

Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Agrotis ipsilon*

Rafael Silva Menezes¹
Vinícius Fiúza Dumas²
Érica Soares Martins³
Lílian Botelho Praça⁴
Rose Gomes Monnerat⁵

Resumo

Agrotis ipsilon (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta rosca, é uma praga polífaga e cosmopolita, causadora de sérios danos em cultivos hortícolas e em sistemas de produção de grãos. Uma das alternativas para o combate a essa praga pode ser a utilização de produtos a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), bactéria aeróbica, Gram positiva, caracterizada pela produção de proteínas tóxicas a insetos. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui uma coleção de cerca de 2.300 estirpes de Bt. Neste trabalho, cem estirpes dessa coleção foram testadas para controle de *A. ipsilon* e, destas, nove foram bastante tóxicas. Essas estirpes pertencem aos sorotipos *kurstaki*, *aizawai*, *sotto* e *galleriae*. A análise molecular e proteica mostrou a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1F*, *cry2* e *cry11* e suas respectivas proteínas, indicando serem essas as proteínas envolvidas na atividade tóxica das estirpes selecionadas.

Palavras-chave: Hortaliças. Proteínas Cry. Controle biológico.

¹ MSc. Ciências Agrárias. Universidade de Brasília – UnB; e-mail:.

² MSc. Biologia Molecular – UnB; e-mail: vfdumas@yahoo.com.br.

³ PhD Biologia Molecular – UnB; e-mail: erica_martins@pop.com.br

⁴ MSc. Agronomia – UnB. Assistente do Centro Nacional de Recursos Genéticos, EMBRAPA; e-mail: lilian@cenargen.embrapa.br

⁵ PhD Agronomia. Ecole Nationale Agronomique de Montpellier. Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; e-mail: rose@cenargen.embrapa.br

1 Introdução

Agrotis ipsilon (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta rosca, é uma praga polífaga e cosmopolita causadora de sérios danos em cultivos hortícolas e em sistemas de produção de grãos. Segundo Souza (2005), o dano causado pelo inseto é maior se a população de lagartas, em estágio de desenvolvimento avançado, for alta. O que é comum de acontecer em Sistemas de Plantio Direto (SPD), no qual o solo é mantido sob cobertura permanente com diversas culturas em sucessão e sem revolvimento, protegendo pupas e adultos desse inseto.

O controle da lagarta rosca, normalmente, é realizado com aplicação de inseticidas químicos logo no início da infestação; contudo, sabe-se que o uso constante e indiscriminado de inseticidas pode causar desequilíbrios ecológicos, seleção de populações de insetos resistentes e perdas econômicas (ALVES; SERIKAWA, 2006). Uma das alternativas para o combate a essa praga pode ser a utilização de produtos a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Essa bactéria pertence à família *Bacillaceae*, é aeróbica, Gram positiva e caracterizada pela produção de inclusões proteicas cristalinas (proteínas Cry), durante seu ciclo de crescimento, no momento de sua esporulação (SCNEPF et al., 1998). As inclusões cristalinas de Bt contêm proteínas denominadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry, que, atualmente, formam uma família com mais de 400 membros, classificados em 60 grupos. A atividade tóxica dessas proteínas contra insetos-praga possibilitou o desenvolvimento de bioinseticidas e a seleção de genes codificadores de proteínas inseticidas, utilizados na produção de plantas transgênicas resistentes a insetos. O modo de ação das proteínas Cry tem sido extensivamente estudado e sabe-se que, após a ingestão, essas proteínas (protoxina), são solubilizadas, devido ao pH alcalino intestinal (CHARLES et al., 2000) e ativadas por proteinases intestinais. Após ser ativada, a proteína reconhece e se liga aos receptores de membrana específicos, causando alterações na permeabilidade, levando a um choque osmótico e, conseqüentemente, à paralisia e morte do inseto por inanição e septicemia (MONNERAT; BRAVO, 2000; SILVA-WERNECK; MONNERAT, 2001).

