

**PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*
EFETIVAS PARA O CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis*
(Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against
Anticarsia gemmatalis)**

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 Penteadó
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 82

**PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*
EFETIVAS PARA O CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis*
(Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against
Anticarsia gemmatalis)**

**A. C. Batista
V. M. Melatti
C. Demo
E.S. Martins
L. B. Praça
A. C. M. M. Gomes
R. Falcão
C. S. Brod
R. G. Monnerat**

**BRASÍLIA, DF
2005**

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: *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 Alice Bianchi e Maria Iara Pereira Machado*

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

1ª edição

1ª impressão (2004): 150 unidades

Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis* = Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Anticarsia gemmatalis* / A. C. Batista ... [et al.]. – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; n. 82)

1. *Bacillus thuringiensis* – *Anticarsia gemmatalis* - Controle biológico. I. Batista, A. II. Série.

632.96 - CDD 21

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
RESULTADOS.....	12
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÕES.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* EFETIVAS PARA O CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis* (Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Anticarsia gemmatalis*)

A. C. Batista¹
V. M. Melatti²
C. Demo¹
E.S. Martins³
L. B. Praça⁴
A. C. M. M. Gomes⁵
R. Falcão⁵
C. S. Brod⁶
R. G. Monnerat⁷

RESUMO

Anticarsia gemmatalis é considerada a principal praga da soja, pois causa grandes danos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. A utilização de agentes de controle biológico para reduzir populações deste inseto é uma alternativa viável. Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* são utilizados no controle de lagartas há mais de vinte anos. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco onde estão armazenadas diversas estirpes desta bactéria. Este trabalho teve como objetivo a seleção e caracterização de estirpes tóxicas a *A. gemmatalis*. Foram utilizadas 1375 estirpes de *B. thuringiensis*. Dentre estas, três S550, S845 e S1905 apresentaram alta toxicidade contra *A. gemmatalis*, sendo a estirpe S845 a mais

¹ Bióloga – Mestranda em Ciências Agrárias – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga – Graduanda – Centro Universitário de Brasília (UniCeub) – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Bióloga – Doutoranda em Biologia Molecular – Universidade de Brasília – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁴ Engenheira Agrônoma – Mestre em Ciências Agrárias – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

⁵ Bióloga – Técnica de Nível Superior – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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

⁷ Bióloga – PhD - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

eficaz. Essas três estirpes poderão ser utilizadas como base para a produção de bioinseticidas para o controle de larvas de *A. gemmatalis*.

ABSTRACT

Anticarsia gemmatalis represents the most important pest of soybean in Brazil. It causes several damages to soybean crops by feeding plant leaves. In some cases it could destroy the plant totally. Biological agents to control this pest have been used to reduce insect population. Bt products have been used to inhibit lepidopteran attack for a long time. One of the alternatives for its control is the utilization of *Bacillus thuringiensis* (Bt), an entomopathogenic bacterium characterized by the production of the 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 was to select *B. thuringiensis* strains toxic to *A. gemmatalis*. After bioassays with 1375 strains, three, S550, S845 and S1905, were selected as presenting high level of toxicity. The S845 was the most efficient. These strains could be used in bioinsecticides production to control *A. gemmatalis* larvae.

INTRODUÇÃO

A cultura da soja abriga um número elevado de espécies de insetos. Alguns causam sérios prejuízos à cultura e são considerados como pragas principais, como *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Esta lagarta é encontrada em todos os locais de produção de soja, causando grandes danos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta (MOSCARDI e SOUZA, 2002).

A lagarta da soja é um inseto mastigador e se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos. Quando se alimentam, além de remover nutrientes, as lagartas injetam toxinas nas plantas (SILVA *et al.*, 2002). Esta lagarta também causa prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, feijão-vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, no período da floração (PRATISSOLI, 2002).

