

Elaboração de Metodologia de Bioensaio Seletivo e de dose de *Bacillus thuringiensis* Contra o Pulgão do Algodoeiro (*Aphis gossypii*)

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 217

ELABORAÇÃO DE METODOLOGIA DE BIOENSAIO SELETIVO E DE DOSE DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA O PULGÃO DO ALGODOEIRO (*Aphis gossypii*)

M V. Melatti
E. Martins
L. B. Praça
C. Berry
E. Sujii
R. G. 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) 448-4600 Fax: (61) 340-3624
<http://www.cenargen.embrapa.br>
e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*
Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*
Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista
Maurício Machaim 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: *Rosameres Rocha Galvão*
Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

Figura da Capa. Esquema ilustrativo das etapas da realização do bioensaio seletivo e de dose de *B. thuringiensis* contra o pulgão do algodoeiro. **A.** Vedação do pote de vidro, com a solução pronta, com algodão. **B.** Acomodação do bioensaio para a colocação dos insetos. **C.** Término do bioensaio vedado com tampa de plástico.

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

E 37 Elaboração de metodologia de bioensaio seletivo e de dose de *Bacillus thuringiensis* contra o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). / M. V. Melatti... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 217).

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Algodão. 3. Bactéria. 4. Pulgão. 5. *Aphis gossypii*. I. Melatti, M. V. II. Série.

633.51 – CDD 21

SUMÁRIO

Resumo	5
Introdução	6
Metodologias elaboradas	7
Resultados Discussão.....	11
Conclusões	12
Referencias Bibliográficas	12

ELABORAÇÃO DE METODOLOGIA DE BIOENSAIO SELETIVO E DE DOSE DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA O PULGÃO DO ALGODOEIRO (*Aphis gossypii*)

M. V. Melatti¹

E. Martins¹

L. B. Praça²

C. Berry³

E. Sujii⁴

R. G. Monnerat⁴

Resumo

A cultura do algodão vem crescendo e ocupando grandes áreas de cultivo. Este crescimento expõe esta cultura ao ataque severo de diversas pragas, entre elas o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). Este inseto tem causado até 44% de perdas à cultura do algodão, atacando principalmente os estágios iniciais da cultura, devido à sucção contínua da seiva ou à transmissão de doenças viróticas. A utilização de *Bacillus thuringiensis* surge como uma alternativa viável para o controle biológico do pulgão do algodoeiro, pois recentemente foi constatado que esta bactéria pode circular de forma sistêmica na planta. Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia de bioensaio seletivo e de dose de *B. thuringiensis* contra *A. gossypii*. O bioensaio seletivo consiste na utilização de bactéria crescida e o de dose na utilização de proteína purificada em diferentes diluições. Um bioensaio seletivo foi realizado com uma estirpe de *B. thuringiensis* marcada com *gfp* ("green fluorescence protein"), que permitiu a visualização da bactéria em um macerado do inseto alimentado da planta tratada com essa bactéria, através de microscopia ótica de fluorescência, confirmando exposição do *A. gossypii* a bactéria. Este resultado confirmou a eficiência das metodologias propostas, podendo estas serem utilizadas em laboratório para selecionar estirpes com potencial tóxico contra o pulgão do algodoeiro.

¹ Bióloga, MS.C, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Universidade de Brasília - UNB

² Engenheiro Agrônomo, MS.C, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Biólogo, Ph.D, Universidade de Cardiff - UR

⁴ Biólogo, Ph.D, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Introdução

Hoje a região centro-oeste é responsável por 84% da produção brasileira de algodão. Porém, um fator limitante para produtividade desta cultura são os danos causados por pragas, onde pelo menos 30 espécies de insetos-pragas já foram identificados (FONTES et al., 2006).

Aphis gossypii, conhecido como pulgão do algodoeiro, é um inseto cosmopolita (KESSING e MAU, 1991) e polífago, que ataca diversas culturas como cucurbitáceas, citrus, algumas plantas ornamentais (*Hibiscus ssp.*) e, principalmente, o algodão e o melão (MESSIAS e PASSOS, 1977). O pulgão é uma das primeiras pragas que ocorre no algodoeiro, podendo ser encontrado com maior frequência no algodão novo e em desenvolvimento (GALLO et al., 2002).

