

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES *cry3*,
vip1, *vip2* E *vip1/vip2* EM ISOLADOS DE *Bacillus*
thuringiensis E TOXICIDADE EM LARVAS DE
Anthonomus grandis (BOHEMAN, 1883) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Meire de Cássia Alves
Bióloga

Jaboticabal – São Paulo - Brasil
Fevereiro de 2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES *cry3*,
vip1, *vip2* E *vip1/vip2* EM ISOLADOS DE *Bacillus*
thuringiensis E TOXICIDADE EM LARVAS DE
Anthonomus grandis (Boheman, 1883) (COLEOPTERA:
CURCULIONIDAE)**

Meire de Cássia Alves

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Co-orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro de 2011

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MEIRE DE CÁSSIA ALVES – nascida em 23 de agosto de 1984, na cidade de São Gotardo – MG. Ingressou no curso de Ciências Biológicas em agosto de 2004 (Licenciatura Plena e Bacharelado) pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia - MG, obtendo o título de Bióloga em dezembro de 2008. Durante a graduação, foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET), vinculado à Secretaria de Educação Superior do Ministério da Educação (SESu/MEC). Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Jaboticabal, desenvolvendo a pesquisa da dissertação como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Recentemente, foi aprovada no Curso de Doutorado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, com início em março de 2011.

“Há uma ligação em tudo. (...) Isto sabemos: a Terra não pertence ao homem; o homem pertence à Terra. Isto sabemos: todas as coisas estão ligadas, como o sangue que une uma família. (...) O que ocorre com a terra recairá sobre os filhos da terra. O homem não teceu o tecido da vida: ele é simplesmente um de seus fios. Tudo o que fizer ao tecido, fará a si mesmo.(...)”

Cacique Seattle, 1855 (EUA)

À Deus!

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará. (...) Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias.”

Salmo 23

À minha amada e extraordinária Família! Razão da minha vida...

***“E se por acaso a dor chegar
Ao teu lado vão estar
Pra te acolher e te amparar
Pois não há nada como um Lar”***

Anjos de Resgate

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, por ter fornecido todas as condições para que este trabalho fosse desenvolvido.

À minha orientadora Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, por confiar em mim e acreditar no meu trabalho. Por todo apoio e entendimento! Muito obrigada!!!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, por todo o aprendizado, ensinamento, auxílio e confiança depositados!

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos pelo apoio e atenção dedicados.

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraudo pela execução e auxílio nas análises estatísticas realizadas no trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro pela importante contribuição na avaliação deste trabalho.

À Eliane Cristina da Cunha Alves (“Li”), pelo auxílio, consideração, eficiência e apoio indispensável para a realização desta pesquisa.

Aos colegas do LGBBA, pela receptividade, amizade e por todo o convívio de laboratório ao longo do meu mestrado.

À todos os professores e funcionários da Universidade, destacando os integrantes do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, em especial ao Aldo, Ivana e Lucinda, pela dedicação, apoio e alegria nos serviços prestados.

Às pesquisadoras da EMBRAPA – CENARGEN, Dra. Rose Gomes Monnerat e a Dr. Érica Soares Martins, por terem aberto as portas do Laboratório para que pudesse finalizar meus trabalhos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e a Dr. Sandra Regina Magro, pelo auxílio e disponibilidade e por terem proporcionado a oportunidade de realização do biensaio no Laboratório de Entomologia e Acarologia da ESALQ.

À pesquisadora Dra. Simone Cristina Picchi pelo auxílio e sugestões prestadas na utilização do programa “ARLEQUIN”.

À CAPES, por ter proporcionado as condições financeiras necessárias para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas de Laboratório Anita, Jú Rossi, Gaby!! Pela amizade, companheirismo, confiança e longas horas de bate papo!! Muito obrigada!!

Às meninas da “República” e aos amigos que fiz em Jaboticabal! Por todos os momentos de alegrias, tristezas, festas, distrações, bate papo! Obrigada!

À tia Sybelli, minha grande amiga para todas as horas e lugares! Sempre me orientando e aconselhando... Muito obrigada pela confiança, orações e torcida!!

Às minhas grandes e eternas amigas Carol e Dali!! Pelos anos de amizade, pela irmandade sempre presente, pelas alegrias compartilhadas, lágrimas divididas e cumplicidade. Vocês são imprescindíveis na minha vida!! Amo muito vocês!!

À minha família (meus pais: Nascimento e Divina; meus irmãos: Marco, Márcio e Márcia; meus amados sobrinhos/afilhados) pelo apoio e dedicação sempre oferecidos! Obrigada pela confiança e por acreditarem em mim, quando nem eu mesma acreditei... Vocês são tudo na minha vida!! Amo muitooo vocês!!

SUMÁRIO	Página
RESUMO	x
SUMMARY	xi
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1- Bactérias entomopatogênicas	4
2.2- <i>B. thuringiensis</i> visando ao controle de insetos-praga	6
2.3 - Modo de ação das toxinas inseticidas de <i>B. thuringiensis</i>	8
2.3.1 - δ -endotoxinas (Proteínas Cry e Cyt)	9
2.3.1.1 - Modo de ação das proteínas Cry	11
2.3.2 - VIP (Proteína Inseticida Vegetativa)	14
2.3.3 - α -exotoxina	15
2.3.4 - β -exotoxina	16
2.4 - Caracterização dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> utilizando marcadores moleculares	17
2.5 - Cotonicultura e a espécie <i>Anthonomus grandis</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 - Isolados de <i>B. thuringiensis</i> e condições de cultivo	22
3.2 - Extração do DNA total de <i>B. thuringiensis</i>	23
3.3 - Identificação dos genes <i>cry3</i> , <i>vip1</i> , <i>vip2</i> e <i>vip1/vip2</i> por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	24
3.3.1- Oligonucleotídeos iniciadores gerais	24
3.3.2 - Identificação dos genes <i>cry3</i> , <i>vip1</i> , <i>vip2</i> e <i>vip1/vip2</i> por PCR	25
3.4 - Caracterização dos genes <i>cry3</i> , <i>vip1</i> , <i>vip2</i> e <i>vip1/vip2</i> por PCR- RFLP	26
3.5 - Obtenção das proteínas Cry3, Vip1, Vip2 e Vip1/Vip2 de <i>B.</i> <i>thuringiensis</i>	28

3.6 - Bioensaio de toxicidade em larvas de <i>A. grandis</i>	30
3.6.1 - Criação de <i>A. grandis</i>	30
3.6.2 - Bioensaio seletivo	31
3.7 - Análise estatística dos dados	32
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 - Identificação dos genes <i>cry3</i> , <i>vip1</i> , <i>vip2</i> e <i>vip1/vip2</i> por PCR	34
4.2 - Caracterização dos genes <i>cry3</i> , <i>vip1</i> , <i>vip2</i> e <i>vip1/vip2</i> por PCR- RFLP	38
4.3 - Análise estatística dos dados	41
4.4 - Bioensaio de toxicidade em larvas de <i>A. grandis</i>	44
5 - CONCLUSÕES	50
6 - REFERÊNCIAS	51

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES *cry3*, *vip1*, *vip2* E *vip1/vip2* EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* E TOXICIDADE EM LARVAS DE *Anthonomus grandis* (BOHEMAN, 1883) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

RESUMO - O controle biológico utilizando microrganismos vem sendo estudado como uma alternativa ao uso de agroquímicos. Estes pesticidas poluem o ambiente, além de serem tóxicos a diversas espécies vegetais e animais. Diante disso, a bactéria *Bacillus thuringiensis* é um importante entomopatógeno que vem sendo utilizado na agricultura pelo fato de secretar proteínas que são tóxicas a insetos pertencentes a diversas ordens. Dentre os diversos genes de *B. thuringiensis* que codificam proteínas tóxicas, as classes *vip1*, *vip2* e *cry3* destacam-se como alternativa para o controle de insetos-praga da ordem Coleoptera. O presente trabalho objetivou a identificação e caracterização molecular, por meio da técnica de PCR-RFLP, dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* em uma coleção de *B. thuringiensis*, quanto a possíveis polimorfismos existentes, procurando relacioná-los à toxicidade em larvas de *Anthonomus grandis*. Da análise de 1078 isolados de *B. thuringiensis*, foram encontrados 151 isolados positivos para os genes em estudo e 14 perfis polimórficos, indicando a presença de subclasses destes genes. Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade indicam que os polimorfismos gênicos podem apresentar interferência na toxicidade das proteínas, sendo que a toxina Cry3 apresentou uma maior efetividade na mortalidade em larvas de *A. grandis*. Os resultados também evidenciaram que a PCR-RFLP mostrou-se apropriada para a detecção da variabilidade genética em *B. thuringiensis*, permitindo a identificação de haplótipos.

Palavras-chave: PCR-RFLP, proteínas inseticidas, bicudo do algodoeiro

**IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF *cry3*, *vip1*, *vip2* AND
vip1/vip2 GENES IN *Bacillus thuringiensis* ISOLATES AND TOXICITY IN
Anthonomus grandis (BOHEMAN, 1883) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)
LARVAE**

SUMMARY - Biological control using microorganisms is being studied as an alternative to the use of agrochemicals. These pesticides pollute the environment, being toxic to many species of plants and animals. For these reasons, the bacterium *Bacillus thuringiensis* is an important entomopathogen that has been used in agriculture, once it produces proteins that are toxic to many target insect orders. Among several genes from *B. thuringiensis* that encode toxic proteins there are *vip1*, *vip2* and *cry3* classes that stand as an alternative for controlling insect pests belonging the Coleoptera order. The objective of this work was to identify and characterize molecularly, through PCR-RFLP, the genes *cry3*, *vip1*, *vip2* and *vip1/vip2* in a collection of *B. thuringiensis*, for possible polymorphisms exist, trying to relate them to the toxicity in *Anthonomus grandis* larvae. Analysis of 1078 isolates of *B. thuringiensis*, were found 151 positive isolates for the genes under study and 10 polymorphic profiles, which indicate the presence of subclasses of the genes. These results obtained in tests toxicity indicate that polymorphisms gene may have interference with the toxicity of the protein, and the toxin Cry3 showed a greater effectiveness in mortality in *A. grandis* larvae. These results also showed that the PCR-RFLP proved to be suitable for the detection of genetic variability in *B. thuringiensis*, allowing the identification of haplotypes.

Keywords: PCR-RFLP, insecticidal proteins, boll weevil

1. INTRODUÇÃO

O crescimento acelerado da população mundial e conseqüentemente o aumento na demanda por alimentos vêm impulsionando o incremento da agricultura para atender às necessidades agrícolas, por meio do aumento da produção e especialmente da produtividade. Entretanto, uma das dificuldades que a agricultura enfrenta e que contribui para a diminuição da sua produtividade é o ataque de insetos fitófagos. Inúmeras espécies de insetos causam algum tipo de dano às plantações, correspondendo a perdas da ordem de 20 a 30% da produção mundial (ESTRUCH et al., 1997; HERRERA-ESTRELLA, 1999; SILVA-FILHO & FALCO, 2000; MORAES, 2010).

Os métodos de controle de pragas na agricultura baseiam-se na utilização de inseticidas químicos. Cerca de 3,7 milhões de toneladas de pesticidas são consumidos anualmente, quantidade projetada para 10 milhões de toneladas/ano em 2050. O Brasil encontra-se em 5º lugar no ranking de maior consumidor de pesticidas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

No entanto, devido aos efeitos adversos, que têm causado sérios problemas ao ecossistema, estes produtos despertam maiores preocupações. Tais inseticidas são altamente tóxicos e de amplo espectro de ação, com graves

consequências ao homem e ao meio ambiente, podendo causar também a seleção de populações de insetos resistentes (PINTO & FIUZA, 2008).

Devido a estes fatores, a busca por métodos alternativos de controle de insetos, que possam reduzir ou até mesmo substituir os inseticidas convencionais vem crescendo de forma considerável e, atualmente, as novas técnicas abrangem plantas geneticamente modificadas, inseticidas seletivos, parasitóides e microrganismos entomopatógenos.

Inseticidas biológicos são utilizados há vários anos para o controle de pragas agrícolas e são considerados uma excelente alternativa ao uso de agroquímicos por representarem uma alternativa mais sustentável. Dentre os organismos empregados no controle biológico, a bactéria *Bacillus thuringiensis* destaca-se por apresentar excelente potencial entomopatogênico, podendo ser utilizada no controle de insetos-alvo, especialmente aqueles da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Esta bactéria é atualmente responsável pelo mercado de 90-95% de bioinseticidas, apresentando também a vantagem de possibilitar o isolamento e expressão de suas proteínas em outros organismos por meio da transgenia (POLANCZIK, 2004; FERRY et al., 2006).

A principal característica de *B. thuringiensis* (*Bt*) é a produção de cristais inseticidas durante a esporulação. Estes cristais consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, denominados *cry*. Outras proteínas inseticidas posteriormente descritas são denominadas de proteínas inseticidas vegetativas (*Vip*) e têm alta especificidade contra lepidópteros (*Vip3*) e coleópteros (*Vip1* e *Vip2*) (ESTRUCH et al., 1997), e caracterizam-se por serem sintetizadas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria e por não apresentarem homologia com as proteínas *Cry*.

No entanto, para serem tóxicas aos organismos alvo, as toxinas de *B. thuringiensis* precisam ser ativadas. O mecanismo de ação está relacionado à solubilização das proteínas *Cry* no meio alcalino do intestino dos insetos suscetíveis. As protoxinas são convertidas em fragmentos tóxicos pela ação de enzimas digestivas e esse processo resulta na liberação de fragmentos tóxicos

que posteriormente, ligam-se a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal levando a formação de poros e ao desequilíbrio osmótico da célula (FIUZA, 2004; BRAVO et al., 2007). Dessa forma, o inseto tem sua alimentação paralisada, levando-o à septicemia e conseqüentemente, à morte.

Nos últimos anos, a caracterização e a identificação de genes potenciais de *B. thuringiensis* têm sido realizadas por meio de diversas técnicas de biologia molecular. A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *Bt* é estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que tem como característica a amplificação exponencial de uma determinada sequência de ácido nucleico *in vitro*, através da utilização de oligonucleotídeos iniciadores (FATORETTO, 2002; NARIMAN, 2007; PINTO & FIUZA, 2008).

Porém, as interações entre as proteínas produtoras de cristal podem afetar intensamente a toxicidade de um isolado. Assim, os testes de toxicidade complementam a caracterização e podem inferir seu real potencial no controle dos insetos-alvo.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo a identificação, por meio da técnica de PCR, dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* (coleóptero-específicos) a partir de uma coleção de 1078 isolados de *B. thuringiensis*, oriundos de diferentes regiões brasileiras e verificar a possível ocorrência de polimorfismos de nucleotídeos nestes genes, por meio da técnica de PCR-RFLP. Posteriormente, buscou-se associar estes polimorfismos à eficiência da mortalidade em larvas de *Anthonomus grandis* (Boheman, 1883) (Coleoptera: Curculionidae), por meio de bioensaio seletivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Bactérias entomopatogênicas

No final do século XIX, as toxinas bacterianas com potencial atividade inseticida para o controle de insetos-praga e vetores de doenças foram casualmente descobertas, por meio das investigações das doenças que ocorriam nas criações de abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Atualmente, são conhecidas inúmeras espécies de bactérias associadas a insetos, porém, poucas apresentam as características desejáveis à aplicação no controle biológico de pragas.