O uso de produtos de amplo espectro, ou seja, não seletivos, além de destruir os inimigos naturais, pode selecionar o aparecimento de populações resistentes desta praga, exigindo uso de produtos mais fortes ou em doses elevadas. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável. Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* são utilizados no controle de lagartas há mais de vinte anos. *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram positiva, da família *Bacillaceae*, que produz inclusões protéicas cristalinas no momento de sua esporulação. Estas proteínas são chamadas de delta-endotoxinas e são produzidas sob a forma de protoxinas, as quais são transformadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto pela ação do pH alcalino intestinal e pela ação de proteases. A toxina ativada causa a lise das células epiteliais e a morte das larvas (ARONSON *et al.*, 1986).

No mundo inteiro, diversas estirpes de *B. thuringiensis* têm sido isoladas. Estima-se que existam 50.000 estirpes conhecidas, entre estas, algumas são

eficazes contra Nematóides (EDWARDS et al., 1988), Trematóides, Protozoários, Hymenopteros, Homopteros, Orthopteros e Ácaros (FEILTELSON, 1994).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem realizado diversos testes com o intuito de encontrar e caracterizar estirpes com maior toxicidade, que produzam toxinas diferentes das já existentes e que possam ser utilizadas na produção de bioinseticidas. Tendo em vista a importância desta praga para a agricultura brasileira, este trabalho teve como objetivo a seleção e caracterização de estirpes tóxicas a *A. gemmatalis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das estirpes: Foram utilizadas 1375 estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Estas estirpes foram isoladas a partir de amostras de solo e água (MONNERAT et al., 2001).

Caracterização morfológica: As estirpes foram cultivadas em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), em incubador rotativo a 200rpm, 28°C, durante 48 às 72h (até completa esporulação). Em seguida foram observadas em microscópio de contraste de fases a fresco, para observação da forma dos esporos e dos cristais.

Caracterização entomopatogênica: Todas as estirpes foram testadas contra larvas de *A. gemmatalis*.

As larvas de *A. gemmatalis* foram obtidas da criação massal estabelecida na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desde 1989 (SCHMIDT *et al.*, 2001). As lagartas foram criadas em dieta artificial, em insetário regulado a temperatura de 28°C ± 2, umidade relativa de 70% ± 5 e fotoperíodo de 14/10 horas. Os adultos depositavam os ovos em papel de filtro, que eram esterilizados e colocados em dieta artificial. Após a eclosão, as larvas se alimentavam da dieta e após completarem o ciclo larval, as pupas eram coletadas e colocadas em gaiolas onde os adultos copulavam e ovipositavam no papel, reiniciando o ciclo.

Foram realizados dois tipos de bioensaios: o seletivo, onde foram selecionadas as estirpes que causavam 100% de mortalidade, e o de dose, onde se calculou a concentração letal necessária para matar 50% da população testada.

Os bioensaios seletivos foram realizados espalhando-se 150µL da cultura de cada estirpe cultivada em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), em incubador rotativo a 200rpm, 28°C, durante 48 a 72h (até completa esporulação) na dieta distribuída previamente em copos descartáveis de 50mL. Após a absorção da cultura pela dieta, dez larvas de segundo estágio foram colocadas em cada copo, e estes foram fechados com tampas de acrílico e incubados nas mesmas condições de criação do inseto. Foram feitas duas repetições e, dois copos foram deixados sem a bactéria, como testemunha. A primeira leitura foi feita 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram passadas para novos copos de plástico de 50mL, contendo dieta livre do bacilo. No quinto dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura (MONNERAT et al., 2001).

O bioensaio de dose foi realizado com as estirpes liofilizadas. Cada estirpe foi cultivada por 72h em meio NYSM em incubador rotativo a 200 rpm e 28°C. O material crescido foi centrifugado a 10.000 rpm por 30min, a 4°C, congelado por 16h e liofilizado por 18h. Após liofilização, prepararam-se diluições de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 – Tabela de diluições e concentração final para a realização de bioensaios contra lepidópteros.

