

BIOLOGICAL CONTROL

Atividade Tóxica de Isolados de *Bacillus thuringiensis* a Larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)

JULIANA R V DA COSTA¹, JULIANA R ROSSI¹, SUZANA C MARUCCI¹, ELIANE C DA C ALVES¹, HAROLDO X L VOLPE², ANTONIO S FERRAUDO³, MANOEL V F LEMOS¹, JANETE A DESIDÉRIO¹

¹Depto de Biologia Aplicada à Agropecuária; ²Depto de Fitossanidade; ³Depto de Ciências Exatas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal, Rod Prof Paulo Donato Castellane s/nº, 14.884-900, Jaboticabal, SP, Brasil; julcosta@fcav.unesp.br; jurossi@fcav.unesp.br; suzy_marucci@yahoo.com.br; eliane@fcav.unesp.br; hxlvolpe@ig.com.br; fsajago@gmail.com; mvictor@fcav.unesp.br; janete@fcav.unesp.br

Edited by Ítalo Delalibera Jr – ESALQ/USP

Neotropical Entomology 39(5):757-766 (2010)

Toxic Activity of *Bacillus thuringiensis* Isolates to *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Larvae

ABSTRACT - *Aedes aegypti* (L.), the main vector of dengue fever in Brazil, has been controlled with the use of massive chemical products, contributing to the development of resistance and decreasing the insect control efficiency. The control of dipterans with bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* has been satisfactory, due to the production of insecticidal proteins denominated Cry (crystal), Cyt (cytolytic) toxins and Chi (chitinase), and to the synergistic effects among them. The present work aimed to select *B. thuringiensis* isolates efficient against *A. aegypti* larvae. A bacterial collection containing 1,073 isolates of *B. thuringiensis*, obtained from different locations of Brazilian territory, had the DNA isolated and submitted to PCR amplifications using specific primers for *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* and *chi* genes. For the LC₅₀ and LC₉₀ determination, the entomopathogenic isolates were evaluated by selective and quantitative bioassays. Only 45 isolates (4.2%) presented amplicons for the *cry* and *cyt* genes. The *chi* gene sequence was detected in 25 (54.3%) of those isolates. From the 45 isolates submitted to the selective bioassays, 13 caused 100% mortality of *A. aegypti* larvae. The identification of *cry*, *cyt* and *chi* genes of *B. thuringiensis* and the toxicity analysis on *A. aegypti* led to the selection of a set of isolates that have the potential to be used in the formulation of new bioinsecticides.

KEY WORDS: Biological control, *cry*, *cyt*, chitinase, dengue fever

O desenvolvimento de resistência de populações de insetos aos inseticidas químicos afeta diretamente a reemergência de doenças transmitidas por vetores, principalmente aquelas em que não é possível a cobertura vacinal para garantir a proteção da população humana. *Aedes aegypti* (L.), com ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais, está sempre associado ao domicílio humano e proximidades, embora possa ser encontrado longe dos aglomerados urbanos. No Brasil, o controle químico tem sido ineficiente em conter o mosquito, o qual apresenta altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada (Ministério da Saúde 2007), tornando o seu combate uma tarefa difícil (Rey 2002).

Desse modo, são necessários estudos que propiciem métodos alternativos para o seu controle. Podem ser mencionados como métodos de controle biológicos alternativos aqueles produtos onde o ingrediente ativo são microrganismos, os quais são aplicados de maneira similar a um inseticida químico (Melo & Azevedo 1998).

No gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de

várias ordens de insetos-praga, como Lepidoptera, Coleoptera, além de dípteros vetores de doenças humanas (Cavados *et al* 2001, De Maagd *et al* 2003). *Bacillus thuringiensis* produz, durante sua esporulação, inclusões cristalinas, compostas por proteínas denominadas δ -endotoxinas, codificadas pelos genes *cry*, as quais são tóxicas contra diferentes hospedeiros. Muitas linhagens de *B. thuringiensis* possuem um único gene *cry*, enquanto outras podem apresentar complexas combinações de genes (Bravo *et al* 1998).

Diversas linhagens de *B. thuringiensis* produzem uma série de outras toxinas que podem participar da ação entomopatogênica. A proteína Cyt, de peso molecular 28 kDa, é uma citolisina de ação inespecífica, produzida, principalmente, pela variedade *israelensis*, sendo acumulada no cristal, juntamente com as δ -endotoxinas típicas desta variedade. Por não apresentar homologia com as demais proteínas Cry, as toxinas Cyt não são classificadas como δ -endotoxinas (Lereclus *et al* 1993).

Segundo Regev *et al* (1996), outras proteínas que vêm sendo estudadas no controle biológico de insetos são as quitinases (Chi) (Arora *et al* 2003), presentes em

isolados de *B. thuringiensis*. Estudos demonstram que a quitinase hidrolisa a quitina na membrana peritrofica do inseto, formando poros que facilitam o contato entre as δ -endotoxinas e seus receptores no epitélio intestinal, aumentando a toxicidade de *B. thuringiensis*.

Diversos laboratórios em todo o mundo buscam novos isolados de *B. thuringiensis* que produzam diferentes toxinas ou que estejam mais adaptados às condições locais, para que tenham melhor eficácia em campo e possam ser usados no manejo da resistência de insetos (Monnerat & Bravo 2000).

A caracterização e a identificação de genes *cry* de isolados de *B. thuringiensis* têm sido realizadas por meio da técnica de PCR (Fatoreto *et al* 2003, Nariman 2007). No entanto, as interações de proteínas produtoras de cristal podem afetar profundamente a toxicidade de um isolado; assim, os testes de toxicidade complementam a caracterização de cada isolado e podem sugerir seu real potencial no controle biológico dos insetos-alvo.