Dentre as diferentes formas de classificação das bactérias entomopatogênicas, os critérios adotados por FALCON (1971) são os mais utilizados pelo fato de agruparem as bactérias em apenas duas categorias: esporulantes (formam estruturas de resistência) e não-esporulantes (não sintetizam estruturas de resistência), destacando-se com maior importância à patologia de insetos as espécies do gênero *Bacillus* (COSTA et al., 2010).

Este gênero apresenta várias características que colocaram suas espécies entre os agentes mais utilizados no controle de insetos-praga (MELLATI, 2008). Em geral, espécies do gênero *Bacillus* encontram-se em substratos variáveis devido ao complexo enzimático produzido pelas células em forma de bastonetes. As características entomopatogênicas associadas à formação de endósporos e a produção de toxinas determinam a espécie *Bacillus thuringiensis* Berliner como a mais relevante no controle de entomopatógenos (COSTA et al., 2010) (Figura 1).

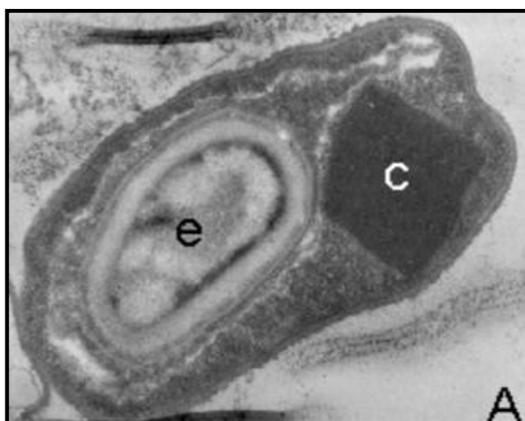


Figura 1. *B. thuringiensis* em microscopia eletrônica (COSTA et al. 2010). e - Esporo; c - Cristal bipiramidal.

Com relação aos agentes de controle biológico utilizados no controle de insetos-praga, produtos à base de *B. thuringiensis* correspondem a cerca de 90% dos bioinseticidas comercializados mundialmente e são utilizados há mais de trinta anos. Neste sentido, destaca-se o produto Dipel® (*B. thuringiensis kurstaki* HD-1), que é altamente eficiente para 170 espécies de lepidópteros-praga, sendo pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). As principais limitações destes produtos são a concorrência com produtos químicos e a falta de investimentos dos setores públicos e privados para o desenvolvimento e formulação dos bioinseticidas (POLANCZYK, 2003).

2.2- *B. thuringiensis* visando ao controle de insetos-praga

Dentre as bactérias de importância econômica empregadas no controle de pragas, a bactéria *B. thuringiensis* (*Bt*) destaca-se por apresentar atividade tóxica contra insetos de diversas ordens, incluindo pragas de grande importância agrícola como *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) e *A. grandis* e também vetores de doenças de importância mundial pertencentes aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (LERECLUS et al., 1993), além de serem patogênicos a outros organismos como nematóides e platelmintos (FEITELSON et al., 1992).

O primeiro relato desta bactéria como agente causal de doenças em insetos data de 1902, quando o biólogo S. Ishiwata, no Japão, isolou uma bactéria esporulante que causava mortalidade em bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), sendo esta denominada como “sotto-disease”. Em 1911, Berliner descreveu pela primeira vez um bacilo isolado a partir de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) e, em 1915, o batizou de *Bacillus thuringiensis*, nome concedido em homenagem a província da Thuríngia (Alemanha) (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000).

Os primeiros ensaios utilizando *B. thuringiensis* foram realizados na Europa entre os anos de 1920 e 1930, no controle de *Ostrinia nubilalis*, lepidóptero da família Pyralidae. Nos Estados Unidos e na Europa, entre os anos de 1930 e 1940, numerosos testes foram realizados contra outras espécies de lepidópteros. Atualmente, no caso do controle biológico, é o microrganismo mais utilizado mundialmente (COSTA et al., 2010).

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada em solos, insetos mortos, plantas e em produtos armazenados (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000), quimioheterotrófica, cuja temperatura ideal de crescimento é em torno de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Suas células vegetativas possuem forma de bastonete, medindo cerca de 1,0 a 2,0 μm de

largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento. É uma bactéria geralmente móvel, possuindo flagelos peritríquios. Sob condições específicas, em geral desfavoráveis ao seu crescimento, desenvolve um ciclo de esporulação típico dos bacilos (MORAES & CAPALBO, 1986).

Características como alta especificidade para insetos, efeito não poluente para o meio ambiente, inocuidade aos mamíferos e outros vertebrados, ausência de toxicidade às plantas além de ser altamente biodegradável fez de *B. thuringiensis* o principal agente de controle microbiano. Diante disso, este entomopatógeno torna-se uma alternativa segura, econômica e ecologicamente viável no controle de insetos-praga de importância agrícola, bem como de importantes vetores de doenças humanas (BRAVO et al., 2005).

O maior avanço na utilização de *B. thuringiensis* tem sido a transformação de diversas cultivares agrícolas visando a expressão das toxinas *Bt*. A partir dos anos 80, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas por meio da incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* na cultura do tabaco e do tomate (OELLER et al., 1991; DIAS, 1992). Desde 1996, a importância comercial destas cultivares transformadas tem crescido de forma considerável, levando-as a ocuparem mundialmente o segundo lugar entre as plantas geneticamente modificadas com maior emprego e distribuição (CRICKMORE, 2006).

As cultivares modificadas com genes *Bt* ("plantas-*Bt*"), apresentam inúmeros benefícios em relação aos formulados de *B. thuringiensis*. Não necessitam de pulverização foliar para o controle dos insetos-alvo, já que a toxina é expressa de forma constitutiva pela própria planta. Além disso, diminuem a quantidade de inseticidas químicos liberados no ambiente, bem como os gases emitidos pelo maquinário agrícola empregado na sua aplicação (JAMES, 2006).

Os hectares cultivados mundialmente com culturas biotecnológicas alcançaram a marca dos 134 milhões em 2009 (Figura 2). Neste mesmo ano registrou-se uma área recorde de cultivo de todas as variedades biotecnológicas, destacando-se as quatro principais culturas geneticamente modificadas. Mais de três quartos (77%) dos 90 milhões de hectares de soja cultivados mundialmente já

são biotecnológicos; para o algodão, quase metade (49%) dos 33 milhões de hectares e para o milho, mais de um quarto (26%) dos 158 milhões de hectares cultivados são plantas-*Bt*; e finalmente, para a canola, estes números correspondem a 21% dos 31 milhões de hectares plantados (JAMES, 2009).

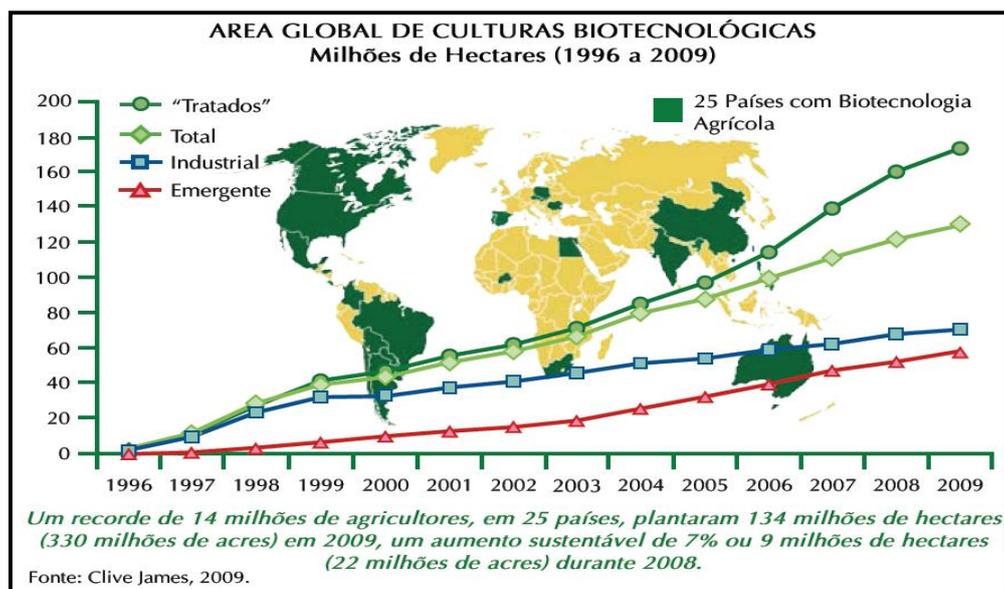


Figura 2. Área global das culturas biotecnológicas (JAMES, 2009).

Mais de 50.000 isolados de *B. thuringiensis* já foram identificados e laboratórios em todo o mundo vêm trabalhando na tentativa de descobrir isolados que apresentem novas toxinas (MONNERAT & BRAVO, 2000). A efetividade dos isolados para o controle de entomopatógenos é variável para cada espécie de inseto. A virulência da bactéria depende das suas diferentes características fisiológicas: produção de toxinas e enzimas, taxa de crescimento e multiplicação, adequação do hospedeiro e suscetibilidade (HABIB & ANDRADE, 1998).

2.3 - Modo de ação das toxinas inseticidas de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis pode produzir várias proteínas com atividade inseticida, destacando-se as δ -endotoxinas, proteínas VIP, α -exotoxinas, β -exotoxinas,

hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HANSEN & SALAMITOU, 2000). Entretanto, o principal fator de patogenicidade atribui-se à ação das δ endotoxinas (proteínas cristal).

2.3.1 - δ -endotoxinas (Proteínas Cry e Cyt)

As δ -endotoxinas, também denominadas proteínas Cry (Figura 3) e Cyt, pertencem a uma classe de proteínas bacterianas conhecidas como toxinas formadoras de poros (TFP), que são solúveis em água, permitindo modificações conformacionais para permitir a inserção ou o translocamento destas proteínas na membrana celular do inseto-alvo (BRAVO, 1997). As proteínas Cry ligam-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades do intestino médio dos insetos, em contraste com as proteínas Cyt que não se ligam a estes receptores, inserindo-se diretamente na membrana e formando poros (SOBERÓN et al., 2006).

A maioria dos isolados de *B. thuringiensis* podem sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas. O processo de formação deste cristal está ligado à esporulação, uma vez que estudos de cristalografia mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio de esporulação e é liberado no momento em que as células são lisadas (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Vários isolados de *B. thuringiensis* também produzem outras endotoxinas, de menor peso molecular (25-28KDa), denominadas endotoxinas citolíticas (Cyt). Diferentemente das δ -endotoxinas, as toxinas Cyt possuem um maior espectro de ação contra insetos, tanto *in vivo* como *in vitro* (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Esta toxina é uma citolisina de ação inespecífica, produzida principalmente pela subespécie *B. thuringiensis israelensis*, sendo acumulada no cristal juntamente com a proteína Cry (MONNERAT & PRAÇA, 2006).

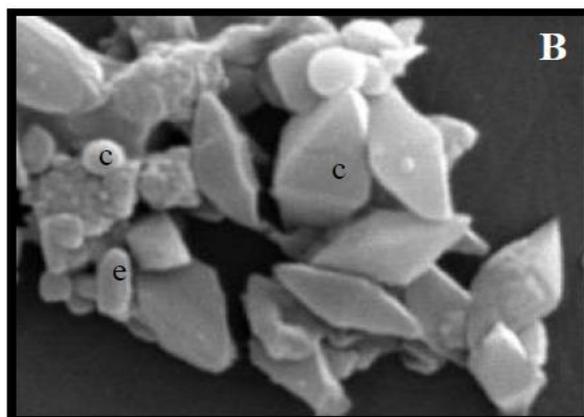


Figura 3. Morfologia de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporo (15.000X) (MARTINS, 2009).

Durante o desenvolvimento, *B. thuringiensis* passa por duas fases: a fase de crescimento vegetativo e a fase estacionária. A primeira caracteriza-se pelo crescimento exponencial das células bacterianas, momento em que há grande disponibilidade de nutrientes no meio. A fase estacionária ocorre quando o meio se torna hostil, e a bactéria adapta-se à diminuição de nutrientes mediante mecanismos genéticos, cessando a reprodução celular. Neste período, o endósporo torna-se maduro, conforme citado por PINTO & FIUZA (2008). A expressão dos genes *cry* geralmente ocorre na fase estacionária da célula, acumulando seu produto na célula-mãe, na forma de uma inclusão cristalífera, a qual é liberada ao meio no final da esporulação (LERECLUS et al., 2000). Ao final da esporulação, a inclusão corresponde a cerca de 20-30% do peso seco da célula esporulada. Apesar da expressão dos genes *cry* estar estreitamente relacionada ao evento da esporulação, existem genes que se expressam independentemente da esporulação (AGAISSE & LERECLUS, 1995), apresentando características particulares, dentre elas a não formação de cristais.

As proteínas Cry apresentam duas regiões distintas compostas por protoxinas: uma porção amino-terminal (N-terminal), normalmente variável, associada à toxicidade da proteína e uma porção carboxi-terminal (C-terminal), sendo esta conservada e associada à formação do cristal (ARANTES et al., 2002; BRAVO et al., 2005).

A estrutura tridimensional da parte ativa (N-terminal) da proteína Cry, consiste em três domínios: I, II e III. O domínio I é composto por sete α -hélices antiparalelas, responsável pela inserção na membrana e formação do poro. O domínio II é composto de três folhas β -pregueadas que, conferem a especificidade da ligação aos receptores celulares. A manutenção da estrutura da molécula pode estar relacionada com o domínio III.

2.3.1.1 – Modo de ação das proteínas Cry

O modo de ação das proteínas cristal em larvas tem sido estudado, principalmente, em lepidópteros (Figura 4). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem a sua agilidade e o tegumento adquire cor marrom-escuro. A ação dos cristais ocorre após a ingestão e solubilização em ambiente alcalino, no intestino das larvas e os sintomas observados incluem: perda do apetite, abandono do alimento, paralisia do intestino e, por fim, morte do inseto (HABIB & ANDRADE, 1998; MONNERAT & BRAVO, 2000).

As proteínas Cry apresentam-se como protoxinas sem ação entomopatogênica, necessitando ser ativadas para o desencadeamento de seus efeitos tóxicos. Logo, quando injetado diretamente na hemolinfa do inseto, o cristal protéico não possui ação tóxica (HABIB & ANDRADE, 1998).

