

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus
thuringiensis* EFETIVOS CONTRA *Sitophilus oryzae* L., 1763**

Najara da Silva

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2008

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

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus
thuringiensis* EFETIVOS CONTRA *Sitophilus oryzae* L., 1763**

Najara da Silva

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Lemos

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

Jaboticabal – SP

Julho – 2008

Silva, Najara da
S586c Caracterização e seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis*
efetivos contra *Sitophilus oryzae* / Najara da Silva. – – Jaboticabal,
2008
vii, 40 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos
Banca examinadora: Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva,
Uderlei Denizete Silveira Covissi
Bibliografia

1. Bactéria empomopatogênica. 2. Coleóperos. 3. Proteína cristal.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

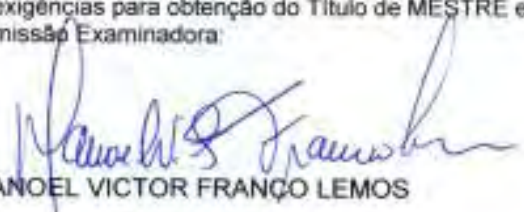
TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* EFETIVOS CONTRA *Sitophilus oryzae* L., 1763

AUTORA: NAJARA DA SILVA

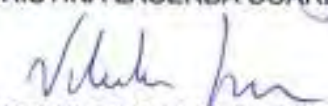
ORIENTADOR: Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Co-Orientador(a): Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:


Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS


Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA


Dr. UDERLEI DONISETE SILVEIRA COVISSI

Data da realização: 11 de julho de 2008.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NAJARA DA SILVA – Nascida em São Paulo-SP, em 24 de março de 1981. Bióloga, graduada pela FIF (Faculdades Integradas de Fernandópolis), Fernandópolis-SP.

Confiança...

*“Não deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem, ou que seus planos nunca vão dar certo, ou que você nunca vai ser alguém... Se você quiser alguém em quem confiar, confie em si mesmo.
Quem acredita sempre alcança.”*

(Renato Russo)

Aos meus pais

Oriete Máximo Pereira

Hostálio da Silva Pereira

Por serem a presença nos momentos de solidão, pelo respeito à minha maneira de ser... Eu não teria conseguido sem vocês! Este momento feliz também é seu... eu farei dele eterno, pois o carinho, o estímulo e o amor foram armas dessa vitória...Eu amo vocês!

DEDICO

Ao meu irmão Wallace, pelo apoio no decorrer desse caminho,

À minha irmã Sandra Maria.

Às minhas queridas sobrinhas

Tainara, Yasmin e Allana, pela alegria e carinho...

À minha cunhada Mônica, por me incentivar.

A TODOS os meus amigos de Fernandópolis, em especial ao Prof. Dr. Uderlei e

Prof. Dr. Carlos Eduardo, pelo apoio aos meus sonhos e auxílio para que se

tornassem reais... Muito obrigada.

Aos meus queridos amigos de Jaboticabal, Fátima, Miguel, Eredi e Naellen, que

foram a minha segunda família nos momentos felizes e difíceis...

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por estar sempre ao meu lado, dando-me força quando pensei em fraquejar, por me acompanhar desde o início dessa longa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela confiança e carinho em transmitir seus conhecimentos, suas experiências e apoiar-me em todas as dificuldades, ensinando, antes que com palavras, pelo exemplo.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela contribuição para a realização deste trabalho.

À Eliane Cristina Cunha Alves, pelo auxílio nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos, pelas sugestões e ensinamentos nas análises morfológicas.

Ao Dr. João Carlos Campanharo, pela dedicação e ensinamentos que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela auxílio financeiro.

À instituição UNESP-Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade concedida.

À seção de pós-graduação, biblioteca, depto de Biologia, ao curso de pós-graduação em microbiologia e a toda a coordenação, pelo auxílio prestado.

A todos os funcionários que, direta ou indiretamente, cooperaram para o bom andamento do trabalho, principalmente àqueles que foram capazes de um gesto de

compreensão e bondade, marcando de uma forma particular minha passagem por esta instituição.

A uma pessoa especial que, durante esse período, esteve ao meu lado, por me oferecer os melhores sentimentos: respeito, carinho e afeto. A você, Marcílio P. Turco.

Em especial à Dra. Ana Maria Guidelli Thuler, pela amizade, atenção, dedicação e força, nos momentos em que a dúvida e o medo se fizeram presentes.

Ao Dr. Irlan Leite de Abreu, pela compreensão, amizade e apoio neste trabalho.

À Janaína, Juliana Costa, Juliana Rossi, Juliana Xavier, Larissa, Michele, Marta, Emeline, Lúcia, Rebeca e Suzana pela convivência, sugestões e amizade.

Aos meus amigos Renato (Chacal), Livia (Bimba), Paula Brunini, Camila Davolos, por tudo que vivemos juntos, mostrando que amizade não tem preço. Pensei que este momento nunca chegaria e agradeço por estarem presentes, fazendo de momentos difíceis uma vitória!

Agradeço a minha tia Odette pela compreensão e apoio, e a todos os tios e primos que acreditaram neste momento.

Aos professores da graduação e da pós-graduação, pelos ensinamentos, dedicação e amizade.

Agradeço a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	2
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Isolados de <i>B. thuringiensis</i>	13
3.2 Cultivo dos isolados.....	13
3.3 Extração de DNA pelo Kit InstaGene™ Matrix (Bio-Rad).....	14
3.4 Amplificação do DNA genômico	14
3.5 Análise do produto amplificado.....	16
3.6 Criação dos insetos.....	17
3.7 Bioensaios	17
3.8 Teste de virulência	18
3.9 Purificação de proteínas.....	19
3.10 Microscopia eletrônica de varredura.....	19
3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS Page).....	20
3.12 Detecção da proteína por Nitrato de Prata.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS.....	32

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* EFETIVOS CONTRA *Sitophilus oryzae* L., 1763

RESUMO - Como alternativa ao controle químico, principal método de controle de pragas agrícolas, a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é um agente de controle com características tóxicas e ambientais que permitem o controle de insetos-praga de acordo com as premissas do MIP. Com o objetivo de buscar novas linhagens potencialmente tóxicas para *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleóptera, Curculinidae), caracterizou-se molecularmente 1.073 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes partes do Brasil quanto ao conteúdo do gene *cry35Ba*. O material genético foi extraído através do kit InstaGene Matrix, utilizado para a amplificação das seqüências através da técnica de PCR, sendo os resultados visualizados em gel de agarose 1,5%. A classe do gene *cry35Ba* foi representada por 60 isolados (5,6%) de *Bt*, os quais foram submetidos ao bioensaio com larvas de *S. oryzae*. Dentre os isolados estudados, quatro causaram mortalidade acima de 50% nos testes de patogenicidade, e os isolados 544 e 622 foram os mais virulentos, conforme determinado pela estimativa da CL_{50} . Nos quatro isolados que demonstraram toxicidade, foi detectado através da microscopia eletrônica a presença de cristais esféricos, e um isolado apresentou cristais bipiramidais e cubóides e pôde-se verificar proteínas com 44 kDa, referentes aos genes *cry35Ba* por SDS-Page. Esses dados demonstram o potencial de *Bt* no manejo de *S. oryzae* e estudos são necessários para determinar a melhor forma de utilização desta tecnologia no manejo dessa praga.

Palavras- chave: bactéria entomopatogênica; coleópteros; proteína cristal.