O objetivo deste trabalho foi identificar, por meio da técnica de PCR, a presença de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) e quitinase (*chi*), a partir de uma coleção de 1073 isolados de *B. thuringiensis* oriundos de diversas regiões brasileiras para, posteriormente, selecionar aqueles efetivos contra larvas de *A. aegypti* por meio de bioensaios seletivos e quantitativos, além de correlacionar o efeito das diferentes combinações gênicas com a eficiência dos isolados na mortalidade das larvas do mosquito. Novos isolados apresentando genes com diferentes modos de atuação poderão ser utilizados para o desenvolvimento de bioinseticidas com maior toxicidade e menores chances de o inseto tornar-se resistente.

Material e Métodos

Isolados de *Bacillus thuringiensis*. Analisaram-se 1073 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diversas regiões brasileiras, pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/Unesp – Campus de Jaboticabal, os quais foram estocados na forma de fitas de papel filtro, impregnadas com uma suspensão de esporos e mantidas a 10°C.

Como linhagens padrão foram utilizadas *B. thuringiensis* var. *israelensis* T04 001, *B. thuringiensis* var. *alesti* T03 001, *B. thuringiensis* var. *sotto* T04 001 e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, cedidas pelo “International Entomophatogenic *Bacillus* Center” do Instituto Pasteur (Paris).

Cultivo e extração de DNA total das bactérias. Os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar nutriente (extrato de carne 3 g/l, peptona bacteriológica 5 g/l e ágar 15 g/l) e incubadas a 30°C por 12h.

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se o Kit InstaGene Matrix (BioRad), segundo as instruções do fabricante. Uma colônia de cada amostra foi ressuspensa em 1,0 ml de água Milli-Q estéril, centrifugadas por 1 min a 15.294 g e o precipitado ressuspensa em 200 μ l da resina InstaGene Matrix - BioRad (em constante agitação em agitador magnético). As suspensões obtidas foram incubadas

a 56°C por 25 min, agitadas em vórtex por 10 s e incubadas a 100°C por 8 min. Em seguida, as amostras foram novamente agitadas em vórtex por 10 s e centrifugadas por 2 min a 15.294 g. O sobrenadante foi transferido para microplacas de polipropileno contendo 96 poços e armazenadas a -20°C.

Construção dos oligonucleotídeos iniciadores. Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) foram elaborados a partir de regiões conservadas de todas as sequências dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt2Aa*, *cyt1Aa* e *cyt1Ab* para a ordem Diptera, depositadas no GenBank, obedecendo a lista de nomenclatura das δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). Para o alinhamento das sequências utilizaram-se os programas ClustalW (Thompson *et al* 1994) e Gene Runner 3.0 (Hastings Software, Inc.). A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada pela MWG e Bio Synthesis. O par de oligonucleotídeo iniciador para o gene da quitinase (*chi*) foi o descrito por Lin & Xiong (2004) (Tabela 1).

Identificação de genes *cry*, *cyt* e *chi* por PCR. As reações de amplificação dos genes *cry* e *cyt* foram otimizadas de acordo com as sequências dos iniciadores e continham solução tampão 1X; 1,0-1,5 mM MgCl₂, 250 μ M dNTPs, 0,6-1,0 mM de cada iniciador, 1 U *Taq* DNA polimerase, 2,0-5,0 μ l da amostra de DNA e água destilada previamente esterilizada (q.s.p. 20 μ l). Uma solução tampão contendo 0,02% BSA (albumina sérica bovina) foi adicionada à reação de PCR para amplificação dos genes *cry11Ba*, *cyt1Aa* e *cyt1Ab*.

O programa utilizado foi otimizado de acordo com a temperatura de pareamento de cada iniciador (Tabela 1), sendo o passo inicial de desnaturação de 5 min a 95°C; 30-35 ciclos de 1 min a 95°C para desnaturação, 1,0-1,5 min a 48-54°C para pareamento dos iniciadores e 1,0-1,5 min a 72°C para extensão; um passo final para completa extensão de 5-10 min a 72°C.

As reações de amplificação do gene da quitinase (*chi*) foram conduzidas em solução tampão 1X; 1,5 mM MgCl₂, 200 nM dNTP; 200 nM de cada iniciador; 1 U *Taq* DNA polimerase, 2 μ l da amostra de DNA e água destilada previamente esterilizada (q.s.p. 20 μ l). O programa utilizado consistiu em um passo inicial de desnaturação de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C e 1,5 min a 72°C; um passo adicional de 10 min a 72°C para completa extensão. As amplificações foram realizadas em termociclador marca MJ Research, modelo PTC 100, equipado com circuito Hot Bonnet. Os fragmentos amplificados foram analisados em géis de agarose a 1,5% para os genes *cry* e *cyt* e 1,0% para o gene da quitinase (*chi*), contendo brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) e comparados com o marcador molecular “1kb DNA ladder” (Fermentas). Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento GEL DOC 2000 (BioRad), com o software Quantity-One.

Bioensaios com larvas de *A. aegypti*. Os isolados de *B. thuringiensis* positivos para presença dos genes *cry* e *cyt* díptero-específicos, além das linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* (controle positivo) e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle negativo), foram submetidos às análises de dois tipos de bioensaios: o seletivo ou discriminante,

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores usados para detecção dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* e quitinase (*chi*) de *Bacillus thuringiensis* e tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Produto (pb)	T° pareamento
<i>cry4Aa</i>	GAAGTGGGTATGGCACTCAAC(d) CTCACAACGATTAGACCCTTC (r)	777	48
<i>cry4Ba</i>	GCGAGGTTTCCCATGTCTAC(d) GTTGTAGGGTGGAAATTGTTATC (r)	347	52
<i>cry11Aa</i>	AGGATGGATAGGAAACGGAAG(d) CCGTATTCCAGCAGGTAAGC (r)	727	50
<i>cry11Ba</i>	TACAGGATGGATAGGGAATGG(d) TAATACTGCCATCTGTTGCTTG (r)	608	50
<i>cyt1Aa</i>	AACTCAAACGAATAACCAAG(d) TGTTCCTTTACTGCTGATAC (r)	300	53
<i>cyt1Ab</i>	AAGCAAGGGTTATTACATTACG(d) CCAATACTAAGATCAGAGGG (r)	698	54
<i>cyt2Aa</i>	GCATTAGGAAGACCATTTG(d) AAGGCTAAGAGTTGATATCG (r)	361	53
<i>chi</i>	ATGGTCATGAGGTCTC(d) CTATTCGCTAATGACG (r)	2027	45