Os pulgões ao sugarem o floema da planta (seiva), causam o encarquilhamento das folhas e a deformação dos brotos, prejudicando assim, o desenvolvimento da planta de algodão. Esta praga apresenta simbiose com formigas, que são atraídas pela sua excreção açucarada, “honeydew” ou mela. Em troca, as formigas protegem os pulgões de seus inimigos naturais (GALLO et al., 2002; MIRANDA, 2006). A excreção do “honeydew” sobre os capulhos abertos causa o “algodão doce” ou “algodão caramelizado”, a substância impregna e mancha a fibra, fazendo-a perder a qualidade como produto comercial para a usina de processamento e a indústria de fiação (MEDEIROS et al., 2005; MIRANDA, 2006).

Esta praga favorece, ainda, o desenvolvimento da fumagina que dificulta a respiração e a fotossíntese da planta, por recobrir toda a superfície da folha (MIRANDA, 2006). Como danos indiretos, pode-se citar a transmissão de viroses no algodão, conhecidas como o “azulão” e o “vermelhão”.

Para o controle desta praga, geralmente utiliza-se o controle químico. Porém, casos de resistência de *A. gossypii* a inseticidas químicos têm sido relatados em produtos dos grupos carbamatos, organofosforados e piretóides em alguns países como na África, Estados Unidos, Austrália, China e Japão (GODFREY et al., 2000). Sendo necessário à busca de novas alternativas de controle, como o uso do controle biológico.

Dentro deste tipo de controle podemos citar o uso de bactérias entomopatogênicas. Estas bactérias necessitam ser ingeridas para ter ação sobre as pragas, logo poucas são capazes de servir como controle biológico do pulgão.

Porém, Monnerat et al. (2003) demonstrou que a bactéria *Bacillus thuringiensis* é capaz de circular endofiticamente dentro da planta. Por tanto, esta bactéria pode ser tornar um agente de controle biológico potencial para insetos sugadores de seiva.

Esta bactéria sintetiza inclusões protéicas cristalinas quando em esporulação, que confere a sua característica entomopatogênica. Estas inclusões são formadas por δ -endotoxinas, também denominadas proteínas Cry, que apresentam ação extremamente tóxica à diversas ordens de insetos (VALADARES INGLIS et al., 1998; MONNERAT e BRAVO, 2000).

Milhares de estirpes *B. thuringiensis* estão armazenadas em coleções por todo o mundo. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, desde 1988, vêm armazenando estas estirpes para testes de caracterização e de determinação da atividade contra diferentes insetos-pragas. A seleção de estirpes de *B. thuringiensis* que sejam ativas a pragas de ordens que ainda não são controlados por esta bactéria como, por exemplo, o pulgão do algodoeiro (Hemiptera: Aphididae), é importante para expandir a utilização desta bactéria na agricultura brasileira.

Para isso, se faz necessário o desenvolvimento de uma metodologia de bioensaio para a seleção destas estirpes em laboratório. Segundo Benintende et al. (2001) a técnica de bioensaios é a única que prova o nível de toxicidade das estirpes testadas. Este trabalho tem como objetivo desenvolver um protocolo de bioensaio seletivo e de dose para a seleção de estirpes de *B. thuringiensis* que tenham potencial para o controle do pulgão do algodoeiro.

Metodologias elaboradas

2.1. Metodologia de bioensaio seletivo

O bioensaio seletivo consiste triagem inicial de estirpes de *Bacillus thuringiensis*, na busca de selecionar estirpes que tenham potencial para o controle do pulgão do algodoeiro.

As estirpes foram cultivadas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), em incubador rotativo a 200 rpm, 28°C, durante 48 a 72h, até sua completa esporulação.

Coletou-se o número necessário de folhas novas de algodão. Estas folhas foram deixadas de molho em solução de hipoclorito 2% por 10 minutos e enxaguadas em água corrente, até a retirada total da solução. Após a lavagem, as folhas foram distribuídas em um papel toalha para a secagem das folhas, se necessário às folhas eram totalmente enxugadas.