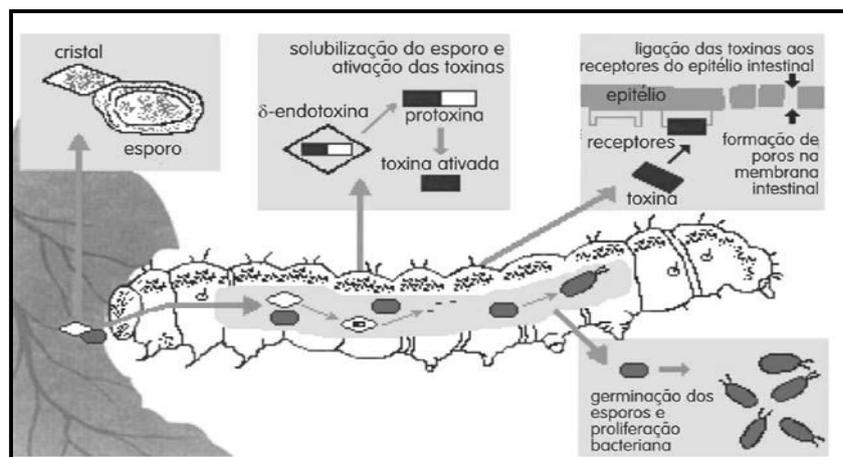


Figura 4. Mecanismo de ação de *B. thuringiensis* (WHO, 1999).

O mecanismo de toxicidade das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em várias etapas, como descrito a seguir:

A) Solubilização e processamento das toxinas

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos por larvas de insetos suscetíveis, são solubilizados no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas Cry. O intestino médio da maioria das larvas dos insetos-alvo apresenta um pH em torno de 9,5. As protoxinas precisam ser processadas por proteases intestinais, para tornarem-se ativas, liberando os polipeptídios tóxicos que são capazes de se ligar aos receptores das microvilosidades nas células colunares do intestino médio (KNOWLES, 1994). A partir de então, as protoxinas perdem a extremidade C-terminal, restando-lhes a porção N-terminal como parte ativa (fragmento tóxico) (MONNERAT & BRAVO, 2000). Parte da extremidade N-terminal pode ser clivada pela ação de metaloproteases sintetizadas pela própria bactéria durante a esporulação (RUCKMINI et al., 2000). A combinação de toxinas proteoliticamente ativadas possui um papel importante na determinação da especificidade aos insetos (HAIDER & ELLAR, 1989).

B) Reconhecimento e ligação ao receptor

Após a ativação das toxinas, ocorre a ligação aos receptores específicos localizados nas membranas celulares do intestino da larva. A união a estes sítios é uma etapa determinante na especificidade das toxinas Cry e é composta de dois passos, sendo um reversível e outro irreversível. O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e o seu sítio de união (união reversível), sendo um requisito básico para que ocorra a toxicidade, mas não o suficiente (SCHNEPF et al., 1998). A união irreversível aos receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligados com a toxicidade (MONNERAT & BRAVO, 2000).

Ainda que necessária, a união não é suficiente para determinar se uma proteína Cry será tóxica contra um determinado inseto. Mediante o estudo da interação entre toxinas Cry e BBMV (Vesículas de Membrana de Borda em Escova), tem-se determinado a especificidade das toxinas Cry em muitos insetos-alvo, levando a aplicação de estratégias que possam evitar o possível surgimento de resistência a estas toxinas (COSTA, 2009), como no caso das lagartas rosadas do algodão nos EUA (SEAB, 2011).

C) Inserção na membrana, agregação, formação do poro e citólise

Após a ligação aos receptores, a toxina Cry se une de forma rápida e irreversível à membrana das células epiteliais, com subsequente formação de poros, proporcionando um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, e, por conseguinte, a perda da integridade da membrana no intestino da larva (RABINOVITCH et al., 2000).

As toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades a cátions, ânions, água e moléculas maiores, causando alterações na permeabilidade da membrana e como consequência final, a destruição do epitélio intestinal (WOLFERSBERG et al., 1996). Uma vez que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso à hemolinfa (DU & NICKERSON, 1996), meio no qual germinam. Tais eventos conduzem à lise das células, liberação do seu conteúdo celular e, por fim, à morte do inseto por inanição e septicemia (MONNERAT & BRAVO, 2000) (Figura 5).

Segundo KNOWLES (1994), o intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos ingeridos do patógeno. Porém, as δ -endotoxinas causam paralisia intestinal, retraindo os esporos e destruindo a parede intestinal. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo seu pH e disponibilizando os nutrientes necessários para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de nutrientes para o crescimento vegetativo da bactéria (COPPING & MENN, 2000).

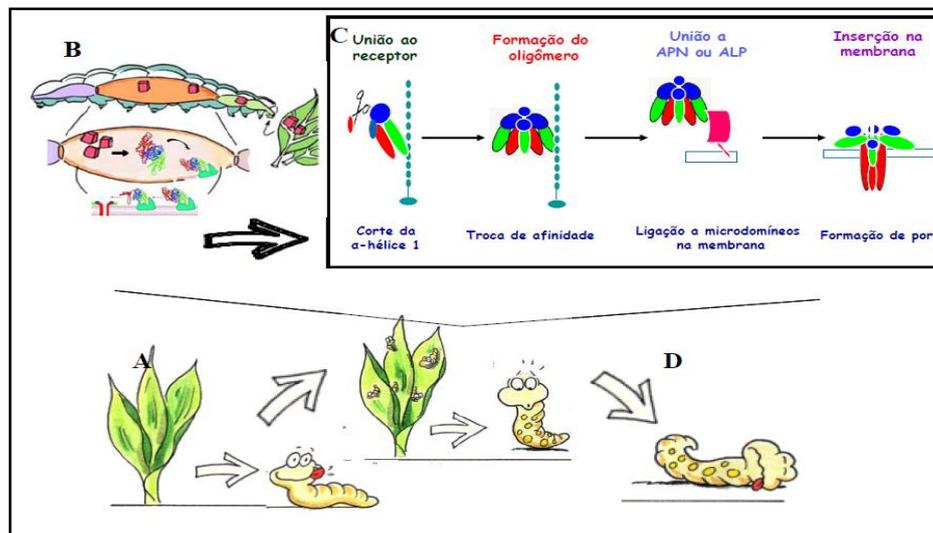


Figura 5. Esquema do modo de ação de toxinas Cry1Ac para lepidópteros. A - O inseto ingere a proteína cristal; B - no intestino médio da larva os cristais são solubilizados e ativados em proteínas monoméricas que se ligam ao primeiro receptor (caderina); C - a toxina sofre mudanças conformacionais e se liga ao segundo receptor; inserção na plataforma de lipídeos da membrana e formação do poro; D - morte do inseto (MARTINS, 2009).

2.3.2 – VIP (Proteína Inseticida Vegetativa)

As proteínas “Vip” (“Vegetative Insecticidal Proteins”) foram descritas por ESTRUCH et al. (1996) e são produzidas durante a fase de crescimento vegetativo de *B. thuringiensis*. Estas apresentam ação sobre um maior espectro de espécies de insetos quando comparadas a muitas proteínas Cry, mas principalmente, contra lagartas da ordem Lepidoptera. As proteínas Vip apresentam uma nomenclatura diferente das proteínas Cry por não formarem cristais protéicos. Os genes responsáveis pela síntese das proteínas Vip estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente com os genes *cry* (ESTRUCH et al., 1996).

As proteínas Vip não têm homologia de sequência ou estrutura com as δ -endotoxinas (RANG et al., 2005). Dentre aquelas já descritas, as proteínas Vip1 e

Vip2 apresentam 100 e 52 KDa, respectivamente, formando uma toxina binária que possui atividade contra larvas de coleópteros. Baseando-se em sua homologia com outras toxinas binárias, verifica-se que a proteína Vip1 tem a propriedade de formar canais oligoméricos ao se ligar aos receptores específicos presentes nas células do intestino médio dos insetos-alvo. Por conseguinte, a proteína Vip2 passaria por estes canais e por apresentar homologia com a ADP-ribosiltransferase, modificaria a actina inibindo sua polimerização, afetaria a estrutura do citoesqueleto, e conseqüentemente levaria a larva à morte (LEUBER et al., 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Segundo FANG et al. (2007), estas proteínas representam uma das maiores descobertas de toxinas com capacidade inseticida, sendo extremamente relevante a ausência de similaridade nas sequências de aminoácidos destas proteínas com as sequências de aminoácidos das δ -endotoxinas, especialmente, em termos de manejo e evolução da resistência.

Portanto, estudos que indicam que as proteínas Vip ligam-se em diferentes sítios nas células do epitélio intestinal de insetos-alvo, quando comparadas com as proteínas Cry, faz com que sejam excelentes candidatas para a utilização conjunta, podendo ser aplicadas para ampliar o espectro de toxicidade e minimizar o risco de resistência cruzada em organismos geneticamente modificados (BEARD et al., 2008; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

2.3.3 - α -exotoxina

A α -exotoxina, também conhecida como fosfolipase-C ou lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase é uma proteína solúvel em água, termolábil e que exige um intervalo de pH ótimo entre 6,6 e 7,4 para tornar-se ativa (ALMEIDA & FILHO, 2006).

A α -exotoxina é uma proteína que possui atividade citolítica, atuando sobre os fosfolípidios que formam as membranas celulares. Esta toxina é altamente tóxica a insetos por via oral ou via hemocélica, causando degeneração e lise de hemócitos (KRIEG, 1971).

2.3.4 - β -exotoxina

A β -exotoxina, também conhecida como thuringiensina, é uma substância termoestável em água, produzida durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. Esta substância além de ser altamente tóxica a insetos pode agir sobre alguns vertebrados (HABIB & ANDRADE, 1998).

Existem dois tipos de β -exotoxina. A β -exotoxina do tipo I, que age através da inibição de nucleotidases e impede a biossíntese de RNA. O efeito é mais visível durante as etapas de metamorfose do inseto, onde os adultos geralmente são menores e inférteis (MONNERAT & BRAVO, 2000). Desde 1970 nos EUA, a utilização de isolados de *B. thuringiensis* com alta produção desta toxina é proibida, devido à constatação de seu efeito teratogênico em intestino de bovinos e ratos (ALMEIDA & FILHO, 2006). A β -exotoxina do tipo II apresenta toxicidade superior a toxina do tipo I, principalmente para coleópteros (LEVINSON et al., 1990).

2.4- Caracterização de isolados de *B. thuringiensis* utilizando marcadores moleculares

A caracterização do conteúdo gênico de *B. thuringiensis* é apresentada como a principal motivação para a realização de amplos programas de busca de novos isolados. Cerca de 300 genes *cry* já foram sequenciados e classificados em 50 grupos e diferentes subgrupos. Mesmo considerando a variabilidade das proteínas Cry e Vip até agora descritas, ainda é extremamente necessária a busca por novas toxinas, visando ao controle de um número maior de insetos e a busca por novas alternativas para o controle da resistência (VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004).

Com a caracterização molecular é possível discriminar os diversos isolados de *B. thuringiensis* por meio do conhecimento de seus padrões de comportamento e do seu genoma (distribuição dos genes *cry* e *vip*) (FRUTOS et al., 1994).

Avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no estudo do DNA, capazes da diferenciação inter e intra-específica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem distinguir isolados, podendo também ser empregados na determinação da presença/ausência de genes de interesse (POLANCZYK & ALVES, 2003).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente utilizando técnicas que têm como base a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A técnica de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. A reação de PCR baseia-se no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a sequência de DNA de fita dupla alvo na amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas sequências de nucleotídeos sejam complementares a sequências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

A técnica de PCR é uma forma de caracterizar isolados de *B. thuringiensis* e é amplamente utilizada em estudos de detecção de novos genes *cry* e *vip* (VALICENTE et al., 2000; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004) onde os oligonucleotídeos iniciadores são desenhados a partir de regiões conservadas destes genes. Além disso, a PCR permite comparar geneticamente isolados pouco conhecidos, além de prever a atividade inseticida de uma determinada toxina (LIMA et al., 2002; PORCAR & JUAREZ-PEREZ, 2003), o que a tornou uma ferramenta de trabalho indispensável.

CAROZZI et al. (1991) utilizaram a técnica de PCR para identificar isolados de *B. thuringiensis* com atividade inseticida contra lepidópteros, coleópteros e dípteros, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry1*, *cry3* e *cry4*. Trabalhos semelhantes têm sido realizados em todo o mundo para caracterizar o perfil genético das cepas de *B. thuringiensis*, indicar a atividade inseticida das toxinas Cry e Vip e descobrir novos genes (ARRIETA et al., 2004;

VILAS-BÔAS & LEMOS, 2004; ARRIETA & ESPINOZA, 2006; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Esta técnica requer quantidades pequenas de DNA e permite uma rápida e simultânea caracterização de muitas amostras. Todavia, o procedimento normal de PCR não pré-determina exatamente a atividade inseticida do isolado, assim como outros fatores como, por exemplo, o nível de expressão dos genes presentes que estão envolvidos no potencial inseticida de cada toxina. Essa abordagem permite apenas a atribuição do gene em uma respectiva classe de proteína inseticida e não a identificação de determinados genes dentro de uma subclasse (MARTINEZ et al., 2005).

Destaca-se também entre as técnicas de marcadores moleculares para análise de diversidade genética a técnica de PCR-RFLP ou CAPS (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”). CAPS são fragmentos de DNA amplificados via PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos, seguido da clivagem com endonucleases de restrição. As etapas para a obtenção desses marcadores são a extração e amplificação de DNA via PCR, a clivagem com enzimas de restrição, eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida e a visualização dos polimorfismos pela coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta ou com prata. As principais vantagens são a co-dominância e a alta reprodutibilidade dos marcadores (FALEIRO, 2007).

A PCR-RFLP constitui-se em uma estratégia relativamente rápida e simples capaz de detectar diferenças nas sequências de DNA de diferentes indivíduos, podendo assim, possibilitar a realização de estudos de diversidade genética de regiões conservadas não específicas, como também de regiões específicas entre indivíduos de uma mesma espécie ou mesmo entre populações e espécies diferentes. A presença ou ausência de sequências específicas de quatro a oito pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, podem variar entre indivíduos, gerando assim os polimorfismos (FATORETTO, 2002) e consequentemente a identificação de possíveis alelos dos genes em estudo.

Portanto, a identificação e a caracterização de novos genes de *B. thuringiensis*, destacando-se os genes *cry* e *vip*, podem resultar em novas

alternativas para o controle de espécies de insetos com nenhuma ou pouca suscetibilidade às proteínas atualmente conhecidas, além de auxiliar no desenvolvimento de sistemas de manejo que evitem ou minimizem o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de insetos-alvo em campo (TABASHINIK et al., 1990; TABASHINIK, 1994).

2.5- Cotonicultura e a espécie *Anthonomus grandis*

A cotonicultura é uma das culturas de maior interesse econômico, a nível mundial. Na indústria têxtil, a fibra do algodão é reconhecida como a mais importante e de maior valor de mercado. O algodoeiro é a planta de aproveitamento mais completo e a que oferece a mais variada gama de produtos de utilização universal (PONCHIO, 2001; BALLAMINUT et al., 2006). A lavoura de algodão no Brasil atingiu recentemente (safra 2010/2011) importância há muito tempo não vista. Os preços altos praticados no mercado interno e externo estimularam os produtores a aumentar a área de cultivo. O aumento previsto para a área foi de 45,3% ou seja, 378,8 mil hectares acima do que o que foi cultivada na safra 2009/10. A produção da pluma de algodão está projetada para 1.835 mil toneladas procedente da área plantada que deverá alcançar uma produtividade de 1511 kg/ha, superior em 5,7% a produtividade da safra anterior (CONAB, 2011). Apresenta grande importância econômica, social e política, tanto em áreas rurais quanto nos setores industriais.