(d) direto; (r) reverso

onde se testou a cultura final total da bactéria e que serviu para fazer uma pré-seleção dos isolados determinando quais apresentavam atividade entomopatogênica; e o quantitativo (ou de dose), cujo objetivo foi determinar, entre os isolados pré-selecionados, quais seriam os mais tóxicos. Para isso, foi determinada a concentração necessária para causar mortalidade de 50 e 90% da população (CL_{50} e CL_{90}).

Insetos. Utilizaram-se larvas de 3º instar de *A. aegypti* provenientes de ovos cedidos pelo Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores, Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) – Instituto de Ciências Biológicas (ICB), os quais permaneceram no LGBBA, sob as seguintes condições: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. de 75 a 80% e fotofase de 1h (Eiras 1991). Durante o desenvolvimento, as larvas foram mantidas em cubas plásticas com água sem cloro (aproximadamente 5 cm de profundidade) e alimentadas com ração em pélets para répteis (Reptolife®) durante todo o ciclo larval.

Preparo das suspensões bacterianas. Para o preparo das suspensões de esporos/cristal, os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo as linhagens padrão, foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura ágar nutriente e incubados a 30°C durante cinco dias, permitindo a completa esporulação e liberação dos cristais. Após esse período, todo o conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubos de centrífuga (Falcon) contendo 10 ml de água grau Milli-Q autoclavada e 0,05% de TWEEN20® (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada e utilizada na preparação de suspensão $1,5 \times 10^7$ esporos-cristal/ml, a qual foi testada no bioensaio seletivo.

Bioensaios seletivos. Os bioensaios seletivos foram realizados distribuindo-se suspensões de $1,5 \times 10^7$ esporos-cristal/ml dos isolados de *B. thuringiensis* positivos para os genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos), em copos descartáveis contendo 200 ml de água destilada e 20 larvas de 3º instar de *A. aegypti*. O experimento foi conduzido em quatro repetições e, para comparação dos resultados, foram incluídas as linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle negativo), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (controle positivo) e copos sem a cultura bacteriana (testemunha). A condução do experimento foi realizada em condição ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, $75\% \pm 5\%$ UR, fotofase de 12h), sendo a mortalidade larval avaliada nas quatro primeiras horas, 24h e 48h após aplicação da suspensão bacteriana, sendo consideradas mortas as larvas totalmente inertes.

Para caracterizar a distribuição dos isolados quanto à mortalidade foi utilizada a técnica exploratória de agrupamento por método hierárquico utilizando como medida de semelhança entre os isolados, a distância euclidiana e como algoritmo de agrupamento o método de Ward (Hair *et al* 2005). Como variáveis foram utilizadas as contagens de mortalidade nos tempos de exposição dos isolados frente às concentrações das suspensões bacterianas. As análises foram processadas pelo software Statistica, versão 7 (Statsoft 2004).

Bioensaios quantitativos (CL_{50} e CL_{90}). A CL_{50} e CL_{90} foram realizadas a partir de treze concentrações: 150,0; 75,0; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34; 1,17; 0,58; 0,29; 0,14; 0,07 e 0,03 x 10^5 esporos-cristal/ml da cultura bacteriana de cada isolado, cultivada nas mesmas condições descritas anteriormente. Em seguida, adicionou-se a suspensão bacteriana de cada um

dos isolados aos copos, seguindo as mesmas condições dos bioensaios seletivos.

Nas quatro primeiras horas e 24h após a aplicação da suspensão foi realizada a contagem do número de larvas mortas, determinando-se a CL_{50} e CL_{90} , por meio da análise de probit, utilizando-se o programa POLO PLUS (LeOra Software Berkeley, CA) (Finney 1971).

Resultados e Discussão

Presença de genes *cry*, *cyt* e *chi*. A amplificação dos fragmentos de tamanho esperado foi obtida por PCR utilizando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa*. As análises permitiram verificar que, dos 1073 isolados submetidos a PCR, apenas 45 (4,2% do total) apresentaram amplificação para um único gene ou para a combinação deles entre alguns isolados (Tabela 2).

A maioria dos isolados de *B. thuringiensis* apresentou perfis de genes *cry* e *cyt* variados, onde foi possível identificar a presença de um gene em 25 isolados, dois genes em quatro isolados, três em 10 isolados, quatro em quatro isolados e cinco em dois isolados, apresentando 14 diferentes combinações de genes. A identificação dos genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos), mediada por PCR, revelou que as maiores frequências de perfis gênicos na coleção estudada foram para *cry4Ba*, *cyt1Ab* e a combinação dos três genes *cry11Aa*, *cyt1Aa* e *cyt2Aa*.

As porcentagens de isolados de *B. thuringiensis* que amplificaram para os genes díptero-específicos foram relativamente baixas. Apenas sete (0,7%) isolados apresentaram amplificação para o iniciador *cry4Aa*, 25 (2,3%) para *cry4Ba*, 16 (1,5%) para *cry11Aa* e seis (0,6%) para *cry11Ba*. Para os iniciadores *cyt*, 17 (1,6%) amplificaram para o iniciador *cyt1Aa*, seguidos de sete (0,7%) para *cyt1Ab* e 12 (1,1%) para *cyt2Aa* (Fig 1).