Enquanto isso, o fluxo laminar foi organizado. Neste colocou-se os potes plásticos e suas tampas, os tubos de vidro de 5 mL autoclavados, algodão autoclavado, as pipetas automáticas (p1000 e p5000), as ponteiros brancas e amarelas, e uma placa de Petri de vidro pequena.

O bioensaio consistiu em colocar 4 mL de água em cada pote de vidro de 5 mL e adicionar 1 mL da bactéria desejada crescida. Para cada estirpe testada foram feitas três repetições. Em seguida, colocou-se uma folha de algodão lavada em cada pote de vidro, vedado com o auxílio de um algodão. O pedúnculo das folhas foi cortado novamente com um bisturi, dentro da placa de Petri contendo água. Isto auxilia na retirada do ar que a planta absorveu durante este período de espera, a fim de evitar que o ar penetre nos elementos condutores do xilema, bloqueando a entrada de água (RAVEN et al., 1978). Com isso, mantém-se a circulação de água dentro do xilema e floema da folha.

Cada pote de vidro pronto foi acomodado dentro de potes plásticos, onde foram colocadas 10 ninfas de 2º instar de *A. gossypii* retiradas da colônia, na parte abaxial das folhas. Estes foram fechados com suas tampas que eram furadas e vedadas com voal ou um pedaço de algodão, para permitir a circulação de ar dentro do ensaio. As tampas de plástico foram identificadas com o número da estirpe utilizada e a data do início do bioensaio (Figura 1). O bioensaio foi acomodado na sala de bioensaio climatizada, com a temperatura regulada em $26^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa de $78\% \pm 2$ e fotofase de 12 horas (dia/ noite).

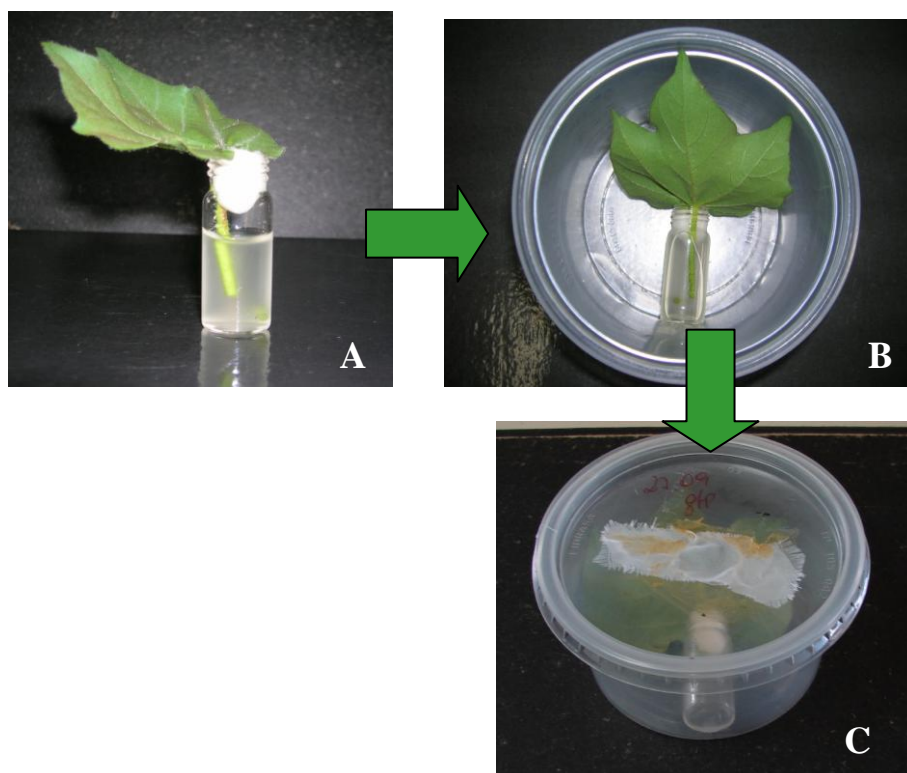


Figura 1. Esquema ilustrativo das etapas da realização do bioensaio seletivo e de dose de *B. thuringiensis* contra o pulgão do algodoeiro. **A.** Vedação do pote de vidro, com a solução pronta, com algodão. **B.** Acomodação do bioensaio para a colocação dos insetos. **C.** Término do bioensaio vedado com tampa de plástico.

