

Análise da diversidade genética de isolados de *Bacillus thuringiensis* por fAFLP¹

Analysis of the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* by fAFLP

Irlan Leite de Abreu², Ana Maria Guidelli Thuler³, Manoel Victor Franco Lemos⁴

¹Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp).

²Pós-Doutorando do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Unesp-FCAV. irlanla@fcav.unesp.br.

³Ex-aluna do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da Unesp-FCAV. guidelli@fcav.unesp.br

⁴Autor para correspondência. Unesp-FCAV, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s.n, CEP 14884-900, Jaboticabal (SP), Brasil. mvictor@fcav.unesp.br

Resumo

Isolados da bactéria *Bacillus thuringiensis* provenientes de sete estados do Brasil foram submetidos a análises da relação genética por meio de fAFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados com a utilização de iniciadores com corantes fluorescentes), com objetivo de determinar o grau de variabilidade e a similaridade existente com genótipo de linhagens-padrão. Amostras do DNA genômico de cada isolado e as linhagens-padrão foram duplamente digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*, e os fragmentos obtidos foram ligados a adaptadores especiais. Reações de amplificação pré-seletiva e seletiva foram realizadas, e os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em um sequenciador ABI377 e analisados com auxílio dos programas GeneScan e Genotyper. Os padrões obtidos produziram bandas polimórficas que foram agrupadas, gerando um dendrograma que evidencia grande similaridade genética entre os isolados de *B. thuringiensis* utilizados com as linhagens-padrão incluídas nesta análise.

Palavras-chave adicionais: DNA fingerprinting, PCR, enzimas de restrição, eletroforese de DNA.

Abstract

Bacillus thuringiensis isolates obtained from seven states of Brazil were analyzed by the technique fAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) with the objective of determining the degree of variability and the existing similarity with the genotype of ancestral strains. The genomic DNA from each isolate was double digested with the enzymes *EcoRI* and *MseI* and the resulting fragments were ligated to special adapters. Pre-selective and selective amplifications were carried out using a set of primers and the amplified fragments were taken to be electrophoretically separated in an ABI377 DNA sequencer machine. The resulting patterns were analyzed by the softwares GeneScan and Genotyper. The banding patterns yielded a number of polymorphic bands which were grouped producing a dendrogram exhibiting great similarities among the bacterial isolates and the control strains that were included in the analysis.

Additional key-words: DNA fingerprinting, PCR, restriction enzymes, DNA electrophoresis

Introdução

Um agente entomopatogênico destaca-se em meio aos demais, tratando-se da espécie bacteriana denominada *Bacillus thuringiensis* (VALADARES-INGLIS et al., 1998; HÖFTE et al., 1989; MAAGD et al., 2001; SCHNEPF et al., 1998). Este organismo tem merecido especial atenção por parte dos pesquisadores por produzir proteínas com ação entomopatogênica para muitas larvas das pragas de lavoura pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Dictyoptera e outros organismos,

como nematoides, ácaros e protozoários (QUESADA-MORAGA et al., 2004).

Quando formas larvais das pragas se alimentam destas proteínas, elas desencadeiam uma série de reações que culminam com a morte destas larvas, caracterizando assim uma opção de grande importância de controle biológico de pragas. Além disso, as proteínas usadas como agentes de controle geram uma participação importante nos modelos de sistemas de controle biológico, pois possuem reduzido grau de toxicidade para os seres humanos e animais domésticos bem como para o ecossistema em geral (FEITELSON et al., 1992). Diferentes técnicas têm

sido usadas para estabelecer relações genéticas entre os microrganismos e relacionar o grau de toxicidade para o controle das pragas em lavouras.

Métodos moleculares têm sido usados para melhor entender esses organismos, como a técnica AFLP (polimorfismo de cumprimento de fragmentos amplificados), que permite a visualização pelo uso de marcadores radioativos, e a técnica fAFLP (polimorfismo de cumprimento de fragmentos amplificados com fluorescência), que utiliza iniciadores marcados com substâncias fluorescentes, associados a sequenciadores automáticos e programas de alta capacidade de análise computacional. Essas técnicas são utilizadas em estudos taxonômicos e são empregadas como ferramentas para entender a epidemiologia, a genética e os aspectos fenotípicos de populações bacterianas (RYU et al., 2005; BURKE et al., 2004; TICKNOR et al., 2001; ARNOLD et al., 1999; DUIM et al., 2001; ZABEAU & VOS, 1993). Neste trabalho, utilizou-se a técnica fAFLP na avaliação da diversidade genética envolvendo isolados pertencentes à

espécie *B. thuringiensis*, objetivando determinar o grau de variabilidade genética e a correlação entre genótipos diferentes envolvendo as linhagens-padrão e os isolados em análise. O agrupamento gerado através da técnica poderá dar indicativo da potencialidade tóxica desses isolados em relação aos padrões.