A maior frequência obtida foi para o gene *cry4Ba*, encontrado em 25 isolados, seguido por *cyt1Aa* (18), *cry11Aa* (17), *cyt2Aa* (12), *cyt1Ab* (8) e *cry11Ba* (7). Apenas a

linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* amplificou para os sete genes estudados (Tabela 2).

Geralmente, a frequência de isolados díptero-específicos em uma coleção de *B. thuringiensis* é baixa quando comparada à frequência de isolados lepidópteros-específicos. A partir de 38 isolados de *B. thuringiensis*, Cavaleiro *et al* (2005) identificaram 14 isolados patogênicos, sendo 13 a insetos da ordem Lepidoptera e um a insetos da ordem Diptera, o qual apresentou perfil protéico semelhante a *B. thuringiensis* var. *israelensis*, apresentando os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*.

Duas coleções de *B. thuringiensis*, provenientes de ambientes terrestres e aquáticos foram caracterizadas quanto ao conteúdo de genes *cry* por Martínez & Caballero (2002). A maior frequência encontrada entre os isolados foi para os genes lepidópteros-específicos. Os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* e *cry11A* não foram encontrados nos isolados analisados.

Tendo em vista os casos frequentes de resistência, uma das formas de se manejá-la em populações de campo é a utilização de novos isolados de *B. thuringiensis* que apresentem perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry* e *cyt*, como os encontrados nos isolados deste estudo. A presença de diferentes genes não significa que eles estejam sendo expressos; no entanto, dá um forte indício de que esses isolados poderão ser empregados na formulação de novos bioinseticidas comerciais efetivos para dípteros.

Dos 45 isolados previamente caracterizados como díptero-específicos (Tabela 2), e que foram submetidos a PCR para detecção da presença do gene *chi*, foram obtidos 25 (54,3%) isolados quitinolíticos, que amplificaram fragmentos de DNA de aproximadamente 2.1 kb.

Bioensaio seletivo. Dos 45 isolados (díptero-específicos) de *B. thuringiensis* submetidos aos testes de bioensaios seletivos, 13 (28,9%) representados na Tabela 2, apresentaram 100% de mortalidade contra larvas de *A. aegypti*, sendo estes submetidos aos bioensaios quantitativos para cálculo da CL_{50} e CL_{90} .

A relação entre toxicidade e conteúdo de genes dos isolados de *B. thuringiensis* estudados sugere atuação

Tabela 2 Conteúdo gênico das linhagens padrão e dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e porcentagem de mortalidade de larvas de *Aedes aegypti* após aplicação de suspensões de $1,5 \times 10^7$ esporos-cristal/ml.

Isolados	Genes								Média de mortalidade (%)					
	<i>cry</i>				<i>cyt</i>				Tempo após aplicação (h)					
	<i>cry4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa</i>	<i>cyt1Ab</i>	<i>cyt2Aa</i>	<i>Chi</i>	1	2	3	4	24	48
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
<i>B. t. tenebrionis</i> ¹	-	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0
<i>B. t. israelensis</i> ²	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100	100	100	100	100
I_67	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	46,3	50
I_68	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	27,5	36,3
I_69	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	32,5	41,3
I_70	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	42,5	48,8
I_71	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	25	31,3

Continua

Tabela 2 Continuação.

Isolados	Genes								Média de mortalidade (%)					
	<i>cry</i>				<i>cyt</i>				Tempo após aplicação (h)					
	<i>cry4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa</i>	<i>cyt1Ab</i>	<i>cyt2Aa</i>	<i>Chi</i>	1	2	3	4	24	48
I_72	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	45	51,3
I_77	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	25	26,3
I_79	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	41,3	48,8
I_82	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	1,25	56,3	75
I_92	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0
I_102 ³	+	+	+	-	+	+	-	+	100	100	100	100	100	100
I_106 ³	-	+	+	-	+	+	-	+	100	100	100	100	100	100
I_107 ³	+	+	+	-	-	-	+	+	100	100	100	100	100	100
I_115 ³	+	+	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_118	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	1,25	25	43,7
I_119	-	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0	0	58,8	62,5
I_138	-	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0	0	63,8	65
I_143	-	-	-	-	-	+	-	-	0	0	0	0	0	0
I_144	-	-	-	-	-	+	-	-	0	0	0	0	0	0
I_145	-	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0	0	0	0
I_147 ³	+	+	+	-	-	-	-	+	100	100	100	100	100	100
I_153	-	+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	35	55
I_154 ³	+	+	+	-	-	-	-	+	100	100	100	100	100	100
I_166	-	-	-	-	+	-	-	+	0	0	0	0	0	0
I_168	-	-	-	+	+	-	+	-	0	0	0	0	0	0
I_169	-	-	-	+	+	-	-	-	0	0	0	0	0	1,25
I_177 ³	+	+	+	-	-	-	-	-	100	100	100	100	100	100
I_178 ³	+	+	+	-	-	-	+	+	100	100	100	100	100	100
I_186	-	-	-	+	+	-	-	+	0	0	0	0	0	0
I_188 ³	-	-	+	+	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_189	-	-	-	+	+	-	+	-	0	0	0	0	0	0
I_522	-	+	-	-	-	-	-	-	0	0	1,25	1,25	68,8	82,5
I_531 ³	-	-	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_534	-	-	+	-	+	-	-	-	0	0	0	0	37,5	43,8
I_559	-	+	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0
I_574	-	-	+	-	+	-	-	+	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25
I_575 ³	-	-	+	-	+	-	+	+	100	100	100	100	100	100
I_576 ³	-	-	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_577 ³	-	-	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_579	-	+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
I_580	-	+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
I_581	-	-	-	-	+	-	-	-	0	0	0	0	0	0
I_582	-	-	+	-	+	-	+	-	0	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5
I_585	-	+	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
I_1119	-	-	-	+	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0