CHARACTERIZATION AND SELECTION OF *Bacillus thuringiensis* ISOLATES EFFECTIVE AGAINST *Sitophilus oryzae* L., 1763

SUMMARY: An alternative to chemical control, which is the major agricultural pest control method, the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* is a control agent with toxic and environmental characteristics that allows the control of pest insects according to the IPM precepts. In order to find new strains, potentially toxic to *Sitophilus oryzae* Lineu, 1763 (Coleoptera: Curculinidae), 1073 strains of *B. thuringiensis* from different parts of Brazil were characterized molecularly for the cry35Ba gene. Genetic material was extracted with InstaGene Matrix kit, used for the amplification of sequences in PCR, and viewed in 1,5% agarose gel. The gene cry35Ba class was represented by 60 *B. thuringiensis* isolates (5.6%), which were then subjected to bioassays with *S. oryzae* larvae. Among the isolates studied, four caused more than 50% mortality in the pathogenicity tests, and the isolates 544 and 622 were the most virulent, as determined by CL50 estimates. The four isolates that were toxic showed in the electron microscopy the presence of spherical, and isolates one presented crystals bi-pyramidal and cuboid crystals, and a 44-kDa protein was found in SDS-Page, which correspond to the product of cry35Ba genes. These data demonstrate the potential of *B. thuringiensis* for the management of *S. oryzae* larvae. More studies are required to determine the best use of these isolates for pest management.

Key-words: coleopterans, crystal proteins, entomopathogenic bacterium.

1. INTRODUÇÃO

O controle de insetos, sejam eles nocivos à agricultura ou vetores de doenças, é feito hoje, em sua maioria, por produtos químicos. O uso desses inseticidas vem causando danos ao homem e ao meio ambiente, atingindo inimigos naturais, contaminando alimentos, solo, água e favorecendo uma rápida seleção de insetos resistentes. Como alternativa ao controle químico, pode ser feito o manejo integrado de pragas, onde se inclui o controle biológico, usando bactérias, fungos, vírus e outros organismos com tais habilidades.

Atualmente, o mercado mundial de bioinseticidas não chega a representar 5% do mercado de pesticidas. No entanto, a utilização desses produtos vem apresentando um crescimento anual 10 vezes maior quando comparado aos produtos químicos. Os produtos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* representam mais de 80% dos bioinseticidas e são usados especialmente em países como os Estados Unidos, onde sua comercialização chega a superar a dos inseticidas químicos.

O sucesso dessa bactéria na diversidade de produtos para o controle biológico deve-se em grande parte ao fato de sua característica tóxica ser determinada por proteínas produzidas durante a esporulação, sendo ativas contra pragas de diversas culturas, como a soja, algodão, gramíneas (pastagens, milho, cana, arroz), crucíferas (couve, couve-flor, repolho, brócolis), tomate, fumo, mandioca, café, eucalipto, alfafa, citrus, maracujá, seringueira, abacaxi, amendoim, coqueiros, cucurbitáceas (abóbora, pepino, melão, melancia). Essas toxinas são codificadas por genes, sendo que toxinas específicas a diferentes organismos são codificadas por genes diferentes. Este caráter monogênico apresentado por essas toxinas facilita em muito a manipulação destes genes em processos biotecnológicos.

O crescente uso da proteína cristal e a não-toxicidade causada a mamíferos têm levado a uma intensificada pesquisa de novas linhagens com diferentes espectros de ação. Além disso, o interesse de encontrar novas linhagens tem-se mostrado grande devido à preocupação com o manejo preventivo de resistência desses alvos às δ -endotoxinas

produzidas por *B. thuringiensis* e também buscando-se caracterizar melhor o modo de ação dessas proteínas (Carozzi et al., 1991).

O controle de pragas das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Nematoda é feito, na maioria das vezes, utilizando somente inseticidas químicos, visando simplesmente à aniquilação das pragas, sem considerar o desenvolvimento de estratégias de Manejo Integrado de Pragas (MIP) ou outras que visem a diminuir o impacto causado pelos inseticidas convencionais. Isto resulta em poluição do meio, intoxicação humana, aumento dos custos de produção e evolução acelerada da resistência das pragas aos pesticidas. O MIP ou estratégias semelhantes que tenham o objetivo comum de manejar as pragas, baseiam-se na integração de várias táticas de controle com objetivo de manter a população da praga abaixo do nível de dano econômico ou insuficiente para causar epidemias. A adoção dessa premissa permite a obtenção de produtos com baixo nível de resíduos e preserva o meio, favorecendo a atuação dos inimigos naturais (parasitóides, predadores e entomopatógenos) como agentes do controle de pragas.

Na presente proposta de trabalho, a bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* é mencionada como uma alternativa viável com grande potencial para o controle de coleópteros como *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleoptera, Curculionidae), gorgulho que constitui uma das pragas mais importantes dos grãos armazenados do Brasil por uma série de características que apresenta: elevado potencial biótico, infestação cruzada, elevado número de hospedeiro, adultos e larvas danificam o grão e também pelo fato de competir com o alimento humano, utilizando além de grãos produtos de cereais processados como macarão e mandioca desidratada. Nesse contexto, este trabalho objetiva caracterizar molecularmente 1.073 isolados de *B. thuringiensis* quanto ao conteúdo de genes *cry35Ba*, realizando bioensaios para verificar sua eficiência em larvas de *S. oryzae*, e traçar nos isolados tóxicos, perfis morfológicos e protéicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A crescente preocupação com o meio ambiente tem elevado a importância das pesquisas científicas que procuram diminuir a agressão constante que o ecossistema sofre por intervenções antrópicas. Por este motivo e outros, como o elevado custo de defensivos agrícolas e o aumento da resistência das pragas a esses produtos, o número de pesquisas com microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública aumentou (DESTÉFANO 2003). Entre estes microrganismos, destaca-se a bactéria *Bacillus thuringiensis*, que possui atividade entomopatogênica, amplamente utilizada como controle biológico de várias pragas agrícolas (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

A história dessa bactéria possui mais de um século (BERLINER, 1915) e foi descrita pela primeira vez por BERLINER (1911) quando este pesquisador isolou o bacilo da lagarta *Anagasta kuehniella*, uma mariposa que se desenvolve na farinha de trigo. Após essa descoberta, Berliner nomeou-o de *Bacillus thuringensis* em homenagem a província alemã de Thuringia. Embora esta tenha sido a primeira descrição, não foi o primeiro isolamento.

Em 1901, um biólogo japonês, S. Ishiwata isolou a bactéria como o agente causal da doença do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, quando a mesma já estava morta e foi denominada como “sotto-disease” (ISHAWATA,1901). Em 1908 Iwabuchi denominou esta bactéria de *Bacillus sotto Ishiwata*, que mais tarde, foi determinado como nome inválido, e o nome mais recente, *Bacillus thuringensis*, foi mantido, (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). A partir desta descoberta, o bacilo vem sendo isolado por outros pesquisadores (MATTE,1927; OHBA,1984).

Após este evento, a primeira tentativa de teste de campo envolvendo a bactéria *B. thuringiensis* foi conduzida por HUSZ (1929), através de um programa internacional de controle da lagarta européia do milho, da espécie *Ostrinia nubilalis*, onde se obtiveram resultados promissores. A partir daí, a bactéria *B. thuringiensis* foi considerada, pela indústria, como o primeiro entomopatógeno a ser amplamente explorado como agente de controle biológico (HALL,1967).

A produção comercial da bactéria *B. thuringiensis* teve início na França, quando foi lançado no mercado, em 1938, com um produto denominado Sporeine (LAMBERT & PEFEROEN, 1992). No início de 1950, o interesse pela utilização deste patógeno aumentou nos Estados Unidos, principalmente para o controle de lepidópteros (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992). No início da década de 1970, já havia vários produtos para o controle de Lepidoptera, e a descoberta da variedade *israelensis*, ativa sobre larvas de dípteros, revolucionou o controle de insetos vetores de doenças, particularmente dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium*. Em 1983, outro letal para larvas de Coleoptera, chamado de *B. thuringiensis* variedade *tenebrionis*, foi descoberto. Posteriormente, variedades tóxicas a nematóides e ácaros foram encontradas, embora não sejam ainda utilizadas comercialmente (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Devido a esta característica de especificidade ao inseto-praga, não tendo efeito sobre muitos dos inimigos naturais, é muito estudada como agente de controle biológico (HALL, 1967).