Na maioria dos países onde o algodoeiro é cultivado, a vulnerabilidade a pragas representa o principal problema desta cultura. Sem alternativas de controle mais eficazes, o agricultor acaba por utilizar produtos químicos. O algodoeiro pode ser atacado por inúmeros insetos-praga, incluindo pulgões, percevejos, mosca-branca, lagartas, ácaros e outras espécies de menor importância. Entre aqueles de maior impacto à cultura, encontra-se o bicudo do algodoeiro, *A. grandis* (MIRANDA, 2006).

O bicudo do algodoeiro é considerado a principal praga dos algodoeiros nas Américas e no mundo, provocando queda de botões florais e redução na

qualidade das fibras (BUSOLI et al., 1994). Este inseto foi introduzido no Brasil no início da década de 80, gerando a partir de então, prejuízos crescentes não só para os agricultores, mas também para todos os segmentos da cadeia produtiva dependente (SANTOS, 2003) (Figura 6). Seu elevado poder de destruição deve-se à sua alta capacidade reprodutiva e às numerosas gerações em um ciclo agrícola (TOLEDO et al., 2000).

A. grandis é um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae, que se alimenta de pólen. Sem esse substrato, as fêmeas não conseguem desenvolver seus ovos, precisando, desta maneira, de plantas no estágio reprodutivo (GALLO et al., 1988). Seu ciclo de vida é relativamente curto, apresentando uma extraordinária capacidade de reprodução. O processo de infestação tem início quando os botões florais do algodão atingem cerca de 6 mm de diâmetro (LEONARD et al., 1999). As larvas são curculioniformes, eclodindo entre três a cinco dias após a oviposição, e alimentando-se por sete a doze dias no interior dos botões florais e maçãs, até o estágio de pupa. Após a emergência, os adultos alimentam-se por três a sete dias, até a cópula e produzirem mais ovos (NAKASU, 2009).



Figura 6. Estágios de desenvolvimento de *A. grandis*. A. Ovos; B. Larva; C. Pupa; D. Adulto (MARTINS, 2009).

Considerando que os adultos alimentam-se inserindo seu aparelho bucal em partes abaixo da superfície da planta, e que todo o desenvolvimento do inseto é endofítico, há uma grande dificuldade em controlar esta praga (METCALF & METCALF, 1993). Entre as estratégias empregadas, destaca-se a utilização de inseticidas químicos, chegando a 17 aplicações em um ciclo de cultivo, causando danos ao meio ambiente e aumentando os custos da produção (OLIVEIRA et al., 2008). Entretanto, é o método que tem apresentado maior eficácia no controle do bicudo (WOLFENBERGER et al., 1997).

Outras estratégias de controle são: o uso de feromônios e plantio-isca (GALLO et al., 1988), o uso de variedades precoces de rápida frutificação e maturação, a catação e destruição dos botões florais (SILVIE et al., 2001), o manejo integrado e o controle biológico (CARVALHO et al., 2001; SILVA et al., 2002).

Neste cenário, a utilização de plantas transgênicas de algodão expressando genes de *B. thuringiensis* resistentes a insetos apresenta inúmeras vantagens, como a redução de aplicações, tanto de agentes de controle químico como biológico, além da resistência durante todo o ciclo de produção do algodoeiro, sendo também uma alternativa econômica e ecologicamente viável. Portanto, faz-se necessária a busca por novos isolados mais eficazes, com amplo espectro de toxicidade e, que apresentem genes potenciais para o controle de insetos da ordem Coleoptera.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos moleculares do presente estudo foram realizados no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, SP. A realização do bioensaio seletivo ocorreu no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

3.1 – Isolados de *B. thuringiensis* e condições de cultivo

Para a realização das análises moleculares foram utilizados 1078 isolados de *B. thuringiensis* e uma linhagem padrão, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, como referência de controle positivo (coleóptero-específico) nas reações. Estes isolados fazem parte da coleção mantida pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.

Os isolados estão estocados sob a forma de fitas de papel filtro impregnadas com uma suspensão de esporos, em tubos esterilizados com tampa, devidamente etiquetados e mantidos em BOD a 4^oC.

Para o início dos experimentos, fitas de papel filtro foram submersas em água estéril no dia anterior à repicagem, obtendo-se uma suspensão de esporos (solução de trabalho), que também foram mantidas em BOD a 4^oC.

Para o cultivo das células bacterianas, uma alíquota da solução de trabalho foi adicionada em placas de Petri contendo meio de cultura “Nutriente Ágar” (NA) (extrato de carne 3 g/l; peptona bacteriológica 5 g/l e ágar 15 g/l) (GORDON et al., 1973) e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky esterilizada, sendo posteriormente incubadas em estufa a 30^oC por 16 h. Posteriormente, uma colônia foi inoculada com o auxílio de uma alça de platina estéril em 50 ml de meio de cultura BHI líquido (“Brain Heart Infusion Agar” – Himedia®) (peptona 10 g/l; glicose 2 g/l; cloreto de sódio 5 g/l e fosfato dissódico 2,5 g/l) e colocadas sob agitação a 200 rpm, por 4 h e 30 min, a 30^oC, para multiplicação e renovação celular.

3.2 - Extração do DNA total de *B. thuringiensis*

Para a realização das análises de amplificação, o DNA total dos isolados foi obtido utilizando-se a metodologia descrita por LETOWSKI et al (2005). Extraíu-se também, utilizando o mesmo protocolo, o DNA total da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, utilizado como referência de controle positivo nas amplificações com os iniciadores gerais.

Uma alíquota da solução estoque de esporos (solução de trabalho) de cada isolado foi inoculada, individualmente, em placas de Petri contendo meio de cultura BHI sólido (“Brain Heart Infusion Agar” – Himedia®), as quais ficaram incubadas em BOD a 30^oC durante a noite. Após este período, utilizou-se uma alça de platina para coletar uma alíquota do meio de cultura, a qual foi transferida

para um tubo Falcon acrescido de 2 ml de meio BHI líquido, incubado em seguida a 30°C, 200 rpm durante a noite.

As culturas bacterianas provenientes foram centrifugadas a 13.000 rpm, em temperatura ambiente, por 2 min. O “pellet” foi ressuspenso em 400 µl de água esterilizada, agitando vigorosamente os tubos por 10 segundos, em agitador do tipo vortex, seguindo-se o aquecimento por 15 min em banho-maria. A solução foi novamente centrifugada a 13.000 rpm, durante 15 min e por fim, transferiu-se 200 µl do sobrenadante com o DNA obtido para outro tubo de microcentrifuga esterilizado. O DNA foi armazenado a - 20 °C para posterior utilização.

3.3 – Identificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.3.1- Oligonucleotídeos iniciadores gerais

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para a confirmação da presença dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* nos isolados de *B. thuringiensis*. Para isso, foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores obtidos a partir de regiões conservadas dos genes e do alinhamento de sequências consenso: Gral-*cry3* (Ben-Dov et al., 1997), Gral-*vip1* e Gral-*vip2* (Hernández-Rodríguez et al., 2009) (oligonucleotídeos degenerados). Foi realizada a análise da região intergênica dos genes *vip1* e *vip2*, utilizando o par de iniciadores Gral-*vip1/vip2* (Shi et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* de isolados de *B. thuringiensis*.

Iniciadores	Sequências	Produto (pb)
Gral- <i>cry3</i>	5'CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC 3' (d) 5'CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT 3' (r)	620
Gral- <i>vip1</i>	5'TTATTAGATAACAACAACAAGAATATCAATCTATTMGNTGGATHGG3'(d) 5'GATCTATATCTCTAGCTGCTTTTTTCATAATCTSARTANGGRTC 3' (r)	585
Gral- <i>vip2</i>	5'GATAAAGAAAAAGCAAAAAGAAATGGGRNAARRA 3' (d) 5'CCACACCATCTATATACAGTAATATTTTCTGGDATNGG 3' (r)	845
Gral- <i>vip1/vip2</i>	5'AAATTAGTGATCCGTTACCTTCTT3' (d) 5'CAACTTGCTTTTCTTTCCCTTTAT3' (r)	742

(d): direto; (r): reverso. *Código universal para as bases degeneradas: R=A, G; Y=C, T; M=A, C; S=G, C; H=A, T, C; D=G, A, T; N=A, C, G, T.

3.3.2 - Identificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* por PCR

As reações e os programas de amplificação foram otimizados conforme as características específicas dos iniciadores. Para as reações de PCR utilizou-se como DNA molde para as amplificações, o DNA de 1078 isolados em estudo e o DNA a linhagem padrão, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle positivo).

As reações de amplificação para os referentes pares de oligonucleotídeos iniciadores (Gral-*cry3*, Gral-*vip1*, Gral-*vip2* e Gral-*vip1/vip2*) foram conduzidas, separadamente, em um volume final de 20 µl contendo: 3 µl de DNA molde; 2,5 mM de uma solução de dNTP`s; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase; 2 µl da solução tampão para a reação de PCR (10X) [200 mM Tris; 500 mM KCl (pH 8,4)] e água destilada grau Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 µl).

Em todos os lotes de reações de amplificação foi realizado um controle negativo no qual a quantidade de DNA foi substituída por água grau Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador (PTC- 100 "Programmable Thermal Controller" - MJ Research, Inc.), equipado com circuito "Hot Bonnet" (Tabela 2).

Tabela 2. Condições utilizadas para a amplificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* de isolados de *B. thuringiensis*.

Iniciadores	Ciclo	Desnaturação	Hibridização	Polimerização	Polimerização final
Gral- <i>cry3</i>	30	1 min a 94°C	1 min a 52°C	1 min a 72°C	5 min a 72°C
Gral- <i>vip1</i> e Gral- <i>vip2</i>	35	1 min a 95°C	1 min a 47°C	1.5 min a 72°C	10 min a 72°C
Gral- <i>vip1/vip2</i>	30	1 min a 94°C	1 min a 48°C	1min a 72°C	10 min a 72°C

Após a realização das amplificações, foi adicionado 3,0 µl de tampão de amostra (“loading buffer”- 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) em cada amostra amplificada. Um volume final de 10 µl foi aplicado em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e posteriormente, submetido à eletroforese horizontal em cuba Sunrise por 2 h a uma corrente elétrica de 100 V, conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/ml). Em todas as eletroforeses realizadas, adotou-se o emprego de uma amostra de DNA, com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1kb (“1kb DNA ladder”), produzida pela Invitrogen®, a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados sob luz ultra violeta (UV) e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC 2000 - Bio-Rad®), por meio do “software Quantity-one”.

3.4 - Caracterização dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* por PCR-RFLP

Os fragmentos resultantes da amplificação para os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* foram posteriormente submetidos à análise de caracterização molecular por meio da técnica de PCR-RFLP. Para a escolha das enzimas de restrição utilizadas nesta técnica, todas as sequências das subclasses foram analisadas no

“software pDRAW 32” (AcacloneSoftware), o qual forneceu a localização dos iniciadores gerais, as enzimas de restrição e os seus respectivos sítios dentro da região amplificada dos genes. Desta forma, foram identificadas as enzimas que cortariam o produto, quantos fragmentos seriam gerados e seus respectivos tamanhos. Na Figura 7 verifica-se a localização dos iniciadores Gral-cry3 (direto e reverso) na análise da subclasse *cry3A6* (Ben-Dov et al., 1997) utilizando este software, bem como as enzimas *EcoRI* e *HpaII*, que foram selecionadas para as reações de restrição para o gene *cry3*. Com relação às enzimas de restrição selecionadas para os outros genes, obteve-se: gene *vip1* → *AluI* e *MboI*; gene *vip2* → *HpaII* e *BsaAI*; gene *vip1/vip2* → *BsaAI* e *Sau96I*. Estas foram sintetizadas pela empresa Biolabs®, cada qual com o seu respectivo tampão.

Após a amplificação do DNA dos isolados com os iniciadores mencionados anteriormente, foram realizadas reações de restrição para cada produto obtido. As reações foram conduzidas em um volume total de 10,0 µl, contendo 3,0 µl do produto amplificado de cada isolado, 1,0 µl do tampão 10X, específico para cada enzima, 1,0 µl da enzima de restrição e 5,0 µl de água Milli-Q estéril. Posteriormente, foram incubadas a 37°C e o tempo de incubação variou para cada enzima, conforme orientações do fabricante.

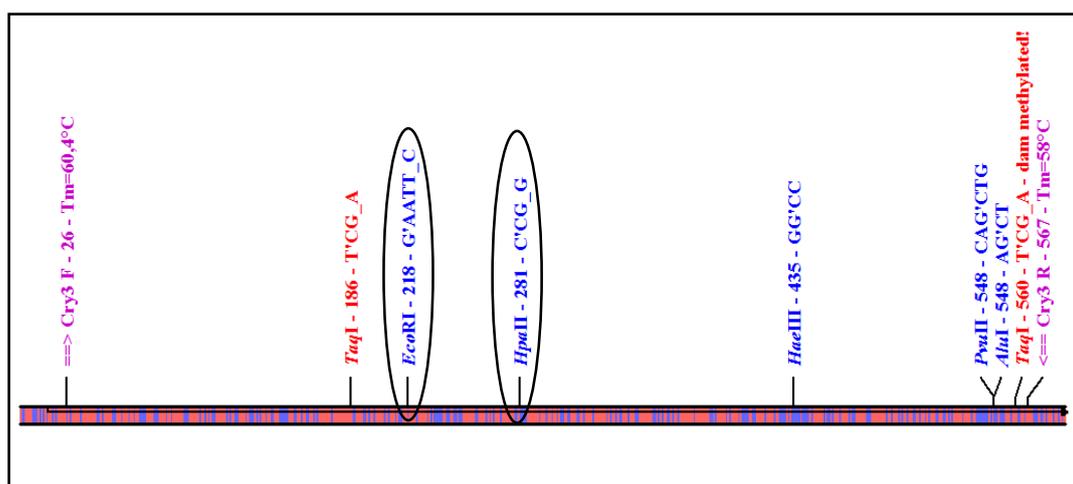


Figura 7. Posição da região amplificada na ORF *cry3A6* de *B. thuringiensis* com os respectivos iniciadores e enzimas de restrição selecionadas.

Após a realização das restrições, um volume de 10 µl de cada amostra, acrescido de 3,0 µl de tampão de “loading buffer”, foi aplicado em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml) e em seguida submetido à eletroforese horizontal em cuba Sunrise por 2 h a uma corrente elétrica de 100 V, conduzida em tampão TBE 1X, também adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/ml). Adotou-se também o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, múltiplos de 1 kb “1 kb DNA ladder” (Invitrogen®), a qual foi utilizada como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos que foram obtidos nas reações de restrição, utilizando também uma amostra do produto amplificado, não restringido, obtido para a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

A combinação de cada produto amplificado de PCR com presença ou ausência de sítio de restrição para cada enzima foi utilizada para definir a existência de alelos para um loco particular. A análise de haplótipos por este método foi representada pela combinação de alelos (amplificação + restrição) para cada um dos locos.