¹ Isolado utilizado como controle positivo; ² isolado utilizado como controle negativo; ³ isolados que foram selecionados para avaliação de CL₅₀ e CL₉₀ nos bioensaios quantitativos; (+) presença do gene; (-) ausência do gene

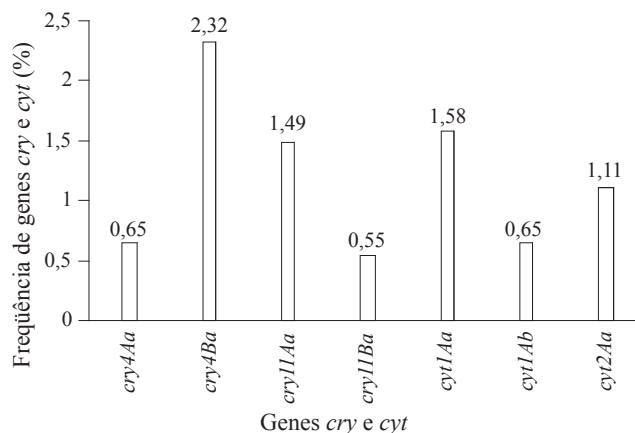


Fig 1 Frequência de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) nos isolados de *Bacillus thuringiensis*.

conjunta das toxinas no controle de *A. aegypti*. Os isolados que carregam três ou mais genes díptero-específicos (*cry* e *cyt*) foram efetivos nos testes dos bioensaios seletivos, ocasionando mortalidade de 100%, igualando-se ao tratamento com a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Alguns isolados (168, 186, 189, 574 e 582) apresentaram três combinações de genes e não apresentaram eficiência de controle contra as larvas dos insetos. Nestas combinações não estavam presentes os genes *cry4Aa* e *cry4Ba* e, nos isolados 574 e 582, o gene *cry11Aa* também não estava presente.

Ibarra et al (2003) identificaram novos isolados de *B. thuringiensis* com atividade tóxica a *A. aegypti*. Dentre eles, quatro foram superiores a *B. thuringiensis* var. *israelensis*, apresentando perfil protéico similar. Um deles apresentou atividade tóxica similar, mesmo contando com quatro proteínas diferentes (Cry11, Cyt1, Cyt2 e Cry30).

A importância da proteína Cry11Aa1 na toxicidade contra larvas de mosquito é conhecida (Federici et al 1990). Em alguns estudos a toxina Cry11Aa apresenta maior toxicidade em *A. aegypti*, *Anopheles stephensi* Liston e *Culex pipiens* L., enquanto a proteína Cyt1Aa é pouco tóxica, mas sinérgica o efeito tóxico das proteínas Cry (Gould 1998, Promdonkoy & Ellar 2000, Fernández et al 2006). As proteínas Cry4A e Cry4B também têm sido relatadas agindo sinérgicamente em larvas de mosquito (Bravo et al 2007), o que pode explicar a mortalidade causada pelo isolado 177, que não apresentou genes *cyt* mas apresentou os genes *cry4Aa*, *cry4Ba* e *cry11Aa*.

O gene *cry11Aa* foi encontrado em todos os isolados que apresentaram eficiência na mortalidade e em todos os períodos avaliados, havendo forte indício de que nos testes de toxicidade, a proteína Cry11Aa atue conjuntamente com, pelo menos, uma das proteínas Cyt. A combinação de pelo menos um gene *cry* com um dos genes *cyt* esteve presente nos isolados que apresentaram 100% de mortalidade. Dos três genes *cyt* (*cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*), os mais frequentes foram *cyt1Aa* e *cyt2Aa*.

As proteínas Cyt são toxinas hemolíticas e citolíticas produzidas por muitas linhagens de *B. thuringiensis*, particularmente as que demonstram atividade inseticida para mosquitos. A toxicidade de Cyt1Aa às larvas de mosquitos é

baixa em comparação com a de Cry4 e Cry11A (Crickmore et al 1995), o que confirma os dados obtidos neste trabalho, onde os isolados 166 e 581 apresentaram apenas o gene *cyt1Aa* e não foram eficazes no controle do mosquito (Tabela 2). No entanto, quando presentes em bioensaios, as proteínas Cyt adicionam à atividade de muitas toxinas Cry contra mosquitos, incluindo Cry4A, Cry4B e Cry11Aa.

A elevada associação entre as toxinas Cry e Cyt1A pode ser a base das interações sinérgicas para larvas de dípteros (Tabashnik 1992). De fato, o trabalho de Pérez et al (2005) mostrou que as toxinas Cry11Aa e Cyt1A têm a capacidade de se ligar através de epítomos existentes em ambas as moléculas. Em ensaios de interação mostrou também que a ligação de Cry11Aa à BBMF ("Brush Border Membrane Fraction") de *A. aegypti* foi otimizada pela presença da Cyt1A. O trabalho de Beltrão & Silva-Filha (2007), com ensaios de competição, mostrou que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, unem-se especificamente à BBMF de *A. aegypti*, sendo alta a afinidade para os sítios de união, sugerindo que o aumento na afinidade de união poderia ter ocorrido por meio da interação sinérgica com a toxina Cyt1Aa, a qual não fez parte da análise pelos autores. Esse dado reforça a idéia da necessidade de associação entre as toxinas Cry e a Cyt para a interação com o epitélio intestinal das larvas de *A. aegypti*.

Estudos realizados com *B. sphaericus* mostram que seu modo de ação, baseado na presença de uma única toxina, favorece o aparecimento de larvas resistentes de *Culex quinquefasciatus* Say. Wirth et al (2004) testaram combinações da toxina binária de *Bacillus sphaericus*, que apresenta duas proteínas (42 kDa e 51 kDa), com as toxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* para larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes e constataram que algumas dessas combinações foram tóxicas para as larvas, fato decorrente da maior complexidade das toxinas em ação. Avaliaram também o potencial de seleção de resistência em larvas de *C. quinquefasciatus* tratadas com a toxina binária sozinha ou combinada com a toxina Cyt1A do *B. thuringiensis* var. *israelensis*, observando que larvas expostas à toxina binária apresentavam resistência, enquanto a mistura da toxina binária e Cyt1A não provocava alteração na suscetibilidade das larvas (Wirth et al 2005).