Material e métodos

Amostras Bacterianas

As amostras consistiram de 14 linhagens-padrão da bactéria *Bacillus thuringiensis*, 12 isolados da espécie *B. thuringiensis* (VILAS BOAS, 2002), além de duas outras linhagens de bactérias correlatas que serviram como linhagens de referência: *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. Estas amostras bacterianas fazem parte da coleção pertencente ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, e encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação e origem dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e linhagens de referência.
Table 1 - *Bacillus thuringiensis* and reference strains identification and origin.

Isolados e linhagens de referência	Origem	Local de isolamento
1 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	BGSC ^a	
2 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i>		
3 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>thuringiensis</i>		
4 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>londrina</i>	Instituto Pasteur	Londrina - PR
5 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i>	BGSC ^a	
6 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i>		
7 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>		
8 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1		
9 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebriones</i>		
10 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>pondicheriensis</i>		
11 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>jinghongiensis</i>		
12 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>shandongiensis</i>		
13 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD-73		
14 <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>		
15 MG ₁	Albertina – MG, Brasil	Solo cultivado com figo
16 MT ₁	Cuiabá – MT, Brasil	Ninho de <i>Solenopsis</i>
17 MT ₄	Cuiabá – MT, Brasil	Ninho de <i>Solenopsis</i>
18 MT ₇	Cuiabá – MT, Brasil	Autoestrada
19 PI ₂	Teresina – PI, Brasil	-
20 PR ₅	Londrina – PR, Brasil	Solo cultivado com algodão
21 SP ₁	Tupi Paulista – SP, Brasil	Solo cultivado com banana
22 SP ₂	Caconde – SP, Brasil	Solo cultivado com milho
23 SP ₆	Piracicaba – SP, Brasil	Fezes de coruja
24 SP ₄	Parapanema – SP, Brasil	Solo cultivado com trigo
25 RN ₁	Parelhas – RN, Brasil	Reservatório de água vazia
26 RS ₁	Gramado – RS, Brasil	-
27 <i>Bacillus cereus</i>	ATCC ^b	ATCC
28 <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC ^b	ATCC

^a Bacillus Genetic Stock Center (<http://bacillus.biosci.ohio-state.edu/>); ^b ATCC – American Type Culture Collection
- Não identificado / not identified

Condições dos cultivos bacterianos

Tanto os isolados de *B. thuringiensis* quanto as linhagens de referência *B. cereus* e *B. subtilis* foram cultivados em placas contendo meio Ágar Nutriente (NA) e incubadas a 30 °C, por 16 h. As colônias obtidas foram inoculadas em 50 mL de caldo de infusão de cérebro e coação (BHI) Biobrás[®], agitando-se a 200 rpm em agitador orbital, por 4 h e 30 min, a 30 °C.

Extração de DNA

As culturas bacterianas foram centrifugadas por 10 min a 7.400 X g, a 20 °C, de acordo com procedimento descrito por MARMUR (1961), modificado pela diminuição da concentração da solução salina de citrato (0,15M NaCl, 0,1M citrato de sódio, pH 7,0), por se tratar de amostras de bactérias Gram-positivas. Os precipitados bacterianos obtidos por centrifugação, pesando aproximadamente 0,5, g foram ressuspensos em 6 mL de solução salina (0,15M NaCl, 0,1M EDTA, pH 8,0). Acrescentou-se 0,5 mL de dodecil sulfato de sódio (25%) e agitaram-se suavemente as preparações. Em seguida, acrescentou-se um volume de uma solução de acetato de sódio 2,5 M até que a concentração final fosse 1M. As proteínas foram precipitadas com a adição de igual volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v). Após agitação vigorosa por 5 min e centrifugação a 7.400 X g por 15 min, os sobrenadantes foram recuperados, e os ácidos nucleicos foram precipitados com a adição de 2 volumes de etanol (100%), à temperatura de 4 °C. Após incubação sob refrigeração de 0 °C por 10 min, o material foi centrifugado novamente a 7.400 X g, e os ácidos nucleicos, coletados e ressuspensos em TE [10 mM Tris HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA]. Em seguida, as preparações foram tratadas com RNase (50 µg/mL) e incubadas por 30 min, a 37 °C. Repetiu-se a etapa da precipitação com etanol (100%) para a obtenção das preparações de DNA de cada uma das amostras bacterianas utilizadas neste estudo. O material obtido foi estocado a -20 °C até o momento do uso. As amostras de DNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria, segundo SAMBROOK & RUSSEL (2001), utilizando um espectrofotômetro Beckman[®], modelo DU 640B. Depois, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, preparado com tampão TEB (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,2), sob voltagem constante de 70 V, durante 2 h aproximadamente.