Dentro deste contexto, ressaltam-se a importância e a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de novos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, pois diferentes formulações e a identificação de novos isolados com diferentes toxinas podem promover maior atividade tóxica e melhor resultado do produto em diferentes condições ambientais (MEDEIROS, 2006).

O desenvolvimento da bactéria *B. thuringiensis*, Gram-positiva, faz-se em meios artificiais simples na presença de oxigênio, e em ambiente com certas restrições, como ausência de nutrientes, e esse bacilo entra em processo de esporulação, produzindo uma grande quantidade de proteína com atividade inseticida. Essas proteínas acumulam-se formando um corpo de inclusão protéica, fato este que as denominou de proteína Cristal (Cry), também chamada de δ -endotoxina (YAMAMOTO & DEAN, 2000; BRAVO et al., 2005).

As proteínas Cry são codificadas pelos genes *cry*, que se encontram preferencialmente localizados nos plasmídeos, geralmente conjugativos, e juntamente com uma freqüente associação a elementos genéticos móveis determinam a grande diversidade

desses genes e a conseqüente ocorrência de linhagens contendo diferentes combinações dos mesmos e, portanto, com perfis de toxicidade distintos (LERECLUS et al., 1993).

A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos: um deles dependente dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde estão classificados a maioria dos genes *cry*, e o outro, independente do processo de esporulação, como os genes VIPs, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

As protoxinas produzidas assumem formas morfológicas distintas evidenciadas através do estudo morfológico realizado por microscopia eletrônica, apresentando cristais bipiramidais, cuboidais, piramidais e esféricos. o qual pode fornecer indicações sobre a atividade tóxica e, conseqüentemente, a ligação dessa toxicidade aos diferentes tipos de genes codificadores de proteína cristal, efetivos contra vários insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (DE MAAGD et al., 2003). Essas diferenças estruturais e tóxicas também são reveladas pelos alinhamentos, mostrando regiões comuns entre genes *cry*, denominadas regiões conservadas, e regiões onde se apresentam diferenças na seqüência de nucleotídeos, resultando em diferentes proteínas Cry, ativas contra várias espécies de ordens distintas (SCHNEPF et al., 1998).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que a mesma possui. Estes genes codificam as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. A toxicidade das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

Esses cristais, quando ingeridos pelos insetos, juntamente com os esporos, são solubilizados em condições específicas de pH, atuam no sistema digestivo dos insetos e as protoxinas são convertidas em δ -endotoxinas. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto

também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, para de se alimentar (HÖFTE & WHITELEY, 1989; COPPING & MENN, 2000).

Um determinado isolado de *B. thuringiensis* pode produzir um ou mais tipos de cristais. Esse isolado por sua vez, pode conter uma ou mais toxina com peso molecular variado. Por exemplo, *B. thuringiensis* variedade *kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70kDa), enquanto *B. thuringiensis* variedade *tenebrionis* possui uma única toxina com peso molecular de 67 kDa, e uma relação parcial entre a composição da proteína e sua estrutura foi estabelecida por LERECLUS (1993) e GLARE & O'CALLAGHAM (2000) .

Segundo PARKER & FIEL (2005), as proteínas Cry, também chamadas de toxinas Cry, produzidas pela bactéria *B. thuringiensis* e secretadas como uma proteína solúvel em água, pertencem a uma classe de toxina conhecida como toxina formadora de poros (PFT). As toxinas formadoras de poros apresentam através da utilização da cristalografia de raios-X a estrutura tridimensional (Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa e Cry4Ba), sendo compostas por três domínios com funções distintas. As toxinas Cry, embora apresentem similaridade estrutural, demonstram diferenças consideráveis na seqüência de aminoácidos e nas atividades tóxicas contra diferentes organismos, fato que auxilia esclarecer diferenças na especificidade inseticida.

O domínio I foi descrito pela primeira vez em Cry3Aa por LI et al (1991) e, pelas propriedades deste domínio, sugere ser o domínio formador de poro da toxina Cry, ou seja, responsável pela inserção da toxina na membrana. Para isto, uma maior mudança conformacional é necessária a fim de transformar o domínio I e capacitar sua estrutura para inserção interna na membrana do hospedeiro (PIGOTT & ELLAR, 2007). O domínio II apresenta maiores variações na sua estrutura com diferenças consideráveis no tamanho, conformação e seqüência dos “loops”. Acredita-se que o domínio II possa ter uma importância determinante na especificidade da toxina, sendo responsável pela ligação toxina-membrana (LI et al., 1991; PIGOTT & ELLAR, 2007). O domínio III apresenta menos variações estruturais do que o domínio II, e a diferença essencial encontra-se no tamanho, na orientação e seqüências dos “loops” (BOONSERM et al., 2005), tendo a função de catalisar a ligação da toxina ao receptor (PIRES et al., 2004).

Estudos detalhados da atividade das δ -endotoxinas demonstram existir duas etapas na ligação da toxina ao receptor, envolvendo processos reversíveis e irreversíveis. No primeiro caso, mesmo havendo afinidade dos receptores de membrana no intestino dos insetos com as proteínas Cry, algumas toxinas podem ligar-se aos receptores, sem essa ligação ser suficiente para causar a morte das larvas de inseto. Isso deve-se ao fato de essas toxinas apresentarem especificidade reduzida, resultando em uma ligação pouco estável e reversível com o receptor, ou seja, a toxina reconhece o receptor, mas não se liga irreversivelmente a ele, não se projetando para dentro da membrana. No segundo caso envolve uma ligação forte da toxina ao receptor e a inserção da toxina na membrana, com conseqüente desenvolvimento da doença no inseto (ARONSO & SHAY, Y., 2001).

Em uma primeira abordagem de sistematização da classificação deste tipo de genes, HOFTE & WHITELEY (1989) classificaram-nos de acordo com a seqüência de aminoácidos de seus produtos e a especificidade de ação das toxinas. Como conseqüência do avanço da compreensão de seus mecanismos de ação, através de ferramentas da biologia molecular, novos genes cry foram seqüenciados e catalogados, originando diversas exceções dentro desta classificação inicial. Por esta razão, CRICKMORE et al. (1998) propuseram uma nova maneira de classificar tais genes, baseada somente na seqüência de aminoácidos codificada por eles, não levando em consideração o perfil de toxicidade.

Até o momento, a coleção de toxinas Cry possui aproximadamente 350 genes cry seqüenciados e classificados em 51 classes com diferentes subdivisões, dependendo do grau de similaridade de seus aminoácidos (CRICKMORE, 2008). Essa variabilidade genética existente entre os diferentes isolados de *B. thuringiensis* pode ser estudada pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). Essa técnica tem muitas utilidades e pode ser empregada com a finalidade de amplificar regiões conhecidas do DNA, para comparar geneticamente isolados de *B. thuringiensis* pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma toxina (BRAVO et al., 1998; CARROZI et al., 1991; PORCAR & JUARÉZ-PERÉS, 2003).

Vários pesquisadores buscam caracterizar novos isolados de *B. thuringiensis* quanto ao seu potencial entomopatogênico, contra principais pragas de grãos armazenados. Dentre essas pragas, o *Sitophilus oryzae* (L., 1763) (Coleoptera, Curculionidae) é uma das

principais pragas dos grãos armazenados no Brasil, por uma série de características que apresenta: elevado potencial biótico, infestação cruzada, praga de profundidade, elevado número de hospedeiros, e pelo fato de tanto larvas como adultos danificarem os grãos (GALLO et al., 2002). É uma espécie cosmopolita que, supostamente, teve sua origem na Índia, e foi disseminado pelo mundo por grãos infestados e transportados em navios (ATHIÉ & PAULA, 2002).