A comparação da toxicidade com os diferentes genes da família Cry mostra claramente a superioridade, em termos de atividade inseticida, do gene *cry11Aa*, já que esteve presente nas combinações e, as combinações dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* mostraram-se como a segunda contribuição mais importante à toxicidade.

Quanto à importância da detecção do gene *chi* nos isolados, alguns trabalhos relatam que a co-aplicação de δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* com quitinases bacterianas aumenta o efeito inseticida da bactéria para larvas de insetos. No entanto, não se pode relacionar o aumento da atividade inseticida dos isolados deste trabalho com a presença do gene *chi*, já que, dos 13 isolados que apresentaram 100% de eficiência na mortalidade, apenas sete apresentavam o gene *chi* e, cinco isolados, que não apresentaram o gene *chi*, tiveram 100% de eficiência na mortalidade das larvas, provavelmente pela ação das outras toxinas envolvidas (Tabela 2).

Bioensaio quantitativo (CL₅₀ e CL₉₀). No primeiro período avaliado, após 1h da aplicação da suspensão bacteriana, os isolados 188 e 577 apresentaram os menores valores de CL₅₀ (0,116 e 0,133 x 10⁵ esporos/ml) e CL₉₀ (0,350 e 0,485 x 10⁵ esporos/ml) (Tabela 3). A linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresentou 0,332 e 4,975 x 10⁵ esporos/ml para CL₅₀ e CL₉₀ respectivamente, semelhantes ao isolado 107 (0,294 e 3,176 x 10⁵ esporos/ml) (Tabela 3).

No segundo período de avaliação, realizado 2h após a aplicação das suspensões bacteriana, os valores de CL₅₀ para os isolados 102 e 107 foram 0,022 e 0,016 x 10⁵ esporos/ml, respectivamente. Para os isolados 188 e 577, os valores da CL₉₀ foram (0,169 e 0,113 x 10⁵ esporos/ml, respectivamente). O isolado 178 (CL₅₀ = 0,078 e CL₉₀ = 0,351 x 10⁵ esporos/

ml) foi o que mais se aproximou dos valores da linhagem padrão (Tabela 3).

No terceiro período avaliado, 3h após a aplicação da suspensão bacteriana, não foi possível determinar os valores de CL₅₀ e CL₉₀ dos isolados 102, 107, 115, 188 e 577, pois os mesmos apresentaram índices de mortalidade superiores a 50%, mesmo utilizando baixas concentrações de esporos/cristal, não permitindo os cálculos. Dois isolados (106 e 531) apresentaram baixos valores (0,015 e 0,024 x 10⁵ esporos/ml) para CL₅₀ e (0,087 e 0,083 x 10⁵ esporos/ml) para CL₉₀, respectivamente. Os isolados cujos valores assemelharam-se à linhagem padrão foram 147, 154 e 576 e, nesse período, os isolados 177 e 575 apresentaram os maiores valores de CL₅₀ e CL₉₀.

Tabela 3 Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Aedes aegypti* após 1, 2 e 3h da aplicação da suspensão bacteriana.

Isolados	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	Slope ± SE	χ ²
<i>B. t. israelensis</i>	0,33 (0,06-1,01)	4,97 (1,51-15,51)	1,09 ± 0,12	23,77
I_102	0,19 (0,12-0,28)	0,90 (0,56-1,92)	1,91 ± 0,25	0,47
I_106	0,19 (0,13-0,28)	0,84 (0,53-1,79)	2,03 ± 0,27	1,66
I_107	0,29 (0,10-0,64)	3,17 (1,29-22,49)	1,24 ± 0,15	23,91
I_115	0,21 (0,09-0,42)	2,07 (0,96-9,15)	1,30 ± 0,16	18,42
I_147	0,25 (0,14-0,41)	1,34 (0,76-3,58)	1,78 ± 0,21	13,52
I_154	0,52 (0,30-0,89)	2,38 (1,29-7,40)	1,94 ± 0,22	11,27
I_177	0,48 (0,33-0,70)	1,71 (1,10-3,69)	2,34 ± 0,31	6,67
I_178	0,25 (0,18-0,35)	0,74 (0,50-1,43)	2,73 ± 0,37	8,99
I_188	0,13 (0,08-0,19)	0,48 (0,30-0,16)	2,27 ± 0,33	2,49
I_531	0,21 (0,11-0,36)	1,44 (0,76-4,58)	1,54 ± 0,19	0,49
I_575	1,73 (1,35-2,21)	4,58 (3,38-7,34)	3,03 ± 0,44	2,51
I_576	0,22 (0,16-0,32)	0,73 (0,48-1,56)	2,51 ± 0,34	12,41
I_577	0,11 (0,07-0,17)	0,35 (0,21-1,01)	2,68 ± 0,42	0,00
2h após aplicação				
<i>B. t. israelensis</i>	0,07 (0,03-0,12)	0,31 (0,18-1,22)	2,10 ± 0,36	72,98
I_102	0,02 (0,00-0,05)	0,33 (0,15-1,55)	1,08 ± 0,23	16,37
I_106	0,03 (0,00-0,07)	0,37 (0,17-2,12)	1,18 ± 0,24	19,37
I_107	0,01 (0,00-0,05)	0,53 (0,20-2,89)	0,84 ± 0,17	17,92
I_115	0,03 (0,00-0,08)	0,60 (0,25-3,48)	0,98 ± 0,18	20,63
I_147	0,06 (0,01-0,13)	0,57 (0,27-2,56)	1,41 ± 0,22	22,68
I_154	0,09 (0,04-0,13)	0,42 (0,22-2,61)	2,02 ± 0,33	28,70
I_177	0,14 (0,10-0,20)	0,43 (0,29-0,85)	2,71 ± 0,39	12,82
I_178	0,07 (0,03-0,13)	0,35 (0,19-1,45)	1,96 ± 0,34	159,74
I_188	0,04 (0,02-0,06)	0,16 (0,11-0,34)	2,28 ± 0,50	2,03
I_531	0,05 (0,03-0,07)	0,25 (0,16-0,50)	1,94 ± 0,38	7,12
I_575	1,06 (0,82-1,38)	3,11 (2,25-5,05)	2,75 ± 0,37	352,03
I_576	0,05 (0,02-0,08)	0,18 (0,12-0,46)	2,47 ± 0,47	14,98
I_577	0,04 (0,03-0,06)	0,11 (0,08-0,20)	3,34 ± 0,75	2,66

