

**ESTUDO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS AO
BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis* Boheman, 1983).**

**Study from Activity and Characterization Biochemical and Molecular of
Strains of *Bacillus thuringiensis* Toxics at the Bolweevil (*Anthonomus
grandis* Boheman, 1983)).**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Conselho de Administração**

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana

Diretores Executivos
José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 83

**ESTUDO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE
Bacillus thuringiensis TÓXICAS AO BICUDO DO
ALGODOEIRO (Anthonomus grandis Boheman,
1983).**

**Study from Activity and Characterization Biochemical
and Molecular of Strains of Bacillus thuringiensis
Toxics at the Bolweevil (Anthonomus grandis
Boheman, 1983)).**

Érica Soares Martins

Lílian Botelho Praça

Vinícius Fiuza Dumas

Eduardo Hideki Sone

Isabel C. Waga

Ana Cristina M. M. Gomes

Rosana Falcão

Rose Gomes Monnerat

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600 Fax:
(61) 3340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005)

- E 82 Estudo da atividade e caracterização bioquímica e molecular de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1983) / Érica Soares Martins ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.
23 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 83)

Bacillus thuringiensis - bactéria entomopatogênica. 2. *Bacillus thuringiensis* – estirpes tóxicas - bicudo do algodoeiro. 3. *Anthonomus grandis* Boheman - bicudo do algodoeiro – controle biológico. I. Martins, Érica Soares. II. Série.

579.362 – CDD 21.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

ESTUDO DA ATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ESTIRPES DE *Bacillus* *thuringiensis* TÓXICAS AO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis* Boheman, 1983).

Érica Soares Martins¹
Lílian Botelho Praça²
Vinícius Fiuza Dumas³
Eduardo Hideki Sone⁴
Isabel C. Waga⁵
Ana Cristina M. M. Gomes⁶
Rosana Falcão⁶
Rose Gomes Monnerat⁷

RESUMO

O bicudo-do-algodoeiro é a principal praga da cotonicultura nacional. Uma alternativa para o seu controle é o uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria entomopatogênica caracterizada pela produção de cristais protéicos. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de um banco de *Bacillus spp.* onde estão armazenadas diferentes estirpes de Bt. O objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes de *B. thuringiensis*, patogênicas ao bicudo. A partir de ensaios realizados com 215 estirpes foram selecionadas 05 que apresentaram melhores resultados de patogenicidade. As estirpes mais tóxicas foram a S601 e a S1806. A primeira apresentou metade do valor de CL50 da estirpe padrão, *B. thuringiensis tenebrionis* e a segunda, valor de CL50 semelhante ao padrão. A estirpe S601 apresentou perfil gênico de *cry1Ad* e *cry1B* e S1806 *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, semelhante ao *B. thuringiensis israelensis*.

¹ Bióloga – Doutoranda em Biologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Engenheira Agrônoma – Mestre em Ciências Agrárias – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Biólogo – Graduando – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheiro Florestal – Bthek Biotecnologia.

⁵ Bióloga – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁶ Bióloga – Técnica de Nível Superior – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁷ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

STUDY FROM ACTIVITY AND CHARACTERIZATION
BIOCHEMICAL AND MOLECULAR OF STRAINS OF
Bacillus thuringiensis TOXICS AT THE BOLWEEVIL
(*Anthonomus grandis* Boheman, 1983)).

ABSTRACT

The cotton boll weevil is the major pest of cotton. One of the alternatives for its control is the utilization of *Bacillus thuringiensis* (Bt), an entomopathogenic bacterium characterized by the production of crystal proteins. Embrapa Genetic Resources and Biotechnology has a collection of *Bacillus* strains in which different strains of Bt are stored. The aim of this work to select *B. thuringiensis* strains toxic to boll weevil. After bioassays with 215 strains, 5 were selected as presenting good levels of toxicity. The most toxic strains were S601 and S1806. Compared to the standard *B. thuringiensis tenebrionis*, S601 presented an LC50 that was half of Bt tenebrionis and S1806 similar values of LC50. S601 encoded *cry1Ad* and *cry1B* and S1806 *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, like *B. thuringiensis israelensis*.