O armazenamento de grãos pode ser definido como um ecossistema em que, mudanças qualitativas e quantitativas podem ser ocasionadas por interações entre os fatores físicos, químicos e biológicos (SINHA, 1973). Dentre os fatores que afetam os grãos durante o armazenamento, o ataque pelo inseto-praga *S. oryzae* assume particular importância, principalmente em condições tropicais como a do Brasil, encontrando nos grãos um habitat ideal para o seu desenvolvimento (ATHIÉ & PAULA, 2002). Como consequência do seu desenvolvimento, o *S. oryzae* reduz o peso do grão (FONTES et al., 2003), o valor nutricional (IRABAGON, 1959) e também o poder germinativo das sementes (MATIOLI & ALMEIDA, 1978).

Para o controle dessa praga são utilizados inseticidas químicos, que são altamente tóxicos para o homem e para, o meio ambiente, e responsáveis pelo aparecimento de populações de insetos resistentes, apresentando-se como um dos principais riscos ambientais. Insetos evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade a longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Com o intuito de reduzir o uso desses produtos e os riscos trazidos por eles, é necessário o emprego de alternativas mais seguras de controle. Assim, os agentes de controle biológico, principalmente as toxinas produzidas pela bactéria *B. thuringiensis*, são uma alternativa ecologicamente viável (PRAÇA et al., 2004).

Embora seja uma praga importante, até o momento, não há relatos de estudos em que a bactéria *B. thuringiensis* tenha sido aplicada no controle dessa praga, não sendo conhecido, portanto, nenhum gene ativo para este inseto. Neste contexto, podemos ressaltar a importância da continuidade de pesquisas na busca de alternativas eficazes no controle dessa praga, sem danos ao meio ambiente.

Para isso, novas classes de genes *cry* vêm sendo estudada, e, segundo ELLIS et al. (2002) uma nova família de proteína cristal foi descoberta em isolado de *B. thuringiensis* contendo genes efetivos contra *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera, Chrysomelidae). Essas proteínas, denominadas de Cry34 e Cry35, mostram atividade tóxica ocorrendo como conjunto binário de proteína inseticida (MOELLENBECK et al., 2001). Este novo modo de ação é observado em bioensaios de patogenicidade e virulência, e também em milho geneticamente modificado (SCHNEPF et al., 2005; STORER et al., 2006).

Por serem proteínas recém-descobertas e relatadas como ativas à ordem Coleoptera para família Chrysomelidae, este trabalho apresenta uma nova alternativa de controle biológico, utilizando-se de isolados de *B. thuringiensis* brasileiros que possuem genes semelhantes aos descritos, que codificam a proteína Cry responsável pelo controle de *S. oryzae*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *B. thuringiensis*

Foram analisados 1.073 isolados de *B. thuringiensis* obtidos de vários pontos do território brasileiro, da coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal. Os isolados foram cedidos pelo Prof. Dr. Sérgio Batista Alves, do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos (Depto. de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP), Piracicaba-SP, Dr. Edílson Paiva (Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo), Sete Lagoas-MG, e Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos (Depto. de Biologia Aplicada à Agropecuária) FCAV/UNESP/Jaboticabal. Esse isolados são armazenados na forma de esporos impregnados em fita de papel-filtro, em tubos de plástico de 2 ml com tampa de rosca e água milli-Q estéril com temperatura controlada, em câmara incubadora tipo *Biologic Oxygen Demand* (B.O.D.), regulada para 10°C permanente.

3.2 Cultivo dos isolados

Neste procedimento, as fitas de papel, contendo esporos dos 1.073 isolados da bactéria *B. thuringiensis*, foram imersas em água estéril milli-Q com 24 h de antecedência ao cultivo. Foi retirada uma alíquota da solução de esporos, semeados com alça bacteriológica de platina em placas, de Petri contendo aproximadamente 10 ml de meio de cultura “Nutriente Agar” NA sólido (extrato de carne 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/l e Ágar 15 g/l), por 12 h, a $30 \pm 0,5$ °C, em câmara incubadora, para o desenvolvimento de colônias isoladas.

3.3 Extração de DNA total pelo Kit Insta-Gene Matrix® (Bio-Rad)

Para analisar o material genético, utilizou-se uma resina de troca iônica do Kit Insta-Gene Matrix produzido pela Bio-Rad.

Uma colônia isolada obtida do cultivo descrito foi ressuspensa em tubos para microcentrífuga em 1 ml de água destilada (milli-Q), centrifugada durante 1 min a 15.000 Xg, a 20°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspenso em 200 µl da resina Insta-Gene® Matrix. Em seguida, o material obtido, onde estavam o DNA e a resina, foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 min. Agitou-se vigorosamente em um aparelho agitador do tipo vórtex por 10 s e foi incubado em água fervente (100°C) por 8 min. O mesmo foi novamente agitado em vórtex por 10 s e centrifugado a 15.000Xg por 3 min a 20°C. Posteriormente, 150 µl do sobrenadante foram colhidos, transferidos para uma microplaca de polipropileno, contendo 96 poços, e armazenados em freezer -20°C até o momento do uso.

3.4 Amplificação do DNA genômico

As amostras de DNAs bacterianos foram submetidas a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com oligonucleotídeos iniciadores para o gene *cry35Ba*, elaborados a partir das seqüências do gene *cry35Ba* depositadas no GenBank, de acordo com a Tabela 1, utilizando-se do software Clustal W (THOMPSON et al., 1994) para o alinhamento das seqüências e identificação de regiões conservadas e do *Gene Runner* 3.0 (Hastings Software, Inc.) para a elaboração dos iniciadores.

Tabela 1. Iniciadores para isolados de *Bacillus thuringiensis* testados em *Sitophilus oryzae*.

Iniciador	Seqüência	Tamanho esperado amplificado (pb)
<i>cry35Ba</i>	F 5'AACTGATGAAATACCTGAAG 3' R 5'TCAACAATAAATCCTACAGC 3'	≈585 pb

F: Forward; R: Reverse

Após a síntese, esses oligonucleotídeos foram diluídos a uma concentração de 1.000 pmoles/ μ l em tampão TE 10:1 [10 mM Tris HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA], e essa solução foi armazenada em freezer a -20°C. Uma alíquota de 1 μ l foi diluída em 99 μ l de água milli-Q estéril, para uma concentração final de 10 pmol/ μ l, a qual foi utilizada nas reações de amplificação.

Essas reações foram compostas de tampão para reação de PCR (200 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,4), 1 mM de cloreto de magnésio, 250 μ M de uma solução de dNTPs, 10 pmol/ μ l de cada iniciador para o gene *cry35Ba*, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (INVITROGEN), 30 ng de DNA molde e água estéril filtrada e autoclavada milli-Q (q.s.p. 20 μ l).

A quantidade em microlitros de cada reagente componente da reação de PCR (exceto o DNA) foi multiplicado pelo número de diferentes amostras de DNA de *B. thuringiensis*, acrescido de 10% do volume total, visando a não faltar volume de reação para nenhuma amostra. Os reagentes foram homogeneizados com auxílio de uma micropipetadora.

Essas reações foram colocadas em aparelho termociclador (PTC-100 “programa thermal controller” – MJ Research, Inc®) programado com um passo inicial de desnaturação a 94°C, por 5 min e 35 ciclos, constituído de três passos: desnaturação a 94°C por 30 s; pareamento a 40°C por 45 s; extensão a 72°C por 1 min; e um passo extra de extensão a 72°C por 7 min. As reações foram mantidas a 4°C para a conservação do material.