Suspensão I (µl)	Bactéria (mg)	Água (µl)	Concentração (µg/ml)
	1	1000	1000
Suspensão II (µl)	Suspensão I (µl)	Água (µl)	Concentração (µg/ml)
	571,4	428,6	571,4
Dose	Suspensão II (µl)	Água (µl)	ng/cm ²
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	72	928	720
4	43,2	956,8	432
5	25,9	974,1	259
6	15,5	984,5	155
7	9,3	990,7	93
8	5,6	994,4	56
9	3,4	996,6	34
10	2,0	998,0	20

Após preparo das diluições, espalharam-se 35µL das mesmas na dieta distribuída previamente em placas de cultivo de células. Após absorção das diluições pela dieta, uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço, e as placas foram fechadas com tampa de acrílico e incubadas nas mesmas condições da criação de insetos. Foi feita uma placa para cada diluição e uma outra foi deixada como testemunha.

A primeira avaliação da mortalidade foi feita 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram passadas para copos de plástico de 50mL, contendo dieta livre do bacilo. No quinto dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura. Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (FINNEY, 1971, 1971) e a concentração letal foi determinada.

Caracterização molecular: As estirpes selecionadas por meio de bioensaios seletivos foram caracterizadas quanto à presença de genes codificadores de proteínas Cry ativas contra lepidópteros. Para isso, foram realizados testes de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*.

O par de oligonucleotídeos *gral-cry1* (BRAVO *et al.*, 1998) foi utilizado para a identificação de genes *cry1* (geral). Para os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1D* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos específicos, respectivamente denominados CJ1/CJ2, CJ2/CJ3, CJ4/CJ5, CJ6/CJ7, CJ8/CJ9, CJ10/CJ11 e CJ12/CJ13 (Ceron *et al.*, 1994). Os genes *cry1E*, *cry1F* e *cry1G* foram identificados por meio dos pares de oligonucleotídeos específicos CJ14/CJ15, CJ16/CJ17 e CJ18/CJ19 (Ceron *et al.*, 1995). A detecção de genes *cry2* foi realizada a partir de oligonucleotídeos *gral-cry2* (Ibarra *et al.*, 2003) e para identificação de genes do grupo *cry9* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos *spe-cry9A*, *spe-cry9B* e *spe-cry9C* (Bravo *et al.*, 1998).

A extração de DNA foi realizada a partir da 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-100TM). Foram

transferidos 2 μ L de DNA de cada amostra para um tubo de polipropileno contendo 12,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 100mM de dNTP mix, tampão de Taq 10x e 2,5U de Taq DNA polimerase (5,0U) em um volume total de 40 μ L. Os resultados das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%. A estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) foi utilizada como padrão.

Caracterização de proteínas através de SDS-PAGE: A caracterização bioquímica das estirpes efetivas 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 em incubador rotativo por 72h a 200rpm e 28°C.

Caracterização ultra-estrutural: A caracterização ultra-estrutural foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. Para isso as suspensões de cristais das estirpes mais eficazes foram liofilizadas, depositadas em suportes metálicos, cobertos com ouro por 180 segundos, utilizando metalizador EMITECH modelo K550 e foram observadas em microscópio eletrônico de varredura.

RESULTADOS

Caracterização morfológica: Todas as estirpes analisadas apresentaram morfologia correspondente a *B. thuringiensis*, contendo esporos e cristais de formas variáveis.

Caracterização entomopatogênica: Das 1375 estirpes testadas, 25 causaram 100% de mortalidade em bioensaios seletivos e foram selecionadas para o bioensaio de dose (Tabela 2). As estirpes S550, S845 e S1905 foram as mais tóxicas contra *A. gemmatilis*. A estirpe S845 apresentou o menor valor de CL₅₀ entre todas as estirpes analisadas.

Tabela 2. Resultados dos bioensaios de dose contra *A. gemmatalis*.