INTRODUÇÃO

O algodão (figura 1) é uma das plantas de maior interesse econômico cultivada em nível mundial. Na década de 90, essa planta superava o preço de outros produtos também importantes como a soja, milho e trigo (PONCHIO, 2001). Na indústria têxtil, a fibra do algodão é reconhecida como a mais importante e de maior valor de mercado.

O Brasil já foi um dos maiores produtores mundiais de fibras de algodão. Até o início da década de 80, o país produzia uma quantidade de plumas superiores ao consumo interno. Devido a uma série de problemas de natureza agrônômica e de mercado, a produção interna começou a cair gradativamente a partir de 1986, levando a um desequilíbrio na balança comercial desse produto no país (SANTOS, 2003).

Entre os principais fatores de ordem agrícola que contribuíram para o decréscimo dessa cultura no Brasil, destaca-se o estabelecimento do bicudo do algodoeiro (figura 2), considerado a principal praga das Américas (BUSOLI et al., 1994; GALLO et al., 2002). O bicudo do algodoeiro foi introduzido no Brasil no início da década de 80. Logo após seu estabelecimento, favorecido pelas condições do clima tropical, a lavoura algodoeira gerou prejuízos crescentes não só para os agricultores, mas também para todos os segmentos da cadeia produtiva dependente dessa fibra e de seus produtos.



Figura 1-Algodão. Fontewww.ccpm.pt/
boletim_71.htm



Figura 2- Inseto adulto do bicudo do algodoeiro. Fonte: www.viarural.com.ar/.../Insectos/picudo01.htm

Anthonomus grandis é um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae, mede normalmente de quatro a nove milímetros de comprimento e sete milímetros de envergadura, de coloração castanho-ferruginosa quando jovem e cinza quando se torna mais velho. A variação do tamanho do bicudo é influenciada por uma série de fatores, destacando-se entre eles, a quantidade de alimento no estágio larval (PRAÇA et al., 2003).

Várias formas de controle vêm sendo pesquisadas e utilizadas com o intuito de minimizar os efeitos danosos da perda de produção. Entre as mais utilizadas, cita-se o uso de defensivos químicos, que embora oneroso e de grande impacto ao meio ambiente, tem apresentado maior eficácia no controle do bicudo (MARTIN et al., 1987; WOLFENBERGER et al., 1997). Outros métodos de controle são o uso de feromônios e plantio-isca (GALLO et al., 2002), uso de variedades precoces de rápida frutificação e maturação, catação e destruição dos botões florais (SILVIE et al., 2001), controle biológico (SILVA e RAMALHO, 2001) e manejo integrado (CARVALHO et al., 2001).

Nos últimos 20 anos, grupos de pesquisas em todo o mundo vêm tentando conseguir por meio de melhoramento tradicional, cultivares de algodão resistentes ao bicudo, porém os resultados obtidos não são significativos. Uma nova perspectiva tem surgido com a possibilidade de obtenção de um algodão transgênico, contendo gene ou genes de resistência ao bicudo. Uma das principais vantagens do algodão transgênico é a redução de insumos químicos

para o estabelecimento da lavoura. A adoção de algodão Bt pelos agricultores do México e EUA para controle de lagartas contribuiu para redução de 50% nas aplicações de inseticidas. Na Argentina a redução do uso de inseticidas alcançou 65% (SANTOS, 2003).

Bacillus thuringiensis (Bt), é uma bactéria aeróbica, Gram-positiva, caracterizada por produzir inclusões protéicas, com atividade entomopatogênica, durante a esporulação. Esses cristais são compostos por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry (MONNERAT et al., 2000). As proteínas Cry apresentam ação extremamente tóxica para larvas de insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera e algumas espécies das ordens Nematoda, Protozoa e Acari (FEITELSEN, 1994). As toxinas Cry apresentam um espectro de ação normalmente restrito a uma ordem de insetos em particular. Atualmente, mais de 300 genes *cry* já foram seqüenciados e as proteínas Cry estão classificadas em 46 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de dois grupos de toxinas Cyt, em função do grau de similaridade e identidade de seus aminoácidos. A atualização constante desses dados pode ser visualizada via Internet no site: http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

Para insetos da ordem Coleoptera, as toxinas comumente descritas são as das classes Cry3 e Cry8, porém, recentemente, algumas toxinas das classes Cry1, Cry4, Cry22, Cry12, Cry18 e Cry34 têm sido descritas para esta ordem.

A Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), possui um banco de *Bacillus spp.* entomopatogênicos (MONNERAT et al., 2001), onde estão armazenadas diferentes linhagens de *B. thuringiensis*. O objetivo deste trabalho é identificar e linhagens de *B. thuringiensis*, que apresentem atividade patogênica para o bicudo do algodoeiro, que poderão ser utilizadas como fonte de genes para a construção de uma planta transgênica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 215 linhagens de *B. thuringiensis* pertencentes ao banco de *Bacillus spp.* entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas linhagens são originárias de amostras de solo e água de diferentes regiões do país (MONNERAT et al., 2001).

Os insetos utilizados para o bioensaio foram oriundos do laboratório de criação de insetos do Cenargen, onde é feita a criação massal de bicudo do algodoeiro, mantida conforme descrito por Monnerat et al. (2000).

Foram realizados dois tipos de bioensaio: O seletivo, ou discriminante, cujo objetivo foi determinar quais linhagens apresentavam atividade patogênica ao inseto, ou seja, capazes de causar no mínimo 50% de mortalidade de larvas; e o de dose, cujo objetivo foi determinar a toxicidade de cada linhagem.

Os bioensaios seletivos foram realizados incorporando-se 10mL de cultura bacteriana crescida em meio NYSM por 48h a 28 °C e 200rpm em agitador rotativo, em 35mL de dieta artificial (ágar 0,8g, levedo de cerveja 1,2g, gérmen de trigo 1,2g, pharmanédia 0,8g, proteína de soja 2,0g, sacarose 1,2g, sais minerais 0,2g, ácido ascórbico 0,4g, ácido sórbico 0,05g, nipagim 0,04g e solução vitamínica 200µL) a temperatura de aproximadamente 50 °C e em seguida, a dieta foi vertida em placas de Petri. Após solidificação foram feitos 15 furos. Em cada furo foi colocada uma larva neonata. Foram feitas quatro repetições, e uma placa foi deixada sem bactéria, como controle. A leitura foi feita sete dias após o bioensaio (PRAÇA et al., 2004).

Para a realização dos bioensaios de dose, as estirpes que mataram mais de 50% nos bioensaios seletivos, foram liofilizadas após serem cultivadas por 72h em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) a 28°C e 200 rpm. Para isso estes cultivos foram centrifugados a 12.800 x g por 30 minutos, a 4°C (centrífuga BR4i, Jouan), congelados por 16h e liofilizados 18h em liofilizador Labconco modelo Lyphlock modelo 18. Depois de liofilizado, o material foi pesado a fim de se

obter as cinco doses (descritas na tabela 1), usadas no bioensaio. Cada dose pesada foi dissolvida em Twenn 0,01% a fim de se obter uma suspensão mais homogênea. As suspensões foram incorporadas a 35mL de dieta artificial e em seguida, a dieta foi vertida em placas de Petri. Após solidificação foram feitos 48 furos. Em cada furo foi colocada uma larva neonata. Foram testadas as cinco doses (tabela 1) e, mais um controle. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotoperíodo de 14/10 e a uma temperatura de 27°C. Uma semana após o ensaio fez-se a leitura do bioensaio e determinou-se a CL₅₀ através de análise de Probits (FINNEY, 1971). Para comparação dos resultados obtidos, foram feitos ensaios com a linhagem *B. thuringiensis tenebrionis*, S1122, que é a linhagem padrão para insetos da ordem Coleoptera.

Tabela 1 – Concentração final do bioensaio

Dose	Quantidade em mg de Bactéria liofilizada	Quantidade em mL de Twenn 0,01%	Quantidade em mL de Dieta	Concentração Final (mg/mL)
1	60	5,0	35,0	1,5
2	40	5,0	35,0	1,0
3	20	5,0	35,0	0,5
4	10	5,0	35,0	0,25
5	04	5,0	35,0	0,1

A análise das proteínas presentes nas linhagens que apresentaram melhores resultados foi determinada através da eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE 10%) que permitiu conhecer o perfil das proteínas produzidas pelas linhagens.

As proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet et al., 1991. Para comparação dos resultados, a linhagem *B. thuringiensis tenebrionis* foi utilizada como padrão.

Para identificar os genes codificadores das toxinas realizou-se a caracterização molecular através de PCR, usando diferentes oligonucleotídeos (CERON et al., 1995; BRAVO et al., 1998). A metodologia de extração de DNA foi descrita por Sambrook et al. (2001).

