

PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera frugiperda* (Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera frugiperda*)

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
Diretor Presidente

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

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 81

**PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis*
tóxicas a *Spodoptera frugiperda* (Screening of *Bacillus*
thuringiensis strains toxic to *Spodoptera frugiperda*)**

A. Batista

V. Melatti

C. Demo

E. Martins

L. Praça

A.C.M.M. Gomes

R. Falcão

C. Brod

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) 3348-4739 Fax:

(61) 3340-3666 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteadó*

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 Lara Pereira Machado*

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

1ª edição

1ª impressão (2005):

P 966 Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *spodoptera frugiperda* (Screening of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera frugiperda*) / A. Batista ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

19 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 81)

1. *Bacillus thuringiensis* – bioinseticida - *Spodoptera frugiperda*. 2. *Spodoptera frugiperda* - lagarta do cartucho do milho. 3. *Spodoptera frugiperda* – controle biológico. 4. *Bacillus thuringiensis* – seleção de estirpes. 5. *Bacillus thuringiensis* – caracterização de estirpes. I. Batista, A. II. Série.

632.96 – CDD 21.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract.....	8
Introdução.....	9
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Conclusões	18
Referências Bibliográficas	18

PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* TÓXICAS A *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

A. Batista¹

V. Melatti²

C. Demo¹

E. Martins³

L. Praça⁴

A.C.M.M. Gomes⁵

R. Falcão⁵

C. Brod⁶

R.G. Monnerat⁷

Resumo

Spodoptera frugiperda, conhecida como a lagarta do cartucho do milho é um inseto polífago que ataca diversas culturas, como milho, algodão e arroz. Bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* vem apresentando um resultado satisfatório no controle de lepidópteros, no entanto não existe nenhuma formulação específica para controle desta praga. Este trabalho teve como objetivo a seleção e caracterização de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. frugiperda*. Foram utilizadas 1375 estirpes pertencentes ao Banco de Germoplasma de *Bacillus* Entomopatogênicos da Embrapa Recursos

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.

Genéticos e Biotecnologia. As estirpes S550, S845 e S1905 foram as mais tóxicas entre todas as analisadas. Essas estirpes apresentaram proteínas de 130 e 65 kDa., presença de cristais bipiramidais, cubóides e esféricos e diferentes composições de genes cry. Essas 3 estirpes poderão ser utilizadas como base da produção de um bioinseticida para o controle de larvas de *S. frugiperda*.

SCREENING OF *BACILLUS THURINGIENSIS* STRAINS TOXIC TO *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Abstract

Spodoptera frugiperda, known as velvet caterpillar is a polyphagous insect that attacks several crops like corn, cotton and rice. Bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* present good levels of Lepidoptera control, although it does not exist a specifically formulation to control this pest. The aim of this work was to select and characterize *B. thuringiensis* strains toxic to *S. frugiperda*. 1375 strains of the collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology were used in this work. S550, S845 and S845 were the most toxic strains. These strains presented 130 and 65 kDa proteins, bipiramidal, cubical and spherical crystals and different composition of cry genes. These 3 strains could be used as a basis for a bioinsecticide to control *S. frugiperda* larvae.

Introdução

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como a lagarta do cartucho do milho é um inseto polífono que ataca diversas culturas, como milho, algodão e arroz (CRUZ et al., 1999). A severidade do ataque dessa praga vem aumentando em algumas áreas, podendo chegar até a 60% de redução no rendimento de grãos (CRUZ et al., 1999; MEREGE, 2001). *S. frugiperda* provoca danos em todos seus ínstares. Em estádios iniciais, as lagartas apenas raspam as folhas, nos mais avançados podem destruí-las, reduzindo a área fotossintética e afetando o rendimento da produção (MEREGE, 2001).

A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável e bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* vem apresentando um resultado satisfatório no controle de lepidópteros. *B. thuringiensis* é uma bactéria cosmopolita (KRYWUNCZYK e FAST, 1980) sendo encontrada em diversos substratos como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados. As células desta bactéria têm forma de bastonete de 1 a 1,2 μm por 3 a 5 μm (HABIB e ANDRADE, 1998), é Gram positiva e aeróbia, podendo facultativamente crescer em anaerobiose no intervalo de 10 a 40°C. Como característica marcante, esse microorganismo sintetiza inclusões protéicas cristalinas quando em esporulação (MONNERAT e BRAVO, 2000). Estas inclusões são formadas por δ -endotoxinas, também denominadas proteínas Cry que apresentam ação extremamente tóxica a diversas ordens de insetos (MONNERAT e BRAVO, 2000). O peso molecular das δ -endotoxinas pode variar entre 27 e 140 kDa (SCHNEPF et al., 1998) e podem se apresentar nas formas piramidal, bipiramidal, redonda, cúbica e retangular. Esses cristais vistos através de exames microscópicos podem fornecer indicações sobre atividade inseticida das estirpes. Cristais bipiramidais geralmente estão associados à proteínas Cry1, cristais cubóides, à proteínas Cry2 e a morfologia de cristais relativos à proteínas Cry9 pode variar (MONNERAT e BRAVO, 2000; HABIB e ANDRADE, 1998).