A avaliação e o descarte do bioensaio seletivo foi realizado cinco dias após o início do ensaio. Os pulgões foram contados e o número de insetos vivos e mortos nas três repetições foi avaliado. Assim, o percentual de mortalidade foi calculado, considerando 30 insetos mortos como 100% de mortalidade.

Junto com os bioensaios foi preparado um controle negativo, com três repetições. Este foi realizado da mesma maneira, porém não se utilizou bactéria crescida, apenas água. O percentual máximo de mortalidade permitido no controle negativo é de 15%, caso ultrapasse este valor, o bioensaio deverá ser descartado e repetido.

2.1.1. Validação da metodologia proposta

Para confirmar a exposição do pulgão do algodoeiro à bactéria ativa através da alimentação, realizou-se um bioensaio experimental com a bactéria *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* transformada, que expressa o gene da *green fluorescent protein (gfp)*. Esta proteína, quando exposta a luz ultravioleta, emite fluorescência verde, permitindo a detecção da bactéria no material observado (AZEVEDO et al., 2002).

O bioensaio foi realizado igual ao descrito no item anterior, também com três repetições. Após os cinco dias de ensaio, os insetos vivos e mortos foram colocados em um eppendorf de 1,5 mL, adicionado a 200 µL de água destilada estéril. Os insetos foram macerados com o auxílio de um bastão de vidro. A amostra passou por choque térmico, 80°C por 12 minutos, seguido de gelo por 5 minutos. Após o choque térmico foi realizado o plaqueamento da amostra com auxílio de uma alça de platina em uma placa com meio seletivo com eritromicina, pois a bactéria transformada é naturalmente resistente a este antibiótico. As placas foram incubadas na estufa a 30°C por 24 horas para a avaliação do crescimento de colônias. As colônias que cresceram foram observadas em microscópio de fluorescência (Axyophoth Zeiss), para a análise das células vegetativas, pois a fluorescência é observada apenas em células vegetativas.

Para cada repetição realizou-se o mesmo processo.

2.2. Metodologia de Bioensaio de Dose

Para a realização do bioensaio de dose as estirpes de *B. thuringiensis* utilizadas foram purificadas, utilizando-se apenas a proteína pura. A purificação de cristais foi realizada por meio de gradiente de sacarose, de acordo com o protocolo descrito por Bravo e Silva Filha (2001), em seu manual de metodologias.

Após a purificação foram escolhidas as bandas de cada amostra que continha a maior concentração de cristais puros determinados através da quantificação pelo método de

Bradford (1976), com o corante azul de brilhante Coomassie em espectrofotômetro (Hitachi U-2000), com leitura de 595 nm.

As etapas desta metodologia são semelhantes ao do bioensaio seletivo. Foi realizado o bioensaio como descrito anteriormente, diferindo apenas na etapa da aplicação da bactéria. Este bioensaio foi composto de cinco diluições para cada estirpe. As diluições estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Diluições e concentrações utilizadas nos bioensaios de dose, separadas por dia de aplicação no bioensaio.

Diluição	Concentração ($\mu\text{g}/$ 5mL) 1º dia	Concentração ($\mu\text{g} / 5\text{mL}$) 2º, 3º e 4º dia	Concentração final ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
1	100	66	300
2	50	33	150
3	25	16	75
4	10	7	30
5	5	3	15

No primeiro dia de bioensaio, as diluições foram preparadas em eppendorf de 1,5 mL e diluídas em água, com o volume final de 1 mL. Isto é, de acordo com o resultado a quantificação de proteínas, de cada estirpe foi retirada uma quantidade diferente de microlitros para atingir a concentração estipulada na tabela 3.