3.5 Análise do produto amplificado

Após o processo de amplificação, adicionaram-se 3 µl de tampão de amostra (“loading buffer” – 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) às amostras, totalizando 23 µl. Todos os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), acompanhados de uma amostra de DNA contendo fragmentos de tamanho conhecido, múltiplos de 1 kb (1 kb Ladder, FERMENTAS), com o objetivo de servir como referência de migração eletroforética para cálculo do tamanho dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação, além do controle negativo, substituindo o DNA molde por água milli-Q estéril, mostrando ausência de contaminantes.

As eletroforeses foram realizadas em cubas horizontais modelos Sunrise[®] Life Technologies[®] e FB–SB2025 Fisher Scientific, a uma diferença de potencial de migração de, aproximadamente, 120 V por 90 min, conduzida em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, EDTA 2,5mM e Ácido Bórico mM com pH 8,3), também adicionado de brometo de etídio (0,5 µg/ml).

Os fragmentos de DNA, dispostos no gel de agarose, foram visualizados pela incidência de luz UV, documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO-RAD) e avaliados usando a imagem negativa, obtida através do “software” Quantity-One.

3.6 Criação dos insetos

A criação de *S. oryzae* foi realizada em conjunto com o Laboratório de Entomologia da Universidade Federal do Espírito Santo, em colaboração com o Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk.

A criação dos insetos foi feita em 4 recipientes plásticos com capacidade para 8 litros. Em cada recipiente, foi colocado, aproximadamente, 2,5 kg de milho e este foi infestado com 100 *Sitophilus oryzae* não-sexados. Os recipientes foram fechados, e o monitoramento do desenvolvimento das populações, nos diferentes, recipientes foi feito através da parede transparente do mesmo, sem movimentação da massa de grãos. Os insetos utilizados nos experimentos foram retirados dos potes, aproximadamente, seis meses após o início da criação.

3.7 Bioensaios

O caráter patogênico foi avaliado em 60 isolados de *B. thuringiensis*, pela amplificação do gene cry35Ba entre os 1.073 isolados analisados. Os mesmos foram cultivados em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI-Biobrás®), a 28°C, 180 rpm, por 76 h, para a produção dos cristais tóxicos.

Após o cultivo, a suspensão foi submetida a centrifugação para a obtenção do sedimento, sendo o mesmo submetido a três centrifugações (2.655 x g por 20 min) consecutivas a fim de lavá-lo e eliminar o meio de cultura.

Em seguida, uma alíquota de 1 ml foi diluída 1.000 vezes em água destilada esterilizada, e a concentração de esporos foi determinada conforme método descrito por Alves & Moraes (1998).

Os 60 isolados de *B. thuringiensis* foram usados em seis bioensaios contendo dez isolados cada, e os tratamentos foram constituídos de sete repetições e 20 g de grãos de milho (*Zea mays* L.). Seis dias antes da aplicação dos tratamentos, esses grãos foram colocados à disposição de 20 adultos não-sexados para oviposição, durante três dias. Após esse processo, foram submersos, por 1 min, em suspensão contendo *B. thuringiensis*

contendo 3×10^8 esporos/mL. Após a imersão das sementes, elas foram colocadas em câmara de fluxo laminar para a eliminação do excesso de umidade. Após o término da execução dos bioensaios, o material foi mantido à temperatura ambiente.

A mortalidade foi calculada pela diferença entre o número de insetos emergidos dos tratamentos e os emergidos da testemunha entre 25 e 60 dias após a aplicação dos tratamentos. Os dados foram corrigidos conforme a fórmula proposta por Abbot (1925) e submetidos ao “Teste de Tukey”, a 5% de probabilidade.

3.8 Teste de virulência

Nos testes de estimativa da concentração letal média (CL_{50}), foram utilizados os tratamentos que causaram mortalidade acima de 50% nos testes de patogenicidade, e as condições e os meios para o preparo das suspensões dos isolados de *B. thuringiensis* foram os mesmos dos testes de patogenicidade. As sementes de milho, seis dias antes da aplicação dos tratamentos, foram colocadas à disposição de 20 adultos não-sexados para oviposição durante três dias. Em cada tratamento, foram utilizadas sete repetições. Cada tratamento constou de 20 g de sementes de milho (*Zea mays*), anteriormente e submetidas à oviposição, submersas, por 1 min, em suspensão contendo *Bt* (3×10^3 , 3×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 , 3×10^7 e 3×10^8 esporos/ml). Após a imersão, as sementes foram colocadas em câmara de fluxo laminar para a eliminação do excesso de umidade. A avaliação da mortalidade foi feita a partir de 25 dias, após a aplicação dos tratamentos, até 60 dias, contando-se, diariamente, o número de adultos que emergiram.

3.9 Purificação de proteínas

Para a realização do processo de purificação, foram selecionados os isolados que apresentaram atividade tóxica para *S. oryzae*, através dos bioensaios seletivos.

Os isolados foram cultivados em “Nutriente Ágar”, como já descrito. Em seguida, a massa bacteriana foi coletada com auxílio de uma alça bacteriológica de platina e transferida para o caldo nutriente (3 g/l extrato de carne, 5 g/l peptona bacteriológica), dispostos em incubador rotativo a 200 rpm, a 30°C por 96 h até completa esporulação. A coleta das células foi feita por centrifugação a 5.930 x g 4°C 10 min. Este sedimento foi lavado com 30 ml NaCl 0,5 M e centrifugado a 5.930 x g 4°C 10 min, seguido de duas lavagens com água deionizada, a 4°C, nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuscitado em 1 ml de água deionizada, sendo essa suspensão sonificada durante 5 min para o rompimento de possíveis células íntegras e a liberação dos cristais protéicos. A purificação foi feita por ultracentrifugação com gradiente de sacarose, constituído de sacarose 79%, sacarose 67% e amostra das proteínas, montados em tubos para ultracentrífuga. Os tubos contendo o gradiente de sacarose permaneceram durante 15 min, a 4°C a 30.000 rpm. Foi retirada a inclusão protéica formada entre o gradiente de sacarose e depositada em tubos para centrífuga, seguidas de seis lavagens consecutivas com água deionizada gelada (5.930 xg 4°C 10 min) para a retirada da sacarose e a obtenção da proteína. A proteína foi armazenada em freezer a -20°C até o momento do uso (JUAREZ-PEREZ et al, 2002).

3.10 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos isolados foi constatada por microscopia eletrônica de varredura. Uma alíquota de cada amostra (esporo/cristal), obtida no processo de purificação de proteína, foi espalhada em lamínula com auxílio de alça bacteriológica; esse esfregão foi colocado em fluxo laminar para secagem. A seguir, a amostra foi depositada sobre suporte metálico coberto com ouro, por 180 s, utilizando metalizador Emitech, modelo K550, e analisada em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo DSM 962.

3.11 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-Page)

Para a preparação de 50 µl das amostras contendo proteínas, foram adicionados 25µl de tampão de amostra constituído de: 62 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β-mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol, aquecidas por 5 min a 100°C e centrifugadas a 10.621 x g por 30 s. De cada amostra foi retirado uma alíquota de 40µl e aplicada no gel.

A composição do complexo esporo-cristal, presente nas amostras, foi separada em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970), e os reagentes para a confecção dos géis e os respectivos volumes utilizados estão descritos na Tabela 2.

O gel de separação das proteínas foi composto por duas concentrações: um gel inicial concentrador a 5% e um gel posterior de separação, constituído de 8% de acrilamida. O preparado do mesmo foi realizado em placa de vidro medindo 162 x 200 mm com espaçadores de 1,5 mm e transferido para uma cuba vertical, com altura ajustável, da Sigma, modelo Z35, 280-2. A cuba foi cuidadosamente preenchida com tampão de eletrodo, constituído de 0,192M glicina, 0,025M Tris e 0,1% SDS.

A eletroforese desenvolveu-se em corrente constante de 25 mA até que o corante entrasse no gel de separação quando, então, foi aumentada para 30 mA e assim mantida até o final da corrida, durante quatro horas, a aproximadamente 25°C.

