiensis* (Roh *et al.*, 2004a e b). A expressão dessa fusão em baculovírus foi relatada em 2003 por Chang e colaboradores. Nesse experimento foi evidenciada a combinação da toxicidade da proteína Cry1Ac e do baculovírus, aliados a facilidade de monitoramento da GFP, proporcionando a rápida detecção da atividade entomopatogênica, além de viabilizar estudos sobre a disseminação do vírus no campo. A proteína Cry1Ac fusionada à GFP, pode ser um eficiente repórter para monitoramento de plantas recombinantes tanto na detecção da expressão da proteína, quanto na análise da transferência gênica em situações de campo (Shen *et al.*, 2006).

Com a finalidade de desenvolver uma ferramenta que permita o rastreamento de estirpes de *B. thuringiensis*, e assim facilitar os estudos ecológicos dessa bactéria, o presente trabalho propõe a expressão de GFP em uma estirpe brasileira selvagem de *B.*

thuringiensis. A estirpe selecionada para o presente trabalho está depositada no Banco de *Bacillus* entomopatogênicos Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e foi denominada *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76. Essa estirpe é cerca de onze vezes mais ativa que a estirpe HD-1, padrão para Lepidoptera, como estimado pela LC₅₀ (Gitahy, *et al.*, 2007). Por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ótica, foi observada a presença de inclusões bipiramidais e cubóides, o que é consistente com o perfil morfológico de estirpes dessa variedade de *B. thuringiensis*, sendo também confirmada a presença das proteínas Cry por análise em SDS-PAGE. Em adição, foi observada a presença de um pequeno cristal esférico. O perfil plasmidial da S76 também é similar ao obtido para a estirpe HD-1. Amplificações utilizando o DNA total ou plasmidial da S76 e seqüências iniciadoras específicas indicaram a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, que codificam proteínas com atividade para Lepidoptera e *cry2Aa1* e *cry2Ab2*, que codificam proteínas com atividade para Diptera. Não foram detectados a presença dos genes *cry1Ad*, *cry2Ac* e *cry9*, conhecidos por codificarem as respectivas proteínas Cry ativas para Lepidoptera.

A seleção da estirpe para o presente trabalho foi baseada no potencial entomopatogênico do *B. thuringiensis* S76 para o controle de *Diatraea sachtilli*, a principal praga da cana-de-açúcar, *Sacharum* sp. Atualmente, a cana-de-açúcar é uma das principais culturas agrícolas do país fornecendo matéria-prima para a produção de açúcar, álcool e alimentação animal. No Brasil, a área cultivada com cana-de-açúcar, em 2003, foi de 6,2 milhões de hectares, com produtividade 428 milhões toneladas (IBGE, 2006). A agroindústria do açúcar e do álcool aporta para o nosso país, em

produto final, dez bilhões de dólares por ano, gerando um milhão de empregos diretos e indiretos (Rodrigues, 2004).

O controle de *D. saccharalis* é limitado pela localização da lagarta, dentro do colmo, tornando essa inacessível para qualquer tipo de formulação de dispersão. Como parte de um projeto maior, que tem como objetivo o desenvolvimento de um veículo alternativo e eficiente para a utilização de proteínas Cry visando o controle dessa lagarta, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de monitoramento, visando facilitar o estudo das interações entre *B. thuringiensis* S76 e plantas hospedeiras, especialmente em cana-de-açúcar. Facilitando a determinação das possíveis vias de entrada do microrganismo nos tecidos internos da planta, a possível forma de colonização, além de facilitar a identificação dos tecidos preferencialmente colonizados, e permitir a rastreabilidade da persistência de *B. thuringiensis* no ambiente.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma estirpe de *B. thuringiensis* recombinante que permita ser monitorada pela detecção de fluorescência, mantendo as características selvagens. Com esse intuito, foi selecionada a estirpe selvagem de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* S76 como hospedeira para a expressão heteróloga da proteína mutante de GFP.

2.1. Objetivos específicos

- Transferência dos plasmídeos portadores do gene *gfpmut3a* para as estirpes de *B. thuringiensis* S76 e a mutante acristalífera 4Q2-81 utilizada como controle.
- Análises morfológicas de células e colônias recombinantes.

observar se houve mudança nas características de células e colônias, o que pode ser consequência de alguma mudança em nível de genoma;

- Análises dos perfis plasmidial e protéico das recombinantes.

por comparação com a estirpe S76, observar se houve mudanças na expressão de proteínas Cry e no perfil de plasmídeos residentes, já que a manutenção dessas características é desejável para o modelo de estudo proposto.

3. Material e métodos

3.1. Estirpes e crescimento. Para obtenção do recombinante S76Cry⁺ foi utilizada estirpe S76 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* depositada no Banco de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília - DF), e como controle o mutante acristalífero 4Q2-81 (Cry⁻) de *B. thuringiensis israelensis*, totalmente curada de plasmídeos, depositadas no *Bacillus Genetic Stock Center* (Ohio, EUA). Culturas de *B. thuringiensis* em fase vegetativa foram obtidas por crescimento em meio de cultura LB líquido a 28 °C, sob agitação de 200 rpm, até o tempo apropriado e o crescimento celular acompanhado por turbidimetria (A₆₀₀) e/ou microscopia ótica de contraste de fase. Quando necessário, foi adicionado ao meio de cultura o antibiótico apropriado. As estirpes de *B. thuringiensis* foram induzidas à esporulação utilizando meio HCT (Lecadet et al., 1980), a 28 °C, sob agitação de 200 rpm por 48-72 h. A cultura esporulada foi submetida a um choque térmico a 80 °C, por 10 min e os esporos, depois de secos em estufa a 37 °C, foram estocados em papel de filtro estéril. *E. coli* DH5 α , utilizada para amplificação dos vetores pAD123 e pAD43-25, foi cultivada em meio de cultura LB adicionado de ampicilina 100 μ g/mL e cloranfenicol 10 μ g/mL, a 37 °C e 200 rpm de agitação por 16 h. O crescimento em meio sólido foi obtido acrescentando 1,5% de ágar ao meio LB líquido para cultura de *E. coli* e 1,8% de ágar ao meios LB líquido para cultura de *B. thuringiensis*.

3.2. Plasmídeos. Os vetores pAD123 e pAD43-25 (figura 11; Dunn e Handelsman, 1999) são bifuncionais com seqüências de 5925 e 7262 pb, respectivamente, contendo

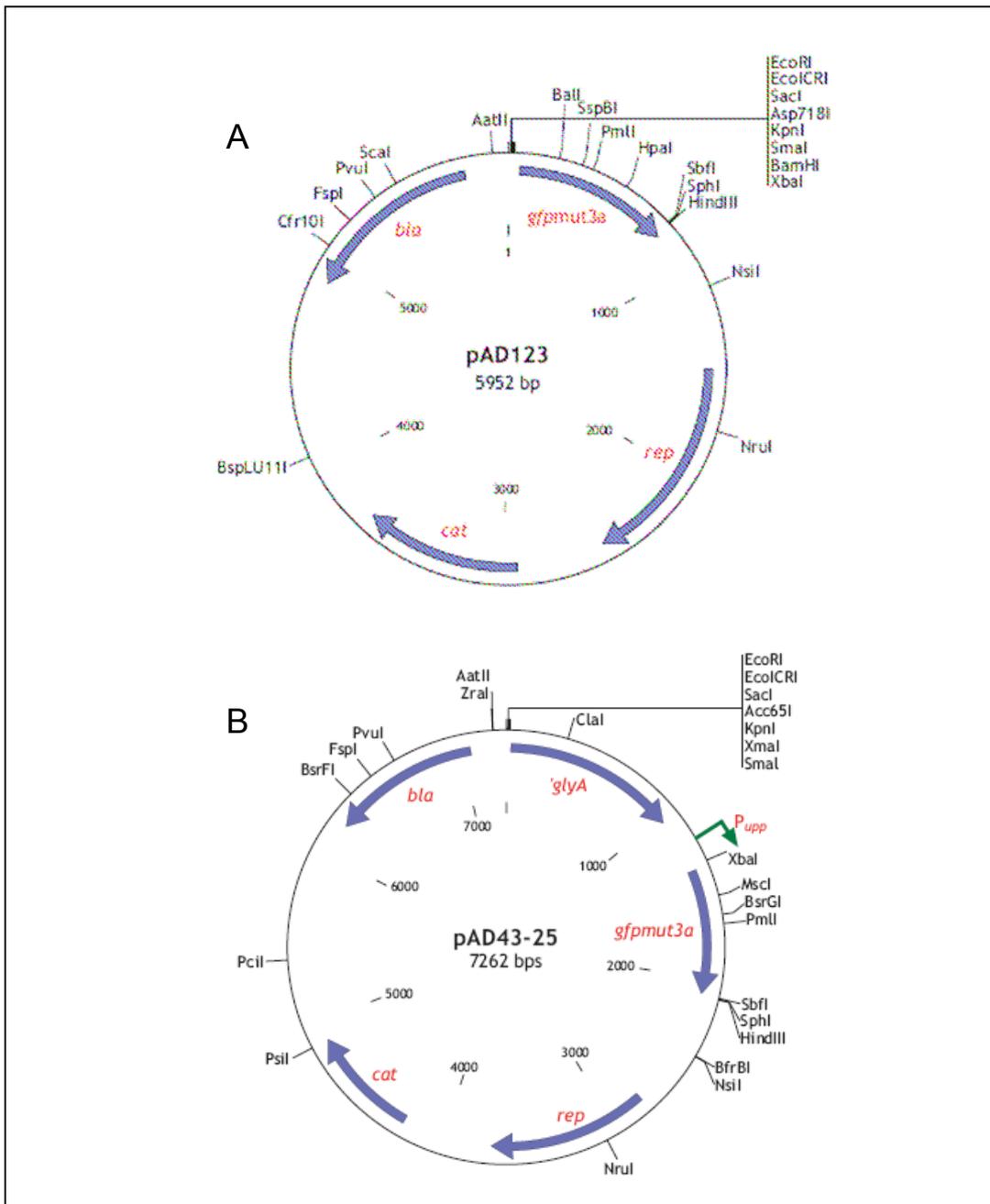


Figura 10. Mapa físico dos plasmídeos portadores do gene *gfpmut3a*. As setas indicam a direção de expressão dos genes, os sítios únicos de restrição, e mostra a localização dos genes *bla* que confere resistência à ampicilina, *cat* que confere resistência à cloranfenicol e *gfpmut3a* que codifica a seqüência da proteína variante de GFP. A seta em verde indica a seqüência promotora.
A) pAD123; B) pAD43-25

Mapas obtidos de <http://www.bgsc.org>.

origens de replicação para *E. coli* (pBR322), que replica com cerca de 25 cópias por cromossomo e para *Bacillus* (pTA1060), que replica com cinco a seis cópias por cromossomo. Contém ainda a seqüência codificante do gene *bla*, que confere resistência à ampicilina, utilizada na concentração final de 100 µg/mL e a seqüência codificante do gene *cat*, que confere resistência ao cloranfenicol, 10 µg/mL, antibióticos utilizados para seleção em *E. coli*. O cloranfenicol 10 µg/mL foi utilizado para seleção em *B. thuringiensis*. Em adição, os plasmídeos contém a seqüência codificadora do gene *gfp* de *A. victoria* otimizada (*gfpmut3a*) por Cormack *et al.* (1996), que resultou em uma proteína GFP (GFPmut3A) com maior eficiência na emissão de fluorescência e formação do cromóforo que a proteína homóloga nativa. O plasmídeo pAD123 não apresenta seqüência regulatória antecedendo a extremidade 5' do gene *gfpmut3a*, portanto, esse não é expresso, enquanto que o vetor pAD43-25 possui uma seqüência adicional, proveniente de um fragmento cromossomal *B. cereus* UW15, que dirige a síntese de GFPmut3A de maneira constitutiva.

3.3. Eletrotransformação de *B. thuringiensis*. Os plasmídeos descritos no item anterior foram amplificados em *E. coli* DH5 α , e foram obtidos por lise alcalina e purificados por cromatografia de afinidade utilizando um *kit* Qiagen Tip100 (Qiagen, Alemanha), conforme instruções do fabricante. O DNA foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, ressuspenso em 100 µL de TE e estocados a -20 °C. Quantidade apropriada de pAD123 ou de pAD43-25 foram transferidas para as estirpes de interesse por eletroporação: 200 mL de células hospedeiras foram crescidas em meio LB líquido, a 28 °C, até a fase logarítmica média ($A_{600} \cong 1,5$), coletadas por centrifugação 6000 x *g*, a 4 °C, por 15 min; lavadas com 100 mL H₂O destilada estéril

a 4 °C e ressuspensas em 2 mL de PEG 8.000 40% (p/v). Duzentos e cinquenta microlitros de células competentes foram misturadas a 1 µg de plasmídeo, em cubetas para eletroporação de 0,4 cm (Bio-Rad, USA). As conteúdos das cubetas foi submetido à eletroporação em sistema Bio Rad Gene Pulser modelo II: 1 pulso de 2,5 V; capacitância de 25 µF e resistência de 1.000 Ω. As células foram recuperadas em 1 mL de meio LB líquido, incubadas à 28 °C, sob agitação lenta por uma hora, plaqueadas em meio LB sólido contendo, quando necessário, marca de seleção apropriada, incubadas à 28 °C por 16-18 h.

3.4. Seleção de clones recombinantes. Os dois clones S76ΩpAD43-25, o único clone S76ΩpAD123 obtidos pela transformação de S76 com os respectivos vetores, dez clones Cry⁻ΩpAD43-25 e dez clones Cry⁻ΩpAD123, obtidos pela transformação do mutante Cry⁻ com os respectivos vetores, aleatoriamente escolhidos, além das estirpes parentais, foram repicadas em meio LB sólido contendo antibiótico quando apropriado. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 h e, as respectivas colônias, analisadas pela inspeção visual de emissão de fluorescência em sistema Typhoon 9210 (Amershan Biosciences – Molecular Dynamics, Reino Unido), com os filtros ajustados para excitação em λ_{532} , para a detecção de emissão de fluorescência em λ_{526} e sensibilidade de 200 microns.