As proteínas Cry estão subdivididas em 45 classes (www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore), sendo que as pertencentes aos grupos Cry1, Cry2 e Cry9 estão relacionadas à toxicidade a lepidópteros.

Uma das vantagens do emprego do *B. thuringiensis* é a sua ação restrita a insetos-alvo, não afetando o ser humano e não danificando o meio ambiente. Cerca de 50.000 estirpes desta bactéria já foram identificadas e laboratórios do mundo todo vêm trabalhando na tentativa de descobrir novas estirpes que possuam novas toxinas (MONNERAT e BRAVO, 2000). A efetividade de estirpes para o controle de lepidópteros é variável para cada espécie de inseto. Existem poucos relatos da susceptibilidade de *S. frugiperda* ao *B. thuringiensis*, assim são necessários novos estudos visando o isolamento de novas estirpes para o controle deste inseto.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia tem realizado diversos testes com o intuito de encontrar e caracterizar estirpes com maior patogenicidade, 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 *S. frugiperda*.

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. Essas 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, 30°C, durante 48 a 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 *S. frugiperda*.

As larvas de *S. frugiperda* foram obtidas na criação massal estabelecida desde 1989 na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (SCHMIDT et al., 2001). As lagartas foram criadas em dieta artificial, em insetário regulado a

temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2$, umidade relativa de $70\% \pm 5$ e fotoperíodo de 14/10. 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 copulavam e ovipositavam no papel, reiniciando o ciclo.

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

Os bioensaios seletivos foram realizados espalhando-se $35\mu\text{l}$ da cultura de cada estirpe cultivada em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), em incubador rotativo a 200rpm, 30°C , durante 48 a 72h (até completa esporulação) na dieta distribuída previamente em placas de cultivo de células com 24 poços. Após a absorção da cultura pela dieta, uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a bactéria, como testemunha. As placas foram devidamente fechadas com tampas de acrílico e ligas elásticas. A incubação dos bioensaios foi realizada nas mesmas condições de criação dos insetos. A primeira leitura foi feita 48h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram passadas para copinhos de plástico de 50mL, contendo dieta livre do bacilo. No sétimo dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura. As larvas não foram colocadas em grupos devido ao seu hábito canibal (MONNERAT et al., 2001). Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de Probits (FINNEY, 1971) e a concentração letal foi determinada.

O bioensaio de dose foi realizado com as estirpes liofilizadas. Para isso cada uma foi cultivada por 72h em meio NYSM. O material crescido foi centrifugado a 10.000 rpm por 30min, a 4°C , congelado por 16 horas 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

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 desenhados para os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*.

O par de oligonucleotídeos específicos *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 primers *gral-cry2* (IBARRA et al., 2003) e para identificação de genes do grupo *cry9* foram utilizados os pares de oligonucleotídeos específicos *spe-cry9A*, *spe-cry9B* e *spe-cry9C* (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 2µL de DNA de cada amostra para um tubo de polipropileno contendo 12,5µM de cada oligonucleotídeos específicos, 100mM de dNTP mix, tampão de Taq 10x e 2,5U de Taq DNA polimerase (5,0U) em um volume total de 40µL. 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 (1991), a partir de material crescido em meio NYSM por 72h a 200 rpm e 30°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 e Discussão

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, 26 causaram 100% de mortalidade em bioensaios seletivos e foram selecionadas para o bioensaio de dose (Tabela 2).

As estirpes S0550, S0845, e S1905 foram as mais tóxicas contra *S. frugiperda*. A estirpe S1905 foi a mais eficaz, apresentando a maior toxicidade entre todas estirpes analisadas.

Tabela 2. Resultados dos bioensaios de dose contra *S. frugiperda*.