Continua

Tabela 3 Continuação.

Isolados	CL ₅₀ (IC 95%)	CL ₉₀ (IC 95%)	Slope ± SE	χ ²
<i>B. t. israelensis</i>	0,04 (0,01-0,08)	0,15 (0,09-0,69)	2,43 ± 0,48	16,11
I_102				2,76
I_106	0,01 (0,00-0,03)	0,08 (0,04-0,21)	1,66 ± 0,58	1,66
I_107				23,91
I_115				18,42
I_147	0,03 (0,01-0,06)	0,15 (0,09-0,48)	2,07 ± 0,48	13,52
I_154	0,04 (0,02-0,06)	0,16 (0,11-0,39)	2,23 ± 0,50	0,03
I_177	0,08 (0,06-0,11)	0,20 (0,15-0,33)	3,43 ± 0,59	6,67
I_178	0,02 (0,00-0,04)	0,18 (0,11-0,44)	1,51 ± 0,38	40,36
I_188				2,49
I_531	0,02 (0,00-0,03)	0,08 (0,05-0,19)	2,41 ± 0,78	0,49
I_575	1,03 (0,81-1,32)	1,03 (0,81-1,32)	3,03 ± 0,44	40,03
I_576	0,03 (0,00-0,05)	0,15 (0,09-0,45)	1,85 ± 0,47	19,13
I_577				0,00

CL₅₀: Concentração letal para 50% das larvas; CL₉₀: Concentração letal para 90% das larvas; IC: Intervalo de confiança a 95% de probabilidade. Número de larvas testadas: 15.600.

O isolado 575 pode ser considerado o de menor eficiência tóxica, pois apresentou CL₅₀ e CL₉₀ elevadas nos três períodos avaliados em comparação com os outros isolados e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

Foram determinadas a CL₅₀ e CL₉₀ nos três períodos de avaliação dada a importância do manejo da resistência em populações de insetos, no qual é necessário que se utilizem as menores concentrações de esporos/cristal necessárias ao controle do vetor. A baixa concentração de aplicação viabiliza economicamente os custos operacionais, que normalmente são mais expressivos devido à falta de

atividade residual da bactéria.

Não foi possível estimar a CL₅₀ e CL₉₀ no período de 4h e 24h após a aplicação da suspensão bacteriana pelos altos índices de mortalidade das larvas apresentados, os quais foram superiores a 50%.

A linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* utilizada como controle negativo e a testemunha, as quais não apresentaram eficiência de controle, formaram um grupo à parte quanto à mortalidade induzida em larvas do mosquito (Fig 2a). O isolado 575 foi o menos tóxico (Fig 2c). Os demais isolados 102, 106, 107, 115, 147, 154, 178, 188, 531,

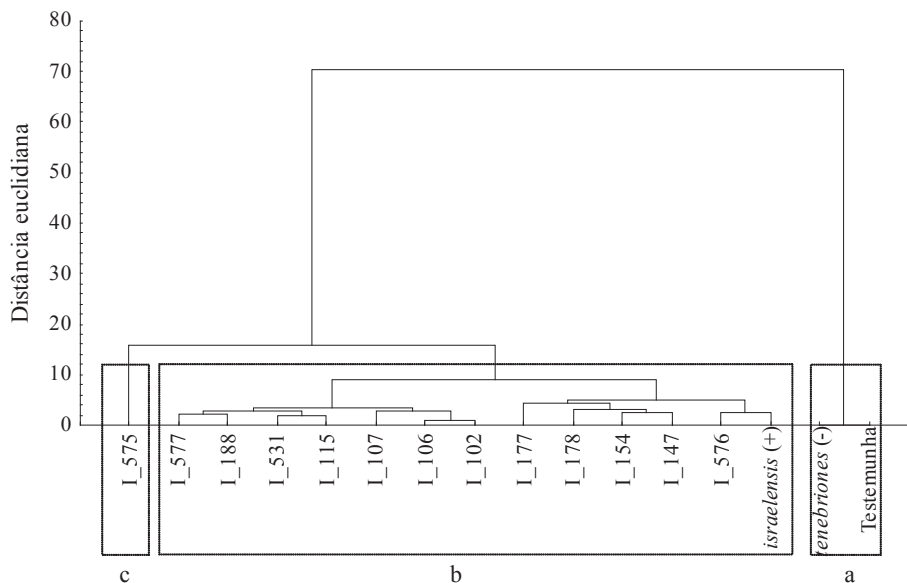


Fig 2 Dendrograma mostrando a ordenação dos isolados de *Bacillus thuringiensis* quanto à eficiência no controle de larvas de *Aedes aegypti*.

576 e 577 formam um grupo conjunto com *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Fig 2b), que apresentou melhor eficiência de controle às larvas, utilizando-se as menores concentrações de esporos-cristal/ml.