Posteriormente, os isolados que apresentaram diferentes padrões polimórficos para cada gene em estudo, foram utilizados nas análises de toxicidade por meio do bioensaio seletivo, o qual verificou a possível relação entre os polimorfismos gênicos e a efetividade das proteínas de *B. thuringiensis* em larvas de *A. grandis*.

3.5 - Obtenção das proteínas Cry3, Vip1, Vip2 e Vip1/Vip2 de *B. thuringiensis*

Conforme análise realizada por meio da técnica de PCR-RFLP, os isolados que apresentaram diferentes perfis polimórficos foram submetidos à avaliação de patogenicidade.

Para se obter as proteínas Vip1, Vip2 e Vip1/Vip2 a partir do sobrenadante da cultura dos isolados selecionados de *B. thuringiensis*, uma alíquota das

amostras foi repicada por estriamento em placa de Petri contendo meio de cultura sólido TB (“Terrific Broth”) adicionado de ágar. Estas foram incubadas em BOD a 30°C por aproximadamente 20 h. Após esse período, fez-se uma pré-cultura das amostras, na qual uma colônia foi coletada e inoculada em erlenmeyer de 125 ml contendo 10 ml de meio de cultura TB e colocado em agitador de incubação “New Brunswick” modelo G25 a 275 rpm a 30°C.

Após o crescimento bacteriano, quantificou-se a densidade óptica 595 nm (DO_{595nm}) das amostras em espectrofotômetro Beckman® (modelo DU-640B), igualando-as a uma mesma DO_{595nm} , a qual deveria estar entre 0,1 e 0,3 para cada amostra. O período total de crescimento da pré-cultura foi de aproximadamente 50 min.

Em seguida, inoculou-se 1,0 ml da pré-cultura de cada amostra em 40 ml de meio de cultura TB, as quais foram deixadas no agitador de incubação a 275 rpm, a 30°C, por 12 h. O meio de cultura foi centrifugado (Beckman J2-21) em tubos de 50 ml a 8000 rpm por 20 min, a 4°C. Logo após o término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para tubos Falcon de 50 ml, para evitar a suspensão de esporos ou células bacterianas provenientes do “pellet”, retidos no fundo do tubo após centrifugação. Por fim, para comprovar a ausência de células bacterianas e esporos, foram feitas lâminas de microscópio óptico com os sobrenadantes coletados. Após esse procedimento, as soluções com as proteínas Vip (sobrenadante) foram armazenadas sob refrigeração, encontrando-se prontas para uso direto no biensaio.

Para se obter a proteína Cry3, inicialmente fez-se o preparo das soluções de esporos/cristais. Os isolados que seriam testados nos bioensaios foram colocados em placas de Petri com meio de cultura Nutriente Ágar (NA) e incubados a 30°C por 96 h (4 dias), de forma que atingissem a completa esporulação.

Após esse período, com o auxílio de uma alça de platina, todo o conteúdo das placas de Petri foi coletado, separadamente. O conteúdo bacteriano de uma única placa, que representou o material de um único isolado de *B. thuringiensis*, foi transferido para tubos “Falcon” com 15 ml de capacidade, contendo 7,0 ml de

água destilada esterilizada Milli-Q e 1% de TWEEN-20 (espalhante adesivo). Depois de completar a homogeneização em aparelho tipo vortex, os esporos foram diluídos e quantificados por ml da suspensão, por meio da leitura em câmara de Neubauer de modo que as suspensões fossem padronizadas a uma concentração de 3×10^8 esporos/ml (ALVES & MORAES, 1998).

É interessante destacar que em *B. thuringiensis* existe uma relação em que a produção de um esporo no citoplasma da célula corresponde a respectiva produção de um cristal. Dessa forma, a concentração de esporos permite inferir a existência equivalente de inclusões cristalinas na biomassa, resultando na atividade inseticida.

3.6 - Bioensaio de toxicidade em larvas de *A. grandis*

3.6.1 - Criação de *A. grandis*

Para verificar a efetividade das proteínas Cry e Vip presentes na linhagem padrão e nos isolados em estudo, realizou-se o teste de patogenicidade em larvas neonatas de *A. grandis*. O bioensaio foi conduzido no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas (LBE), da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As larvas de *A. grandis* utilizadas no bioensaio são provenientes de colônias estabelecidas no Laboratório de Insetos, também da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde é feita a criação do bicudo do algodoeiro, conforme metodologia descrita por MONNERAT et al. (2000).

Os insetos foram criados em dieta artificial (Ágar 2%, levedo de cerveja 2,72%, proteína de soja 4,48%, gérme de trigo 2,72%, pharmamedia 2%, ácido sórbico 0,1%, ácido ascórbico 0,9%, glicose 2,72%, metilparabeno 0,08%, sais minerais 0,05% e solução vitamínica 0,45%), a 28°C, 70% de umidade relativa (U.R.) e fotofase de 12 h. Os ovos de *A. grandis* foram espalhados na dieta e ao eclodir, as larvas desenvolveram-se até a eclosão. Os adultos foram coletados e transferidos para gaiolas destinadas à cópula e oviposição. Por fim, os ovos foram

coletados, esterilizados e espalhados novamente na dieta (MONNERAT et al., 2000).

3.6.2 – Bioensaio seletivo

Foi realizado para a análise de toxicidade e efetividade das proteínas de *B. thuringiensis* o bioensaio seletivo, ou discriminante, cujo objetivo foi determinar quais isolados apresentavam atividade tóxica ao inseto, ou seja, capazes de causar no mínimo 50% de mortalidade de larvas.

Para o ensaio de toxicidade contra *A. grandis*, foram utilizadas placas de cultura de células (NUNC™), contendo seis poços e preenchidas com dieta artificial. O bioensaio seletivo foi realizado incorporando-se 1 mL de cultura bacteriana em 4 mL de dieta artificial (descrita anteriormente), conforme descrito por PRAÇA et al (2004). Após a incorporação das culturas bacterianas na dieta, a mistura foi vertida nas placas de cultura de células, e após solidificação, foram feitos 10 furos de aproximadamente 2 mm de diâmetro e em cada furo foi colocada uma larva neonata de *A. grandis*. O bioensaio foi mantido em câmara de incubação com fotofase de 14 h e temperatura de 27°C. A leitura foi feita após sete dias.

No bioensaio foram testados 9 isolados de *B. thuringiensis*, havendo também três testemunhas (larva alimentada de dieta incorporada com meio TB; larva alimentada de dieta incorporada com tween; larva alimentada apenas com a dieta artificial) e dois controles positivos (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis* + esporo/cristal e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* + sobrenadante com a proteína Vip) (Tabela 3). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo constituído de 14 tratamentos e 2 repetições, com 10 larvas neonatas de *A. grandis* por repetição, totalizando 20 larvas por tratamento.

Tabela 3. Conteúdo gênico dos isolados de *B. thuringiensis* submetidos ao bioensaio seletivo.

Isolado	Tratamento	Gene	Região de Origem
I_143	Tratamento 1	<i>vip1/vip2</i>	Coqueiral (MG)
I_144	Tratamento 2	<i>vip1/vip2</i>	Coqueiral (MG)
I_147	Tratamento 3	<i>vip1/vip2</i>	Desconhecida
I_149	Tratamento 4	<i>vip1/vip2</i>	Desconhecida
I_73	Tratamento 5	<i>vip1/vip2</i>	Santa Helena (GO)
I_48	Tratamento 6	<i>vip1/vip2</i>	Campinas (SP)
I_02	Tratamento 7	<i>cry3</i>	Desconhecida
I_05	Tratamento 8	<i>cry3</i>	Desconhecida
I_09	Tratamento 9	<i>cry3</i>	Desconhecida
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	Tratamento 10	<i>vip1/vip2</i>	Desconhecida
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	Tratamento 11	<i>cry3</i>	Desconhecida
Testemunha + meio TB	Tratamento 12	-	-
Testemunha + tween	Tratamento 13	-	-
Testemunha	Tratamento 14	-	-

3.7 - Análise estatística dos dados

Para a análise estatística dos dados moleculares, foi criada uma matriz de amplificação + restrição. Os dados foram agrupados e submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) por meio do “software Arlequin” (SCHNEIDER et al., 2000; EXCOFFIER et al., 1992), estimando dessa forma a diversidade genética e analisando a estrutura de grupos.

A análise de agrupamento por método hierárquico foi utilizada para explorar a estrutura de grupos contida nos genes *vip*, considerando informações do PCR-

RFLP. O processamento da análise foi feito com o “software Statistica”, versão 7.0 (STATSOFT, 2004), considerando como medida de semelhança a distância euclidiana e como método de ligação entre os grupos o método de Ward (HAIR et al., 2005). A estrutura de grupo resultante consta de um gráfico em forma de árvore denominado dendrograma.

Com relação aos ensaios de toxicidade, os resultados foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias obtidas. Realizou-se também uma análise discriminante entre os tratamentos com a finalidade de verificar diferenças de toxicidade entre as proteínas utilizando o “software Statistica”, versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Identificação dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* por PCR

A comprovação da presença dos genes foi realizada por meio da amplificação do DNA de 1078 isolados de *B. thuringiensis*, os quais apresentaram diferentes tamanhos de produtos amplificados.

Na Figura 8 estão representados os perfis dos DNAs amplificados com os diferentes iniciadores, destacando que os isolados apresentaram um produto de amplificação com o tamanho esperado. Para o gene *cry3*, o tamanho para os produtos foi cerca de 620pb. Com relação aos genes *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* os tamanhos foram de cerca de 585pb, 845pb e 742pb, respectivamente. Obteve-se também, os mesmos tamanhos esperados para os produtos obtidos da amplificação da linhagem de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, utilizada como controle positivo, com os iniciadores para os genes em estudo.

Em toda a coleção avaliada (1078 isolados), 14 isolados (1,29%) apresentaram o produto de amplificação esperado para o gene *cry3*. Em relação ao gene *vip*, 134 isolados corresponderam ao gene *vip1* (12,43%) e 62 isolados (5,75%) ao gene *vip2*. Mas, ainda, 139 isolados (12,89%) apresentaram um

produto de amplificação correspondente ao gene *vip1/vip2*, indicando uma maior frequência deste na coleção analisada. Ressalta-se também que nenhum isolado amplificou para os quatro genes em estudo, de forma simultânea (Tabela 4) e que diversos isolados amplificaram para mais de um gene *vip*.

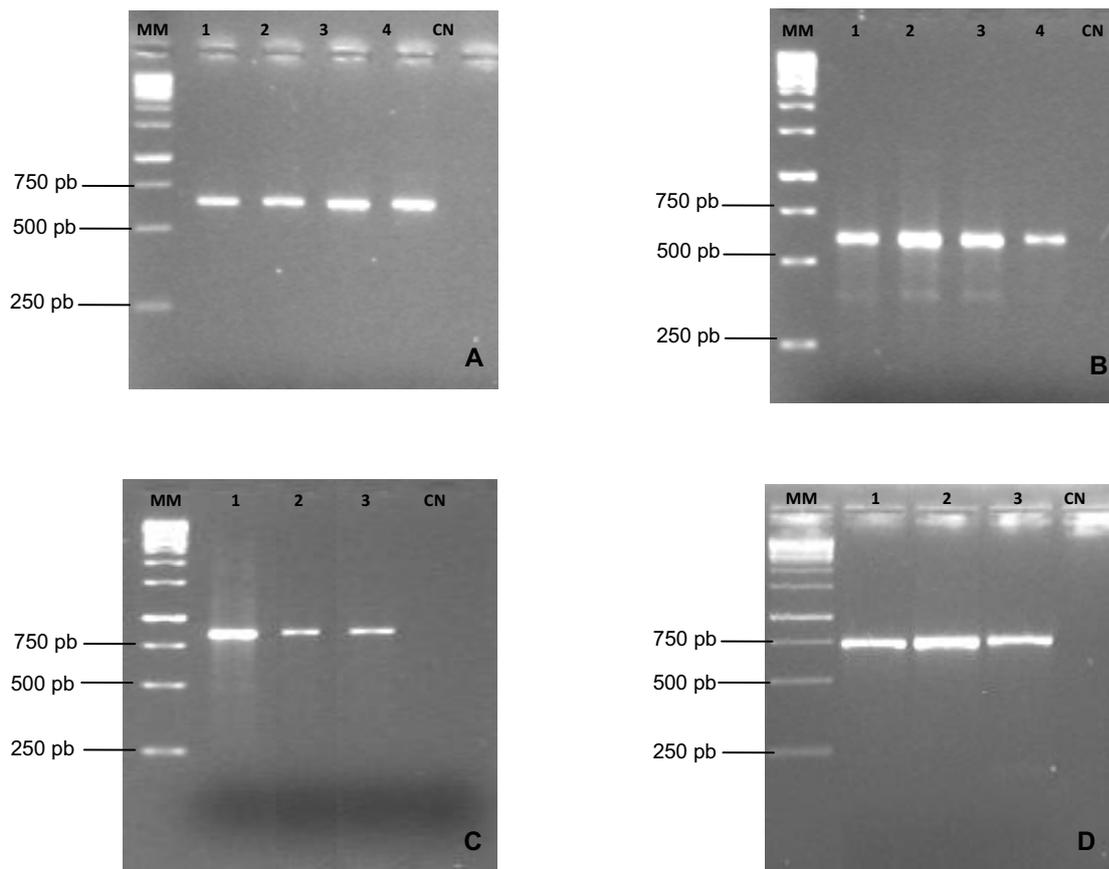


Figura 8. Eletroforograma representando os produtos amplificados por PCR dos isolados de *B. thuringiensis*, com os indicadores: (A) *Gral-cry3* (620pb); (B) *Gral-vip1* (585pb); (C) *Gral-vip2* (845pb); (D) *Gral-vip1/vip2* (742pb). MM – 1 Kb DNA ladder; 1- *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*; CN- Controle negativo da reação.

Tabela 4. Composição e frequência dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* presentes na coleção de 1078 isolados de *B. thuringiensis*.

Genes	Número de isolados	Deteção (%)
<i>cry3</i>	14	1,29
<i>vip1</i>	134	12,43
<i>vip2</i>	62	5,75
<i>vip1/vip2</i>	139	12,89

A PCR permite uma rápida determinação da presença ou ausência de sequências conhecidas, sendo uma caracterização altamente sensível e relativamente rápida. Esta técnica, utilizada inicialmente por CAROZZI et al. (1991) para identificar genes *cry* relacionando-os com sua atividade inseticida, é uma ferramenta que ainda tem sido amplamente utilizada para a identificação de genes que codificam proteínas Cry e Vip e para a análise de diferentes coleções de *B. thuringiensis* (BEN-DOV et al., 1997; BRAVO, 2001; NAZARIAN et al., 2009; BAIG & MEHNAZ, 2010).

É interessante destacar que, também por meio da PCR, resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al. (2009), quanto a frequência dos genes *vip1* e *vip2*. Analisando 507 isolados, estes autores obtiveram 10,7% de isolados amplificados para o gene *vip1* e 9,1% para o gene *vip2*. Diferentemente, foi encontrada uma elevada frequência de genes *vip2*, em coleções de *B. thuringiensis* isolados de plantações de café na Costa Rica, (ARRIETA et al., 2004). ARRIETA & ESPINOZA (2006) também obtiveram resultados contrastantes ao avaliar 146 isolados em seu trabalho, no qual relataram apenas 1 isolado positivo para o gene *vip2* e ausência do gene *vip1* na coleção analisada.