Estirpes	LD 50 (ng/cm²)	Intervalo de confiança (ng/cm²)
S0093	2210,51	987,38-18367,99
S0112	258,46	130,25-1017,60
S0166	525,67	361,92-754,42
S0234	90,24	39,32-144,30
S0550	2,71	2,05-3,37
S0711	103,92	51,29-532,67
S0764	232,36	116,92-358,26
S0811	184,65	144,40-244,11
S0844	1118,64	379,21-68314,84
S0845	2,43	1,062-3,01
S0906	1178,67	562,38-5938,46
S0907	3513,57	1544,34-23685,81
S0908	726,16	520,80-1134,57
S0997	525,70	387,22-699,79
S1269	60,26	34,87-135,26
S1533	105,81	38,97-222,50
S1537	168,92	79,97-1329,88
S1538	618,44	389,50-1312,77
S1539	361,42	197,27-772,31
S1540	197,42	101,15-527,72
S1548	246,70	46,27-501,19
S1549	736,10	421,11-1750,99
S1551	82,06	19,71-176,05
S1876	1616,42	490,84-341985,68
S1905	1,87	0,38-0,37
S2003	51,91	26,96-78,40
Btk	28,52	20,15-41,89

Caracterização protéica e molecular: Todas as estirpes tóxicas a *S. frugiperda* apresentaram perfil protéico de 130 e 65 kDa., semelhante ao padrão, *B. thuringiensis kurstaki* (Figura 1). A caracterização molecular dessas estirpes mostrou a presença dos grupos de genes *cry1* e *cry2* naturalmente esperada em estirpes efetiva contra lepidópteros (Tabela 3). A estirpe S1905, que apresentou maior toxicidade, apresentou o mesmo perfil gênico que o padrão *B. thuringiensis kurstaki*. É possível que os promotores desses genes nesta estirpe sejam mais ativos que no padrão ou que os genes, embora detectados como sendo do mesmo grupo, apresentem pequenas diferenças. Pode ser ainda que esta estirpe possua alguma outra toxina, diferente das descritas. As estirpes S550 e S845 apresentaram composição gênica diferente entre si e entre a S1905 e o padrão. Esses genes, entretanto estão presentes nessas duas últimas estirpes.

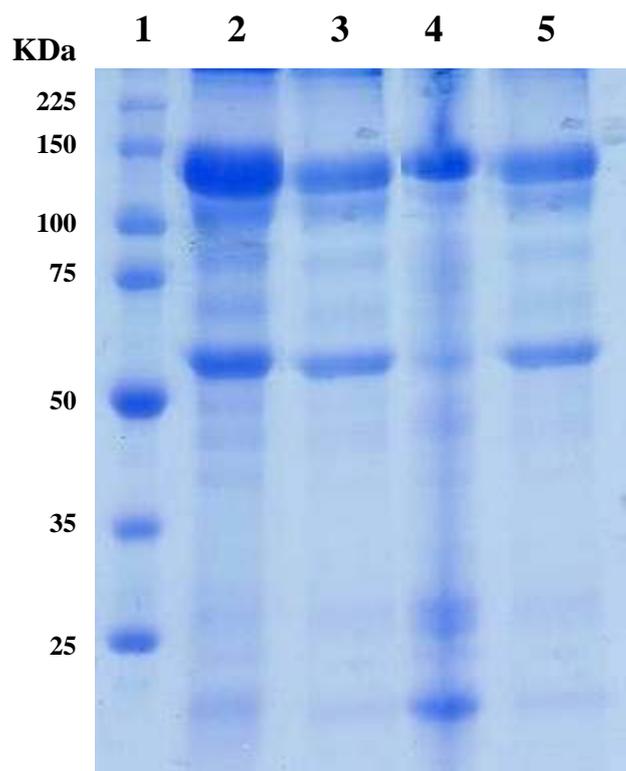


Figura 1: Gel de SDS - PAGE 10% das estirpes estudadas. 1- Marcador de peso molecular, 2- Btk, 3- S550, 4- S845, 5-S1905.

Tabela 3. Caracterização molecular das estirpes com maior efetividade contra os insetos testados.

Estirpes	Caracterização molecular
550	<i>cry1Ab</i> e <i>cry2</i>
845	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>
1905	<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 possuem cristais bipiramidais, cubóides e esféricos, semelhantes aos observados na estirpe padrão *B. thuringiensis subsp. kurstaki* (Figura 2).