Em todo o mundo, são pesquisadas novas estirpes de *B. thuringiensis*, visando o aumento do número de toxinas disponíveis para o controle de insetos. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui em torno de 2.300

estirpes em sua Coleção de Bactérias Tóxicas a Invertebrados (MONNERAT et al., 2001).

Este trabalho teve como objetivo selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas da lagarta rosca. As estirpes tóxicas foram caracterizadas por meio de métodos sorológicos, bioquímicos e moleculares para identificação das proteínas Cry responsáveis pela atividade tóxica.

2 Material e métodos

Insetos: A colônia de *A. ipsilon* foi iniciada a partir da aquisição de lagartas da empresa BUG Agentes Biológicos, localizada em Piracicaba – São Paulo. A criação foi realizada no Laboratório de Criação Massal de Insetos, do Núcleo de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, numa sala que foi mantida à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Para a obtenção de ovos, adultos foram colocados em gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro por 20 cm de altura), fechadas na extremidade superior com filó e, na inferior, com placa de Petri. Os ovos foram coletados diariamente e colocados em recipiente plástico adequado, com furo nas tampas, que permitia a passagem do ar, e com dieta artificial, que serviu para alimentar as larvas recém eclodidas, onde foram mantidas até atingirem o terceiro estágio de desenvolvimento. As larvas de terceiro estágio foram trocadas de recipientes plásticos, contendo dieta artificial, onde foram mantidas até empuparem. A dieta foi preparada de acordo com a composição estabelecida pela empresa BUG Agentes Biológicos (feijão 75g, gérmen de trigo 60g, proteína de soja 30g, caseína 30g, levedo de cerveja 37,5g, solução vitamínica 9mL, ácido ascórbico 3,6g, ácido sórbico 1,8g, nipagin 3g, tetraciclina 0,11g, formol 3,6mL, ágar 27g e 1,2L de água destilada). As pupas eram então coletadas e colocadas nas gaiolas de PVC. Os adultos foram alimentados diariamente com solução aquosa de mel a 10%.

Estirpes de *Bacillus thuringiensis*: Cem estirpes de *B. thuringiensis*, pertencentes à Coleção de Bactérias Tóxicas a Invertebrados da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (MONNERAT et al., 2007), originárias de amostras de

solo e água de diferentes regiões do país, e previamente identificadas como patogênicas, as espécies da ordem Lepidoptera foram utilizadas neste trabalho. Essas estirpes haviam sido previamente sorotipadas pelo Instituto Pasteur de Paris.

Bioensaios: As estirpes foram crescidas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) em agitador rotativo a 28°C, 200 rpm em agitador rotativo (*New Brunswick Scientific Co.*) por 72h. Os bioensaios foram realizados, espalhando-se 35 µL do cultivo de cada estirpe de *B. thuringiensis*, contendo tanto esporos quanto cristais, sobre a superfície da dieta artificial (2 mL) distribuída previamente em placas de cultivo de células com 24 poços. Após a absorção da mistura de esporos e cristais pela dieta do inseto, lagartas de segundo ínstar foram adicionadas às placas, sendo colocada uma lagarta para cada poço, já que as mesmas podem adotar comportamento canibal. Em seguida, os insetos foram deixados em câmara climatizada à temperatura de 27 ± 2°C, UR de 60 ± 10% e fotofase de 14h. Uma placa foi mantida sem a cultura bacteriana, como testemunha. A primeira avaliação (verificação do número de lagartas mortas) foi feita em 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas vivas foram transferidas individualmente para copos de plástico de 50 mL, contendo pedaços de aproximadamente 1 cm³ de dieta sólida, livre do bacilo. No quinto dia do ensaio, foi feita a segunda e última avaliação (Monnerat et al., 2001). As estirpes que causaram no mínimo 70% de mortalidade foram selecionadas para a continuidade do trabalho.