3.5. Análise de emissão de fluorescência. As estirpes recombinantes, assim como as parentais, foram crescidas em meio LB líquido acrescido de cloranfenicol 10 µg/mL, quando necessário, a 28 °C e agitação de 200 rpm. Amostras foram coletadas com 2; 4; 6; 8; 12; 24 e 48 h de crescimento e submetidas à análise visual de emissão de fluorescência pelo sistema Typhoon 9210 e por microscopia de fluorescência. As

imagens geradas no sistema Thyphoon 9210 foram obtidas a partir leituras diretas de 1 mL da cultura, realizada em frasco Erlenmeyer e transferida para placas de cultura de células de 24 poços com diâmetros de 16 mm, com os filtros ajustados como descrito no item anterior. As amostras também foram analisadas, a fresco, por microscopia óptica de fluorescência em fotomicroscópio Zeiss Axiophot (Alemanha) em objetiva 100x e as imagens registradas utilizando filme colorido Fuji Superia 135 mm com sensibilidade de 400 ASA. Para documentação da fluorescência o tempo de exposição foi entre 15 e 30 s. Os mesmos campos selecionados também foram fotografados em contraste de fase utilizando o ajuste automático de tempo de exposição do aparelho.

3.6. Perfil protéico. As estirpes analisadas foram cultivadas em meio LB líquido, conforme descrito anteriormente, por 72 h. As células foram observadas por microscopia de contraste de fase em objetiva de aumento 100x para certificar a esporulação de no mínimo 80% da população. Oitenta microlitros de cada cultura foram submetidos à desnaturação na presença de tampão redutor a 100 °C por 5 min. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes 12% e submetidas à eletroforese (1 V/cm) em tampão de corrida 1x. O gel foi submetido à coloração por solução de Comassie Blue R-250, transferido para a solução descorante e fotografado com o auxílio de câmera fotográfica digital e transiluminador de luz branca.

3.7. Perfil plasmidial e de restrição. O DNA plasmidial da estirpe selvagem e dos clones recombinantes foram obtidos por lise alcalina, precedida por tratamento com lisozima 4 mg/mL, em 4 mL de tampão TEG e purificados em coluna de troca iônica utilizando o *kit* Qiagen Tip100 (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do

fabricante. O DNA foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, ressuspensão em 100 µL de TE e estocado a -20 °C. Quantidades apropriadas de DNA foram digeridas pelas enzimas *Hind* III e *Ssp* I (New England Biolabs, EUA), de acordo com as orientações do fabricante.

Os DNAs plasmidiais intactos ou digeridos foram analisados em gel de agarose 0,6% em tampão TAE 1x, 4 °C. As amostras e o padrão de massa molecular (1 kb Plus DNA ladder - Invitrogen, USA) foram misturados com tampão de amostra e aplicados no gel. O padrão de migração das moléculas de DNA foi visualizado em luz ultravioleta após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), por 1 h, posterior descoloração em H₂O destilada, por 2 h e fotografado utilizando câmera fotográfica digital e transiluminador de luz ultravioleta.

3.8. Curva de crescimento. O ciclo de crescimento das estirpes S76, S76GFP⁻, S76GFP⁺, Cry⁻, Cry⁻GFP⁻ e Cry⁻GFP⁺ foi acompanhado em meio LB líquido, contendo cloranfenicol 10 µg/mL, quando apropriado, com densidade celular inicial baixa (A_{600} de 0,01), a 28 °C e agitação de 200 rpm. Leituras de absorbância, em espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Pharmacia Biothec) A_{600} foram realizadas com intervalos de 30 min. a partir da segunda hora de crescimento, até a entrada na fase estacionária. As curvas de crescimento obtidas são resultados da média aritmética de três leituras, independentes, da mesma cultura. A partir da média das amostras, foi calculado o número logarítmico de células por mL de cultura, para facilitar a plotagem dos dados no gráfico. Para esse cálculo foi considerado que, uma cultura de *B. thuringiensis* com A_{600} 1,5 possui, aproximadamente, 10^8 céls/mL (Lereclus *et al.*, 1989). Também foi calculado o desvio padrão das amostras.

3.9. Análise morfológica das colônias. Esporos das estirpes recombinantes e parentais, ressuspensos em água bidestilada estéril, foram inoculados em meio sólido LB com antibiótico adequado, quando necessário. As placas foram incubadas a 28 °C e fotografadas após 16 e 40 h de incubação, com câmera digital Canon Power Shot A95. As imagens capturadas foram impressas em papel fotográfico.

3.10. Análise morfológica das células. Culturas de S76, Cry^r e os recombinantes derivados de ambas estirpes foram inoculadas em meio LB líquido acrescido de antibiótico adequado, no caso das estirpes recombinantes. As amostras foram coletadas com 2; 4; 6; 12; 24 e 48h de crescimento, analisadas por microscopia óptica de contraste de fase em objetiva com aumento de 100x e fotografadas com o auxílio de uma câmera fotográfica digital DCM35 (Hangzhoul Huzxin IC Technology Co.) acoplada ao microscópio (Zeiss Axiolab, Alemanha). As imagens capturas foram transformadas em formato JPEG e impressas em papel fotográfico.

3.11 - Meios de cultura e soluções

- **Meio Luria-Bertani (LB):** extrato de levedura 0,5%; peptona de caseína 1%; NaCl 1%; ajustar pH 7,2 com NaOH.
- **Meio HCT:** Triptona 0,5%; Hidrolisado de caseína 0,2%; 50 mL de solução I; 10 mL de solução II; 10 mL de solução III, 10 mL de solução IV, o volume foi completado até 1 L com água destilada. O pH do meio foi ajustado para 7,25 com a adição de KOH e autoclavado a 115 °C, por 30 min. No momento do uso, foi adicionada glicose 0,3%.

Solução I: KH_2PO_4 0,5 M

Solução II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mM; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1 mM; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mM.

Solução III: $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 7 mM; H_2SO_4 0,1 M.

Solução IV: $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 M; glicose 0,3%; ajustar pH 7,25 com KOH.

- **PEG 8.000:** polietilenoglicol 40%.

- **SDS-PAGE:**

Gel de poliacrilamida: Tris-HCL, pH 8,8, 12%

Tampão redutor 2X: Tris-HCl, pH 6,8, 200 mM; SDS 4%; β -mercaptoetanol 4%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,1%.

Tampão de corrida 1X: Tris base 24 mM, glicina 19 mM, dodecil sulfato de sódio 3,5 mM.

Solução de coloração: Comassie Blue R-250 0,01%; etanol 52%; ácido acético 10%.

Solução descorante: etanol comercial 9,3%; ácido acético 6,3%.

- **Solução estoque de Ampicilina** 50 mg/mL

- **Solução estoque de Cloranfenicol** 10 mg/mL em etanol
- **Solução de lisozima** 4 mg/mL preparada TEG no momento do uso.
- **TAE 1X:** Tris base 40 mM; Ácido acético 18,8 mM; EDTA 1 mM; pH 8.
- **Tampão de amostra para DNA:** Ficoll 400 25%; Azul de bromofenol 0,25%, TAE 1X.
- **TE:** Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0.
- **TEG:** Tris-HCl 25 mM, pH 8,0; Glicose 50 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0.

4. Resultados e Discussão

B. thuringiensis, apesar de extensamente estudado por seu reconhecido potencial bioinseticida, é uma bactéria com ecologia muito pouco conhecida. Mesmo com a crescente utilização desse ACB na agricultura, pouco se sabe sobre possíveis interações desse microrganismo com as plantas. A maioria dos estudos limita-se à identificação desses microrganismos em superfície ou tecidos internos de vegetais e no solo. Um melhor entendimento das interações entre o *B. thuringiensis* e as plantas é de grande importância para a melhor exploração do potencial dessa bactéria, proporcionando alternativas, não apenas para o controle de pragas, mas também para a exploração de novas estratégias de utilização. Estudos anteriores demonstraram uma possível interação de *B. thuringiensis* como endofítico. Essa possibilidade aponta para um potencial ainda inexplorado: o aproveitamento desse sistema para a expressão heteróloga de genes de resistência a insetos-praga, reguladores químicos vegetais e antibióticos, dentre outros, estratégia empregada para diversas outras endofíticas.

A utilização de marcadores que permitam o rastreamento de microrganismos no ambiente e em diversas condições fisiológicas, é uma ferramenta desejável nos estudos de interação entre esses e as plantas. Uma alternativa eficiente, principalmente pela facilidade de detecção, é a expressão de proteínas fluorescentes. Com esse intuito, no presente trabalho, a estirpe selvagem brasileira S76 de *B. thuringiensis kurstaki*, ativa para Lepidoptera, foi transformada com um plasmídeo contendo o gene *gfp*. Assim, a estirpe S76GFP⁺ foi obtida e analisada segundo diferentes critérios.

Com base em resultados anteriormente obtidos por nosso grupo, pudemos verificar a baixa eficiência de transformação da estirpe S76 (dados não mostrados).

Essa baixa eficiência, somada às possibilidades de cura parcial ou total dos plasmídeos residentes, imposta pela metodologia utilizada para a transformação, e dos possíveis eventos de recombinação entre os vetores inseridos e o genoma da hospedeira, foi utilizada, como controle, a estirpe de *B. thuringiensis israelensis* Cry⁻ 4Q2-81, com reconhecida estabilidade e amplamente utilizada como hospedeira para expressão heteróloga. É importante ressaltar que, além de não conter genes *cry* funcionais, esse mutante sofreu cura total dos plasmídeos residentes. As duas hospedeiras, S76 e Cry⁻, ainda foram transformadas com o vetor parental que deu origem ao vetor de expressão da variante de *gfp*, onde o gene não está precedido de seqüência regulatória.

4.1. Obtenção da estirpe recombinante de *B.thuringiensis* S76 contendo o gene *gfp* (S76GFP⁺)

A estirpe *B. thuringiensis* S76GFP⁺, objeto de estudo do presente trabalho, assim como as estirpes controles, S76GFP⁻, Cry⁻GFP⁻, Cry⁻GFP⁺, foram construídas pela transferência, para as hospedeiras de interesse, dos vetores pAD123 (5.932 pb) ou pAD43-25 (7.262 pb) conforme mostrado na figura 10A e B (Dunn e Handelsman, 1999). Esses vetores bifuncionais contêm origens de replicação tanto para *E. coli* (pBR322), como para *Bacillus* (pTA1060), marcas de resistência a ampicilina (gene *bla*) e cloranfenicol (gene *cat*), além de uma seqüência de um gene mutante de *gfpmut3a* (figura 10A e B). Em pAD123 o gene *gfpmut3a* (Cormack *et al.*, 1996) não é funcional podendo ser expresso após a inserção, no sítio múltiplo de clonagem, de um fragmento contendo uma seqüência promotora em orientação correta. O vetor pAD43-25 é um derivado do pAD123, contendo uma seqüência adicional, proveniente do cromossomo de *B. cereus* UW85, precedendo o ATG iniciador da seqüência codificadora para *gfp*. Essa seqüência regulatória dirige a síntese da variante de GFP de modo constitutivo e em altos níveis.

Os recombinantes obtidos por eletrotransformação foram recuperados em meio de cultura LB sólido, contendo o antibiótico apropriado. Enquanto que, a eficiência de transformação da estirpe Cry⁻ com os vetores pAD123 (Cry⁻ΩpAD123) e pAD43-25 (Cry⁻ΩpAD43-25) foi de $5,9 \times 10^3$ transformantes/μg de DNA e $6,2 \times 10^3$ transformantes/μg de DNA, respectivamente, a eficiência obtida para estirpe S76 com ambos plasmídeos (S76ΩpAD123 e S76ΩpAD43-25) foi de 0,6 transformantes/μg de DNA e 1,2 transformantes/μg de DNA, respectivamente. Essa baixa eficiência de

transformação obtida para a estirpe de *B. thuringiensis* S76 resultou em apenas um recombinante S76 Ω pAD123 e dois S76 Ω pAD43-25.

O clone S76 Ω pAD123, os dois clones S76 Ω pAD43-25, além de dez clones Cry Ω pAD123, dez clones Cry Ω pAD43-25 e dez clones de cada uma das hospedeiras não transformadas, escolhidos aleatoriamente, foram submetidos à avaliação de expressão de GFP por leitura direta de emissão de fluorescência pelas colônias no sistema Thyphoon 9210. Conforme esperado, ambos os clones S76 Ω pAD43-25 e os dez clones Cry Ω pAD43-25 apresentaram emissão de fluorescência, conforme estimado visualmente pela comparação com os demais clones utilizados como controle negativo (figura 11).

Adicionalmente, o DNA plasmidial dos clones recombinantes anteriormente submetidos a análise de emissão de fluorescência foi extraído, por lise alcalina. As estirpes recombinantes obtidas a partir de S76 apresentaram conteúdo plasmidial semelhante ao da estirpe selvagem, exceto pela presença dos respectivos vetores inseridos (dados não mostrados). Conforme esperado, para os clones provenientes da transformação de *B. thuringiensis* Cry- com os plasmídeos de interesse, foi observada apenas a presença dos respectivos vetores (dados não mostrados).

Dessa forma, como não foi possível discriminar, pelas metodologias utilizadas, quaisquer diferenças entre os clones analisados, foram selecionadas, aleatoriamente, um dos dois clones de S76 Ω pAD43-25, referido a partir desse ponto, como *B. thuringiensis* S76GFP⁺.



Figura 11. Varredura da emissão de fluorescência. Recombinantes crescidos em meio LB sólido durante uma noite foram submetidos a leitura direta de emissão de fluorescência utilizando o sistema Typhoon 9210 com excitação no comprimento de 532 nm e detecção de emissão de fluorescência em 526 nm: **A)** Cry⁻ΩpAD123; **B)** Cry⁻ΩpAD43-25; **C)** Cry⁻; **D)** S76ΩpAD123; **E)** S76ΩpAD43-25 e **F)** S76.

Da mesma maneira, foi selecionado um dentre os dez clones analisados anteriormente para cada caso, Cry⁻ΩpAD43-25 e Cry⁻ΩpAD123, que serão referidos, a partir de então, como *B. thuringiensis* Cry⁻GFP⁻ e *B. thuringiensis* Cry⁻GFP⁺,

respectivamente. Os três clones aleatoriamente escolhidos, em conjunto com o clone S76ΩpAD123, referido como *B. thuringiensis* S76GFP⁻, foram comparados entre si e em relação as respectivas hospedeiras, quanto a expressão de proteínas Cry e GFP, a morfologia de células e colônias, o ciclo celular, os perfis plasmidiais e de restrição.