Tabela 2. Reagentes utilizados para a confecção dos géis.

Géis	%	Reagentes	Volume (mL)
SDS-PAGE (concentrador)	5	Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)	2,0
		Acrilamida – Bis (30:0,08%)	1,33
		H ₂ O	4,42
		SDS a 4 %	0,20
		Temed	0,02
		Persulfato de amônio a 10%	0,08
SDS-PAGE (separação)	8	Tris-HCl (2,25 M pH 8,8)	8,18
		Acrilamida – Bis (30:0,08%)	13,07
		H ₂ O	27,14
		SDS a 4 %	1,05
		Temed	0,04
		Persulfato de amônio a 10%	0,40

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio.

Temed – N,N,N',N' – tetramethylethylenediamine

3.12 Detecção da proteína por Nitrato de Prata

Após a eletroforese, o gel foi imerso em 150 ml de solução fixadora 50% de etanol e 10% de ácido acético, durante a noite. Realizaram-se duas lavagem consecutivas de 15 min, com 50 ml de água deionizada, onde se foi adicionaram 50 ml do reagente DDT (0,2 M ditiotretitol), por 15 min, para evitar a oxidação da proteína. Após esse procedimento, o gel foi transferido para 50 ml de uma solução de nitrato de prata a 0,2%, por 30 min, agitando-se suavemente para a coloração do gel. Para a revelação, utilizaram-se duas lavagem sucessivas de 15 s, com 50 ml de carbonato de sódio a 3% (NaCO₃), seguidas de mais três lavagens, com adição de 50 µl de formaldeído a 0,25%. Após o aparecimento das “bandas”,

a ação do revelador interrompeu-se rapidamente pela adição de 30 ml de ácido cítrico 1M. O gel foi mantido em água deionizada até ser fotografado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos têm relatado a caracterização de isolados de *B. thuringiensis* quanto ao conteúdo de genes *cry* com atividade para a ordem Coleoptera e outras ordens, como Lepidoptera e Diptera (PINTO & FIÚZA, 2003; PRAÇA et al., 2004).

No presente trabalho, a análise por PCR dos 1.073 isolados da bactéria *B. thuringiensis*, indicou 60 isolados (5,6%) potencialmente tóxicos, por conter o fragmento correspondente ao gene *cry35Ba* (Figura 1). Esses foram testados na realização dos bioensaios, e revelaram que somente quatro isolados (0,37%) causaram mortalidade acima de 50% em larvas de *S. oryzae* (Gráfico 1). Para relatar ausência de efetividade contra *S. oryzae* e especificidade de linhagens de *B. thuringiensis* para diferentes ordens de insetos, a variedade *kurstaki* HD-1 foi utilizada como controle negativo por não apresentar o gene *cry35Ba*, apresentando 4% de mortalidade para o *S. oryzae*. Como controle positivo, observaram-se 26,30 % de efetividade contra *S. oryzae*, utilizando-se da variedade *tolworthi*, que apresentou o gene *cry35Ba*, ressaltando a importância deste trabalho por encontrar novos isolados de *B. thuringiensis* com eficiência acima de 50%, superando o controle positivo.

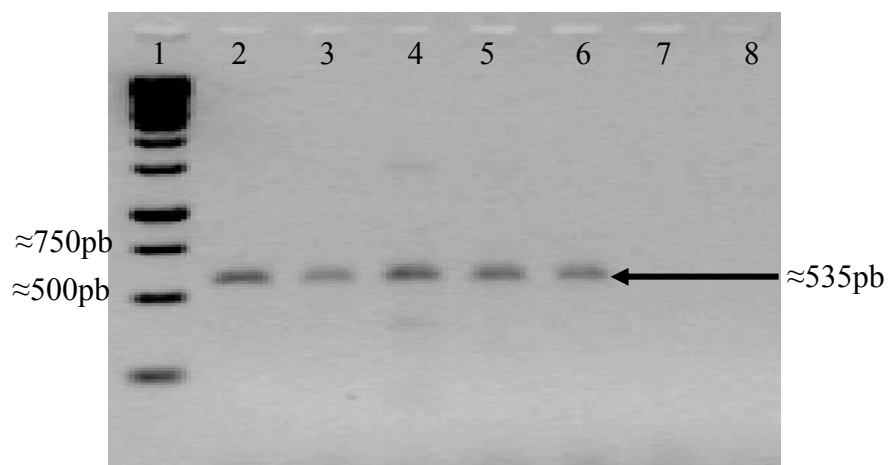


Figura 1. Eletroforograma do material genético amplificado com o primer específico para o gene *cry35Ba*. Canaleta 1: 1kb Plus DNA ladder®; 2: var. *tolworthi*; 3-6: isolados de *B. thuringiensis* em estudo; 7: var. *kurstaki* HD-1 e 8: controle negativo.