Caracterização das estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas: As estirpes que causaram no mínimo 70% de mortalidade foram caracterizadas quanto ao sorotipo, perfil de proteínas e presença de genes *cry*.

Caracterização sorológica: As estirpes foram caracterizadas de acordo com o protocolo descrito por de Barjact e Frachon (1991). Os soros utilizados foram gentilmente cedidos pelo Instituto Pasteur, Paris. Quatro das estirpes tóxicas haviam sido previamente sorotipadas pelo Instituto Pasteur de Paris e foram utilizadas como controle positivo.

Caracterização de proteínas através de SDS-PAGE: A caracterização bioquímica das estirpes foi realizada por meio de eletroforese de proteínas em gel de

poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). As proteínas foram obtidas segundo protocolo descrito por Lecadet et al. (1991), a partir de material crescido em meio NYSM por 72h a 200 rpm em agitador rotativo (*New Brunswick Scientific Co.*) a 28 °C. A estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) foi utilizada como padrão.

Caracterização molecular: As estirpes selecionadas foram caracterizadas quanto à presença de genes codificadores de proteínas Cry. Para isso, foram realizados testes de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando oligonucleotídeos gerais desenhados para os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* e *cry11* (IBARRA et al., 2003) e específicos para identificação de *cry1*, *cry4* e *cry9* (CERON et al., 1994; 1995; BRAVO et al., 1998).

A extração de DNA foi realizada a partir de adaptação do protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As reações de PCR foram realizadas em tubos de polipropileno 0,2 mL, em um termociclador *MJ Research, Inc.* (PTC-100™). Foram transferidos 10µL de DNA de cada amostra para um tubo de polipropileno, contendo 8,0 µM de cada oligonucleotídeo específico, 5 mM de dNTP mix, tampão de Taq 10x e 2,5 U de Taq DNA polimerase para uma reação de 50µL. As condições de amplificação foram descritas por Ceron et al. (1994 e 1995), Bravo et al. (1998) e Ibarra et al. (2003). Após amplificação, 20µl de cada produto de PCR foi carregado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta. As estirpes HD-1 de *B. thuringiensis*, subespécie *kurstaki* e IPS-82 de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis*, foram utilizadas como padrão.

3 Resultados e discussão

Das cem estirpes de *B. thuringiensis* testadas, seis causaram 100% de mortalidade e três causaram mortalidade de 75% nos bioensaios seletivos. Dentre as estirpes que causaram mortalidade de 100%, quatro haviam sido previamente sorotipadas e pertenciam aos sorotipos *galleriae* (S597), *sotto* (S615), *aizawiai* (S616), *kurstaki* (S1450), descritos na literatura como tóxicos a insetos da ordem Lepidoptera (PRAÇA et al., 2006, MONNERAT et al., 2007). As estirpes (S907 e S1168), que também causaram 100% de mortalidade, foram sorotipadas neste trabalho. A estirpe S 1168

foi sorotipada como *kurstaki* e a S907 não reagiu com nenhum dos sorotipos testados, indicando pertencer a uma nova classe. As estirpes S234, S844 e S906 causaram mortalidade de 75%. A estirpe S234 foi sorotipada como Bt *sotto*; S844 não reagiu com nenhum dos sorotipos testados e a S906 foi autoaglutinante (Tabela 1).

Tabela 1 – Estirpes, sorotipos, porcentagem de mortalidade e perfil molecular e protéico das estirpes de *B. thuringiensis* selecionadas.