4.2. Análise da expressão da proteína GFP recombinante (GFPmut3a)

Uma vez que o sistema Typhoon 9210 demonstrou-se adequado para observar a emissão direta de fluorescência das colônias, esse foi utilizado para o acompanhamento da expressão de GFP durante o crescimento em meio LB líquido, incubadas a 28 °C, 200 rpm, com coletas nos intervalos de tempos de 2; 4; 6; 12; 24 e 48 h. Como pode ser observado visualmente na figura 12, foi verificada discreta emissão de fluorescência pela estirpe recombinante S76GFP⁺ a partir de seis horas de crescimento, com incremento na intensidade até 24 h após a inoculação, essa, seguida de um decréscimo visual nas leituras de fluorescência. Esse resultado é surpreendente, uma vez que, a expressão de *gfpmut3a* é dirigida por fator de transcrição típico de fase vegetativa (Dunn e Handelsman, 1999). Sendo assim, no momento em que esse fator encontrar-se inativo, após a septação durante a fase estacionária, a expressão de GFP cessa. No entanto, possivelmente, a estabilidade da molécula de GFP (Ormö, *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996), mesmo quando expressa na fase vegetativa de crescimento de *B. thuringiensis*, proporciona estabilidade atividade por períodos mais longos. A estabilidade da GFP selvagem é notada em diversos sistemas, sendo essa característica marcante, desde os primeiros experimentos de expressão de *gfp* onde foi demonstrada a estabilidade dessa molécula quando expressa em células de procariotos e eucariotos (Chalfie, 1994). Conforme previsto, a estirpe recombinante S76GFP⁻ não apresentou emissão de fluorescência durante todo o experimento, bem como a selvagem (figura 12).

Também foi observada emissão de fluorescência na estirpe controle Cry⁻GFP⁺ (figura 12). Essa, assim como em S76GFP⁺, foi detectada a partir de seis horas de

crescimento. No entanto, a emissão manteve-se aparentemente estável até o final do experimento (48 h). É importante ressaltar que, apesar de ambas recombinantes apresentarem emissão a partir de 6 h de cultivo, a estirpe Cry^-GFP^+ apresenta uma intensidade de emissão discretamente maior que aquela observada para $S76GFP^+$ com o mesmo tempo de crescimento. Como esperado, a estirpe parental e a Cry^-GFP^- não apresentaram emissão nesse sistema de leitura (figura 12).

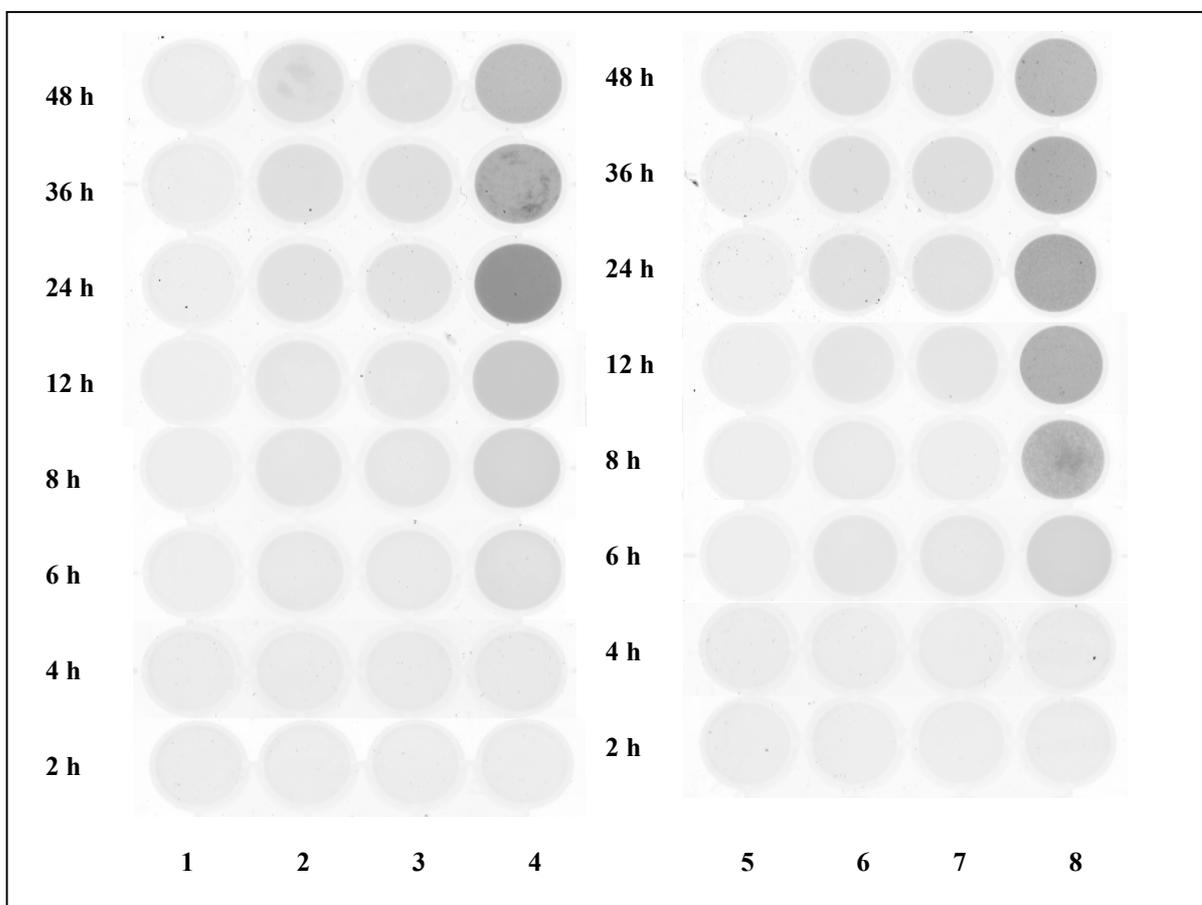


Figura 12. Análise da expressão de GFPmut3a pelas estirpes recombinantes $S76GFP^+$ e Cry^-GFP^+ Recombinantes crescidos em meio LB líquido foram submetidos à leitura direta de emissão de fluorescência utilizando o sistema Typhoon 9210 com excitação no comprimento de 532 nm e detecção de emissão de fluorescência em 526 nm: **1)** meio LB; **2)** $S76^-$; **3)** $S76GFP^-$; **4)** $S76GFP^+$; **5)** meio LB; **6)** Cry^- ; **7)** Cry^-GFP^- ; **8)** Cry^-GFP^+ .

A expressão da variante de GFP também foi detectada por microscopia de fluorescência, em amostras de culturas líquidas crescidas e coletadas nas mesmas condições daquelas submetidas à leitura no sistema Typhoon 9210. Foi observada emissão de fluorescência pela estirpe S76GFP⁺ com apenas duas horas de crescimento (figura 13A). Essa característica mostrou-se constante durante todo o experimento (2; 4; 6; 12 e 24 h de crescimento; figuras 13A e E; 14A e E; 15A e E). A visualização de células fluorescentes por essa técnica, mesmo em estágios iniciais de crescimento, foi possível pela maior sensibilidade dessa metodologia quando comparada com a leitura no sistema Typhoon 9210. De fato, a GFP selvagem necessita de, aproximadamente, duas horas para a completa ciclização do cromóforo e somente após esse período, é possível captar emissão de fluorescência. Em contrapartida, a proteína GFPmut3a promove a formação do cromóforo vinte e uma vezes mais rápida que a selvagem. Sendo assim, a utilização dessa proteína como ferramenta de monitoramento em *B. thuringiensis*, mesmo em estágios iniciais de crescimento, é uma estratégia eficiente, como pode ser observado no presente estudo. Conforme citado anteriormente, a expressão da variante de GFP foi detectada também em estágios tardios de crescimento (12; 24 e 48 h), ou seja, mesmo quando a cultura encontrava-se em fase estacionária, sendo possível a observação de esporângios e esporos maduros emitindo fluorescência (figura 15E). Esse dado sugere novamente a alta estabilidade dessa molécula no sistema de expressão utilizado, uma vez que, em princípio, essa proteína apenas é expressa durante o crescimento vegetativo de *B. thuringiensis*.

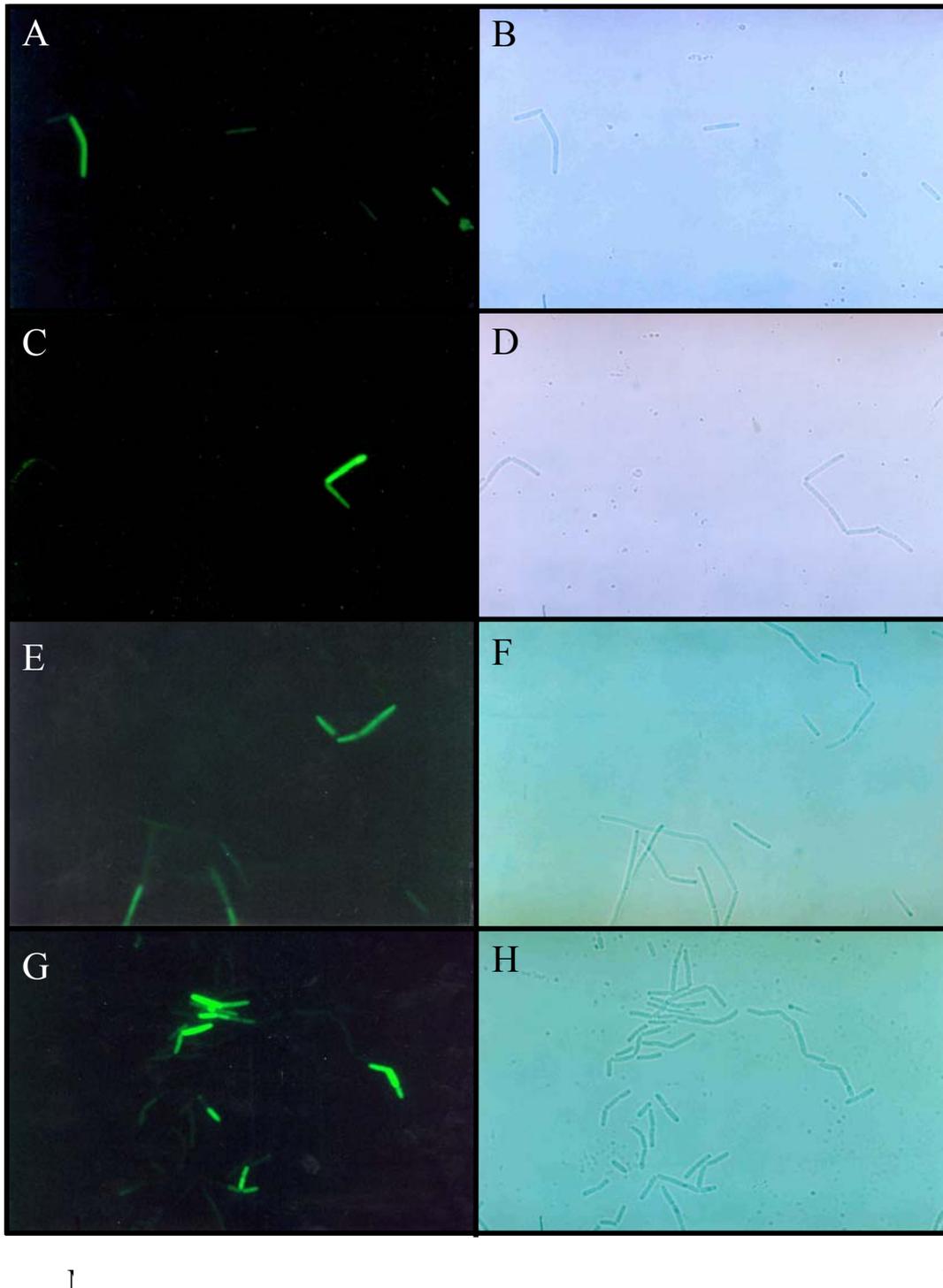


Figura 13. Emissão de fluorescência nas células de *B. thuringiensis* S76GFP⁺ e Cry⁻GFP⁺. As células foram crescidas em cultura líquida e o mesmo campo de cada uma das amostras coletadas, foi avaliado tanto por microscopia de contraste de fase (MCF), quanto por microscopia de fluorescência (MOF) em aumento de 1.000x. **Amostras coletadas em 2h de crescimento: A e B) S76GFP⁺; C e D) Cry⁻GFP⁺; Amostras coletadas com 4h de crescimento: E e F) S76GFP⁺; G e H) Cry⁻GFP⁺.**

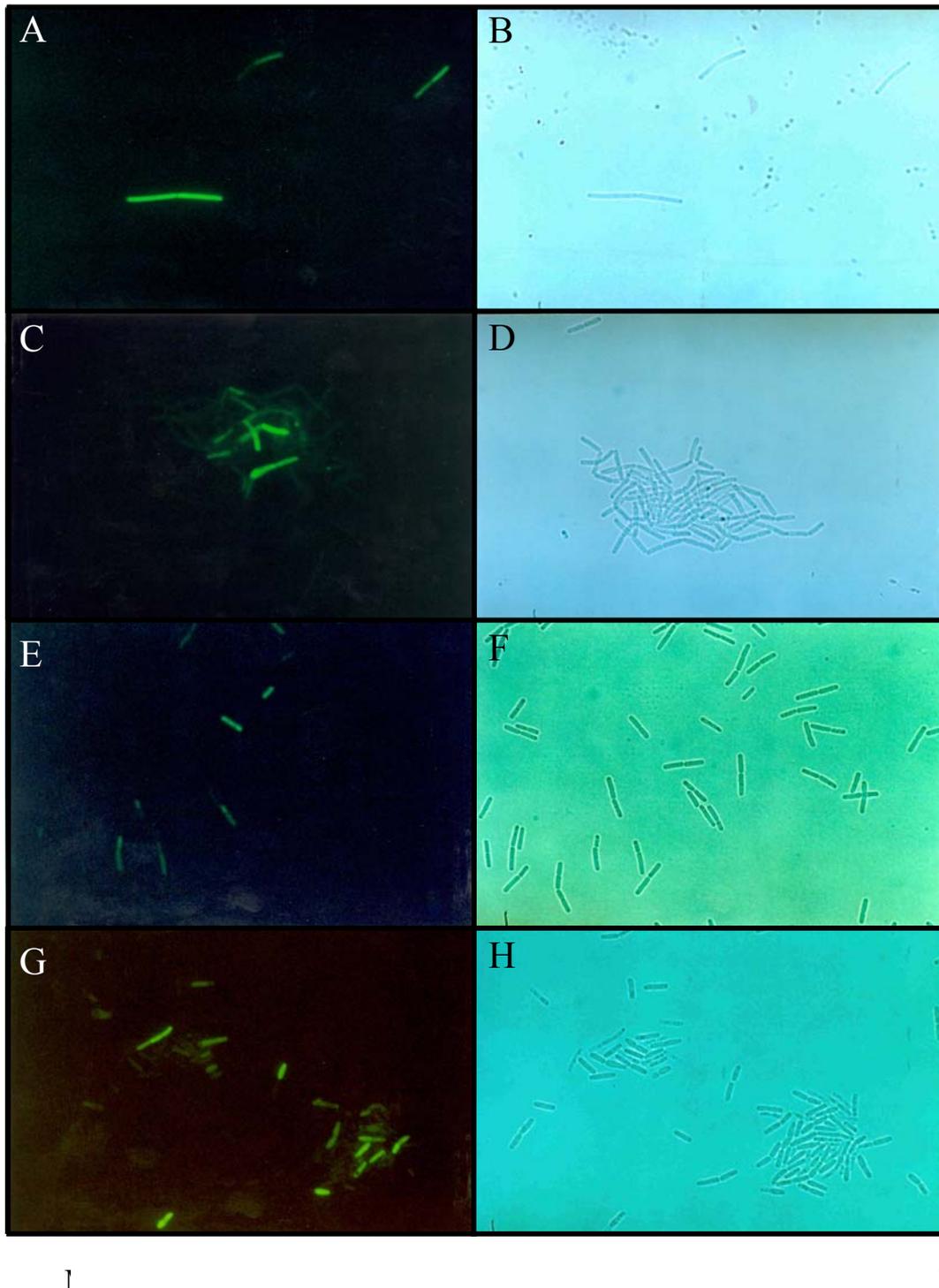


Figura 14. Emissão de fluorescência nas células de *B. thuringiensis* S76GFP⁺ e Cry⁻GFP⁺. As células foram crescidas em cultura líquida e o mesmo campo de cada uma das amostras coletadas, foi avaliado tanto por microscopia de contraste de fase (MCF), quanto por microscopia de fluorescência (MOF) em aumento de 1.000x. **Amostras coletadas em 6h de crescimento: A e B) S76GFP⁺; C e D) Cry⁻GFP⁺; Amostras coletadas com 12h de crescimento: E e F) S76GFP⁺; G e H) Cry⁻GFP⁺.**