Estirpes	CL 50 (ng/cm²)	Intervalo de confiança(ng/cm²)
S0093	685,37	435,79-1344,41
S0112	83,56	45,99-232,01
S0166	2,94	1,44-4,29
S0234	17,22	7,74-42,16
S0392	1363,44	703,00-7166,04
S0550	0,59	0,40-0,81
S0711	5,41	0,12-12,38
S0764	5,43	2,83-8,73
S0811	53,12	30,99-74,52
S0844	1936,20	1029,55-12942,05
S0845	0,02	0,01-0,03
S0906	96,71	46,61-147,35
S0907	2880,51	918,13-1519162,58
S0908	4378,66	1167,85-1969847,56
S0997	21,49	13,06-39,39
S1269	6,80	3,65-20,04
S1537	119,15	85,28-261,73
S1538	41,74	1,29-94,57
S1540	42,18	11,19-82,58
S1548	339,13	221,92-584,03
S1549	1098,40	615,83-3026,98
S1551	2331,09	1078,10-13567,31
S1876	8546,35	1625,88-139838300,75
S1905	0,33	0,09 - 0,70
S2003	61,39	27,02-112,35
Btk	13,73	9,09-20,09

Caracterização protéica e molecular:

As estirpes tóxicas S550, S1905 apresentaram perfil protéico de 130 e 65 kDa, semelhante a estirpe padrão, *B. thuringiensis* subps. *kurstaki* HD-1 (Figura 1), sendo que a estirpe S845 apresentou perfil protéico de 130 e 14 kDa.

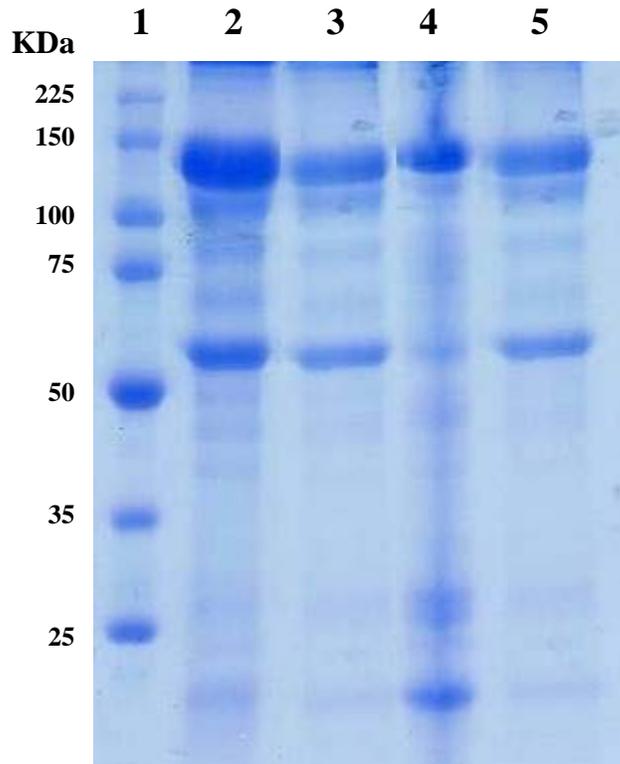


Figura 1: Gel de SDS - PAGE 10% das estirpes estudadas. 1- Marcador de peso molecular, 2- Btk, 3- S550, 4- S845, 5-S1905.

A caracterização molecular destas estirpes mostrou a presença dos grupos de genes *cry1* e *cry2*, naturalmente esperados em estirpes efetivas contra lepidópteros (Tabela 3). Na estirpe S845, que apresentou maior toxicidade, foi constatada a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1B* e *cry2*. A estirpe S550 apresentou genes *cry1Ab* e *cry2* e a estirpe s1905 apresentou genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* e *cry2* presentes no padrão *B. thuringiensis* subps. *kurstaki*.

Tabela 3. Caracterização molecular das estirpes com maior efetividade contra *A. gemmatilis*.