Os ensaios conduzidos neste trabalho mostraram que os isolados entomopatogênicos de *B. thuringiensis* provenientes de diversas regiões do território brasileiro são bastante distintos. Os isolados apresentaram diferentes combinações de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) e também *chi*, o qual foi amplamente encontrado nos isolados de *B. thuringiensis* e que, atuando conjuntamente com os demais, pode aumentar a toxicidade dos isolados.

Foi possível selecionar isolados de *B. thuringiensis* altamente tóxicos às larvas de *A. aegypti* com potencial inseticida similar ao da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*. A alta toxicidade desses isolados pode ser consequência da ação conjunta das toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa identificadas, que representam uma alternativa eficiente no controle de *A. aegypti*, com vantagens significativas como segurança humana, baixo desenvolvimento de resistência e a possibilidade de seu uso como fonte de genes para as toxinas inseticidas, tanto para produção de novos bioinseticidas, como para transferência em diversos microrganismos aquáticos, que são fontes de alimentos para larvas de *A. aegypti*. Essas possíveis estratégias tornam o entomopatógeno bastante promissor no controle biológico do inseto.

Agradecimentos

Ao Prof Álvaro Eduardo Eiras e a Renata Antonaci Gama, do Laboratório de Ecologia Química de Insetos Vetores do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

- Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, Bhatnagar R K (2003) A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem Biophys Res Commun* 307: 620-625.
- Beltrão H B M, Silva Filha M H N (2007) Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *FEMS Microbiol Lett* 266: 163-169.
- Bravo A, Gill S S, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
- Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Abarca C, Ortiz A, Ortiz M, Lina L, Villalobos F J, Peña G, Nuñez-Valdez M E, Soberón M, Quintero R (1998) Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64: 4965-4972.
- Cavados C F G, Fonseca R N, Chaves J Q, Rabinovitch L, Araújo-Coutinho C J P (2001) Identification of Entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1017-1021.
- Cavaleiro H, Praça L B, Martins E S, Medeiros PT, Gomes A A M M, Monnerat R G (2005) Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. *Bol Pesq Des* 87: 1-22.
- Crickmore V, Bone E J, Williams J A, Ellar D J (1995) Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol Lett* 131: 249-254.
- De Maagd R A, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf H E (2003) Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Ann Rev Genet* 37: 409-433.
- Eiras A E (1991) The role of human odours in host location behaviour by female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Tese Ph.D., University of Southampton, Southampton, 122p.
- Fatoretto J C, Sena J A D, Barreto M R, Lemos M V F, Boiça Jr A L (2007) Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop Entomol* 36: 737-745.
- Federici B A, Luthy P, Ibarra J E (1990) Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Structure protein composition and toxicity, p.16-44. In Barjac H D, Sutherland D D J (eds) *Bacterial control of mosquitoes & black flies: biochemistry. Genetics & applications of Bacillus thuringiensis israelensis and Bacillus sphaericus*. Rutgers Univ. Press. New Brunswick, 349p.
- Fernández L E, Aimanova K G, Gill S S, Bravo A, Soberón M A (2006) GPI- anchored alkaline phosphatases is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem J* 394: 77-84.
- Finney D J (1971) *Probit analysis*. 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 333p.
- Gould F (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Ann Rev Entomol* 43: 701-26.
- Hair J J F, Anderson R E, Tatham R L, Black W C (2005) *Análise multivariada de dados*. 5^a ed. Porto Alegre, Bookman, 593p.
- Ibarra J E, Del Rincón C, Ordúz S, Noiega D, Benintende G, Monnerat R, Regis L, De Oliveira C M F, Lanz H, Rodriguez M H, Sánchez J, Peña G, Bravo A (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol* 69: 5269-5274.
- Lereclus D, Delécluse A, Lecadet M M (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p. 37-69. In Entwistle P F, Cory J S, Baley M J, Higgs S (ed) *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. West Sussex, Wiley J, 13p.
- Lin Y, Xiong G (2004) Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. *Biotechnol Lett* 26: 635-639.
- Martínez C, Caballero P (2002) Contents of cry genes and

- insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *J Appl Microbiol* 92: 745-752.
- Melo I S, Azevedo J L (1998) Controle biológico. Jaguariúna, EMBRAPA, 264p.
- Ministério da Saúde (2007) Boletim epidemiológico da dengue. Disponível em <http://www.saude.gov.br> Acesso em 23 de novembro de 2008.
- Monnerat R S, Bravo A (2000) Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência, p.163-200. In Melo I S, Azevedo J L (eds) Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa-CN, v. 3, p.163-2000.
- Nariman A H A (2007) Detection of *cry* genes in local *Bacillus thuringiensis* isolates. *Aust J Basic Appl Sci* 4: 461-466.
- Pérez C, Fernandez L E, Sun J, Folch J L, Soberón M, Bravo A (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18303-18308.
- Promdonkoy B, Ellar D J (2000) Membrane pore architecture of a cytotoxic toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J* 350: 275-282.
- Regev A, Keller M, Strizhov N, Seneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J, Zilberstein A (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl Environ Microbiol* 62: 3581-3586.
- Rey L (2002) Dipteros nematóceros: anofelinos e culicíneos, p.312-323. In Koogan G (ed) Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara, 380p.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler D R, Dean, D H (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 775-806.
- Statsoft, Inc. (2004) Statistica, version 7. Disponível em: www.statsoft.com
- Tabashnik B E (1992). Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl Environ Microbiol* 58: 3342-3346.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J, Clustal W (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80.
- Wirth M C, Ferrari J A, Georghiou G P (2004) Baseline susceptibility to bacterial insecticides in population of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from Mediterranean islands of Cyprus. *J Econ Entomol* 4: 920-928.
- Wirth M C, Jiannino J A, Frederici B A, Walton W (2005) Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Invertebr Pathol* 88: 154-162.

Received 08/I/09. Accepted 05/II/10.