Obtenção dos fAFLPs

O método de obtenção dos fAFLPs foi adaptado de VOS et al. (1995) e ZABEU & VOS (1993), utilizando fósforo fluorescência no lugar de fósforo radiativo. Todos os passos foram desenvolvidos em um termocicla-

dor PTC-100[®] (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA). Adaptadores dupla hélice com terminais para *EcoRI* e *MseI* juntamente com os oligonucleotídeos iniciadores pré-seletivos e seletivos, além de outros componentes usados, eram parte do kit para detecção de fAFLP de microrganismos, fornecido pela Applied BioSystems[®] (Foster City, CA, EUA).

Amostras de 500 ng de DNA dos isolados e das linhagens de referência foram digeridas duplamente com 5 U de *EcoRI* e 2,5 U de *MseI* (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) em 1,25 µL de tampão React, num volume final de 10 µL. Após as digestões, foram adicionados 0,33 µL dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* (2 µM), 1,5 U de T₄ DNA ligase juntamente com tampão da T₄ DNA ligase (50mM Tris-HCl, pH 7,8, 10mM MgCl₂, 10mM ditiotretitol, 1 mM ATP, 25 µg/mL soro albumina bovina). As reações de ligação foram conduzidas a 20 °C, durante 4 h. A preparação dos adaptadores *EcoRI* e *MseI* foi pré-aquecida a 95 °C, durante 5 min, e depois resfriada por 10 min à temperatura ambiente, antes de ser adicionada nas reações de amplificação.

Os amplicons produzidos foram diluídos em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e usados como molde nas reações de amplificação pré-seletivas. Os sítios de ligação dos oligonucleotídeos iniciadores pré-seletivos são as sequências dos adaptadores dos sítios de restrição que proveem uma seleção mediana dos fragmentos de restrição obtidos. As reações foram obtidas utilizando-se de 2 µL de DNA diluídos, 7,5 µL da Core Mix e 0,5 µL dos oligonucleotídeos iniciadores *EcoRI* (1µM) e *MseI* (5 µM) considerados como pré-seletivos.

As condições de amplificação foram: 72 °C por 2 min, 20 ciclos iniciando a 94 °C, por 20 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 2 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em agarose 0,8%, e os géis, posteriormente corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e observados quanto à presença de bandas com, no máximo, 500 pb.

Os produtos pré-amplificados, foram diluídos (1:15) com tampão TE e 1,5 µL, foram usados na reação de pré-amplificação, junto com 7,5 µL de tampão, nucleotídeos e AmpliTaq[®] DNA Polymerase, mistura denominada "Core Mix", que se encontra no kit, 0,5 µL do oligonucleotídeo iniciador *MseI* (5µM) e 0,5 µL do oligonucleotídeo iniciador *EcoRI*, marcado com fluorescência (1µM). Oitenta e uma possíveis combinações de oligonucleotídeos iniciadores foram testadas, usando duas amostras bacterianas escolhidas ao acaso e os reagentes do kit de fAFLP para microrganismos (Applied Biosystems[®]). Condições de amplificação por PCR do tipo "touchdown" foram utilizadas, onde

ocorreu rampa de 1 segundo por vez, como sugerido pelo fabricante deste kit. Estas condições são descritas a seguir: 94 °C por 20 s, decrescendo a temperatura de pareamento de 66 para 56 °C, por 30 s, e depois aumentando a temperatura para 72 °C, por 2 min, repetindo 20 vezes o ciclo de aquecimento a 94 °C por 20 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 2 min, com uma extensão final de 60 °C durante 30 min. A melhor combinação de oligonucleotídeos iniciadores (*EcoRI* – AG JOE e *MseI* – C) foi usada para as amplificações com os isolados de *B. thuringiensis* e linhagens-controle.