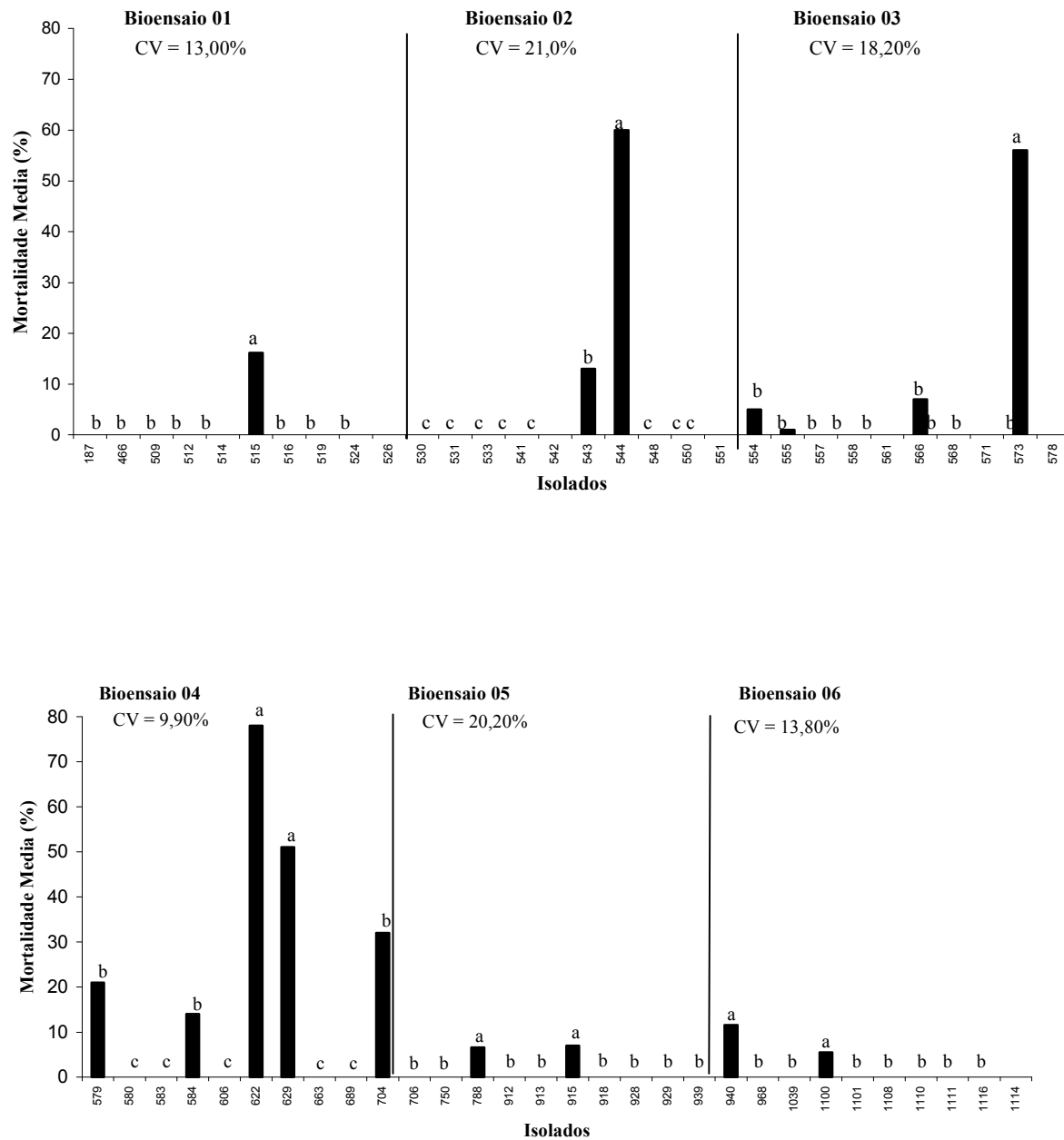


Gráfico 1. Mortalidade média causada por isolado de *Bacillus thuringiensis* em *Sitophilus oryzae*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, a 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Com os resultados obtidos nos bioensaios, pode-se verificar diferenças nas atividades tóxicas apresentadas pelos isolados onde, no segundo bioensaio, o isolado 544 destacou-se dos demais por ser mais ativo para *S. oryzae*, apresentando uma mortalidade de 60%. No terceiro bioensaio, o isolado 573 apresentou uma mortalidade de 56%, sobressaindo aos demais isolados. E no quarto bioensaio, dois isolados destacaram-se: o 622 com 78% de mortalidade, e o isolado 629 com mortalidade de 51%. Os demais isolados apresentaram o gene para a proteína *cry35Ba* e tiveram atividade tóxica para a larva do *S. oryzae* abaixo de 50%.

A baixa frequência com que se encontram isolados efetivos à ordem Coleóptera, vem sendo relatada por outros autores, utilizando diferentes classes de proteínas Cry, ativas à ordem Coleoptera. Pinto & Fiúza (2003) coletaram amostras de solos provenientes do Rio Grande do Sul e obtiveram o perfil genético de 46 isolados, sendo cinco com perfil gênico para mortalidade da ordem Coleoptera. Do mesmo modo, Praça et al., (2004) detectaram que apenas dois isolados (0,7%), entre 300 analisados, eram efetivos para coleópteros. Por outro lado, Bravo et al. (1998) realizaram a identificação de vários genes *cry* em uma coleção de 496 isolados obtidos a partir de amostras de solo de diferentes regiões do México, tendo verificado que 16 isolados apresentaram genes ativos para insetos da ordem Coleoptera. Dentro do mesmo contexto, ainda se pode-se verificar que Ben-Dov et al. (1997) analisaram 215 isolados provenientes do continente asiático e demonstraram a ausência de isolados contendo o gene *cry3*. A mesma situação foi relatada por Chak et al. (1994), na coleção composta por 225 isolados obtidos de amostra de solos de Taiwan, onde foram obtidos diferentes perfis gênicos, mas com ausência do gene *cry3*. Sendo assim, os genes com potencial tóxico para coleópteros são poucos e, em alguns casos, ausentes.

No entanto, dentre a diversidade das proteínas Cry conhecidas, novas proteínas têm sido relatadas com atividade entomocida contra a ordem Coleoptera, como a classe da proteína Cry35 (Ellis et al., 2002; Herman et al., 2002; Schenef et al., 2005), em especial para os insetos da família Chrysomelidae. A suscetibilidade de espécies de outras famílias, como Bostrichidae e Curculionidae, tem sido estudada em relação a outras proteínas Cry (Beegle, 1996; Saade et al., 1996), colaborando para que a bactéria *B. thuringiensis* seja

uma importante fonte de diferentes toxinas, muitas das quais com atividade inseticida para espécies da ordem Coleoptera.

Aparentemente simples, o estudo da atividade tóxica da bactéria *B. thuringiensis* tem algumas características específicas que devem ser consideradas. Neste estudo, houve variações na eficiência dos isolados testados para *S. oryzae* da ordem Coleoptera, podendo ser explicadas por uma série de fatores ligados ao modo de ação desse patógeno, tais como ativação da protoxina, dissolução da toxina, ligação da toxina ativada aos receptores do epitélio intestinal das larvas e inserção da toxina na membrana, sendo este último o fator de maior complexidade, e é, geralmente, determinante no desenvolvimento da toxicidade da proteína no intestino das larvas de insetos (BRAVO et al., 2007).

Embora a inserção na membrana seja o principal fator determinante na suscetibilidade de uma espécie para a toxina Cry, Forcada et al. (1996), observaram em linhagens resistentes de *H. virescens* (Lepidoptera), a existência de enzimas digestivas capazes de degradar as toxinas, diminuindo significativamente a quantidade de toxina ativa no intestino em um determinado momento, reduzindo assim a toxicidade. Além disso, algumas toxinas podem ligar-se aos receptores sem que essa ligação seja determinante para causar a morte das larvas do inseto. A relação entre a alta afinidade de ligação e a pouca ou nenhuma toxicidade ainda não é conhecida, sugerindo que a ligação inicial toxina-receptor pode não ser um bom indicativo da função do receptor na toxicidade e que a inserção na membrana pode ser melhor co-relacionada com a toxicidade, (ARONSO et al, 2001).

Os isolados 544, 573, 622 e 629 de *B. thuringiensis* que apresentaram mais de 50% de efetividade contra a larva de *S. oryzae*, foram selecionados para a estimativa das concentrações letais (Tabela 3). A análise dos dados mostra que não houve diferença significativa entre os isolados 544 e 622, indicando que foram os mais virulentos, pois apresentaram as menores CL₅₀. Porém, entre os dois isolados, pode-se observar que o isolado 544 ocasionou a morte dos insetos com o menor valor da concentração letal, seguido dos isolados 622, 573 e 629.

Tabela 3. Teste de virulência de isolados de *Bacillus thuringiensis* para *Sitophilus oryzae*.

Isolados	Eq. de regressão	CL ₅₀ (IC _{0,05})	n ^o	χ ²
544	$y = 7,08 + 0,61 \cdot \log x$	$4,70 \times 10^3$ ($4,31 \times 10^3 - 6,1 \times 10^3$)	120	6,79 n.s
573	$y = 3,19 + 0,70 \cdot \log x$	$3,55 \times 10^5$ ($3,10 \times 10^5 - 4,11 \times 10^5$)	120	8,60 n.s
622	$y = 3,42 + 0,12 \cdot \log x$	$9,14 \times 10^3$ ($5,1 \times 10^3 - 6,40 \times 10^4$)	120	6,49 n.s
629	$y = 4,71 + 0,11 \cdot \log x$	$7,03 \times 10^5$ ($4,05 \times 10^5 - 5,90 \times 10^6$)	120	7,01 n.s

n.s.: não-significativo, * significativo ao nível de 5%, n^o: número de insetos testados/dose, χ²

A caracterização morfológica, por meio da microscopia eletrônica de varredura, evidenciou a presença de três tipos de cristais para o isolado 544: esféricos, bipiramidais e cubóides, e os isolados 573, 622 e 629 evidenciaram a presença de cristais esféricos (Figura 2).