Para o gene *vip1/vip2*, WARREN (1997) descreveu uma distribuição de 11,9% entre os isolados avaliados, de forma semelhante ao percentual encontrado no presente trabalho. Outro grupo (ESPINASSE et al., 2003), em um trabalho de ocorrência de toxinas inseticidas em *B. thuringiensis*, analisou 125 isolados quanto à presença de genes *cry1I*, *vip1/vip2*, *vip3* e produção de β -exotoxina I, e

identificaram genes *vip1/vip2* em 34,4% dos isolados estudados, demonstrando um percentual superior ao encontrado neste trabalho.

Apenas 1,29% dos isolados foram positivos para o gene *cry3*, diferindo dos resultados de BRAVO et al. (1998), PINTO & FIUZA (2008) e NAZARIAN et al. (2009), que relataram uma maior presença de genes *cry3* nos isolados testados, variando entre 12,5, 21,70 e 22,34%, respectivamente. Entretanto, BEN-DOV et al. (1997) não identificaram este gene em seus trabalhos.

As diferenças encontradas entre os trabalhos analisados e os resultados obtidos neste estudo evidenciam a ampla distribuição de *B. thuringiensis* em diferentes habitats e ecossistemas e a elevada diversidade gênica que apresenta.

É importante destacar que não se verifica na maioria das coleções estudadas uma alta frequência de genes coleóptero-específicos. Com relação à distribuição geográfica de *B. thuringiensis*, AZAMBUJA (2006) associou a presença de determinada classe gênica em diferentes coleções com o local de origem (fatores bióticos e abióticos) de *B. thuringiensis*, indicando a possibilidade de haver relação entre eles. FATORETTO (2002) destaca também, a importância dos estudos que verifiquem a abundância, a distribuição e a diversidade de isolados de *B. thuringiensis*, os quais são importantes não apenas para a busca de novas alternativas de controle de insetos-praga, por meio de isolados com especificidade tóxica diferente daqueles atualmente descritos, mas, também para esclarecer questões relacionadas à evolução e as relações ecológicas desta espécie.

Conforme relataram PINTO & FIUZA (2003), a distribuição de genes na coleção analisada, comparada a outras regiões geográficas, revelou diferenças que também podem estar associadas a fatores abióticos, como características físico-químicas do solo, as quais não foram avaliadas nesta pesquisa.

Com relação aos isolados que não amplificaram para os genes em estudo, é pertinente mencionar as sequências oligonucleotídicas iniciadoras utilizadas, as quais foram desenhadas a partir de sequências consenso por meio do alinhamento de poucas subclasses descritas, conforme relatado na literatura. Desta forma, pode-se presumir a existência de subclasses de genes coleóptero-

específicos que ainda não foram caracterizadas ou relatadas, e consequentemente não foram amplificadas para os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* deste estudo.

A identificação de genes *vip* e *cry* em coleções de *B. thuringiensis* é uma ferramenta imprescindível, pois permite a seleção de isolados específicos para serem utilizados em bioensaios, que são potencialmente tóxicos para determinadas ordens de insetos. As análises realizadas quanto à diversidade de proteínas tóxicas nos isolados testados demonstram o grande potencial que possuem para o controle de diferentes espécies de pragas de importância econômica, destacando-se aqueles da ordem Coleoptera. Destaca-se também a relevância dos estudos de distribuição de genes *vip* e *cry* dentro de uma coleção de isolados, a qual pode auxiliar no entendimento do papel de *B. thuringiensis* no ambiente.

Verifica-se, portanto, que a PCR continua sendo uma técnica importante para avaliar a composição gênica de coleções de *B. thuringiensis*, sendo também utilizada como um indicador para a previsão de toxicidade (THULER, 2007; COSTA, 2009).

4.2 - Caracterização dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* por PCR-RFLP

Após a obtenção do produto de amplificação dos genes em estudo para todos os isolados analisados, procurou-se detectar possíveis polimorfismos nesta região utilizando a técnica de PCR-RFLP, a qual poderia indicar a presença de novas subclasses de genes nos isolados. Para tanto, a escolha das enzimas de restrição foi feita utilizando-se o “software pDRAW 32” (AcacloneSoftware).

Os produtos oriundos da amplificação nos isolados para os genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* foram submetidos a reações de restrição, separadamente, utilizando as enzimas: *EcoRI*, *HincII* e *HpaII* para o gene *cry3* (14 isolados); *AluI* e

Os resultados obtidos por meio da PCR-RFLP indicam uma significativa conservação nas sequências dos produtos amplificados, evidenciada pela identificação de somente três alelos para as enzimas que obtiveram um maior número de sítios de restrição. Entretanto, essa variabilidade genética observada pode indicar a possibilidade da existência de mais de uma subclasse de gene *cry3*, *vip1* ou *vip2* nestes isolados. A análise dos genes *cry* e *vip*, por meio desta ferramenta, resultou na identificação e caracterização dos genes analisados, sugerindo a presença de diferentes subclasses de genes coleóptero-específicos dentro da coleção de isolados deste estudo.

Diversos trabalhos relatam a ocorrência de genes *vip* e *cry* em isolados de *B. thuringiensis* sendo determinada apenas por meio da PCR (LOGUERCIO et al., 2002; ESPINASSE et al., 2003; ARRIETA & ESPINOZA, 2006; NAZARIAN et al., 2009; BAIG & MEHNAZ, 2010;). Porém, essa abordagem permite apenas a identificação da família do gene amplificado e não a subclasse que o gene em estudo pertence. Diante disso, a técnica de PCR-RFLP vem sendo utilizada para auxiliar na detecção e caracterização de diferentes subclasses de genes *cry* e *vip* (SAUKA et al., 2006; BEARD et al., 2008; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; LIU et al., 2009).

Entretanto, conforme verificado por HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al. (2009), a metodologia utilizada neste estudo não permite diferenciar genes intimamente relacionados, na qual obtém-se perfis de restrição semelhantes para estes genes.

Atualmente, a identificação de genes *cry* e *vip* em isolados de *B. thuringiensis* é realizada utilizando múltiplas reações de PCR, com diferentes pares de oligonucleotídeos iniciadores selecionados a partir de regiões conservadas nos diferentes grupos gênicos, os quais são identificados segundo as diferenças de tamanho dos produtos amplificados, tendo algumas restrições. Estes iniciadores, específicos para amplificação de determinados grupos de genes não permitem a detecção de grande parte dos genes atualmente conhecidos, apresentando, portanto, uma grande desvantagem, o grande número de isolados que permanecem sem ter seus genes conhecidos (FATORETTO, 2002).

Diante disso, com o advento das técnicas de sequenciamento do DNA, a identificação de genes de *B. thuringiensis* potencialmente tóxicos contra insetos vem se tornando mais rápida e eficiente, sendo possível detectar um maior número de genes, com maior precisão e, cujas diferenças não são identificadas somente por meio de análises de tamanho dos fragmentos obtidos após amplificação. Assim, o processo de descoberta de novos genes com novas especificidades está acelerando e conseqüentemente o incremento dos programas de controle biológico e de transgenia à base de *B. thuringiensis*.

4.3 - Análise estatística dos dados

A análise da estrutura genética por meio do “software” Arlequin permitiu a caracterização haplotípica dos isolados de *B. thuringiensis* da coleção. Nas Tabelas 5 e 6 estão listados os diferentes haplótipos, obtidos após análise alélica (amplificação + restrição) determinada por PCR-RFLP.

Verificou-se a formação de grupos entre os 151 isolados avaliados em 14 haplótipos na análise da coleção, sendo que 3 correspondem ao gene *cry3* e 11 ao gene *vip* (*vip1*, *vip2* e *vip1/vip2*). Em relação aos haplótipos obtidos para o gene *cry3*, a frequência do haplótipo 3 foi de 0,6 dentro da coleção estudada. Para os haplótipos 1 e 2, a frequência observada foi de 0,2 cada (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência e distribuição de haplótipos para o gene *cry3*.

No.	Frequência	Haplótipo
1	0.20000	1 1 1 1
2	0.20000	1 2 2 2
3	0.60000	1 2 3 3

Para os genes *vip* analisados, obteve-se uma frequência de 0,4 para os isolados agrupados nos haplótipos 2 e 5, demonstrando a elevada frequência com que estes aparecem na coleção. Os isolados restantes distribuem-se em 9 haplótipos com frequência inferior (Tabela 7).

Tabela 7. Frequência e distribuição de haplótipos para os genes *vip*.

No.	Frequência	Haplótipo
1	0.007143	1 1 1 1 1 1 1 1 1
2	0.464286	1 1 1 1 2 2 0 0 0
3	0.035714	1 1 1 0 0 0 0 0 0
4	0.007143	1 1 1 1 3 2 0 0 0
5	0.400000	1 1 1 1 2 2 1 2 1
6	0.007143	1 2 2 1 2 2 1 2 1
7	0.014286	1 2 2 1 2 2 0 0 0
8	0.021429	1 2 2 1 4 2 0 0 0
9	0.007143	1 1 1 1 4 2 0 0 0
10	0.014286	1 1 1 1 2 2 1 2 0
11	0.021429	1 2 2 1 4 3 1 2 2

No dendrograma da Figura 9 observa-se uma estrutura de grupos estabelecida para os genes *vip* contendo dois grupos de isolados (G1 e G2) que podem ser subdivididos em dois subgrupos cada um (G1_1, G1_2, G2_1 e G2_2). O grupo G1 é formado pelos isolados I_1, I_3, I_27, I_28, I_125 e I_135 subdividido nos subgrupos G1_1: isolados I_1 e I_3 e G1_2: isolados I_27, I_28, I_125 e I_135. O grupo G2 é formado pelos isolados I_2, I_4, I_32, I_33 e I_36 subdividido nos subgrupos G2_1: isolados I_2, I_4 e I_32 e G2_2: isolados I_33 e I_36.

Os grupos foram estruturados de modo que perfis polimórficos semelhantes foram agrupados em um mesmo grupo no dendrograma. Assim, a análise multivariada de agrupamento contribuiu na caracterização da coleção de *B. thuringiensis*, devendo ser utilizada na fase exploratória em dados de toxicidade de bactérias entomopatogênicas.

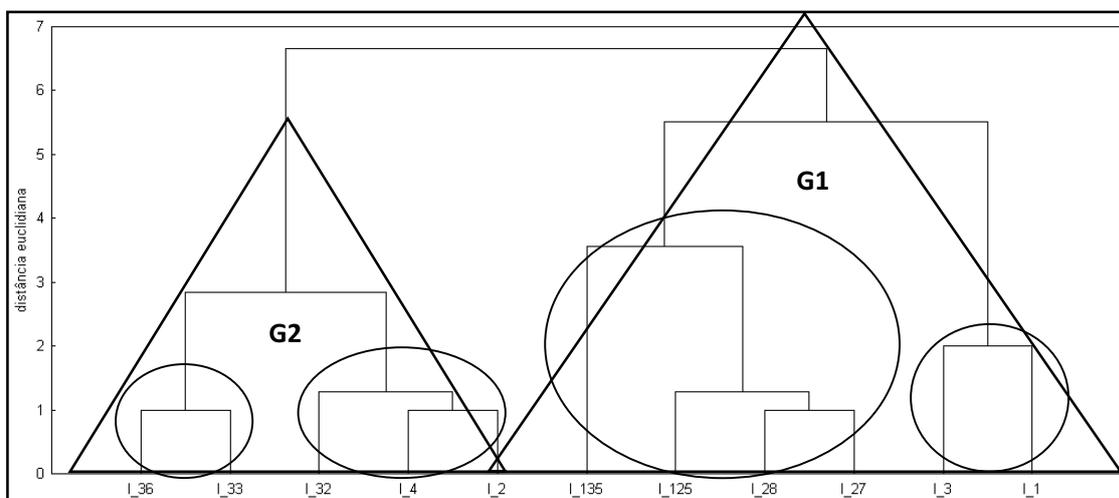


Figura 9. Estrutura de grupos resultante da análise de agrupamento por método hierárquico considerando a amplificação e a restrição dos genes *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* de isolados de *B. thuringiensis*.

O número de dados obtidos para o gene *cry3* impossibilitou a análise de agrupamento por método hierárquico e a consequente estruturação de grupos na forma de um dendrograma, como foi estabelecido para os genes *vip*.

Diversos estudos de análise de diversidade de bactérias vêm sendo realizados nos últimos anos. COSTA (2009) avaliou a estrutura de grupos de 45 isolados de uma coleção e identificou 21 haplótipos, dos quais 13 haplótipos são exclusivos dos isolados pertencentes à coleção de Jaboticabal - SP, evidenciando a ocorrência de variabilidade genética populacional entre os grupos formados. Os resultados obtidos por PICCHI et al. (2006) permitiram detectar níveis de diversidade genética variáveis no sistema de restrição de *Xylella fastidiosa*, em função do hospedeiro e/ou localidade de origem da bactéria, utilizando análises de estruturação de grupos genéticos. O estudo de THULER (2007) analisou a estrutura genética de 650 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões brasileiras, com base nos resultados de amplificação e restrição dos genes *hblA*, *plcR*, *nheBC* e *cry1*, no qual obteve 78 haplótipos definidos para as populações de diferentes regiões.

Com relação à análise da estrutura genética da coleção de isolados de *B. thuringiensis* por distribuição geográfica, constatou-se entre aqueles amplificados para os genes *cry* e *vip* (151 isolados), uma frequência maior de isolados com origem no Estado de Minas Gerais (MG) (35,48%), seguido de Goiás (GO) (30,96%), São Paulo (SP) (7,09%) e Paraná (PR) (0,64%). Cerca de 23,87% dos isolados são de regiões não identificadas (NI). Baseando-se em estudos de distribuição de *B. thuringiensis* em diferentes ecossistemas (PINTO & FIUZA, 2003; AZAMBUJA, 2006), foi evidenciado uma variabilidade regional entre os isolados analisados.

As análises de agrupamento haplotípica para os genes *vip* permitiram identificar dois importantes grupos que apresentaram maior frequência (haplótipos 2 e 5), e distribuem-se entre os Estados de MG e GO, respectivamente, que se caracterizam por serem importantes regiões agrícolas, com destaque para culturas como milho e soja, que são alvo de inúmeros insetos-praga, inclusive da ordem Coleoptera.

Embora ainda escassos, estudos de co-evolução de isolados de *B. thuringiensis* com os seus hospedeiros suscetíveis (insetos-alvo) têm sido propostos. Sua prospecção relacionada com as características do habitat e a diversidade genética são estratégias importantes para a identificação de novas proteínas Cry e Vip com diferentes especificidades (APOYOLO et al., 1995; ARRIETA & ESPINOZA, 2006).