As estirpes foram caracterizadas também, quanto a morfologia de suas inclusões cristalinas. Para tal, 100 µL de cada estirpe, que foi centrifugada a 10.000 x *g*, por 10 min sendo o sobrenadante descartado e o sedimento depositado sobre suportes metálicos. As amostras foram secas ao ar e cobertas com ouro por 180 s, utilizando-se metalizador EMITECH modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 215 linhagens testadas, 05 apresentaram melhores resultados de toxicidade contra as larvas testadas e, foram selecionadas para o bioensaio de dose.

As estirpes avaliadas foram agrupadas em quatro grupos estatisticamente distintos. A estirpe S601 foi classificada no grupo A e apresentou o melhor resultado de CL₅₀, que foi de 0,146mg/mL, a estirpe padrão (Btt) e a S1806 foram classificadas como pertencentes ao grupo B com CL₅₀ respectivamente de 0,328mg/mL e 0,306mg/mL, não diferindo estatisticamente entre si. O grupo C foi formado pela S1989, que é a estirpe padrão para dípteros, apresentou uma CL₅₀ de 0,740 e as demais estirpes S811, S785 e S325 foram classificadas como grupo D, apresentando respectivamente, CL₅₀ de 1,453 mg/mL, 3,450 mg/mL e 8,108 mg/mL (tabela 2).

Tabela 2 – Concentração letal (CL₅₀) das estirpes de *B. thuringiensis* contra *A. grandis*.

Estirpe	CL ₅₀ (mg/mL)	Intervalo de Confiança	Homologia
S601	0,146	0,117-0,174	A
S1806	0,306	0,253-0,362	B
S1122 (Btt)	0,328	0,230-0,440	B
S1989 (Bti)	0,740	0,617 - 0,912	C
S811	1,453	0,974-2,855	D
S785	3,450	1,793-1583,881	D
S325	8,108	2,908-161,472	D

A estirpe S601 além de se destacar pelo seu resultado de CL₅₀, apresentou um perfil protéico (figura 3) bastante diferenciado da estirpe padrão, com uma forte banda de 130 kDa e outras quatro bandas de menor massa molecular. A estirpe S1806 também se destacou por se tratar de uma estirpe de *B. thuringiensis israelensis* (Bti), com atividade descrita para dípteros (MONNERAT et al., 2005), corroborando com alguns trabalhos já realizados por outros grupos de pesquisa, que têm demonstrando a atividade de estirpes de Bti ativas contra insetos da ordem Coleóptera (MENDEZ-LOPEZ et al., 2003). A estirpe S1989 que é a estirpe padrão de Bti também apresentou resultados bastante significativos. As demais estirpes apresentaram um perfil protéico semelhante ao padrão. Quanto à caracterização molecular (tabela 3). A estirpe S601 apresentou os genes *cry1Ad* e *cry1B*, a S1806 apresentou os genes esperados para uma estirpe de Bti, nenhuma das estirpes apresentou produto de PCR para o gene *cry3*, que possui atividade descrita para coleópteros.

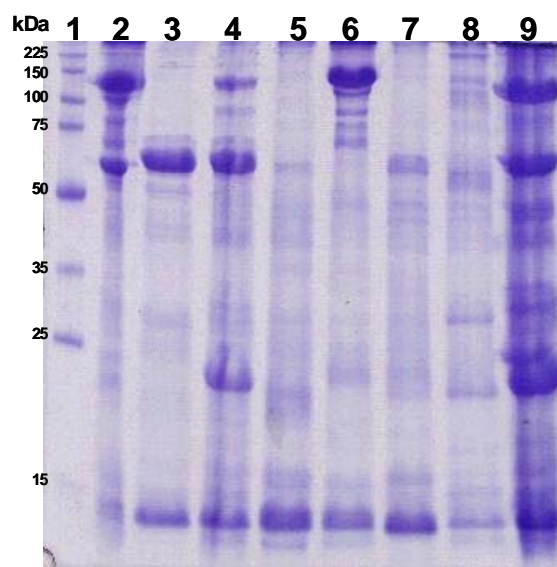


Figura 3 - Gel de SDS - PAGE 10% das estirpes estudadas. 1- Marcador de peso molecular Rainbow (Amersham), 2-Btk, 3-Btt, 4-Bti, 5-S325, 6-S601, 7-S785, 8-S811 e 9-S1806