O bioensaio de dose foi realizado com aplicações diárias. Logo, uma segunda diluição foi preparada para ser aplicada durante os três dias seguintes. A dose então foi duplicada e as diluições foram preparadas em eppendorf de 2 mL da mesma maneira da diluição anterior, totalizando um volume final de 2 mL.

No segundo, terceiro e quarto dia de ensaio, aplicou-se 666,6 μL das diluições preparadas nos tubos de vidro respectivo a sua dose, com cuidado para não retirar o pedúnculo da planta da água. Em seguida, os tubos foram novamente vedados com algodão e armazenados nos seus respectivos potes plásticos. O bioensaio foi outra vez acomodado na sala de bioensaio com condições semelhantes as da colônia de pulgão.

No quinto dia de ensaio, o mesmo foi avaliado e descartado, determinando-se o número total de insetos mortos, adultos e ninfas. As ninfas foram desconsideradas do bioensaio, pois estas nasceram durante o desenvolvimento do ensaio. Foram analisados apenas os insetos mortos e os adultos. Os dados de mortalidade foram analisados através do programa estatístico Probit (FINNEY, 1971), onde a concentração letal (CL_{50}) foi determinada.

O bioensaio de dose foi realizado em duplicata.

Junto com os bioensaios foi preparado um controle negativo. Este foi realizado com as mesmas etapas, porém não se utilizou proteína purificada, apenas água. O percentual máximo de mortalidade permitido no controle negativo é de 15%, caso ultrapasse este valor, o bioensaio deverá ser descartado e repetido.

Resultados Discussão

3.1. Validação da metodologia proposta

A metodologia descrita foi primeiramente testada através do uso da bactéria *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* transformada com o gene de fluorescência (*gfp*) e em seguida, com as outras estirpes a serem estudadas. A confirmação da metodologia foi satisfatória.

Após a realização do bioensaio com a bactéria transformada, preparou-se um macerado de insetos, para o plaqueamento das amostras. O plaqueamento foi realizado para a verificação do crescimento de colônias naturalmente resistentes ao antibiótico eritromicina, presentes na bactéria com o gene *gfp*. O macerado de *A. gossypii* foi realizado com todos os insetos encontrados, separando-os por repetição. Coletaram-se tanto insetos adultos como ninfas, utilizando 15 a 19 insetos em cada uma das três repetições.

Em todos os plaqueamentos, realizados com as amostras (macerado) submetidas à choque térmico, foram obtidas colônias de *B. thuringiensis*. As colônias encontradas apresentaram tamanho médio, coloração esbranquiçada e opaca, com bordas irregulares, sendo estes aspectos característicos *B. thuringiensis*, de acordo com Benintende et al. (2001).

As lâminas foram preparadas a fresco com as colônias crescidas no plaqueamento, para a observação no microscópio de fluorescência (Axyophoth Zeiss). Em todas as repetições observou-se um grande número de células vegetativas com fluorescência verde (AZEVEDO et al., 2002), como demonstrado na figura 2. Esta fluorescência permitiu a detecção do Btk-*gfp* no material analisado, confirmando que a bactéria observada era a mesma que foi inoculada na água da planta.



Figura 2. Observação das células de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* com o gene *gfp* através de microscopia de fluorescência, em aumento de 12.000X. Foto: Felipe Ramos.

Através destas microscopias foi confirmado que o *B. thuringiensis* foi absorvido pela planta de algodão com o pedúnculo imerso em água e ainda, sua capacidade em se translocar pela mesma, sendo sugado através do floema pelo inseto, *A. gossypii*. Situação semelhante foi relatada por Monnerat et al. (2003), porém utilizando a lagarta *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith em plantas de algodão e couve. Eles demonstraram que esta bactéria era capaz de circular na planta e causar mortalidade nas lagartas que desta se alimentavam.

Embora a bactéria inoculada na água tenha sido absorvida pelo xilema da folha, esta foi capaz de se translocar para o floema da planta e ser ingerida pelo pulgão que da seiva do floema se alimentava. Este transporte lateral de água e minerais do xilema para o floema ocorre por meio dos raios vasculares (células parenquimatosas), sendo o movimento descrito por Raven et al. (1985).