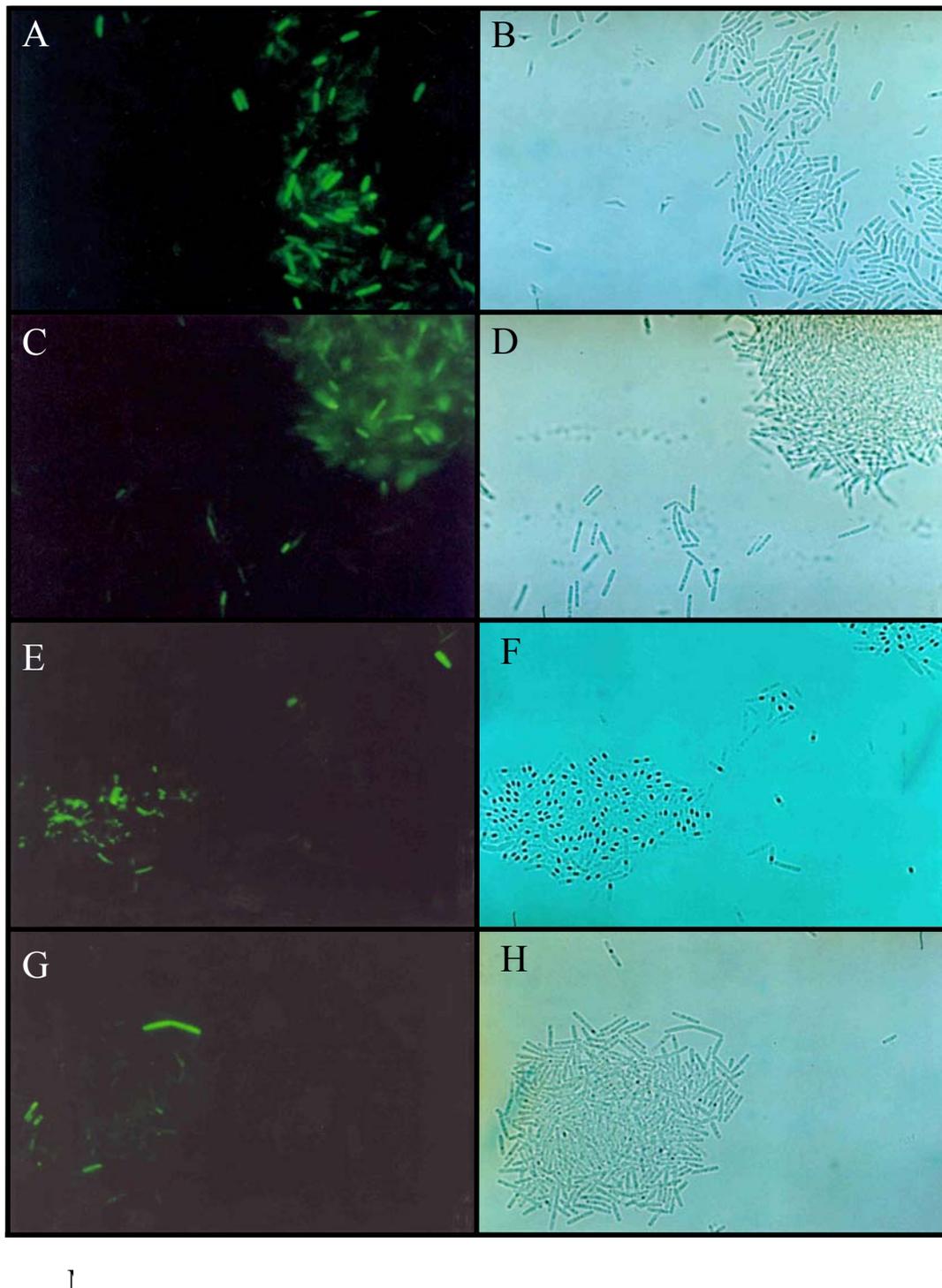


Figura 15. Emissão de fluorescência pelas células de *B. thuringiensis* S76GFP⁺ e Cry⁺GFP⁺. As células foram crescidas em cultura líquida e o mesmo campo de cada uma das amostras coletadas, foi avaliado tanto por microscopia de contraste de fase (MCF), quanto por microscopia de fluorescência (MOF) em aumento de 1.000x. Amostras coletadas em 24h de crescimento: **A e B)** S76GFP⁺; **C e D)** Cry⁺GFP⁺; Amostras coletadas com 48h de crescimento: **E e F)** S76GFP⁺; **G e H)** Cry⁺GFP⁺.

Algumas células da estirpe S76GFP⁺ apresentam emissão de fluorescência visualmente maior que outras (figura 13A e E; 14A e E; 15A e E). Essa diferença na intensidade pode ser explicada pela localização das células em diferentes planos do campo de observação, ou pela diferença nos níveis de expressão de GFP. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Dunn e Handelsman (1999) durante a expressão de GFP em *B. cereus*. A localização em diferentes planos também pode explicar as diferenças na intensidade da coloração verde observada quando as células permaneciam associadas em uma mesma cadeia, durante a fase vegetativa, em arranjo do tipo estreptobacilos.

Em paralelo à análise por microscopia de fluorescência, os mesmos campos e planos, foram observados por microscopia de contraste de fase. Como demonstrado nas figuras 13; 14 e 15, parte da população apresenta intensidade de fluorescência menor ou em níveis abaixo da sensibilidade da técnica. Por esse motivo, visando o melhor aproveitamento dessa ferramenta de monitoramento em estudos futuros, é desejável a seleção das células com maior intensidade de emissão de fluorescência. Uma alternativa apropriada para essa finalidade é a utilização da metodologia do sistema de FACS (*fluorescence activated cell sorter*), que permite a seleção de células de acordo com a intensidade de emissão de fluorescência.

A estirpe controle Cry⁻GFP⁺, assim como a S76GFP⁺, apresentou emissão de fluorescência em todos os tempos de crescimento analisados (2; 4; 6; 12; 24 e 48 horas). De maneira similar aos resultados obtidos para a estirpe S76, a expressão da proteína também ocorreu de forma heterogênea na população (figura 13C e G; 14C e G; 15C e G). Como esperado, as estirpes controle Cry⁻GFP⁻, S76GFP⁻ e as estirpes

parentais não apresentaram emissão de luz verde quando submetidas às mesmas condições (dados não mostrados).

É importante ressaltar que, do nosso conhecimento, não apenas é o primeiro relato de visualização da emissão de fluorescência pela expressão de GFP em células vegetativas de *B. thuringiensis*, mas, igualmente, é o primeiro relato de expressão de GFP em uma estirpe de *B. thuringiensis* selvagem. Os demais relatos descritos utilizaram um mutante *Cry⁻* e promotores ativos durante a fase estacionária.a expressão. Fusões tradicionais da proteína *Cry1Ac*, tanto com GFP quanto EGFP, não se mostraram eficientes para essa finalidade. Apesar de confirmada a expressão por SDS-PAGE e *imunoblot* (Roh *et al.*, 2004 a e b) e da visível emissão de fluorescência pela expressão dessa fusão em plantas (Halfhill *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2006) e em vírus (Chang *et al.*, 2003).

Apesar dos inúmeros esforços para verificar a expressão da proteína GFP por SDS-PAGE, não foi possível identificar a presença de banda correspondente à massa molecular da variante de GFP (figura 16), que é de aproximadamente 28 kDa. No gel apresentado e em outras diversas tentativas, em diferentes tempos de crescimento da cultura (6; 12; 24 e 72 horas de crescimento) e em condições diversas (análise de células lisadas, sobrenadante e cultura precipitada). Uma vez que a GFP mostrou-se estável, esse fato ocorreu, possivelmente, pela presença da proteína em quantidades abaixo do limite de detecção desse sistema ou ainda pela co-migração dessa com uma ou mais proteínas de massa molecular semelhante. Experimentos utilizando técnicas com maior sensibilidade, como por exemplo *immunoblot*, podem ser alternativas

apropriadas para a detecção dessa proteína no extrato celular de *B. thuringiensis* recombinante.

Entretanto, a análise do perfil protéico da estirpe S76 e das recombinantes S76GFP⁺ e S76GFP⁻ demonstrou a presença de proteínas com massas moleculares de aproximadamente de 130 e 71 kDa, ausentes no perfil apresentado pela estirpe Cry⁻ e derivadas, que, provavelmente, correspondem às proteínas Cry características da estirpe selvagem (figura 16). Como foi mencionado, o conteúdo de genes *cry* da estirpe *B. thuringiensis* S76 é composto por *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, além de *cry2Aa1* e *cry2Ab2* (Gitahy *et al.*, 2007) que codificam proteínas ativas para Lepidoptera e Diptera, respectivamente. Dessa maneira, os resultados obtidos apontam para a preservação das respectivas seqüências codantes e da manutenção da capacidade de expressão das δ -endotoxinas.

No sistema proposto, a manutenção da expressão de proteínas Cry pela estirpe S76GFP⁺ é uma característica importante, uma vez que a conservação da atividade entomopatogênica, em associação com a expressão de GFP, é característica desejável para explorar tal ferramenta. Por esse motivo, bioensaios com larvas de *D. sacharallis* empregando o elenco de células utilizadas nesse trabalho serão essenciais para identificar a manutenção dessa atividade.

A detecção da emissão de fluorescência pela expressão de *gfp* em *B. thuringiensis* S76GFP⁺, detectada tanto por microscopia, quanto pelo sistema Typhoon 9210, desde os estágios iniciais de crescimento até o final da esporulação, viabiliza o rastreamento desses microrganismos no ambiente. Sendo assim, a estirpe desenvolvida

possibilita estudos futuros visando o melhor entendimento da ecologia dessa bactéria e suas interações com outros organismos e em diferentes condições fisiológicas.

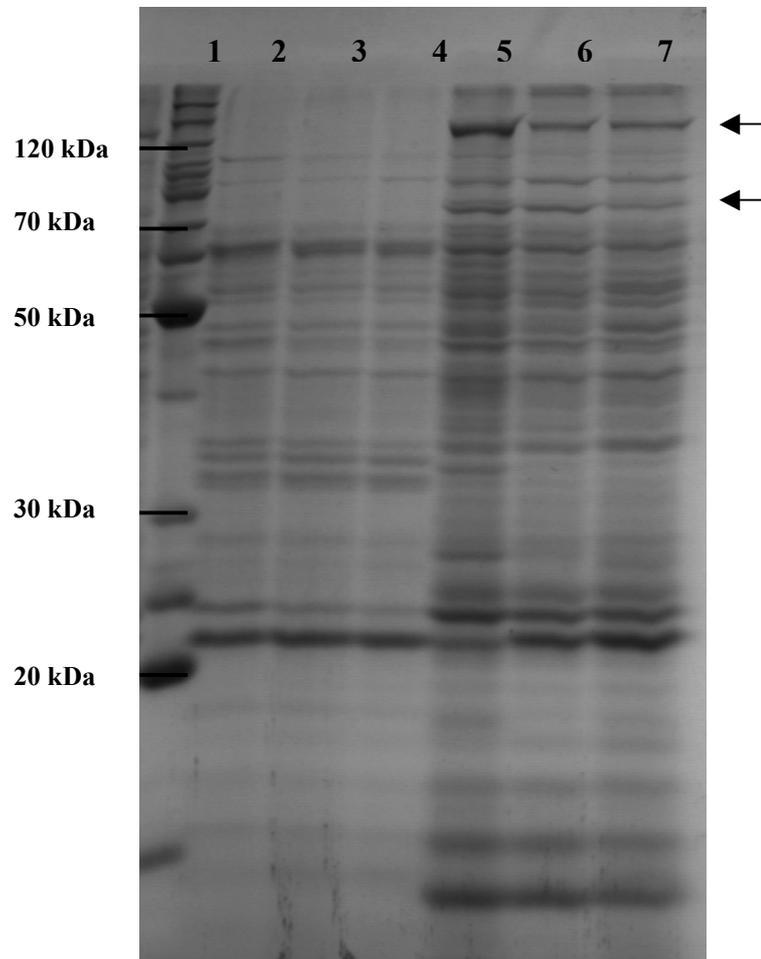


Figura 16. Análise da expressão de proteínas Cry. Culturas em meio líquido LB foram crescidas por 72h e alíquotas da cultura total analisadas em gel de poliacrilamida 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE). As setas indicam as bandas que correspondem, provavelmente, às proteínas Cry. **1)** Marcador de massa molecular Bench Marck (Invitrogen, USA). **2)** Cry⁻; **3)** Cry⁻GFP⁻; **4)** Cry⁻GFP⁺ **5)** S76; **6)** S76GFP⁻; **7)** S76GFP⁺.