Estirpes	Sorotipo	% Mortalidade	Perfil protéico (kDa)	Perfil molecular (genes <i>cry</i>)
S1450	<i>kurstaki</i>	100	130 e 65	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2</i>
S1168	<i>kurstaki</i>	100	130	<i>cry1Aa</i>
S907	Não reagente	100	140	<i>cry1B</i>
S616	<i>aizawai</i>	100	130	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1F</i>
S234	<i>sotto</i>	75	130 e 65	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2</i>
S906	auto-aglutinante	75	140	<i>cry1B</i>
S615	<i>sotto</i>	100	130	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1B</i>
S597	<i>galleriae</i>	100	130	<i>cry1C</i>
S844	Não reagente	75	72 e 65	<i>cry2, cry11</i>

Praça et al. (2003), em seus estudos sobre prospecção de estirpes de Bt efeti-vas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, identificaram que a estirpe S234 apresentou toxicidade a *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Antonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae). Vale ressaltar que a CL₅₀ dessa estirpe, nos bioensaios de dose realizados contra *S. frugiperda*, foi três vezes menor do que o padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (S1450). A atividade tóxica das estirpes S844, S906 e S907, a lagartas de *A. gemmatalis*, inseto-praga, que é o principal causador de danos na cultura da soja no Brasil, foi relatada por Batista et al. (2006). Melatti et al. (2005) demonstraram que *S. frugiperda* é susceptível à estirpe S615, sendo sua CL₅₀ estimada em 1,04 ng/cm², mais eficiente que o Btk que apresentou, nos bioensaios realizados, CL₅₀ de 1,34 ng/cm².

Das nove estirpes selecionadas neste trabalho e que causaram mortalidade igual ou superior a 75% nos bioensaios seletivos, as estirpes S234, S615, S616, S844, S906 e S907 já haviam sido identificadas como tóxicas a insetos-praga por Praça et al., (2003), Melatti et al., (2005), Batista et al., (2006) e Melatti (2008).

A análise do perfil protéico, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das misturas de esporos e cristais das nove estirpes selecionadas nos bioensaios, revelou bandas entre 130 kDa e de 72 kDa, que se equivalem ao perfil esperado do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e dos sorotipos *B. thuringiensis* subsp. *galleriae*, *B. thuringiensis* subsp. *sotto* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (HOFTE et al., 1988; LERECLUS et al., 1993) (Tabela 1).

Por meio da técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos desenhados para detecção dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* e *cry11* (IBARRA et al., 2003) e específicos para identificação de *cry1*, *cry4* e *cry9* (CERON et al., 1994; 1995; BRAVO et al., 1998), foi possível determinar quais os genes *cry* de *B. thuringiensis* estavam presentes nas estirpes. Das nove estirpes selecionadas neste trabalho, as estirpes S234, S844, S906 e S907 já haviam sido caracterizadas quanto à presença dos genes *cry*, em trabalhos anteriores (PRAÇA et al., 2003, MELATTI et al., 2005, BATISTA, et al., 2006). Nessas estirpes, foram encontrados os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry2* e *cry11*. Nas estirpes, que não haviam sido caracterizadas (S597, S615, S616, S844 e S1168), foi identificada a presença de bandas correspondentes aos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1F*, *cry2* e *cry11*. A tabela 1 compila todos os resultados dos genes *cry* presentes nas estirpes tóxicas.

Esses resultados demonstram que diferentes proteínas Cry podem estar envolvidas na atividade tóxica a larvas de *A. ipsilon*. Contudo, o gene *cry1B* foi detectado em cinco das nove estirpes selecionadas. Vale ressaltar que as estirpes S906 e S907 só possuem o gene *cry1B* e que, em seu perfil proteico, foi detectada a presença de uma banda de 130 KDa., correspondente, ao tamanho esperado para a proteína Cry1B, assim sendo, pode-se considerar ser essa a proteína tóxica a *A. ipsilon*.