A partir destes resultados, foi confirmado que a metodologia de bioensaio é eficiente, sendo capaz de fornecer resultados satisfatórios na seleção de estirpes de *B. thuringiensis* para o controle do pulgão do algodoeiro e outros insetos sugadores.

Conclusões

Os resultados obtidos demonstram a eficiência das metodologias propostas, uma vez que através desta foi confirmado que *B. thuringiensis* é capaz circular de forma sistêmica na planta de algodão.

Através da utilização destas metodologias de bioensaio é eficiente será possível obter-se resultados satisfatórios na seleção de estirpes de *B. thuringiensis* para o controle do pulgão do algodoeiro e outros insetos sugadores. Sendo esta bactéria uma alternativa para o controle biológico de *A. gossypii*.

Referencias Bibliográficas

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

BENINTENDE, G.; GLEN, A.; IBARRA, J.; BRAVO, A.; ESPINOSA, A. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*: aislamiento, crecimiento y conservacion de estas bacterias. In: BRAVO, A.; ARRIETA, G.; BENINTENDE, G.; REAL, M.; ESPINOZA, A. M.; IBARRA, J.; MONNERAT, R.; ORDUZ, S.; SOBERÓN, M. **Metodologias utilizadas em investigación sobre bacterias entomopatógenas**. México, D.F.: UNAM, 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

- BRAVO, A.; SILVA FILHA, M. H. Purificação de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; ARRIETA, G.; BENINTENDE, G.; REAL, M.; ESPINOZA, A. M.; IBARRA, J.; MONNERAT, R.; ORDUZ, S.; SOBERÓN, M. **Metodologias utilizadas em investigação sobre bactérias entomopatógenas**. México, D.F.: UNAM, 2001.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; FEITELSON, J.; SCHENEPEF, E.; VAN, R.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: <www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore>. Acesso em: 01 de outubro de 2007.
- FINNEY, D. **Probits analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 80 p.
- FONTES, E. M.; RAMALHO, F.; UNDERWOOD, E.; BARROSO, P. A.; SIMON, M. F.; SUJII, E. R.; PIRES, C.; BELTRÃO, N.; LUCENA, W.; FREIRE, E. The cotton agricultural context in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.; FONTES, E. **Environmental risk assessment of genetically modified organisms**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2006. v. 2, 373 p.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, 920 p.
- GODFREY, L. D.; ROSENHEIM, J. A.; GOODEL, P. B. Cotton aphid emerges as major pest in SJV cotton. **California Agriculture**, Berkeley, US, v. 54, p. 26-29, 2000.
- KESSING, J. M.; MAU, R. F. ***Aphis gossypii* Glover**. 1991. Disponível em: <www.extento.hawaii.edu>. Acesso em: 01 de maio de 2007.
- MEDEIROS, A. A.; OLIVEIRA, J. F.; CHAGAS, M. C. M.; LEITÃO, F. A. S.; LIMA, J. S.; GUEDES, F. X.; OLIVEIRA, L. M. **Algodão: plantio do algodoeiro herbáceo de sequeiro**. Natal: Embrapa: Emparn, 2005. 28 p.
- MESSIAS, S.; PASSOS, G. **Algodão**. São Paulo: Instituto de Ensino Agrícola, 1977. 323 p.
- MIRANDA, J. E. **Manejo integrado das pragas do algodoeiro do cerrado brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 24 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 98), 2006.
- MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p. 163-200.
- MONNERAT, R. G.; SANTOS, R. C.; BARROS, P. C.; BATISTA, A. C.; BERRY, C. **Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 4 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado Técnico, 98).
- MONNERAT, R. G.; PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Ed.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 121-155.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; CURTIS, H. **Biologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1985. 724 p.
- VALADARES INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DE SOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. de; Azevedo, J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, [1998]. v. 1. p. 201-230.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, New York, v. 3, p. 315-343, 1984.