Depois de confirmada a visualização da emissão de fluorescência foram realizadas comparações morfológicas e de padrão de crescimento entre a estirpe de *B.*

thuringiensis S76GFP⁺, a estirpe controle e a selvagem, com o objetivo de verificar se houve a manutenção dessas características na estirpe recombinante.

4.3. Análises morfológica e fisiológica da estirpe recombinante de *B. thuringiensis* S76 contendo o gene *gfp* (S76GFP⁺)

Mudanças fenotípicas podem indicar alterações no conteúdo genético de um microrganismo. Por esse motivo, a estirpe de S76GFP⁺ de *B. thuringiensis* foi cultivada em meio LB líquido, contendo cloranfenicol 10 µg/mL, em paralelo com as demais estirpes de interesse, com o objetivo de analisar possíveis alterações no ciclo celular e nas morfologias celular e de colônia. As amostras foram coletadas com intervalos regulares de 30 minutos a partir de duas horas de cultivo. Os dados apresentados na figura 17 refletem um crescimento típico de populações unicelulares em sistema descontínuo, onde pode ser observado o crescimento exponencial até a transição para a fase estacionária. Foi observado um discreto incremento no tempo de geração para os recombinantes S76GFP⁺ e Cry-GFP⁺ quando comparados com as respectivas parentais e com os recombinantes S76GFP⁻ e Cry-GFP⁻ (figura 17A e B). Essa alteração poderia ser explicada pela titulação de fatores de transcrição típicos de fase vegetativa imposta pela expressão de *gfpmut3A*, ainda que o vetor pAD43-25 replique com baixo número de cópias (5-6 cópias/cromossomo). O fato desse mesmo incremento não ter sido verificado para os recombinantes obtidos pela transferência do plasmídeo contendo o gene não funcional, onde a replicação é mediada por informações contidas no mesmo fragmento, reforça essa idéia.

O crescimento das células de interesse em meio LB sólido incubadas a 28 °C por 16 e 40 h também foi analisado. Foi observada a formação de colônias após 16 h de incubação para todas as estirpes analisadas, exceto para o recombinante S76GFP⁺ (figura 18). Entretanto, com 40 h de incubação, pode ser observado, para todas as

casos analisados, colônias com aspecto arredondado e aveludado, típicos das parentais. Embora o tempo de crescimento em meio sólido e líquido não se sobreponham, uma vez que as condições tenham particularidades, como por exemplo a incorporação de O_2 , esse dados corroboram aqueles obtidos na curva de crescimento (figura 16) notadamente para o recombinante S76GFP⁺ (figura 17).

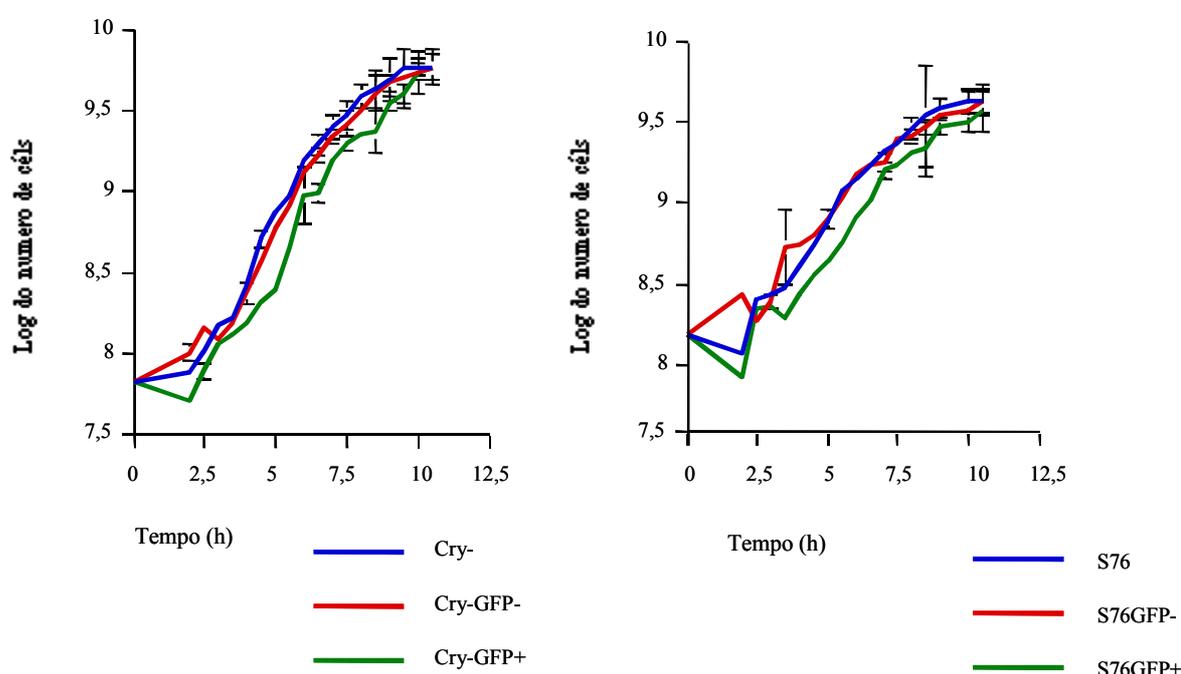


Figura 17. Curvas de crescimento de S76 (A), Cry⁻ (B) e derivadas. Curvas de crescimento baseadas em leitura de absorbância (A_{600}) de cultura líquida em intervalos de 30 min.

Em adição, as células cultivadas, em meio LB líquido e, coletadas com 2; 4; 6; 12; 24 e 48 h foram comparadas por microscopia de contraste de fase. Não foi possível visualizar alterações na morfologia, no arranjo típico em estreptobacilos, observados durante o crescimento vegetativo, assim como na formação dos respectivos esporos (figuras 19; 20 e 21).

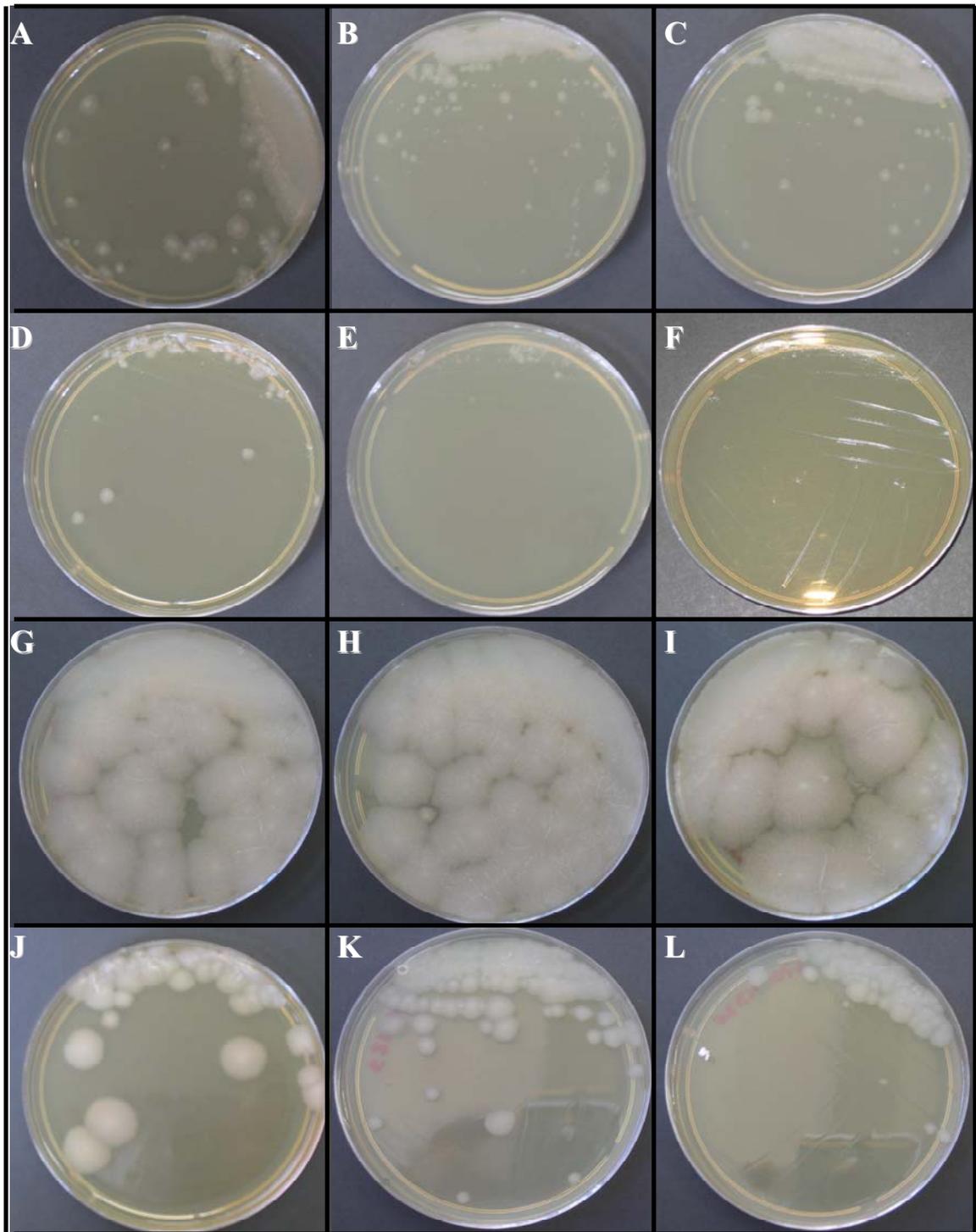


Figura 18. Morfologia das colônias de S76 e Cry⁻ parentais e recombinantes. Colônias crescidas em meio de cultura LB sólido. **16h de crescimento** **A)** Cry⁻; **B)** Cry⁻GFP⁺; **C)** Cry⁻GFP⁺; **D)** S76; **E)** S76GFP⁻; **F)** S76GFP⁺; **40h de crescimento** **G)** Cry⁻; **H)** Cry⁻GFP⁻; **I)** Cry⁻GFP⁺; **J)** S76; **K)** S76GFP⁻; **L)** S76GFP⁺.

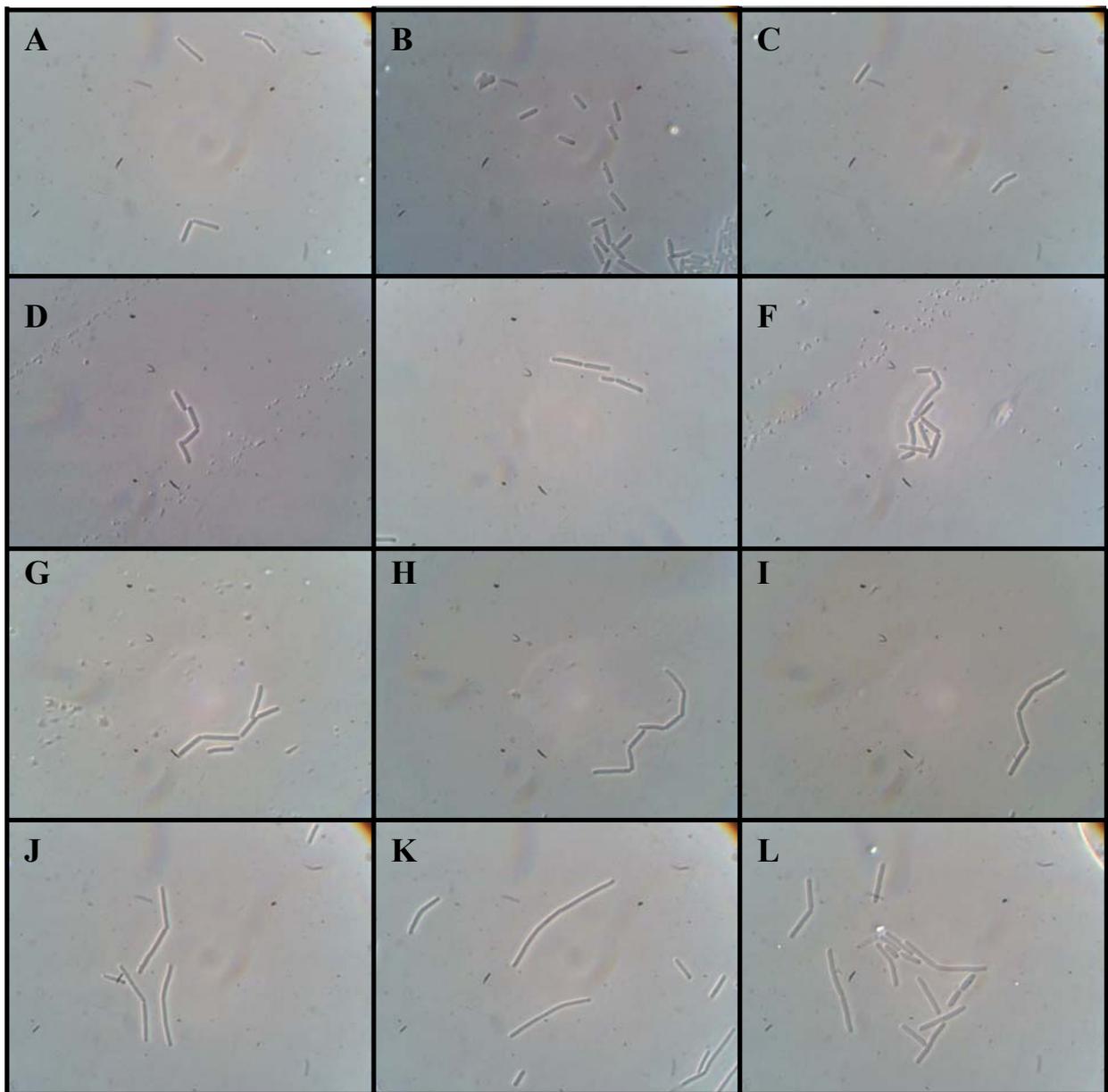


Figura 19. Morfologia das células de S76 e Cry⁻ parentais e recombinantes. As células foram crescidas em cultura líquida e avaliadas por microscopia de contraste de fase com aumento de 1.000x. Amostras coletadas com 2h de crescimento: **A)** Cry⁻; **B)** Cry⁻GFP⁻; **C)** Cry⁻GFP⁺; **D)** S76; **E)** S76GFP⁻; **F)** S76GFP⁺. Amostras coletadas com 4h de crescimento: **G)** Cry⁻; **H)** Cry⁻GFP⁻; **I)** Cry⁻GFP⁺; **J)** S76; **K)** S76GFP⁻; **L)** S76GFP⁺.