Sugere-se que a presença de *B. thuringiensis* em diferentes ecossistemas pode estar relacionada com o seu hábitat, fatores bióticos e abióticos presentes. Portanto, as análises de toxicidade tornam-se uma importante ferramenta para corroborar a possível relação existente entre a origem dos isolados, sua co-evolução e a presença de polimorfismos em coleções de *B. thuringiensis*.

4.4 - Bioensaio de toxicidade em larvas de *A. grandis*

Os níveis de eficiência inseticida das proteínas Cry3, Vip1, Vip2 e Vip1/vip2 contra larvas de *A. grandis* foram obtidos por meio de bioensaio seletivo,

envolvendo 9 isolados de *B. thuringiensis*, os quais foram selecionados com base nos diferentes perfis de restrição obtidos na PCR-RFLP (Figura 10). A linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* foi utilizada como controle positivo. Três controles negativos (testemunhas) foram utilizados neste experimento, onde a dieta artificial não foi incorporada com as proteínas de *B. thuringiensis*.

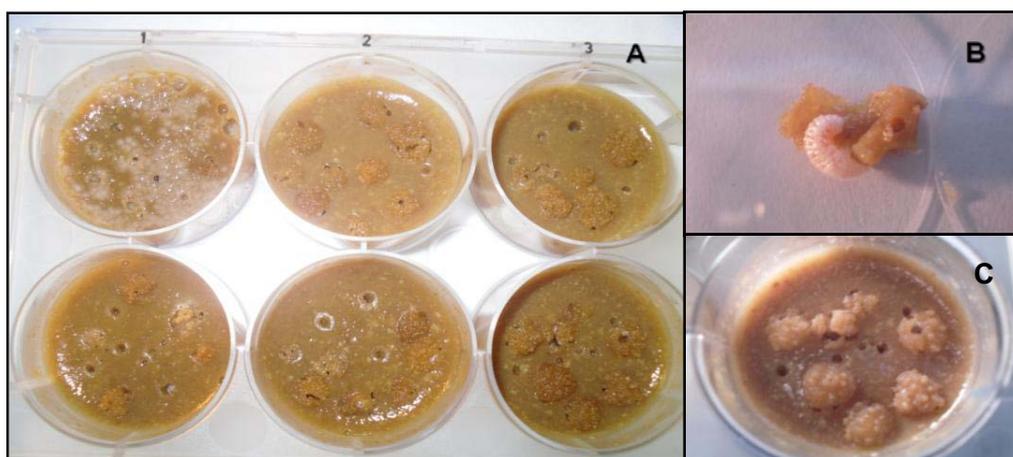


Figura 10. Placa de cultura contendo dieta artificial e larvas de *A. grandis* (A/C); larva de *A. grandis* após realização do experimento (sete dias) (B).

Na Tabela 8 observa-se a mortalidade obtida após o bioensaio seletivo. Dos nove isolados avaliados, quatro apresentaram baixa eficiência (< 35%) ao inseto-alvo e cinco isolados apresentaram mortalidade média entre 35 e 75%. Estes resultados diferem daqueles obtidos por MARTINS (2009), a qual avaliou a efetividade de diferentes isolados de *B. thuringiensis*. Foram identificados cinco isolados com elevado potencial para o controle de *A. grandis*, com valores de mortalidade significativos nos ensaios de dose. MARTINS (2004) avaliando também a toxicidade de *B. thuringiensis* em larvas de bicudo do algodoeiro e constatou uma mortalidade superior a encontrada neste trabalho. Entretanto, OLIVEIRA (2008) trabalhando com a evolução *in vitro* de moléculas Cry8 ativas contra *A. grandis*, constatou nos ensaios de atividade entomotóxica um percentual inferior a 61% de mortalidade entre os tratamentos avaliados. PORCAR et al.

(2010) analisando o efeito das toxinas Cry1 e Cry3 em larvas de coleópteros, também obtiveram uma taxa de mortalidade baixa, variando entre 7 e 15%.

Diversos trabalhos na literatura relatam uma baixa eficiência das toxinas *Bt* em insetos da ordem Coleoptera. Uma menor efetividade destas proteínas em coleópteros pode estar relacionada ao fato de que o pH intestinal destes insetos varia entre neutro e um pouco ácido, necessitando, então, de uma ativação *in vitro* (SCHNEPF et al., 1998). Diferenças na atividade proteolítica entre os insetos-alvo podem também ser responsáveis pela especificidade e efetividade das toxinas. Por exemplo, a principal protease digestiva de lepidópteros e dípteros é a serino-protease enquanto nos coleópteros ocorre principalmente cisteíno e aspartato-proteases (MAAGD et al., 2001).

Tabela 8. Mortalidade média de larvas neonatas de *A. grandis* no bioensaio seletivo.

Isolado	Tratamento	Mortalidade (%)
I_143	Tratamento 1	45%
I_144	Tratamento 2	20%
I_147	Tratamento 3	40%
I_149	Tratamento 4	25%
I_73	Tratamento 5	35%
I_48	Tratamento 6	30%
I_02	Tratamento 7	65%
I_05	Tratamento 8	55%
I_09	Tratamento 9	30%
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> (<i>vip</i>)	Tratamento 10	40%
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> (<i>cry3</i>)	Tratamento 11	90%
Testemunha + meio TB	Tratamento 12	45%
Testemunha + tween	Tratamento 13	45%
Testemunha	Tratamento 14	30%

O ensaio apresentado neste trabalho demonstrou que dos 9 isolados testados, apenas o isolado I_02 apresentou-se promissor para estudos mais detalhados de toxicidade em larvas de bicudo do algodoeiro, com uma mortalidade de cerca de 65%.

Pode-se inferir também uma possível associação entre a presença de diferentes perfis polimórficos nos genes e a efetividade das proteínas inseticidas, por meio da avaliação do bioensaio seletivo. O isolado I_02, mais efetivo para o controle de *A. grandis*, apresentou padrões de restrição diferentes quando comparado com os outros isolados e com a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, em relação as enzimas de restrição utilizadas. Desta forma, torna-se fundamental a realização de estudos mais aprofundados de biologia molecular (sequenciamento do gene *cry3*), de toxicidade e comparativos com outros isolados que apresentaram o mesmo perfil de restrição e que não foram submetidos ao ensaio seletivo, para assim verificar a presença de prováveis mutações que possam estar influenciando a efetividade da toxina.

O teste t mostrou existir diferença significativa entre as médias dos valores de sobrevivência e mortalidade ($p = 0,0094$), podendo ser visualizada na Figura 13. A média dos valores de larvas vivas (5,8) é superior à média dos valores de larvas mortas (4,5) indicando que as proteínas utilizadas no bioensaio de toxicidade não apresentaram a efetividade esperada.

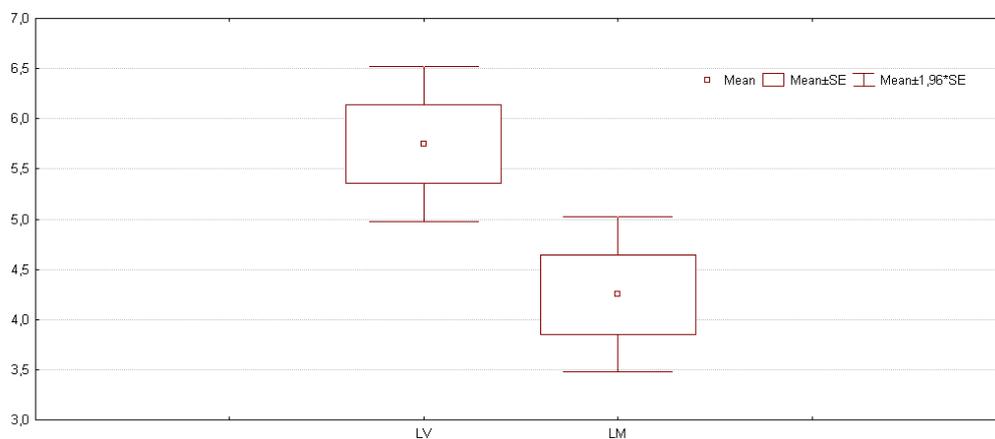


Figura 13. Média de larvas vivas e mortas de *A. grandis* expostos a dieta contendo proteínas dos isolados de *B. thuringiensis*.

Realizou-se também uma análise discriminante entre os tratamentos com a finalidade de verificar diferenças de toxicidade entre as proteínas utilizando o “software Statistica”. A análise discriminante entre os tratamentos visualizada na Figura 14 indicou que o Tratamento 7 (isolado I_02/gene *cry3*) respondeu de forma mais efetiva nos ensaios com *A. grandis* quando comparado com os outros tratamentos. Estes resultados são constatados por meio da análise da média e da variância encontradas.

Desta forma, é imprescindível realizar estudos mais detalhados de biologia molecular e de toxicidade para comprovar a eficácia do isolado I_02, o qual indicou ser promissor para o controle de *A. grandis*.

A toxicidade de alguns isolados de *B. thuringiensis* a insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos. Portanto, torna-se necessário realizar bioensaios com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade e a interação presente (LEE et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998).

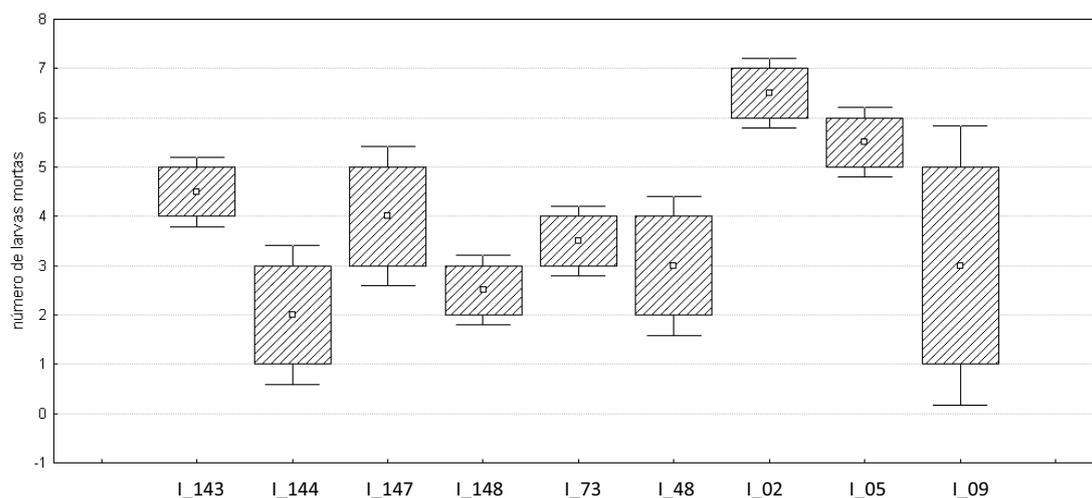


Figura 14. Mortalidade média entre os tratamentos para os indivíduos de *A. grandis* expostos a dieta contendo proteínas dos isolados de *B. thuringiensis*.

Várias toxinas coleóptero-específicas têm sido descritas como tóxicas para diversos insetos. Dentre elas, destaca-se Cry1Ba e Cry1Ia para *Leptinotarsa decemlineata* e *A. grandis* (MARTINS et al., 2006; NAIMOV et al., 2001; ZHONG et al. 2000; MARTINS et al., 2008), Cry3A para *Crysmela scripta* e *Hypothenemus hampei* (JAMES et al., 1999, LÓPEZ-PAZOS et al., 2009) e Cry22Ab para *Diabrotica* spp. e *L. decemlineata* (METTUS & BAUM, 2000).

Conforme relatado na literatura (FRANKENHUYZEN, 2009), um total de 47 toxinas Cry já foram testadas contra 39 espécies de coleópteros. As espécies ou gêneros mais comumente testados foram *Diabrotica* spp. (24,0%), *L. decemlineata* (20,8%), *C. scripta* (10,2%), *Holotrichia* ssp. (5,8%), *Anomala* ssp. (4,3%), *Tribolium castaneum* (3,7%) e *A. grandis* (3,7%), de um total de 72,7% dos coleópteros testados. Destaca-se também que os ensaios de toxicidade foram mais frequentes na família Chrysomelidae (62,6%).

Os resultados obtidos indicam um potencial da proteína Cry3, especialmente, indicando que os estudos com estes isolados devem ser aprofundados, tanto na parte molecular quanto nos ensaios de toxicidade, para que se conheçam suas proteínas e respectivos genes codificadores. A partir do momento em que os genes potenciais são conhecidos, estes poderão ser aplicados na engenharia genética para a produção de organismos geneticamente modificados, especialmente plantas de algodão, como método de controle ao *A. grandis*, que é um inseto endofítico e de difícil combate por métodos convencionais.

5 – CONCLUSÕES

- 1) A análise por PCR permitiu prever a atividade inseticida de diferentes isolados de *B. thuringiensis* pela presença dos genes *cry3*, *vip1*, *vip2* e *vip1/vip2* coleóptero-específicos.
- 2) A técnica de PCR-RFLP mostrou-se apropriada para a detecção da variabilidade genética em *B. thuringiensis*, permitindo a identificação de haplótipos e sugerindo a presença de diferentes subclasses de genes coleóptero-específicos.
- 3) Os estados de Minas Gerais e Goiás apresentaram frequência superior de isolados coleóptero-específicos.
- 4) Foi verificada uma baixa mortalidade em larvas de *A. grandis*.
- 5) O isolado I_02, que apresentou perfis diferentes de polimorfismo quando comparado com os outros isolados testados, respondeu de forma mais efetiva no bioensaio seletivo em larvas de *A. grandis*.
- 6) A classe de proteínas Cry3 mostrou-se mais efetiva no controle de *A. grandis* quando comparada com as proteínas Vip testadas.

6 - REFERÊNCIAS

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p. 6027-6032, 1995.

ALMEIDA, J. E.; FILHO, A. B. Microrganismos no controle de pragas. In: PINTO, A. S.; NAVA, D. E.; ROSSI, M. M.; MALERBO-SOUZA, D. T. **Controle Biológico de pragas – na prática**. Piracicaba: CP 2, 2006, 287 p.

ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 765-778. 1998.

APOYOLO, C. I.; DRIF, L.; VASSAL, J. M.; DEBARJAC, H.; BOSSY, J. P.; LECLANT, F.; FRUTOS, R. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sun flower moth, *Homoeosoma nebulella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p. 4343-4347, 1995.

ARANTES, O. M.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002, 433 p.

ARRIETA, G.; ESPINOZA, A. M. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain collection isolated from diverse Costa Rican natural ecosystems. **Revista de Biología Tropical**, v. 54, n.1, p.13-27, 2006.

ARRIETA, G.; HERNÁNDEZ, A.; ESPINOZA, A. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari. **Revista de Biología Tropical**, v.52, p.757-764, 2004.

AZAMBUJA, A. O. 2006. **Ecologia de *Bacillus* spp. em solos orizícolas e o impacto dos tratamentos fitossanitários**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2006.

BAIG, D. N.; MEHNAZ, S. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. **Microbiological Research**, Bonn, v.165, p.376-383, 2010.