Tabela 3 – Perfil molecular das estirpes estudadas

Estirpes	Genes
S601	<i>cry1Ad, cry1B</i>
S1806	<i>cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt 1, cyt2</i>
S1122 (Btt)	<i>cry3A, cry8</i>
S1989 (Bti)	<i>cry4A, cry4B, cry10, cry11, cyt 1, cyt2</i>
S811	<i>cry1Ab, 1C, 8</i>
S785	<i>cry2</i>
S325	<i>cry1C, 2</i>

A caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura (figura 4) mostrou que as estirpes apresentam, em geral, cristais de formato

arredondado com exceção da S601 e da S811 que possuem cristais bipiramidais.

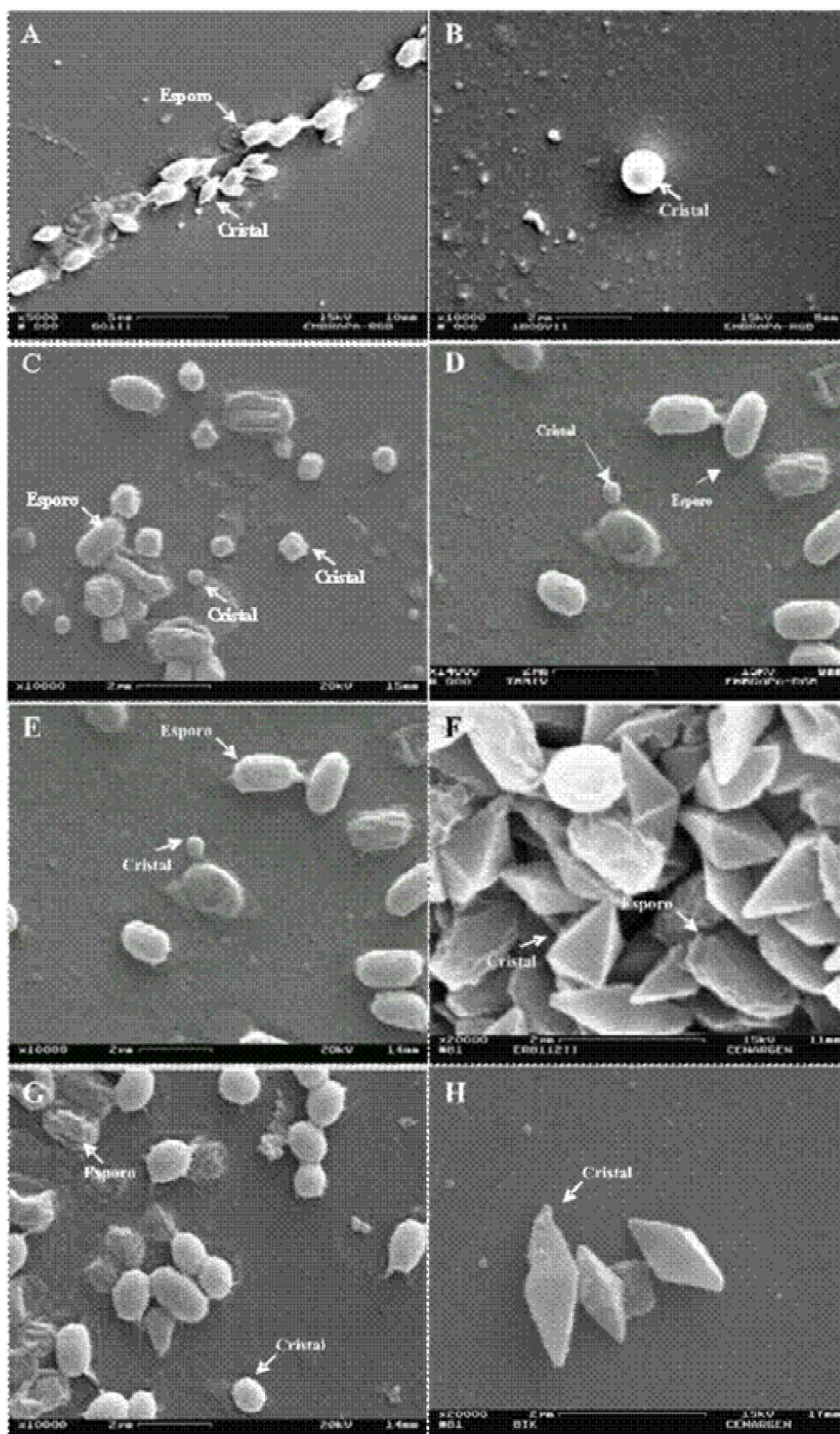


Figura 4 - Microscopia eletrônica de varredura. A-S601, B-S1806, C- Btt, D-S325, E-S785, F-S811, G-Bti e H-Btk.