Eletroforese de sequenciamento em gel de poli(acrilamida) e análise dos dados obtidos.

Alíquotas de 1 mL dos produtos amplificados foram preparadas adicionando-se 1,25 µL de formamida desionizada, 0,125 µL do marcador interno de tamanhos moleculares GeneScan – 500 (Applied Biosystems®) e 0,625 µL do tampão de amostras (0,2 mL 20 mM EDTA, pH 8,0, contendo 50 mg/mL de azul dextran dissolvido em 1 mL de formamida desionizada). As amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 min e resfriadas em gelo picado e imediatamente colocadas nos géis de poliacrilamida, do tipo Long Ranger, a 5% (BioWhittaker Molecular Applications® – BMA), em uma placa de 36 cm contendo 96 canaletas e, posteriormente, analisadas em um sequenciador de DNA automático ABI 377 (Perkin-Elmer CO®). As corridas eletroforéticas foram realizadas seguindo as condições descritas a seguir: 2,5 kV, 60 mA durante 2 h e 30 min, na temperatura de 51°C, usando tampão TBE (89 mM Tris, 89 mM borato e 2,5 mM EDTA, pH 8,2).

Os resultados obtidos foram analisados pelos programas GeneScan 3.1 e Genotyper 2.5. Uma matriz de ausência (0) e presença (1) de bandas foi gerada, sendo posteriormente gerada outra matriz de similaridade construída com base no algoritmo “neighbor-joining” e rotina “restdist” como partes do software PHYLIP 3.572 (FELSENSTEIN, 1993). Uma rotina de “bootstrap” foi executada, levando em conta 1.000 tentativas de realizações para que seja gerada a melhor árvore, utilizando o programa PAUP 4.0b8 (SWOFFORD, 2002). Essas tentativas servem para que o modo de análise sobre os agrupamentos mostre confiança, para ser visualizado através do programa Treeview (PAGE, 2005).

Resultados e Discussão

Foram testadas 81 possibilidades de combinações dos iniciadores, utilizando inicialmente amostras de DNA de uma linhagem-padrão de *B. thuringiensis* var. *israelensis* e um

isolado denominado SP₂, visando à otimização das melhores combinações de iniciadores. A seleção dos melhores iniciadores, nesta condição, foi verificada pela presença de fragmentos polimórficos com uma percentagem em torno de 30% dos fragmentos totais gerados (PATTANAYAK et al., 2000). Sendo assim, foi escolhida a combinação de iniciadores a qual gerou acima de 170 bandas.

Um número reduzido de bandas foi gerado em 77 combinações das 81 possíveis, portanto quatro apresentaram resultado satisfatório. Dentre essas, a combinação de iniciadores *EcoRI* – AG JOE e *MseI* – C foi utilizada para análise de todas as amostras de DNA de *B. thuringiensis*.

O eletroferograma das 28 linhagens de *B. thuringiensis*, gerado pelo programa GeneScan 3.1, apresentou 176 bandas entre 50 e 500 pb, sendo 52 bandas polimórficas. Estas 52 bandas geradas no intervalo entre 50 e 450 pb, com fluorescência acima de 50 unidades arbitárias, em todas as corridas no sequenciador ABI377, foram usadas na análise, conforme citado por AARTS et al. (1999) e HILL et al. (2004), mostrando a padronização da técnica e a escolha dos iniciadores adequados para a realização deste estudo. As bandas polimórficas foram identificadas pelo software Genotyper 2.5.

A Figura 1 apresenta o dendrograma produzido pelo software PHYLIP 3.572 (FELSENSTEIN, 1993), o qual foi estimado pelo “bootstrap”. A similaridade estimada foi de 50% a 100%, evidenciando grande homogeneidade da espécie *B. thuringiensis*. No dendrograma, podem ser observadas duas linhagens-padrão *pondicheriensis* e *israelensis* com uma estimativa abaixo de 50% de similaridade em relação aos clusters analisados, onde esse apresenta grande homogeneidade, atingindo de 70% a 100% de similaridade entre as linhagens. Esses clusters indicam grande similaridade e possuem linhagens que agrupam com linhagem-padrão e suspeitas; como se sabe, as linhagens-padrão são excelentes agentes biológicos que controlam vários insetos-praga, e esse tipo de agrupamento indica novos isolados que poderão ser utilizados no controle biológico pela estimativa de similaridade genética que foi considerada neste trabalho.