BALLAMINUT, C. E.; MOREIRA, M. S.; ALMEIDA, R. E. M. **Fitotoxicidade, perdas na produção e qualidade na fibra**. 2006. 14f. Monografia – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BEARD, C. E.; COURT, L.; BOETS, A.; MOURANT, R.; VAN RIE, J.; AKHURST, R. J. Unusually High Frequency of Genes Encoding Vegetative Insecticidal Proteins in an Australian *Bacillus thuringiensis* Collection. **Current Microbiology**, New York, v.57, p.195–199, 2008.

BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A.; DAHAN, E.; BARAK, Z.; SINAI, R.; MANASHEROB, R.; KHAMRAEV, A.; TROITSKAYA, E.; DUBITSKY, A.; BEREZINA, N.; MARGALITH, Y. Extended Screening by PCR for Seven cry-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4883–4890, 1997.

BRAVO, A.; GILLB, S.S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Kidlington, v.49, p.423–435, 2007.

BRAVO, A.; GILLB, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use In: L. GILBERT; K. IATROU; S. GILL (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier BV, 2005, p. 175-206.

BRAVO, 2001. Citado por: BENINTENDE, G.; IBARRA, J.; BRAVO, A. **Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis***. Metodologías utilizadas em investigación sobre bacterias entomopatógenas. México, D.F., UNAM.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4965-4972, 1998.

BRAVO, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* d-Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, n.9, p. 2793–2801, 1997.

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

CAROZZI, N. B. ; KRAMER, V. C. ; WARREN, G. W. ; EVOLA, S. ; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.11, p.3057-3061, 1991.

CARVALHO, E.; BREDAS, C. E.; BRUGNERA, P.; MARCHESAN, S. A.; GIONGO, J. O.; DE OLIVEIRA, J. C.; ROSIN, J. B.; DOS SANTOS, V.; FILHO, A. C. DE O.; DEGRANDE, P. E. Bloqueio populacional do bicudo do algodoeiro no oeste da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3, 2001, Campo Grande. **Anais...** p. 134-137.

CONAB. **COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&ordem=criterioSafra1>>. Acesso em: 17 de janeiro de 2011.

COOPING, L. G.; MENN. J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v.56, n.5, p. 651-676, 2000.

COSTA, E. L. N.; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; FIUZA, L. M. Artrópodes e Bactérias Entomopatogênicas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. Brasília, v.11, n. 38, p. 04-12, 2010.

COSTA, J. R. V. **Predição *in vitro* da atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* berliner e efeito sinérgico no controle de larvas de *Aedes aegypti* (L.) (diptera: culicidae)**. 2009. 93f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

CRICKMORE, N. Beyond the spore-past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.101, p.616-619, 2006.

DIAS, J. M. C. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.2759-76, 1992.

DU, C.; NICKERSON, K. W. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2932-2939, 1996.

ESPINASSE, S.; CHAUFaux, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 47, p. 501-507, 2003.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p.137-141, 1997.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy Science**, Calcutta, v.93, p.5389-5394, 1996.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial restriction data. **Genetics**, Pennsylvania, v.131, p.479-491, 1992.

FALCON, L. A. Use of bacteria for microbial control, p. 67-95. In: BURGESS, N. W (Ed.), **Microbial control of insects and mites**. New York: Academic Press, 1971, 861p.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102p.

FANG, J.; XU, X.; WANG, P.; ZHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; CHENG, J.; FENG, M. G.; SHEN, Z. Characterization of Chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 Toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, n.3, p.956–961, 2007.

FATORETTO, J. C. **Associação de bioensaio e caracterização molecular para seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda***. 2002. 105f. Monografia. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v.10, n.3, p.271-275, 1992.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, p.23-51.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A. M. R. Transgenic plants for insect pest control: A forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, London, v.15, p.13-19, 2006.

FIUZA, L. M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos: análises *in vitro* de receptores membranares de proteínas Cry em larvas de lepidópteros. **Biotecnologia**, Piracicaba, v.32, p.84-89, 2004.

FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.101, n.1, p.1-16, 2009.

FRUTOS, R.; FEDERICI, B. A.; REVET, B.; BERGOIN, M. Taxonomic studies of *Rickettsiella*, *Rickettsia*, and *Chlamydia* using genomic DNA. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.63, n.3, p.294-300, 1994.

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.; VENDRAMIN, J. D. **Manual de entomologia agrícola**. 2. ed. São Paulo: Ceres, 1988, 486p.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chichester: John Wiley & Sons, 2000, 350 p.

GORDON, R. E.; HAYVES, W. C.; PANG, C. H. N. **The Genus *Bacillus***. Washington DC: Agriculture Research Service, US Department of Agriculture, 1973. 283 p. (Agriculture Handbook, n. 427).

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

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J. Functional mapping of an entomocidal δ -endotoxin: single amino acid changes produced by site-directed mutagenesis influence toxicity and specificity of the protein. **Journal of Molecular Biology**, London, v.208, p.183-194, 1989.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2005, 600p.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.1, p.185-189, 2001.

HANSEN, B. M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. CHARLES, J. et al. (Ed), p.41-64, Kluwer Academic Publishers, 2000.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.107, p.219–225, 2009.

HERRERA-ESTRELLA, L. Transgenic plants for tropical regions: Some consideration about their development and their transfer to the small farmer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.96, p.5978-5981, 1999.

JAMES, C. **Situação global das culturas biotecnológicas/ GM comercializadas: 2009**. ISAAA Briefs (Serviço Internacional para Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia), 2009, v.41.

JAMES, C. **Situação global da comercialização das lavouras GM: 2006**. ISAAA Briefs (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications), 2006, v.32.

JAMES, R. R.; CROFT, B. A.; STRAUSS, S. H. Susceptibility of the Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to Different Strains and Transgenic Toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Environmental Entomology**, Lanhan, v.28, n.1, p.108-115, 1999.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, London, v.24, n.2, p.275-308, 1994.

KRIEG, A. Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.425-426, 1971.

LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E. A.; DEAN, D. H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.583-586, 1996.

LEONARD, B. R.; GRAVES, J. B.; ELLSWORTH, P. C. Insect and mite pests of cotton. In: SMITH, C.W.; COTHREN, J.T. **Cotton: origin, history, technology, and production**, 1999, p.489-551.

LERECLUS, D.; AGAISSE, H.; GRANDVALET, C.; SLAMITOU, S.; GOMINET, M. Regulation of toxin virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v.290, p.295-299, 2000.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley; Sons, 1993, p.37-70.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of *cry1* gene Contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.9, p.5391-5398, 2005.

LEUBER, M.; ORLIK, F.; SCHIFFLER, B.; SICKMANN, A.; BENZ, R. Vegetative Insecticidal Protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for Oligomer and Channel Formation. **Biochemistry**, Washington, v.45, p.283-288, 2006.

LEVINSON, B.; KASYAN, K.; CHIU, S.; CURRIER, S.; GONZÁLES, J. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p.3172-3179, 1990.

LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Identification of new isolates de *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxins

electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.25, p.225-229, 2002.

LIU, T.; GUO, W.; SUN, W.; SUN, Y. Biological characteristics of *Bacillus thuringiensis* strain Bt11 and identification of its cry-type genes. **Frontiers of Agriculture in China**, Beijing, v.3, n.2, p.159–163, 2009.

LOGUERCIO, L. L.; BARRETO, M. L.; ROCHA, T. L.; SANTOS, C. G.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.93, p.269–277, 2002.

LÓPEZ-PAZOS, S. A. GÓMEZ, J. E. C., CERÓN, J. A. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, doi:10.1016/j.jip.2009.05.011, 2009.

MAAGD de, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Kedlington, v.17, p.193-199, 2001.

MARTINEZ, C.; IBARRA, J. E.; CABALLERO, P. Association analysis between setoptype, Cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.90, p.91-97, 2005.

MARTINS, E. S. **Estudo da atividade de proteínas Cry derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro.** 2009. 102f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

MARTINS, É. S.; AGUIAR, R. W. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.104, p.1363–1371, 2008.

MARTINS, É. S.; AGUIAR, R. W. S.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M.; **Cry1Ba protein is toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman).** Direct Submission, *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt>, 2006.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MONNERAT, R. G. **Desenvolvimento de metodologia de bioensaio de dose contra o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) utilizando estirpes de *Bacillus thuringiensis*.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. (Comunicado técnico, 108).

MELATTI, V. M. **Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*).** 2008. 101f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

METCALF, R. L.; METCALF, R. A. **Destructive and useful insects: their habits and control.** New York: McGraw-Hill, 1993.

METTUS, A. L.; BAUM, J. A. **Polypeptide compositions toxic to (Diabrotica) insects, obtained from *Bacillus thuringiensis*; CryET70, and Methods of Use.** WIPO Patent WO 026378, 2000.

MIRANDA, J. E. **Distribuição vertical de lagartas de *Spodoptera frugiperda* no algodoeiro.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. (Comunicado Técnico, 277).

MONNERAT, R.; PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas.** Brasília: Embrapa Cerrados, 2006, 352p.

MONNERAT, R.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.; AZEVEDO, J. **Controle Biológico.** Jaguariúna, São Paulo, v.3. p.163-200, 2000.

MONNERAT, R. G.; DIAS, S. C.; OLIVEIRA-NETO, O. B. de; NOBRE, S. D.; SILVA-WERNECK, J. O., SÁ, M. F. G. **Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório.** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, 5p.

MORAES, M. G. **Plantas GMs na agricultura: um balanço de 12 anos de uso e o futuro.** Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/plantas_gm_na_agricultura.pdf>. Acesso em: 22 de novembro de 2010.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole, 1986, p.127-170.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: Editora UFLA, 2006, 729 p.

NAIMOV, S., WEEMEN-HENDRIKS, M., DUKIANDJIEV, S., DE MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.5328–5330, 2001.

NAKASU, E. Y. T. **Potenciais receptores de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) para toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis***. 2009. 101f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

NARIMAN, A. H. A. Detection of *cry* genes in local *Bacillus thuringiensis* isolates. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.4, p.461-466, 2007.

NAZARIAN, A.; JAHANGIRI, R.; JOUZANI, G. S.; SEIFINEJAD, A.; SOHEILIVAND, S.; BAGHERI, O.; KESHAVARZI, M.; ALAMISAEID, K. Coleopteran-specific and putative novel cry genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.102, p.101–109. 2009.

OELLER P.W.; LU, M.W.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A.; Theologis, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, vol.254, p.437-439, 1991.

OLIVEIRA, M. E. C. R.; CARDOSO, U. P.; BRITO, A. F.; SANTOS, V. C.; MENEZES Jr.; A. O.; CASTELLANI, M. A. Infestação, parasitismo e predação do bicudo do algodoeiro *Anthonomus Grandis* Boheman Coleoptera: Curculionidae) em cultivo de algodão no semi-árido do sudoeste da Bahia. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 60°, 2008, Campinas. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBPC/UNICAMP, 2008. Disponível em: <<http://www.sbpcnet.org.br/livro/60ra/resumos/resumos/R3171-1.html>>. Acesso em: 25 novembro de 2010.

OLIVEIRA, G. R. **Evolução *in vitro* de moléculas Cry ativas contra *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda***. 2008. 106f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

PICCHI, S. C.; VILAS-BOAS, L. A.; CERESINI, P. C.; LEMOS, E. G. M.; LEMOS, M. V. F. Strain variability in the DNA immigration control region (ICR) of *Xylella fastidiosa*. **Research in Microbiology**, v.157, p.254–262, 2006.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* aplicados na engenharia genética de plantas, conferindo resistência a insetos-praga. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v.3, n.3, p.159-168, 2008.

PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.4, p.699-702, 2003.

POLANCZYK, R. A. **Estudo de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**. 2004. 144f. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. *B. thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, v.7, p.1-10, 2003.

PONCHIO, L. A. **Paridade de preços nos mercados nacional e internacional do algodão e a competitividade da cotonicultura brasileira**. 2001. 48f. Monografia (Trabalho de graduação). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

PORCAR, M.; GARCÍA-ROBLES, I.; DOMÍNGUEZ-ESCRIBA, L.; LATORRE, A. Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry3Aa endotoxins on predatory Coleoptera tested through artificial diet-incorporation bioassays. **Bulletin of Entomological Research**, v.100, p.297-302, 2010.

PORCAR, M.; JUAREZ-PEREZ. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology**, Farhan Royal, v.26, p.419-132, 2003.

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 Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.1, p.11-16, 2004.

RABINOVITCH, L.; SILVA, C. M. B.; ALVES, R. S. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000, v.2, p.17-90.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.10, p.6276-6281, 2005.

RUCKMINI, V.; REDDY, C. Y.; VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie**, Paris, v.82, p.109-116, 2000.

SANTOS dos, R. C. **Estudos biológicos e moleculares da colesterol oxidase visando o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**. 2003. 152f. Tese – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

SAUKA, D. H.; COZZI, J. G.; BENINTENDE, G, B. Detection and Identification of cry1I Genes in *Bacillus thuringiensis* Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **Current Microbiology**, New York, v.52, p.60-63, 2006.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin: a software for population genetics data analysis**. User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva, 2000.

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

SEAB. **SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO**. Disponível em: <<http://www.seab.pr.gov/modules/noticias/article.php?storyid=3523>>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2011.

SHI, Y.; MA, W.; YUAN, M.; SUN, F.; PANG, Y. Cloning of *vip1/vip2* genes and expression of Vip1Ca/Vip2Ac proteins in *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, London, v.23, p.501-507, 2007.

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* HUBNER). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.1, p.67-74, 2002.

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Interação planta-inseto: adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase produzidos pelas plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, v.2, p.38-42, 2000.

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

SOBERÓN, M.; FERNÁNDEZ, L.; PÉREZ, C.; GILL, S.; BRAVO, A. Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. **Toxicon**, Kidlington, 03 p., 2006.

STATSOFT. **Statistica, version 7**. 2004. Disponível em: www.statsoft.com. Acesso em: 13 de janeiro de 2011.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology**, Palo Alto, v.39, p.47-79, 1994.

TABASHNIK, B. E.; CUSHING, N.L.; FINSON, N.; JOHNSON, M.W. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.83, n.5, p.1671-1676, 1990.

THULER, A. M. G. ***Bacillus thuringiensis*: diversidade gênica, estrutura genética de populações e eficiência no controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**. 2007. 93f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

TOLEDO, D. M.; BRODSKY, H. A.; PARDO, G. E.; CONCI, O. C.; BRAGA SOBRINHO, R. **Monitoreo del picudo del algodono (*Anthonomus grandis*)**

Bh.) em el Noreste Argentino. Universidad Nacional Del Nordeste, 2000. (Comunicaciones Científicas y Tecnológicas).

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identification of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* strains that are efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, p.147-153, 2000.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.50, n.8, p.605-613, 2004.

WARREN, G.W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: CAROZZI, N.; KOZIEL, M. (Ed.). **Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants**. London: Taylor and Francis Ltd. 1997. p.109-121.

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, Memphis. **Proceedings...** p. 1296-1300.

WOLFERSBERG, M. G.; CHEN, X. J.; DEAN, D. H. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin Cry1Aa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.279-282, 1996.

WHO. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 217: Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis*. Geneva, 1999. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>. Acesso em: 05 de setembro de 2010.

ZHONG, C.; ELLAR, D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LINC, S.; HARTC, E. R. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.76, n.2, p.131-139, 2000.