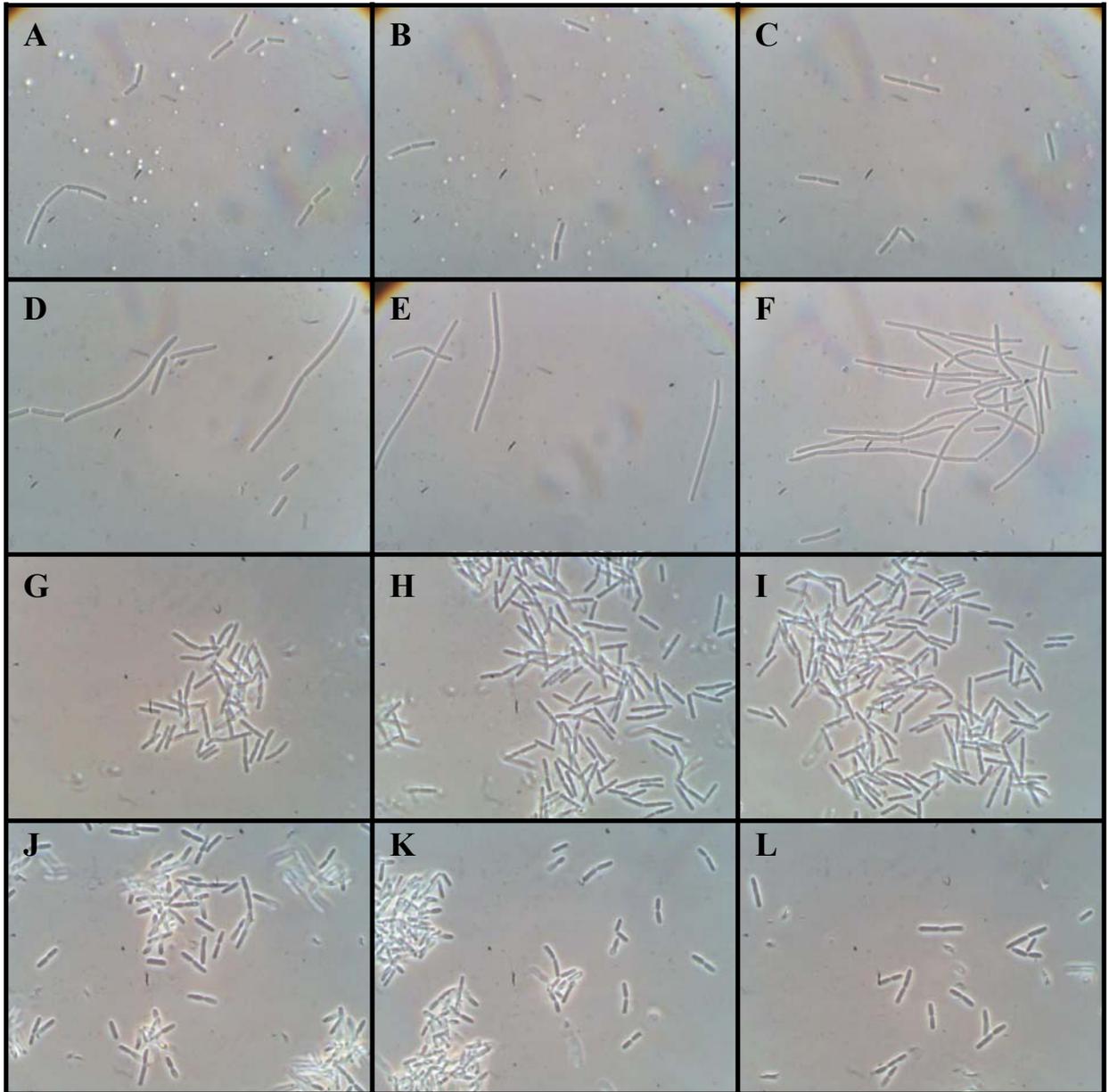


Figura 20. Morfologia das células de S76 e Cry⁻ parentais e recombinantes. As células foram crescidas em cultura líquida e avaliadas por microscopia de contraste de fase com aumento de 1.000x. Amostras coletadas com 6h de crescimento: **A)** Cry⁻; **B)** Cry⁻GFP⁻; **C)** Cry⁻GFP⁺; **D)** S76; **E)** S76GFP⁻; **F)** S76GFP⁺. Amostras coletadas com 12h de crescimento: **G)** Cry⁻; **H)** Cry⁻GFP⁻; **I)** Cry⁻GFP⁺; **J)** S76; **K)** S76GFP⁻; **L)** S76GFP⁺.

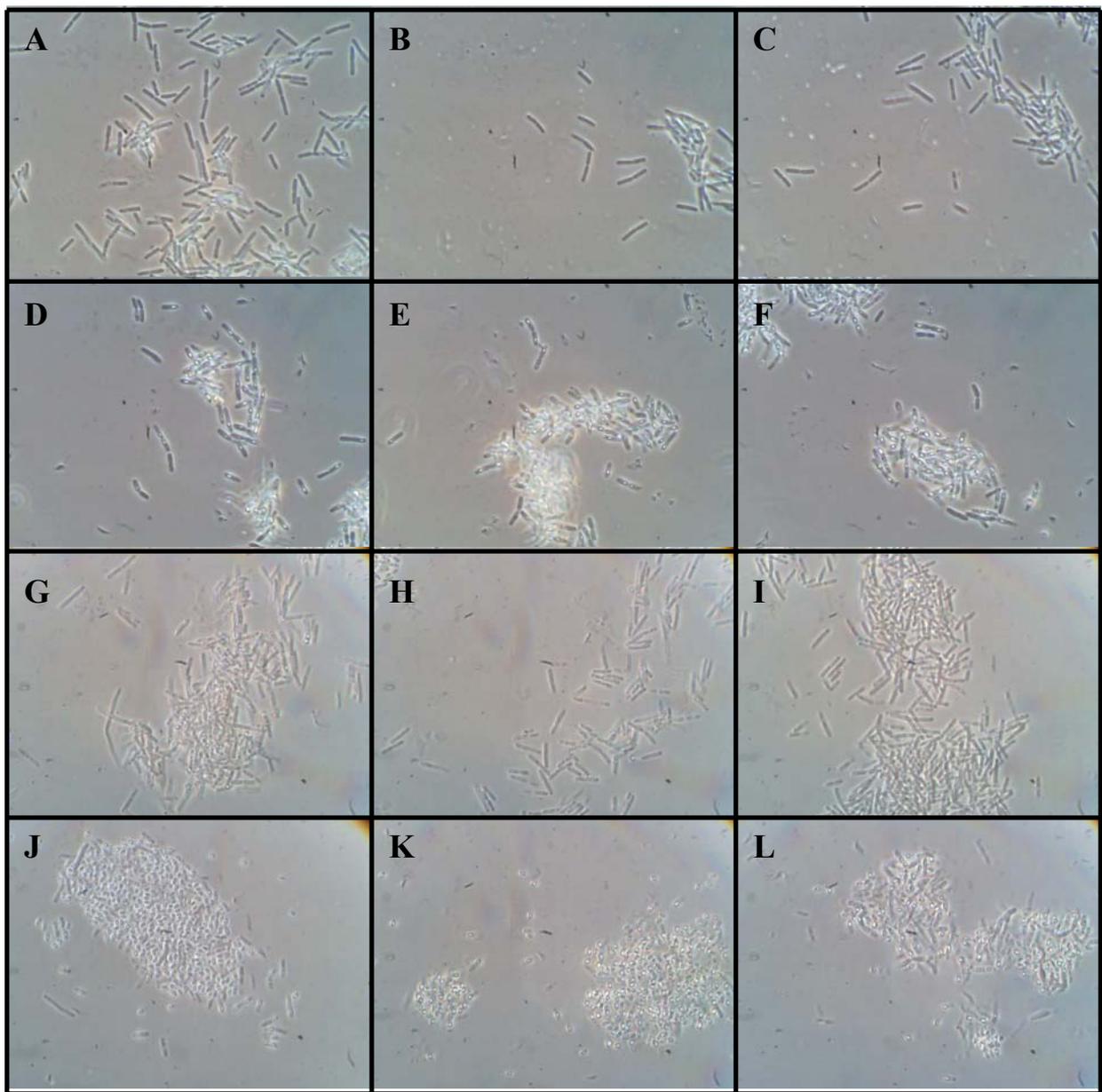


Figura 21. Morfologia das células de S76 e Cry⁻ parentais e recombinantes. As células foram crescidas em cultura líquida e avaliadas por microscopia de contraste de fase com aumento de 1.000x. Amostras coletadas com 24h de crescimento: **A)** Cry⁻; **B)** Cry⁻GFP⁻; **C)** Cry⁻GFP⁺; **D)** S76; **E)** S76GFP⁻; **F)** S76GFP⁺. Amostras coletadas com 48h de crescimento: **G)** Cry⁻; **H)** Cry⁻GFP⁻; **I)** Cry⁻GFP⁺; **J)** S76; **K)** S76GFP⁻; **L)** S76GFP⁺.

Como não foram observadas alterações morfológicas e nem no padrão de crescimento, a não ser pelo discreto aumento no tempo de geração, entre as estirpes recombinantes S76GFP⁺ e Cry-GFP⁺, as respectivas estirpes controles (GFP⁻) e as parentais, foi realizada análise comparativa do perfil plasmidial, com o intuito de verificar se a manutenção das características fenotípicas parentais descritas estenderam-se ao perfil de plasmídeos residentes.

4.4. Estabilidade genética da estirpe recombinante de *B.thuringiensis* S76 contendo o gene *gfp* (S76GFP⁺)

As estirpes de *B. thuringiensis* HD-1, padrão para Lepidoptera, e S76, pertencem à subespécie *kurstaki* e apresentam perfis plasmidiais semelhantes, contendo cerca de onze elementos extracromossomais (Gitahy *et al.*, 2007). O padrão de migração de bandas, obtido à partir da análise do DNA plasmidial de S76 em gel de agarose, foi compatível com o descrito anteriormente (figura 22A, coluna 1). Conforme esperado, o perfil plasmidial das recombinantes S76GFP⁺, S76GFP⁻ apresentaram, além do perfil da estirpe selvagem, evidência dos plasmídeos transformantes, destacando que, não foi observada a cura de nenhum dos plasmídeos residentes de S76 durante a manipulação (figura 22A, colunas 4 e 6). A estirpe controle Cry⁻ não contém plasmídeos, sendo assim, conforme esperado, as recombinantes Cry⁻GFP⁻ e Cry⁻GFP⁺ apresentaram no perfil plasmidial apenas a presença dos vetores pAD123 e pAD4325, respectivamente (figura 22B, colunas 3 e 9).

Essa informação foi corroborada pelo perfil de restrição obtido com a digestão dos DNA plasmidial dos clones de interesse. A enzima de restrição *Hind* III lineariza, ambos plasmídeos pAD123 e pAD43-25, gerando fragmentos de DNA de cerca de 5,9 (figura 22A, coluna 7, figura 22B, coluna 4) e 7,2 kb (figura 22A, coluna 12; figura 22B, coluna 11), respectivamente. Por sua vez, a digestão com a enzima *Ssp* I gera quatro fragmentos no primeiro caso e cinco no vetor de expressão de *gfp*. A digestão do plasmídeo pAD123 com essa enzima gera fragmentos de DNA 2.927 pb; 1.793 pb; 1.171 pb e 61 pb, que podem ser observados pela digestão do DNA plasmidial de

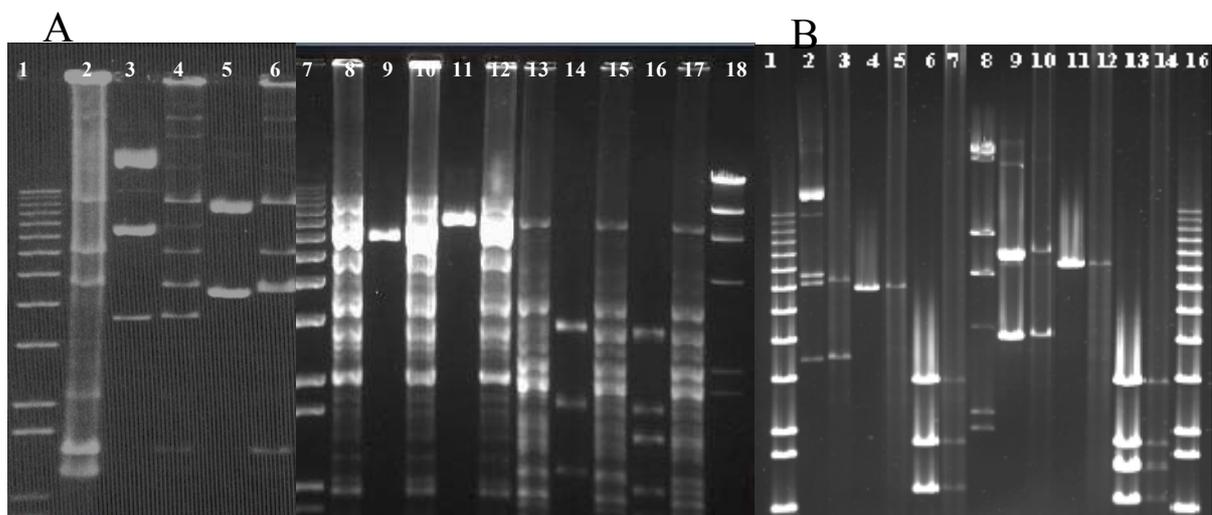


Figura 22. Análise do perfil plasmidial das estirpes recombinantes S76GFP⁻, S76GFP⁺, Cry⁻GFP⁻ e Cry⁻GFP⁺. DNA plasmidial intacto. **A.** 2) S76; 3) pAD123; 4) S76GFP⁻; 5) pAD43-25; 6) S76GFP⁺. DNA plasmidial digerido com a enzima de restrição *Hind* III. 8) S76; 9) pAD123; 10) S76GFP⁻; 11) pAD43-25; 12) S76GFP⁺. DNA plasmidial digerido com a enzima de restrição *Ssp* I. 13) S76; 14) pAD123; 15) S76GFP⁻; 16) pAD43-25; 17) S76GFP⁺; 1 e 7) Marcador 1 kb plus DNA ladder (invitrogen-USA); 18) fago λ digerido com *Hind* III; **B.** DNA plasmidial intacto. 2) pAD123; 3) Cry⁻GFP⁻; 9) pAD43-25; 10) Cry⁻GFP⁺; DNA plasmidial digerido com a enzima de restrição *Hind* III 4) pAD123; 5) Cry⁻GFP⁻; 11) pAD43-25; 12) Cry⁻GFP⁺. DNA plasmidial digerido com a enzima de restrição *Ssp* I. 6) pAD123; 7) Cry⁻GFP⁻; 13) pAD43-25; 14) Cry⁻GFP⁺. 1 e 16) Marcador 1 kb plus DNA ladder (invitrogen); 8) fago λ digerido com *Hind* III;

S76GFP⁻ (figura 22A, coluna 13), e Cry⁻GFP⁻ (figura 22B, coluna 7), excluído o menor fragmento que pelo seu pequeno tamanho não pode ser visualizado em gel de agarose na concentração adequada para a análise desta heterogênea e complexa população de fragmentos de DNA. O vetor pAD43-25 possui cinco sítios de restrição para *Ssp* I, gerando cinco fragmentos de DNA com tamanhos de 2.927 pb; 1.793 pb; 1.418 pb, 1.063 pb e 61 pb, que foram observados pela digestão do DNA plasmidial das estirpes recombinantes S76-GFP⁺ e Cry⁻-GFP⁺ com essa enzima (figura 22A, coluna 15; figura 22B, coluna 14). De maneira que, o menor fragmento não pode ser observado pela razão discutida acima. Em adição aos fragmentos obtidos pela restrição dos vetores pAD123 e pAD43-25, o perfil plasmidial das recombinantes provenientes

de S76 inclui ainda fragmentos adicionais produzidos pela restrição dos plasmídeos residentes da estirpe parental (figura 21A, colunas 8, 10, 13 e 15).