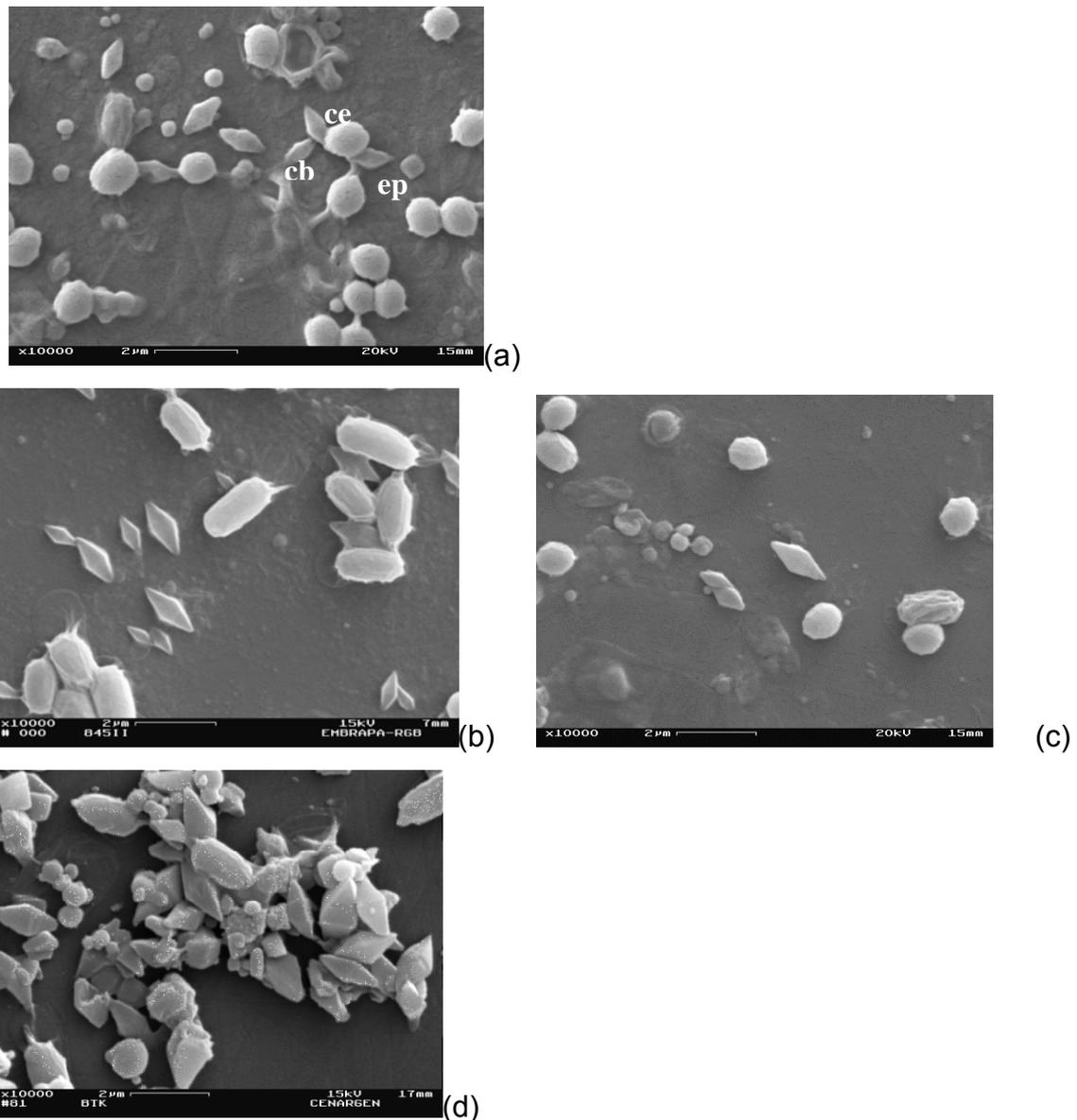


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporos-cristais das estirpes de *Bacillus thuringiensis* S550 (a), S845 (b), S1905 (c) e *B. thuringiensis subsp. kurstaki* HD-1 (d). ce: cristal esférico; cb: cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide, ep: esporo.

Conclusões

Das 1375 estirpes de *B. thuringiensis* armazenados no Banco de Germoplasma da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 3 estirpes foram selecionadas e caracterizadas para serem utilizadas como base da produção de um bioinseticida para o controle de larvas de *S. frugiperda*.

Referências Bibliográficas

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

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. S.; MATOSO, M. J. **Controle biológico de Spodoptera frugiperda utilizando o parasitóide de ovos Trichogramma**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1999. 40 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 30)

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

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.

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

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 36, p. 139-140, 1980.

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

MEREGE, W. H. **Milho (*Zea mays L.*)**. Disponível em: <<http://www.agrobyte.com.br/milho.htm>>. Acesso em: 4 maio 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. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000. v. 3, p. 163-200.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. **Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 p.

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

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, US, v. 62, p. 775-806, 1998.

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

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