Os resultados evidenciaram grande homogeneidade das linhagens de *B. thuringiensis*, atingindo 92% de similaridade genética, indicando pequena diferença genética entre as linhagens, segundo GRADY et al. (2000). O dendrograma gerado mostra populações similares de regiões diferentes. No entanto, a linhagem-padrão *pondicheriensis* separou-se dos clusters.

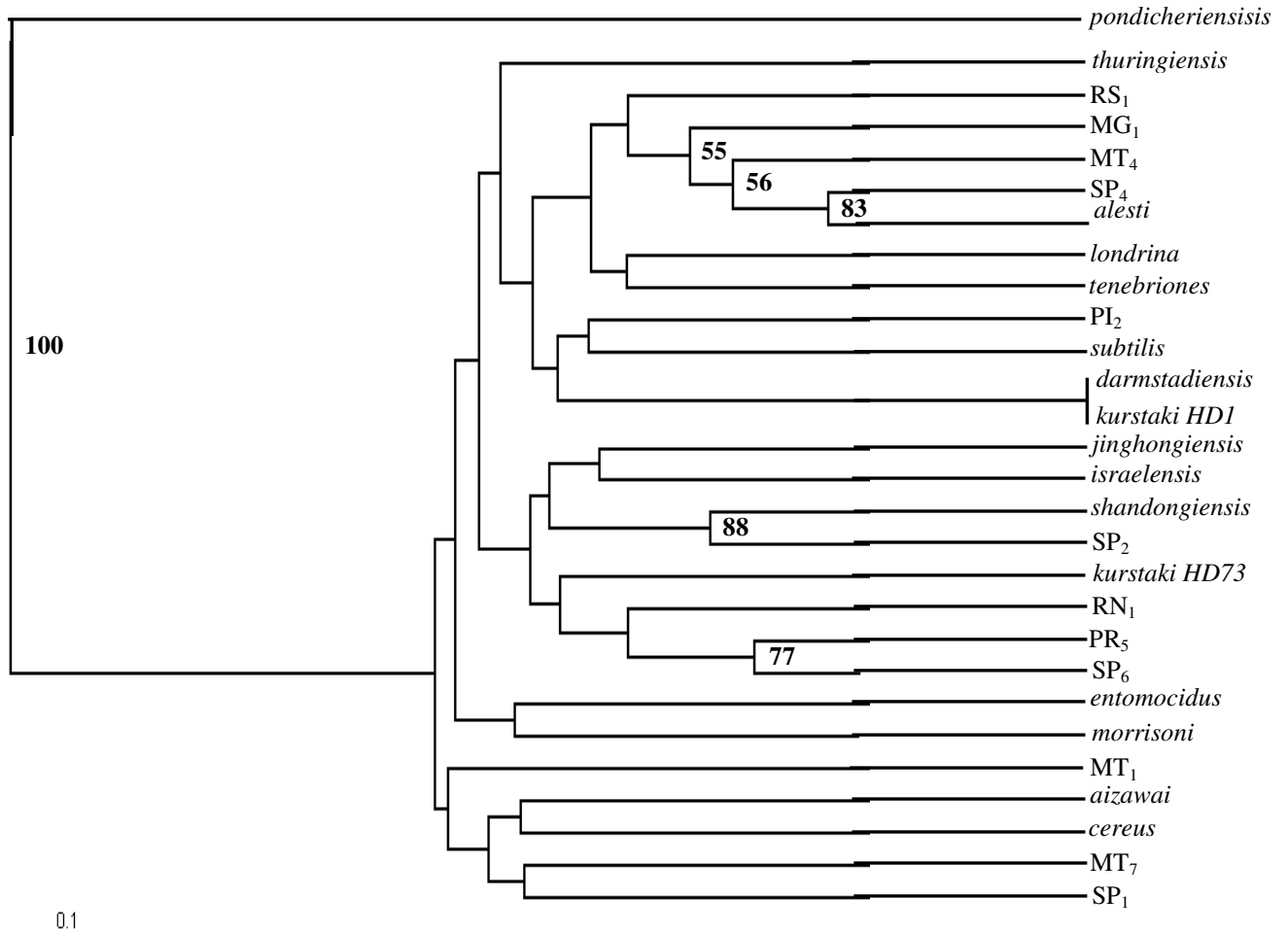


Figura 1 - Dendrograma gerado pelo software PHYLIP 3.572. Os números entre as divisões dos “clusters” indicam a percentagem (%) de “bootstrap” com 1.000 repetições. A escala abaixo indica 10% da divergência genética. A identificação das amostras indica os números de (1-28) isolados, os “clusters” mostram os agrupamentos com alta similaridade e baixa variabilidade genética.