A análise do perfil plasmidial, por essa metodologia, revelou a manutenção do elenco de plasmídeos residentes de S76, tanto na estirpe recombinante S76-GFP⁻, quanto na S76-GFP⁺ em adição aos vetores recombinantes introduzidos. Esses dados estão de acordo com aqueles obtidos pela varredura de emissão de fluorescência pelo sistema Typhoon 9210.

Os resultados obtidos no presente trabalho, evidenciando a expressão da variante de GFP em níveis suficientes para detecção por microscopia de fluorescência e pelo sistema de leitura Typhoon 9210, a manutenção das características morfológicas e fisiológicas analisadas, assim como a expressão das proteínas Cry, corroboram com a evidência do potencial de utilização da estirpe S76GFP⁺ como ferramenta de monitoramento tanto em experimentos *in vitro* quanto no ambiente. O desenvolvimento dessa estirpe é um dos objetivos do projeto que envolve a caracterização da estirpe S76, objeto de estudo do grupo de pesquisa formado pela colaboração entre o Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de *B. thuringiensis*, UnB, e Embrapa Agrobiologia.

Possibilitar estudos sobre a ecologia de *B. thuringiensis* S76 e suas interações com *Saccharum* sp. são as perspectivas imediatas do presente trabalho. No entanto, essa ferramenta de rastreamento pode ser utilizada com diversas finalidades, como estudos de persistência no ambiente e em plantas, interações de *B. thuringiensis* com plantas, animais, outros microrganismos, dentre outros.

5. Conclusões e Perspectivas

5.1 Conclusões

- No presente trabalho, foram obtidos os recombinantes S76 GFP⁺, S76GFP⁻, Cry⁻ GFP⁺ e Cry⁻ GFP⁻, a partir da transformação da estirpe brasileira selvagem S76 e de um mutante acristalífero de *B. thuringiensis*, respectivamente.
- Foi possível observar emissão de fluorescência pelas estirpes recombinantes, transformadas com o vetor contendo o gene *gfpmut3a* funcional, por microscopia de fluorescência, assim como por leitura direta de emissão de fluorescência pelo sistema Typhoon 9210. Por microscopia de fluorescência, foi possível visualizar emissão a partir de 2 h até estágios avançados de crescimento em cultura líquida, sugerindo a estabilidade da variante de GFP, em ambas as hospedeiras de *B. thuringiensis*.
- Não foram observadas alterações na expressão dos genes *cry* característicos da estirpe S76, sendo evidenciada a presença, por SDS-PAGE, de proteínas com massa molecular aproximada de 130 e 71 kDa, correspondentes às proteínas Cry.
- As estirpes recombinantes não apresentaram alterações na morfologia de células e de colônias quando comparadas as estirpes hospedeiras.
- Houve um discreto acréscimo no tempo de geração das estirpes GFP⁺, provavelmente pela expressão adicional de GFP.
- A estirpe de interesse, S76 GFP⁺, não apresentou alterações no elenco de plasmídeos residentes da estirpe selvagem, exceto pela presença do vetor pAD43-25.

- A eficácia na expressão de GFP em *B. thuringiensis*, a facilidade de detecção da fluorescência, a estabilidade da proteína nesse sistema de expressão, somados a manutenção das características selvagens, indicam que a estirpe recombinante S76GFP⁺ é apropriada para estudos de monitoramento desse microrganismo.

5.2. Perspectivas

- A avaliação da atividade entomopatogênica do recombinante S76GFP⁺, a inoculação em cana-de-açúcar, além de estimativa de prevalência no ambiente são perspectivas imediatas, necessárias para validação dessa estratégia.

6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, L. F., BROWN, K. L., WHITELEY, H. R. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. **J. Bacteriol.**, v. 173, pp. 3846–3854, 1991.
- AGAISSE, H., LERECLUS, D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.**, v. 13, pp. 97–107, 1994a.
- AGAISSE, H., LERECLUS, D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* *cryIIIA* toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spo0A* mutant. **J. Bacteriol.**, v. 176, pp. 4734–4741, 1994b.
- AGAISSE, H., LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **J. Bacteriol.**, v. 177, pp. 6027–6032, 1995.
- AMARGER, N. Genetically modified bacteria in agriculture. **Biochimie.** v. 84(11), pp. 1061–1072, 2002.
- ANDREWS J. H., HARRIS R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 38, pp. 145–180, 2000.
- ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **App. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 10, p. 4906–4914, oct. 2002.
- ARONSON, A. I., BECKMAN, W., DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, v. 50(1), pp. 1–24, 1986.
- ARONSON, A. I., Flexibility in the protoxin composition of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, pp. 21–27, 1994.
- ARONSON, A. I., SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 195, pp. 1–8, 2001.
- ARONSON, A. Sporulation and *d*-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. **CMLS, Cell. Mol. Life Sci.** v. 59, pp. 417–425, 2002.H
- AZEVEDO, J. L., MACCHERONI, W. JR., PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB Electr. J. Biotech.**, n.1, v. 15, 2000.
- BACON, C. W., HINTON, D. M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In “**A Manual of Environmental Microbiology**” (G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, M. V. Walter, Eds.), pp. 413–421. ASM Press, Washington, DC, 1997.
- BACON, C. W., YATES, I. E.; HINTON, D. M., MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, n. 2, p. 324–332, 2001.
- BAI, Y., DÁOUST, F., SMITH, D. L., DRISCOLL, B. T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soilbean root nodules. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, pp. 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 Biol. Biochem.**, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BAUM, J. A., MALVAR, T. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.**, v. 18, pp. 1-12, 1995.
- BEEGLE, T., YAMAMOTO, T. History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development, **Can. Entomol.** v. 124, pp. 587-616, 1992.
- BELL, C. R., DICKIE, G. A., HARVEY, W. L. G., CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 46-53, 1985.
- 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(10), pp. 980-988, 1998.
- BLOEMBERG, G. V., LUGTEMBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, pp. 343-350, 2001.
- BODDEY, R. M., URQUIAGA, S., ALVES, B. J. R., REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.
- BROWN, K. L., WHITELEY, H. R. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase capable of transcribing crystal protein genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 85, pp. 4166-4170, 1988.
- BROWN, K. L., WHITELEY, H. R. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. **J. Bacteriol.** v. 172, pp. 6682-6688, 1990.
- CANO, R. J., BORUCKI, M. K.. Revival and identification of bacterial spores in 25-40-million-year-old Dominican amber. **Science**, v. 268, pp.1060-1064, 1995.
- CHALFIE, M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Trends in Genetics.** v. 10(5), p. 151, 1994.
- CHANG, J. H., CHOI, J. Y., JIN, B. R., ROH, J. Y., OLSZEWSKI, J. A. SEO, S. J. O'REILLY, D. R. JE, Y. H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. **J. Invert. Pathol.**, v. 84(1), pp. 30-37, 2003.
- CHEN, C., WEISS, D. S., GHIGO, J. M., BECKWITH, J. Septal localization of FtsQ, an essential cell division protein in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** v. 181, pp. 521-530, 1999.
- CHIU, W., YASUO, N., ZENG, W., HIRANO, T., KOBAYASHI, H., SHEEN, J. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Curr. Biol.**, v. 6, pp.325-330, 1996.
- CLAYDON, N., GROVE, J. F., POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochem.**, v. 24(5), pp. 937-943, 1985.
- CODY, C. W., PRASHER, D. C, WESTLER, W. M., PRENDERGAST, F. G., WARD, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. **Biochemistry.** v. 32(5), pp. 1212-1218, 1993.

- COMPANT, S., REITER, B., SESSITSCH, A., NOWAK, J., CLÉMENT, C., BARKA E. A. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Appl Environ Microbiol.** v. 71(4), pp. 1685–1693, 2005.
- COPPING, L. G., MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest. Manag. Sci.**, v. 56, n. 5, pp. 651-676, 2000.
- CORMACK, B. P., VALDIVIA, R. H., FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene.** v. 173, pp. 33-38, 1996.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microb. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, pp. 807-813, 1998.
- DEKKERS, L. C., MULDER, I. H., PHOELICH, C. C., CHIN-A-WOENG, T. F., WIJFJES, A. H., LUGTENBERG, B. J. The *sss* colonization gene of the tomato-Fusarium oxysporum f. sp. radialis-lycopersici biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type pseudomonas spp. bacteria. **Mol. Plant. Microbe Interact.**, v. 13(11), pp. 1177-1183, 2000.
- DE MAAGD, R. A., BRAVO, A., BERRY, B., CRICKMORE, N., SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, v. 37, pp. 409-433, 2003.
- DE-SOUZA, M. T., LECADET, M. M., LERECLUS, D. Full expression of the cryIIIA toxin gene of *Bacillus thuringiensis* requires a distant upstream DNA sequence affecting transcription. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 10, pp. 2952-2960, 1993.
- DE-SOUZA, M. T.; AGAISSE, H. & LERECLUS, D. High-level transcription of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis* depends on a second promoter located 600 bp Upstream of the Translational Start Site. **Genet. Brazilian J.** v. 19(2), pp. 197-203, 1996.
- DU, C., MARTIN, P. A. W., NICKERSON, K. W. Comparison of Disulfide Contents and Solubility at Alkaline pH of Insecticidal and Noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* Protein Crystals. **App. Environ. Microbiol.**, v. 60(10), pp. 3847-3853, 1994.
- DUNN, A. K., HANDELSMAN, J. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*. **Gene.** v. 226(2), pp. 297-305, 1999.
- EDWARDS, D. H., THOMAIDES, H. B., ERRINGTON, J. Promiscuous targeting of *Bacillus subtilis* cell division protein DivIVA to division sites in *Escherichia coli* and fission yeast. **EMBO J.**, v. 19(11), pp. 2719-27, 2000.
- ENGELHARD, M., HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environ. Microbiol.** v. 2(2), pp. 131-41, 2000.
- ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews. Microbiology.** v.1, pp. 117-126, 2003.
- FU, X., SHIH, Y. L., ZHANG, Y., ROTHFIELD, L. I. The MinE ring required for proper placement of the division site is a mobile structure that changes its cellular location during *Escherichia coli* division cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 98, pp. 980–985, 2001.

- GHIGO, M., WEISS, D. S., CHEN, J. C., YARROW, J. C., BECKWITH, J. Localization of FtsL to the *Escherichia coli* septal ring. **Mol. Microbiol.** v. 31, pp. 725–737, 1999.
- GITAHY, P. M., DE-SOUZA, M. T., MONNERAT, R., ARRIGONI, E. D., BALDANI, J. I.. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian J. Microbiol.**, v. 38, pp. 531-537, 2007.
- GLARE, T. R., O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. John Wiley, Chincester, 350 p., 2000.
- GLAZER, A. N., NIKAIDO H. Microbial Insecticides. **Microb. Tecnol.: Fund. App. Microbiol.**, W. H. Freeman and Company, 1° ed, New York, pp. 209-236, 1995.
- GLATRON, M. F., RAPOPORT, G. Biosynthesis of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis*: half-life of its corresponding messenger RNA. **Biochic.**, v. 54, pp. 1291-1301, 1972.
- GOHAR, M., GILOIS, N., GRAVELINE, R., GARREAU, C., SANCHIS, V., LERECLUS, D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. **Proteomics.** v. 5, pp. 3696–3711, 2005.
- GRALL, S., MANCEAU, C. Colonization of *Vitis vinifera* by a Green Fluorescence Protein-Labeled, *gfp*-Marked Strain of *Xylophilus ampelinus*, the Causal Agent of Bacterial Necrosis of Grapevine. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69(4), pp. 1904–1912, 2003.
- GRAY, E. J., LEE, K. D., SOULEIMANOV, A. M., DI FALCO, M. R., ZHOU, X., LY, A., CHARLES, T. C., DRISCOLL, B. T., SMITH, D.L. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100(3), pp. 545-54, 2006.
- GROCHULSKI, P., MASSON, L., BORISOVA, S., PUSZTAI-CAREY, M., SCHWARTZ, J., BROUSSEAU, R., CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. **J. Mol. Biol.**, v. 254, pp. 447-464, 1995.
- GROSS, L. A., BAIRD, G. S., HOFFMAN, R. C., BALDRIDGE, K. K., TSIEN, R. Y. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 97(22), pp. 11990-11995, 2000.
- GROSSMAN, A. Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. **Annu. Rev. Genetics**, v. 29, pp. 477-508, 1995.
- HALE, C. A., BÔER, P. A., Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. **J. Bacteriol.** v.181, pp. 167–176, 1999.
- HALFHILL, M. D., SUTHERLAND, J. P., MOON, H. S., POPPY, G. M., WARWICK, S. I., WEISSINGER, A. K., RUFTY, T. W., RAYMER, P. L., C. STEWART, N. Jr. Growth, productivity, and competitiveness of introgressed weedy *Brassica rapa* hybrids selected for the presence of Bt *cryIAc* and *gfp* transgenes. **Molecular Ecology.** v. 14 (10), pp. 3177–3189, 2005.
- HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAVEE, W. F., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.** v. 43, pp. 895-914, 1997.