CONCLUSÃO

Os ensaios apresentados neste trabalho mostraram que das 215 linhagens testadas, duas, são linhagens que possuem alto potencial para o controle do bicudo do algodoeiro. Uma vez que seus resultados de CL_{50} foram melhores que o do padrão recomendado para ordem Coleoptera.

Este é um resultado promissor, pois estas linhagens deverão ser melhor estudadas, para que se conheçam suas proteínas e respectivos genes codificadores. Uma vez conhecidos os genes, estes poderão ser clonados e expressados em cultivares de algodão numa tentativa de combate ao *A. grandis*, que é um inseto endofítico e de difícil combate por métodos convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BUSOLI, A. C.; SOARES, J. J.; LARA, F. M. **O bicudo do algodoeiro e seu manejo**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 32 p. (FUNEP. Boletim, 5)

CARVALHO, E.; BREDÁ, C. E.; BRUGNERA, P.; MARCHESAN, S. A.; GIONGO, J. O.; OLIVEIRA, J. C. de; ROSIN, J. B.; SANTOS, V. dos; O. FILHO, A. C. de; DEGRANDE, P. E. Bloqueio populacional do bicudo do algodoeiro no Oeste da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Campo Grande. **Produzir sempre, o grande desafio**: anais. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 134-137.

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. 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.

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

FEITELSEN, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994, Montpellier, France. **Proceedings...** [S.l: s.n., 1994?]. p. 184.

FINNEY, D. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. p. 50-80.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDARMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

LECADET, M. M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 840-849, 1991.

MARTIN, D. F.; BARBOSA, S.; CAMPANHOLA, C. **Observações preliminares e comentário sobre o bicudo do algodoeiro, no Estado de São Paulo**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1987. 21 p. (EMBRAPA-CNPDA. Circular Técnica, 1).

MÉNDEZ-LÓPEZ, I.; BASURTO-RÍOS, R.; IBARRA, J. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, p. 73-77, 2003.

MONNERAT, R. G.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA NETO, O. B. de; NOBRE, S. D.; WERNECK, J. O. S.; SÁ, M. F. G. de. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 46)

MONNERAT, R. G.; DIAS, D. G. S.; SILVA, S. F. da; MARTINS, E. S.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, 2005. No prelo.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F. da; WERNECK, J. O. S. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias entomopatogênicas do gênero *Bacillus***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 60).

PONCHIO, L. A. **Paridade de preços nos mercados nacional e internacional do algodão e a competitividade da cotonicultura brasileira**. 2001. 48 p. Monografia (Bacharelado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A.C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 34 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 41).

PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepdoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

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

SANTOS, R. C. dos. **Estudos biológicos e moleculares da colesterol oxidase visando o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2003.

SILVA, A. M. C.; RAMALHO, F. S. Competição entre populações dos parasitóides *Catolaccus grandis* (Burks) (Himenóptera: Pteromalidae) e *Bracon vulgaris* Ashmead (Himenóptera: braconidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Campo Grande. **Produzir sempre, o grande desafio: anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 155-157.

SILVIE, P.; LEROY, T.; BELOT, J. L.; MICHEL, B. **Manual de identificação das pragas, e seus danos no algodoeiro**. 1. ed. Cascavel: COODETEC: CIRADCA, 2001. 74 p. (Boletim Técnico, n.º 35).

WOLFENBERGER, D. A.; HAMED, A. A.; LUTTRELL, R. G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* against the boll weevil *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera, Curculionidae). In: BELTSVILLE COTTON CONFERENCES, 1997. [Proceedings...]. [S.l: s.n.: 1997?]. p. 1296-1300.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors relateds to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Process**, v. 3, p. 315-343, 1984.