Figure 1 - Dendrogram generated by the software PHYLIP 3.572. The numbers refer to the clusters's divisions and indicate the bootstrap percentage (%), with 1,000 repetitions. The scale below indicates 10% of the genetic divergence. The identification of the samples indicate the numbers of (1-28) isolates, the clusters show the groupings with high similarity and low genetic variability.

A linhagem-padrão *alesti*, que controla insetos da ordem Lepidóptera, agrupou-se com os isolados RS1, MG1, MT4 e SP4. Em outro cluster, aparecem linhagens-padrão, como *entomocidus*, *morrisoni* e *kurstaki-HD73*, agrupadas com os isolados RN1, PR5 e SP6, que também são responsáveis pelo controle de insetos da ordem Lepidóptera. Outro agrupamento foi formado com as linhagens-padrão *aizawai* e *cereus* e os isolados MT1, MT7, SP1. Em um dos clusters gerados, observou-se um agrupamento interessante, pois mostrou 100% de similaridade entre as linhagens padrão *darmstadiensis* e *kurstaki-HD1* que possuem gene produtor da proteína delta-endotoxina *cry1Aa* (CRICKMORE et al., 1998).

O dendrograma indica que, em dois clusters, aparecem linhagens-padrão que pos-

suem o gene *cry4Aa1* que codifica proteína tóxica a insetos da ordem Díptera e o gene *cry3Aa6* codificador de proteína para controle de insetos da ordem Coleóptera. A linhagem-padrão *israelensis*, responsável pelo controle de larvas do inseto da ordem Díptera, agrupou-se com a linhagem-padrão *shandongiensis*, e a linhagem *tenebriones*, responsável por controlar insetos-praga da ordem Coleóptera, agruparam-se com o isolado *londrina*. Isso evidencia que características evolutivas ainda estão presentes, pois o isolado *londrina* (gene desconhecido) mostrou grande indicio de ser semelhante à linhagem-padrão *tenebriones*. Considerando o agrupamento detectado pela técnica fAFLP (isolado *londrina* com a linhagem-padrão *tenebrionis*) e com base em estudos recentes com bioensaios (dados não mostrados) há indicação de que este

isolado seja específico para insetos da mesma ordem que a linhagem-padrão *tenebriones*.

Outro cluster que aparece na Figura 1 indica que ocorreu agrupamento entre a linhagem-padrão *shandongiensis* e o isolado SP2, sendo que essas linhagens produzem proteína Cry com toxicidade semelhante.

A técnica AFLP verifica os sítios de restrição no genoma bacteriano, gerando polimorfismo, o que permite relacionar os genes dos isolados com o grau de eficiência dos genes responsáveis para codificar as proteínas Cry-padrão, que são responsáveis por controlar ordens de insetos-praga em lavouras. A distribuição equitativa dos isolados pode ser mostrada pela baixa variabilidade genética da espécie ou pela transferência de gene horizontal, onde plasmídeos e materiais extracromossomais são responsáveis pela troca de informações (HILL et al., 2004). Comparando os resultados deste trabalho com os obtidos por TROVÓ FABIANO et al. (2005), observou-se a mesma resposta em relação à técnica quando utilizada em isolados da bactéria *Staphylococcus aureus*, pois também foi determinada baixa variabilidade genética e alta similaridade entre os isolados de regiões diferentes.

A técnica gera agrupamentos entre os organismos e permite a verificação das características genotípicas de patogenicidade, e gene de resistência. Esses organismos podem ter recebido material genético por conjugação, pois é comum microrganismos trazerem, de seus ancestrais, características evolutivas e adaptativas para a espécie.

Conclusões

Existe grande relação genética entre as linhagens-padrão e os isolados avaliados, quando analisada pela técnica AFLP. Isto constitui uma alternativa para identificar isolados com características de linhagens-padrão.