- HARPER, B. K., MABON, S. A., LEFFEL, S. M., HALFHILL, M. D., RICHARDS, H. A., MOYER, K. A., STEWART, C. .N. Jr. Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. **Nat Biotechnol.** v. 17(11), pp. 1125-1129, 1999.
- HASELOFF, J. SIEMERING, K. R., PRASHER, D. C., HODGE, S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plant brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 94, pp. 2122-2127, 1997.
- HASTINGS, J. W., MORIN, J. G. Comparative biochemistry of calciumactivated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, *Pelagia* and *Renilla*. **Biol. Bull.** v. 137, p. 402, 1969.
- HEEB, S., BLUMER, C., HAAS, D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **J Bacteriol.** v. 184(4), pp. 1046-1056, 2002.
- HEIM, R, PRASHER, D. C, TSIEN, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, pp. 12501–12504, 1994.
- HEIM, R., TSIEN, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. **Curr. Biol.**, v. 6(2), pp. 178-182, 1996.
- HENDERSON, J. N., REMINGTON, S. J. Crystal structures and mutational analysis of amFP486, a cyan fluorescent protein from *Anemonia majano*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.102(36), pp. 12712-12717, 2005.
- HOFLICH, G., WIEHE, W., KUHN, G., Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative rhizosphere mechanisms, **Experientia**, v. 50, pp. 897–905, 1994.
- HÖFTE, H., WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, v. 53, n 2, pp. 242-255, 1989.
- HU, Z., LUTKENHAUS, J. Topological regulation of cell division in *Escherichia coli* involves rapid pole to pole oscillation of the division inhibitor MinC under the control of MinD and MinE. **Mol. Microbiol.** v. 34, pp. 82–90, 2000.
- JACOBS, M. J., BUGBEE, W. M., GABRIELSON. D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Can. J. Bot.** v. 63, pp. 1262-1265, 1985.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Herbaspirillum, and endophyte diazotrophic colonizing vascular tissue in levae of sorghum bicolor L. Moench. **J. Experimental Botany**, v. 48, n. 308, 785-797, 1997
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crop. Res.**, v. 65, p. 197-209, 2000.
- JAMES, C. Preview: Global status of comercialized biotech/GM crops: 2004. ISAA Brief (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, USA, n. 32, 2004.

- JARRETT, P., STEPHENSON, M. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56(6), pp. 1608-1614, 1990.
- JORDAN, M.C. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation. **Plant. Cell. Rep.**, v.19, pp. 1069–1075, 2000.
- JUNG, K, CÔTÉ, J.C. A review of environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Tec. Bull., N. 29**, Canadá, 2000.
- JURAT-FUENTES, J. L., ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Eur. J. Biochem.**, v. 271(15), pp. 3127-3135, 2004.
- KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Adv. Insect Physiol.**, v. 24, n. 2, pp. 275-308, 1994.
- KNIGHT, P. J., CRICKMORE, N., ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol.**, v. 11(3), pp. 429-436, 1994.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J., ARAUJO, W. L., MENDES, R., GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environ. Microbiol.**, v. 6, pp. 1244–1251, 2004.
- LEE. S., RETH, A., MELETZUS, D., SEVILHA, M., KENNEDY, C. Characterization of a major cluster of *nif*, *fix* and associated genes in a sugarcane endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. **J. Bacteriol.**, v. 182, pp. 7088-7091, 2002.
- LAMBERT, B., JOOS, H., Fundamental aspects of rhizobacterial plant growth promotion research, **Trends Biotechnol.** v. 7, pp. 215–219, 1989.
- LERECLUS, D., LECADET, M. M., RIBIER, J., DEDONDER, R. Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystaliferous strains. **Mol. Gen. Genet.**, v. 186, pp. 391-398, 1982.
- LERTCANAWANICHAKUL, M., WIWAT, C., BHUMIRATANA, A., DEAN, D. H. Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. **Curr. Microbiol.** v. 48(3), pp. 175-181, 2004.
- LEWIS, P. J., ERRINGTON, J. Use of green fluorescent protein for detection of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Microbiology** 142, pp. 733–740, 1996.
- LI, J., CARROLL, J., ELLAR, D. J. Crystal structure of insectidicidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v. 353, pp. 815-821, 1991.
- MA, X., EHRDARDT, D.W., MARGOLIN, W. Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 93, pp. 12998–13003, 1996.
- MAHILLON, J., HAZY, R., HALLET, B., DELCOUR, J. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. **Genetica**, v. 93, pp. 13-26, 1994.
- MIKI, B., MCHUGH, S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **J. Biotechnol.** v. 5;107(3), pp. 193-232, 2004.

- MOIR, A., CORFE, B. M., BEHRAVAN, J. Spore germination. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 59, pp. 403-409, 2002
- MORIN, J. G., HASTINGS, J. W. Energy transfer in a bioluminescent system. **J. Cell. Physiol.** v. 77, pp. 313–318, 1971.
- MORISE, H., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., WINANT, J. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. **Biochemistry.** v.13, pp. 2656–2662, 1974.
- MORSE, R.J., YAMAMOTO T., STROUD, R.M., Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, v. 9, pp.409–417, 2001.
- NAGAMATSU, Y., KOIKE, T., SASAKI, K., YOSHIMOTO, A., FURUKAWA, Y. The cadherin-like protein is essential to specificity determination and cytotoxic action of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIAa toxin. **FEBS Lett.**, v. 29(2), pp. 385-390, 1999.
- NEWMAN, D. K., BANFIELD, J. F. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, n.10, v. 296, p.1071-7, 2002.
- NEWMAN, L. A., REYNOLDS, C. M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends Biotechnol.**, v. 23(1), pp. 6-8, 2005.
- OLIVARES, F. L. BALDANI, V. L., REIS, V. M., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominatly of Gramineae. **Biol. Fertil Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- ONYENWOKE, R. U., BRILL, J. A., FARAHI, K., WIEGEL, J. Sporulation genes in members of the low G+C Gram-type-positive phylogenetic branch (Firmicutes). **Arch. Microbiol.**, v. 182(2-3), pp. 182-192, 2004.
- ORMÖ, M., CUBITT, A. B., KALLIO, K., GROSS, L. A., TSIEN, R. Y., REMINGTON, S. J. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. **Science.** v. 273, pp.1392–1395, 1996.
- PATRIQUIN, D. G., DORING J., BEREINER J.. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Can. J. Microbiol.** v. 24, pp. 734-742, 1978.
- PEROZZO, M. A., WARD, K. B., THOMPSON, R. B., WARD, W. W. X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals. **J. Biol. Chem.** v. 263, pp. 7713–7716, 1988.
- PHILLIPS, G. J. Green fluorescent protein--a bright idea for the study of bacterial protein localization. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 204(1), pp. 9-18, 2001.
- PHILLIPS, Z. E. V., STRAUCH, M. A *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression.. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 59, pp. 3392-402, 2002.
- PONCET, S., DERVYN, E., KLIER, A., RAPOPORT, G. Spo0a represses transcription of *cry* toxin genes in *B. thuringiensis*. **Microbiology.** v. 143, pp. 2743-2751, 1997.
- PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. **Gene.** v. 111, pp. 229–233, 1992.
- RAJANMOHAN, F., LEE, M. K., DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins: Molecular Mode of Action. **Progr. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.**, v. 60, pp. 1-27, 1998.

- RASKIN, D. M., DE BOER, P.A. The MinE ring: an FtsZ-independent cell structure required for selection of the correct division site in *E. coli*. **Cell**. v. 91, pp. 685–694, 1997.
- RASKIN, D. M., DE BOER, P. A. Rapid pole-to-pole oscillation of a protein required for directing division to the middle of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, pp. 4971–4976, 1999.
- RASKO, D. A., ALTHERR, M. R., HAN, C. S., RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 29, pp. 303-329, 2005.
- REID, B. G., FLYNN, G. C. Chromophore formation in green fluorescent protein. **Biochemistry**. v. 36, pp. 6786–6791, 1997.
- REMINGTON, S. J. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. **Curr. Opin. Struct. Biol.** v. 16(6), pp. 714-721, 2006.
- RIZZUTO, R., BRINI, M., PIZZO, P., MURGIA, M., POZZAN, T. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. **Curr. Biol.**, v. 5(6), pp. 635-42, 1995.
- RODRIGUES, I. C., Certificação ambiental e desenvolvimento sustentável: avaliação para o setor sucroalcooleiro localizado na bacia hidrografica do rio Mogi – Guaçú, SP. Tese de doutorado. 297 p., UFSCar, SP, 2004.
- ROH, J. Y., LEE, I. H., LI, M. S., CHANG, J. H., CHOI, J. Y., BOO, K. S., JE, Y. H. Expression of a recombinant Cry1Ac crystal protein fused with a green fluorescent protein in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Cry-B. **J. Microbiol.**, v. 42(4), pp. 340-3454, 2004a.
- ROH, J. Y., LI, M. S., CHANG, J. H., CHOI, J. Y., SHIM, H. J., SHIN, S. C., BOO, K. S., JE, Y. H. Expression and characterization of a recombinant Cry1Ac crystal protein with enhanced green fluorescent protein in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. **Lett. Appl. Microbiol.** v. 38(5), pp. 393-399, 2004b.
- ROMEIS, J., MEISSLE, M., BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnol.**, v. 24, n. 1, 2006.
- ROOS, I. M. M., HATTINGH, M. J. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* on sweet cherry leaves. **Phytopathol.** v. 108, pp. 18-25, 1983.
- SABARATNAM, S., BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69(2), pp. 1220-1228, 2003.
- 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. Biol. Rev.**, v. 62(3), pp. 775-806, 1998.
- SHELTON, A. M., ZHAO, J. Z., ROUSH, R. T. Economic, ecological, food safety and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 47, pp. 845-881, 2002.
- SHEN, B.C., STEWART, C. N. Jr., ZHANG, M. Q., LE, Y. T., TANG. Z. X., MI, X. C., WEI, W., MA, K. P. Correlated expression of *gfp* and *Bt cry1Ac* gene facilitates quantification of transgenic hybridization between Brassicas. **Plant. Biol.** v. 8(5), pp. 723-730, 2006.

- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. **J. Cell. Comp. Physiol.** v. 59, pp. 223–239, 1962.
- SHIMOMURA, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. **J. Microscopy.** Review article. v. 217(1), pp. 3–15, 2005.
- STEPHENS, C. Bacterial sporulation: A question of commitment? **Curr. Biol.**, v. 8, pp. 45–48, 1998.
- STEPHENSON, K. A., LEWIS, R. J. Molecular insights into the initiation of sporulation in Gram-positive bacteria: new technologies for an old phenomenon. **FEMS Microbiol. Revi.**, v.29, pp. 281–301, 2005.
- STEWART JR, C. N. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. **Plant Cell Rep.**, v. 20, pp. 376–382, 2001
- STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 67(4), pp.491–502, 2003.
- STUURMAN, N., PACIOS BRAS, C., SCHLAMMAN, H. R., WIJFJES, A. H., BLOEMBERG, G., SPAINK, H. P. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Mol Plant Microbe Interact.** v. 13(11), pp. 1163–1169, 2000.
- SZEWCZYK, B. OYOS-CARVAJAL, L. PALUSZEK, M. SKRZECZ, I. SOUZA, M. L. Baculoviruses — re-emerging biopesticides. **Biotechnol. Adv.**, v. 24(2), pp. 143–160, 2006.
- TAKAYAMA, K., KJELLEBERG, S. The role of RNA stability during bacterial stress responses and starvation. **Environ. Microbiol.**, v. 2(4), pp. 355–65, 2000.
- TOMBOLINI, R., VAN DER GAAG, D. J., GERHARDSON, B., JANSSON, J. K. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Appl Environ Microbiol.** v. 65(8), pp. 3674–3680, 1999.
- THOMAS, D. J. I., MORGAN, J. A. 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(1), pp. 118–124, 2000.
- TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annu. Rev. Biochem.** v. 67, pp. 509–544, 1998.
- URETA, A., ALVAREZ, B. RÁMON, A., VERA, M. A., MARTÍNÉZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil.**, v. 127, p. 271–277, 1995.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C., DE-SOUZA, M. T., SHILER., W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: **Controle Biológico.** Ed. Embrapa, Jaguariúna, pp. 102–225, 1998
- VALAITIS, A. P., JENKINS, J. L., LEE, M. K., DEAN, D. H., GARNER, K. J. Isolation and partial characterization of gypsy moth BTR-270, an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. **Arch. Insect. Biochem. Physiol.** v. 46(4), pp. 186–200, 2001.

- VAZQUEZ-PADRON, R. I., RIVA, G., AGÜERO, G., SILVA, Y., PHAM, S. M., SOBERÓN, M., BRAVO, A., AÏTOUCHE, A. Cryptic endotoxic nature of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab insecticidal crystal protein. **FEBS Lett.**, v. 570, pp. 30-36, 2004.
- VERMA, S. C., SINGH, A., CHOWDHURY, S. P., TRIPATHI, A. K. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. **Biotechnol Lett.** v. 26(5), pp. 425-429, 2004.
- 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(4), pp. 369-374, 1998.
- VREELAND, R. H., W. D. ROSENZWEIG, D. W. POWERS. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. **Nature**, v. 407, pp.897-900, 2000.
- WANG, S., HAZELRIGG, T. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. **Nature**. v. 369(6479), pp. 400-403, 1994.
- WEHRL, W., NIEDERWEIS, M., SCHUMANN, W. The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. **J. Bacteriol.**, v. 182(13), pp. 3870-3873, 2000.
- WEISS, D. S., CHEN, J. C., GHIGO, J. M., BOYD, D., BECKWITH, J. Localization of FtsI (PBP3) to the septal ring requires its membrane anchor, the Z ring, FtsA, FtsQ, and FtsL. **J. Bacteriol.** v. 181, pp. 508–520, 1999.
- WONG, H. C., SCHNEPF, H. E., WHITELEY, H. R.. Transcriptional and translational start sites for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **J. Biol. Chem.**, v. 258, pp. 1960–1967, 1983.
- WONG, H. C., CHANG, S.. Identification of a positive retroregulator that stabilizes mRNAs in bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 83, pp. 3233–3237, 1986.
- YAMAMOTO, T., DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F., DELÈCLUSE, A., NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomophatogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 81-100, 2000.
- YANG, F., MOSS, L. G., PHILLIPS, G. N. JR. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nat. Biotechnol** v. 14, pp. 1246–1251, 1996.
- YU, X. C., TRAN, A. H., SUN, Q., MARGOLIN, W. Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. **J. Bacteriol.** v. 180, pp. 1296–1304, 1998.
- ZHANG, M. Y., LÖVGREN, A., LOW, M. G. LANDÉN, R. Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis*: reduced expression of flagellin and phospholipases. **Infect. Immun.** v. 61, pp. 4947–4954, 1993.

Brasília, novembro, 2007.