Estirpes	Caracterização molecular
S550	<i>cry1Ab</i> e <i>cry2</i>
S845	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>
S1905	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>
Btk	<i>Cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>

Caracterização ultra-estrutural: Os resultados da microscopia eletrônica de varredura mostraram que as estirpes S550, S845 e S1905 possuem cristais bipiramidais, cubóides e esféricos, semelhantes aos observados na estirpe padrão *B. thuringiensis subsp. kurstaki* (Figura 2).

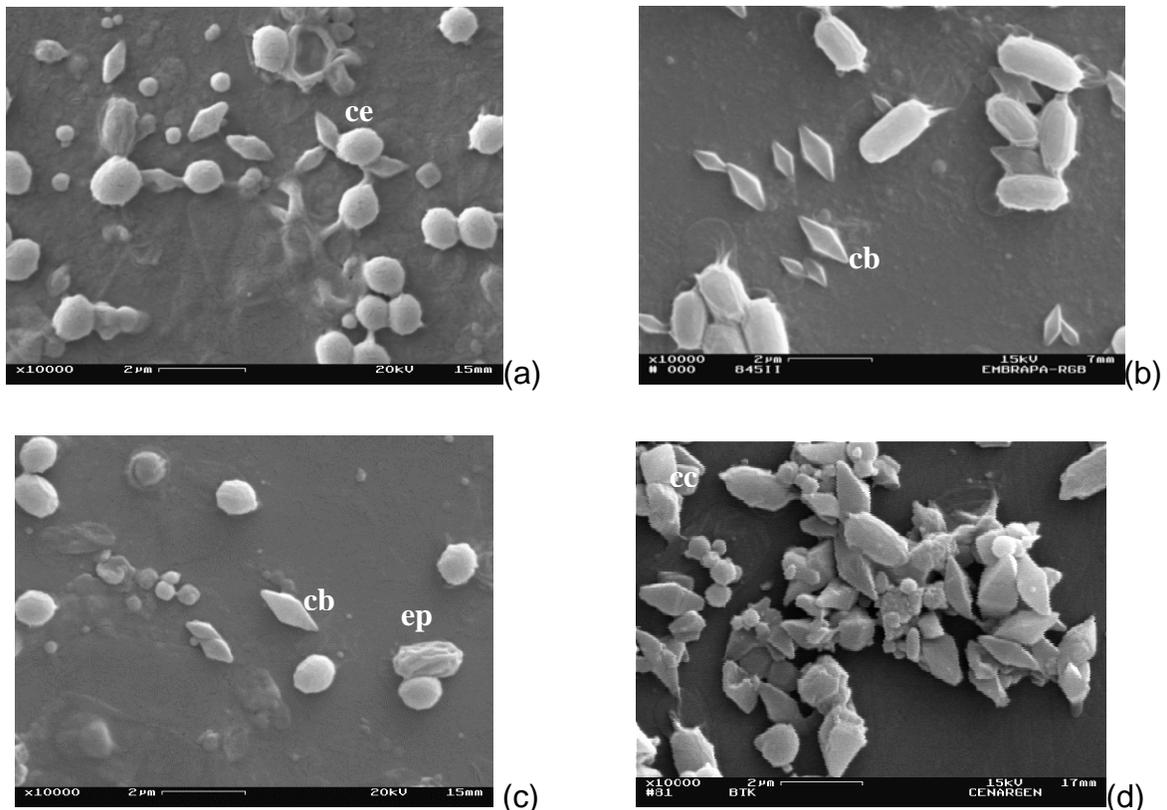


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais das estirpes de *Bacillus thuringiensis* S550 (a), S845 (b), S1905 (c) e *B. thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1 (d). ce: cristal esférico; cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide, ep: esporo.

DISCUSSÃO

As estirpes S845, S550 e S1905 apresentaram alta toxicidade a *A. gemmatalis*, sendo S845 a mais eficaz, apresentando menor valor de CL_{50} , sendo superior estatisticamente a todas as outras estirpes analisadas, inclusive, superior ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Estes resultados de superioridade ou semelhança de estirpes contra lepidópteros em relação ao padrão, já haviam sido relatados por De-Souza et al. (1999).

A análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da mistura de esporos e cristais das estirpes S550 e S1905 apresentou dois polipeptídios principais de aproximadamente 130 e 65 kDa semelhantes entre si e que correspondem ao perfil do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (LERECLUS et al., 1993). É importante observar que o perfil de 130 kDa é considerado padrão característico de estirpes ativas contra lepidópteros e coleópteros e o perfil de 65 kDa é característico de estirpes ativas contra lepidópteros e dípteros. A estirpe S845 apresentou dois polipeptídios de 130 e 14 kDa, este último está relacionado com as proteínas do grupo Cry34, que apresentam atividade contra insetos da Ordem Coleoptera (CRICKMORE et al., 2002).

As estirpes apresentaram, em comum, genes que pertencem ao grupo *cry1*, demonstrando mais uma vez que é freqüente a aparição de genes *cry1* nas coleções de *B. thuringiensis* estudadas e genes *cry2* que indica atividade tóxica a insetos da ordem Lepidoptera (BRAVO et al., 1998).

As amostras de cristais purificados em gradiente de sacarose das estirpes S550, S845, S1905 e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* mostraram, através da microscopia eletrônica de varredura que as mesmas possuem cristais bipiramidais, cubóides e esféricos. Estas formas vistas através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre atividade inseticida dos cristais de uma estirpe (LERECLUS et al., 1993).

Cristais bipiramidais podem estar associados às proteínas do tipo Cry1, que apresentam atividade contra insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera e os cristais cubóides podem estar associados com as proteínas do tipo Cry2 que

apresentam atividade contra insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. As estirpes estudadas apresentaram os mesmos cristais que a estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 utilizada como padrão, confirmando o observado por Höfte et al. (1989).

CONCLUSÕES

Das 1375 estirpes de *B. thuringiensis* armazenadas no Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 5 estirpes foram selecionadas e caracterizadas, sendo que destas 3 estirpes serão utilizadas como base em estudos para a produção de bioinseticidas para o controle de larvas de *A. gemmatilis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONSON A. I., BECKMAN W., DUNN P.. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, v. 50, p. 1-24, 1986.

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

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 60, p. 353-356, 1994.

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, DC, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 26 nov. 2002.

DE-SOUZA, M. T.; LIMA, M. I.; SILVA-WERNECK, J. O.; DIAS, J. C. S.; RIBEIRO, B. M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v. 23, n. 1, p. 43-49, 1999.

EDWARDS D. L., PAYNE J., SOARES G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application**, EP 0 303 426 A2, 1988.

FEITELSON J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY, 27., 1994, Montpellier, France. **Proceedings...** [Montpellier, France: Society for Invertebrate Pathology, 1994]. p. 184.

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

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

IBARRA, J; RINCON, C; ORDÚZ, S; BENINTENDE, G; MONNERAT, R; REGIS, L; SÁNCHEZ, J; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquitoes species. **Journal of Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5269-5274, 2003

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

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M-M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Toxins and Genes. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*: an environmental biopesticide: theory and practice**. West Sussex, England: J. Wiley, 1993. p. 37-69.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **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).

MOSCARDI, F.; SOUZA, M. L. de. Baculovirus para o controle de pragas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 24, p. 22-29, 2002.

PRATISSOLI, D. **Pragas e doenças**. Disponível em: <http://200.252.165.4/agrofit/Probl_Fitossanit/PragaseDoencas/Index.htm>. Acesso em: 21 set. 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: CSHL, 1989.

SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Metodologia de criação de insetos para a avaliação de agentes entomopatogênicos**. 2001. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M. G. de A.; BATISTA, R. B.; PIRES, C. V.; XAVIER, L. P. PIOVESAN, N. D.; de OLIVEIRA, J. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* HÜBNER). **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n. 1, p 67-74, 2002.

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