Os genes *cry1Aa* e *cry1Ab* foram encontrados em 4 das 9 estirpes. Todas essas estirpes apresentaram perfis proteicos compatíveis com a presença das prote-

ínas Cry1Aa e Cry1Ab, em torno de 130 KDa. A estirpe S1168 apresentou apenas o gene *cry1Aa*, assim, pode-se considerar que Cry1Aa é tóxica à lagarta rosca. O gene *cry1Ac* e *cry2* foram detectados em 3 estirpes, cujos perfis indicaram a presença de suas proteínas correspondentes, respectivamente, de 130 e 65 KDa. A estirpe S844 possui os genes *cry2* e *cry11* e, no seu perfil proteico, foi detectada a presença de uma banda de 65 KDa, correspondente à proteína Cry2 e outra de 72 KDa, correspondente à proteína Cry11. Esta última proteína está descrita como tóxica a Dípteros (LIMA et al., 2008), já a Cry2 está descrita como tóxica a Lepidópteros, assim, é possível que a proteína tóxica a *A. ipsilon* seja a Cry2.

O gene *cry1C* foi detectado, na estirpe S597, que apresentou uma banda de 130 KDa, compatível com a proteína Cry1C. Essa proteína está descrita como tóxica a diversos insetos da ordem Lepidoptera, tais como a *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* (MONNERAT et al., 1996), mas não está descrita como tóxica a *A. ipsilon*. Esse, portanto, é o primeiro relato da susceptibilidade da lagarta rosca a esta toxina. O gene *cry1F* foi encontrado na estirpe S616, que também possui outros genes.

A proteína Cry1Ab aparece na literatura como tóxica a diferentes insetos da ordem Lepidoptera, tais como, *S. exigua*, *Heliothis virescens*, *Pieris brassicae*, *Manduca sexta*, *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* (BRAVO et al., 2002; MARTENS et al., 1995; PRAÇA et al., 2003). Maagd et al. (2003) não identificaram atividade tóxica das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, em bioensaios com *A. ipsilon*. Porém, nos trabalhos de Gilliland et al. (2002) reportaram significativa atividade da proteína Cry1Ac, na mortalidade de lagartas de *A. ipsilon*. Gilliland et al. (2002) também demonstraram atividade tóxica da proteína Cry1Ac e também da Cry1J.

Os trabalhos conduzidos por Maagd et al. (2003) testaram a atividade de doze proteínas Cry1 e duas Cry9, contra lagartas de *A. ipsilon*. Os resultados obtidos indicaram que a lagarta rosca não foi susceptível à maioria das toxinas analisadas. Porém, entre elas, três apresentaram atividade significativa: Cry 9Ca foi a mais tóxica, seguida por Cry1Aa e Cry1Fb. A proteína Cry 1Aa está presente nas estirpes S234 e S1450 selecionadas nesta pesquisa, confirmando sua possível toxicidade a *A. ipsilon*.

No trabalho de Gilliand et al. (2002), o grupo reportou significativa atividade da proteína Cry1Ac na mortalidade de lagartas de *A. ipsilon*. Gilliand et al. (2002) testaram quatro diferentes toxinas Cry, e a proteína Cry1J também demonstrou resultados satisfatórios, além da Cry1Ac.

As proteínas Cr1Ab e Cry1Ac estão presentes nas estirpes S234, S1450 (Btk) e S615. As estirpes S1450 e S615 causaram 100% de mortalidade, enquanto a S234 causou 75% nos bioensaios realizados, sugerindo a possível atividade tóxica dessas proteínas contra *A. ipsilon*.

Entretanto, é muito difícil estabelecer a contribuição de cada toxina, pois a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ser devido a interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos.

Novos testes devem ser conduzidos com proteínas individuais e em conjunto para que a susceptibilidade de *A. ipsilon* seja determinada e que assim, os danos causados por essa praga possam ser minimizados. Os resultados aqui apresentados podem contribuir para a formulação de bioinseticidas mais específicos para a lagarta rosca, bem como, na identificação de possíveis genes *cry* aplicáveis na transformação de plantas com objetivo de conferir resistência genética a esta praga.

Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Agrotis ipsilon*

Abstract

Agrotis ipsilon (Lepidoptera: Noctuidae), known as black cutworm is a polyphagous caterpillar that causes serial damage in agriculture and in systems of grain production. One option for controlling this insect is the use of products based on *Bacillus thuringiensis* (Bt), a Gram positive, aerobic bacterium, characterized by the production of insecticidal toxins. Embrapa Genetic Resources and Biotechnology has a collection of 2,300 Bt strains. In this work a hundred Bt strains

from this collection were tested against *A. ipsilon* and nine were very toxic. These strains were serotyped as *kurstaki*, *aizawai*, *sotto* and *galleriae*. The molecular characterization and protein profile showed the presence of *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1F*, *cry2* and *cry11* genes and proteins of the corresponding molecular weights. These proteins are, therefore, probably involved in the toxic activity of the selected strains.

Keywords: Vegetables. Cry proteins. Biological control.

Referências

ALVES, A. P.; SERIKAWA, R. H. Controle químico de pragas do algodoeiro. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 1197-1209, 2006.

BATISTA, A. C. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* e estudos de produção para o desenvolvimento de um bioinseticida visando o controle de pragas agrícolas**. 2006. 88 f. Dissertação (Mestrado)–Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

BRAVO, A. et al. Pore formation activity of Cry 1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. **Biochemistry et Biophysical Acta**, New York, v. 1562, p. 63-69, 2002. doi:10.1016/S0005-2736(02)00360-7.

BRAVO, A. et al. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

CERON, J. et al. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 353-356, 1994.

CERON, J. et al. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. **Entomopathogenic bacteria**: from laboratory to field application. New York: Klumer Academic, 2000.

DE BARJAC, H.; FRACHON, E. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga*, Paris, v. 35, n. 2, p. 233-240, 1990. doi:10.1007/BF02374798.

GILLILAND, A. et al. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 delta endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68 n. 4, p. 1509-15, 2002. doi:10.1128/AEM.68.4.1509-1515.2002.

HÖFTE, H. et al. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2010-2017, 1988.

IBARRA, J. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.5269-5274, 2003. doi:10.1128/AEM.69.9.5269-5274.2003.

LECADET, M.M. et al. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 840-849, 1991.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F. et al. (Ed.). **Bacillus thuringiensis**: an environmental biopesticide: theory and practice. Londres: Wiley, 1993. p. 37-69.

LIMA, G. M. S. et al. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 24, p. 2941-2948, 2008. doi:10.1007/s11274-008-9836-x.

MAAGD, R. A. de et al. Activity of eild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. **Archives of Microbiology**, New York, v. 179, p. 363-367, 2003. doi: 10.1007/s00203-003-0543-6.

MARTENS, J. W. M. et al. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* Cru1A(b) crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Francisco, v. 66, p. 249-267, 1995. doi:10.1006/jipa.1995.1097

MELATTI, V. et al. Determinação da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subspécies de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, n. 88, 2005.

MONNERAT, R. G. et al. Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, San Francisco, v. 41, p. 291 - 295, 2007. doi:10.1016/j.biocontrol.2006.11.008.

MONNERAT, R.G. et al. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, San Francisco, v. 72, p. 7029-7035, 2006. doi:10.1128/AEM.01454-06.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa, 2001.

MONNERAT, R.G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000. v. 3. p.163-200.

PRAÇA, L. B. et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004. doi: 10.1590/S0100-204X2004000100002.

PRAÇA, L. B.; SILVA NETO, S. P.; MONNERAT, R. G. ***Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) Biologia, amostragem e métodos de controle**. Brasília: Embrapa, 2006. (Documentos/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 199).

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

SCHNEPEF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. (Circular Técnica, v. 10).

SOUZA, J. C. Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Circular técnica da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**, Belo Horizonte, n. 180, mar. 2005.

YOUSTEN, A.A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, New York, v. 3, p. 315-343, 1984.

**Para publicar na revista Universitas: Ciências da
Saúde, acesse o endereço eletrônico
www.publicacoesacademicas.uniceub.br.
Observe as normas de publicação, para facilitar e
agilizar o trabalho de edição.**