A dispersão equitativa de diferentes genótipos entre as regiões distintas mostra grande similaridade nos agrupamentos.

Em razão da baixa variabilidade genética encontrada, pode-se afirmar que os isolados possuem características de toxicidade que pertencem à espécie *B. thuringiensis*, sendo esta uma metodologia promissora para a identificação de isolados eficientes em promover a mortalidade de insetos-praga em lavouras.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp n° 2000/09709-2), pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

Referências

AARTS, H. J. M.; HAKEMULDER L. E.; VAN HOEF A. M. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.49, n.1-2, p.95-102, 1999.

ARNOLD, C.; METHERELL, L.; WILLSHAW, G.; MAGGS, A.; STANLEY, J. Predictive fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli*: high-resolution typing method with phylogenetic significance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, n.5, p.1.274-1.279, 1999.

BURKE, S. A.; WRIGHT, M. K.; ROBINSON, M. K.; BRONK, B. V.; WARREN, R. L. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.5, p.2.786-2.790, 2004.

CRICKMORE, N.,; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERCLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Molecular Biology Review**, Washington, v.62, n.3, p.807-813, 1998.

DUIM, B.; VANDAMME, P. A.; RIGTER, A.; LAEVENS, S.; DIJKSTRA, J. R.; WAGENAAR, J. A. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. **Microbiology**, Washington, v.147, n.10, p.2.729-2.737, 2001.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, I. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology**, New York, v.10, n.1, p.271-275, 1992.

FELSENSTEIN, J. P. (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.

GRADY, R.; O'NEILL, G.; COOKSON, B.; STANLEY, J. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of the MRSA epidemic. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v.187, n.2, p.27-30, 2000.

HILL, K. K.; TICKNOR, L. O.; OKINAKA, R. T.; ASAY, M.; BLAIR, H.; BLISS, K. A.; LAKER, M.; PARDINGTON, P. E.; RICHARDSON, A. P.; TONKS, M.; BEECHER, D. J.; KEMP, J. D.; KOLSTO, A.; WONG, A. C. L.; KEIM, P.; JACKSON, P. J. Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*,

- Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.2, p.1.068-1.080, 2004.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Review**, Washington, v.53, n.2, p.242-255, 1989.
- MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Cambridge, v.4, n.4, p.193-199, 2001.
- MARMUR, J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v.3, n.1, p.208-218, 1961.
- PAGE, R. D. Treeview taxonomy and phylogenies. <<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/>>. Acesso em: 15 dez 2005.
- PATTANAYAK, D.; SRINIVASAN, K.; MANDOKAR, A. D.; SHUKLA, A.; BHALLA, R.; KUMAR, A. P. AFLP fingerprinting and genotypic characterization of some serovars of *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.16, n.7, p.667-672, 2000.
- QUESADA-MORAGA, E.; GARCIA-TÓVAR, E.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. **Microbiological Research**, Berlin, v.159, n.1, p.59-71, 2004.
- RYU, C.; LEE, K.; HAWNG, H.; YOO, C.; SEONG, W.; OH, H. Molecular characterization of Korean *Bacillus anthracis* isolates by amplified fragment length polymorphism analysis and Multilocus Variable-Number Tandem Repeat analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.8, p.4.664-4.671, 2005.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 1000p.
- 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. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v.62, n.3, p.775-806, 1998.
- SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Disponível em: <<http://www.lms.si.edu/PAUP/>> Acesso em 10 dez 2005.
- TICKNOR, L. O.; KOLSTO, A.; HILL, K. K.; KEIM, P.; LAKER, M. T.; TONKS, M.; JACKSON, P. J. Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.10, p.4.863-4.873, 2001.
- TROVO FABIANO T. L.; LEMOS M. V.; GIVISIEZ P. E. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of human and animal *Staphylococcus aureus* isolates from dairy farms with manual milking. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.109, n.1-2, p.57-63, 2005.
- VALADARES-INGLIS, M. C. C. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico: consulta de estudantes universitários**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.201-230.
- VILAS BOAS, G. F. L. T. **Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus***. 2002. 200f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Eynsham, v.23, n.21, p.4.407-4.414, 1995.
- ZABEAU, M.; VOS, P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application. EP 0534858, 1993.

Recebido em 18-04-2006

Aceito para publicação em 25-07-2007