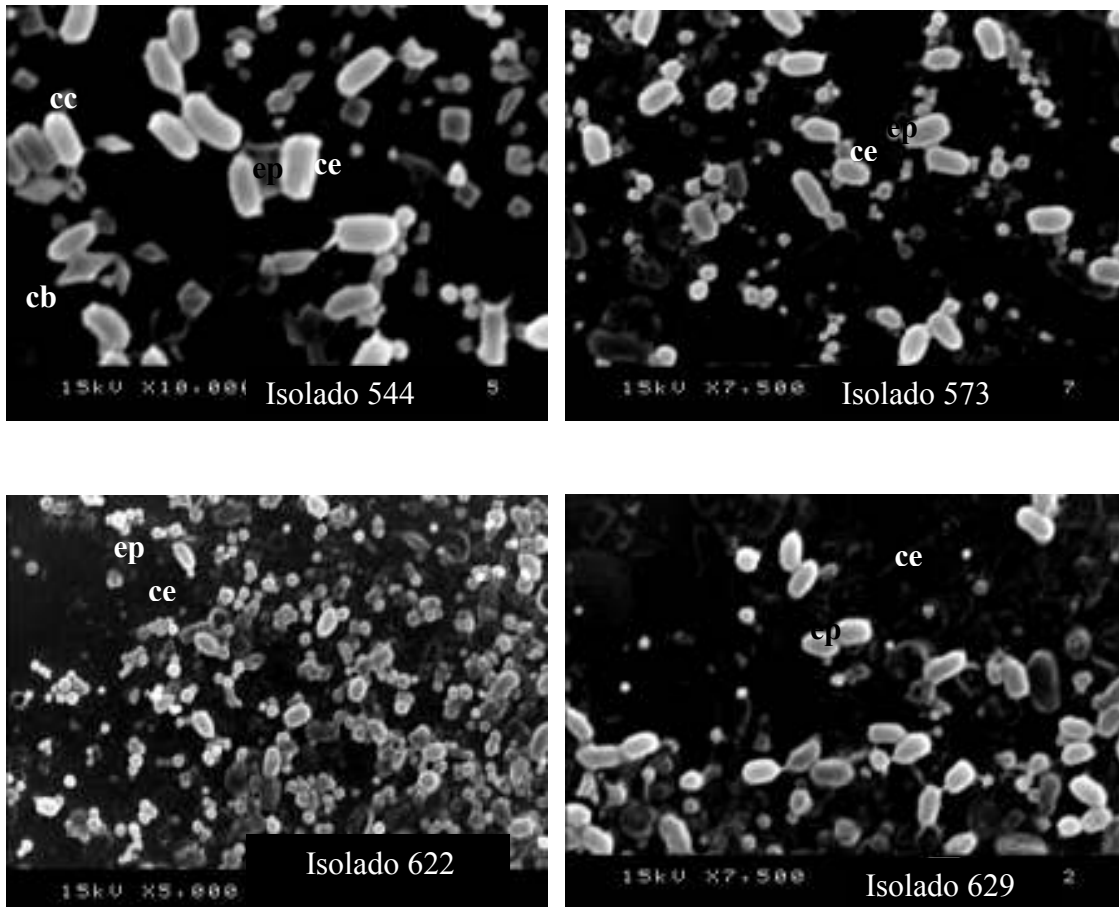


Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura da mistura esporo-cristal; cb:cristal bipiramidal; cc: cristal cubóide; ce: cristal esférico; ep: esporo.

A formação de cristais pode estar associada ao tipo de proteína Cry e, conseqüentemente, ao seu gene *cry* (HÖFTE & WHITELEY, 1989), fornecendo indicações sobre a atividade inseticida dos cristais de um isolado (TAYLOR et al., 1992; LERECLUS et al., 1993; HABIB & ANDRADE, 1998).

Dessa forma, o isolado 544, tem em seu conjunto morfológico a proteína bipiramidal com tamanho de 130 kDa (Figura 2) descrita como ativa para a ordem Lepidoptera (SCHENEPPF et al., 1998). Esses resultados foram confirmados na análise de PCR, utilizando o iniciador *gral-cry1* descrito por Bravo et al. (1998). Os cristais cubóides podem estar associados com a proteína do tipo Cry2, presente neste isolado, também por análise

de PCR, apresentando toxicidade contra lepidópteros e dípteros (HÖFTE et al., 1988); no entanto, essa proteína não foi visualizada na análise de SDS-PAGE, com tamanho de 70 kDa, segundo Crickmore (2008).

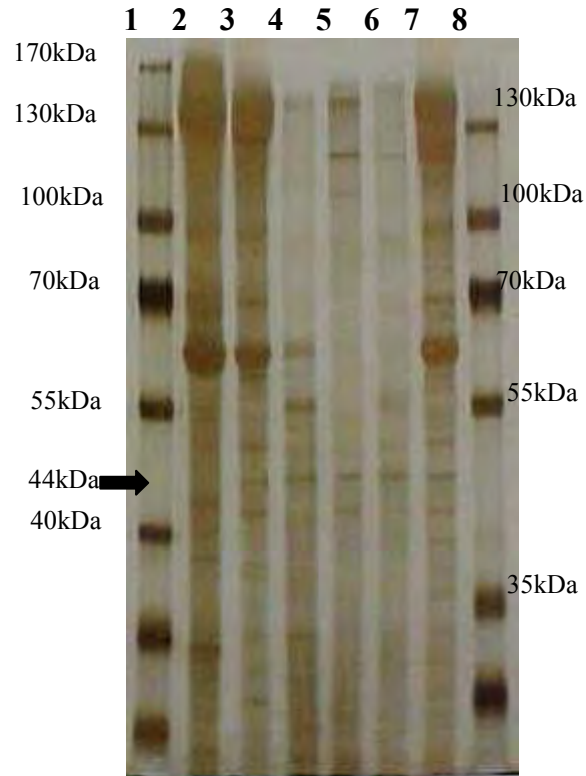


Figura 2. Análise por SDS-PAGE da mistura esporo-cristal para isolados de *B. thuringiensis* em gel de poliacrilamida a 8%. 1: Marcador de tamanho molecular Fermentas Page Ruler™ Prestained protein Ladder Plus #SM0671; 2: var. *toworthi*; 3: isolado 544; 4: isolado 573; 5: isolado 622; 6: isolado 629; 7: var. *kurstaki* HD-1; 8: Marcador de tamanho molecular Fermentas Page Ruler™ Prestained protein Ladder Plus #SM1811.

As formações esféricas comuns aos isolados estudados sugerem que essa morfologia do cristal pode estar associada com a toxicidade dessa bactéria a coleópteros, pois apresentam também o perfil protéico de 44 kDa (Figura 2) referente a proteína Cry35Ba ativa a coleópteros (ELLIS et al., 2002; SCHNEPF et al., 2005; STORER et al., 2006). Esses autores descreveram a ação binária da proteína Cry34 com 14 kDa com a

Cry35, porém este estudo não verificou a presença das mesmas nos perfis protéico e gênico.

Outras proteínas foram identificadas pela análise de SDS-Page, mostrando um perfil protéico de 55 kDa para os isolados 573 e 629, indicando um novo perfil para os mesmos. Para o isolado 622, uma banda de 120 kDa foi encontrada (Figura 2), esse fato pode indicar uma nova proteína Cry, já que este isolado não apresentou em seu perfil morfológico o cristal bipiramidal, que é descrito por Bravo et al. (1998) com peso de 120 kDa.

Contudo, este trabalho evidencia que as relações entre o perfil gênico para o gene *cry35Ba*, as proteínas de 44 kDa e a morfologia esférica estão presentes em todos os isolados efetivos para *S. oryzae*. Embora neste estudo não fosse possível encontrar isolados ativos para *S. oryzae* que apresentassem, concomitantemente, os genes da proteína Cry34 e Cry35Ba, estando o gene *cry34* ausente nos isolados tóxicos, a larva do inseto *S. oryzae* seguiu o modelo de ação binária proposto pelos autores Ellis et al. (2002) e Schnepf et al., (2005).

No entanto, nem sempre os resultados obtidos em laboratório correspondem aos de campo, onde existe a dificuldade de avaliar alguns parâmetros biológicos (Polanczyk & Alves, 2005), o que reforça a necessidade de medidas de controle para *S. oryzae* em grãos de milho armazenados. Uma alternativa é o uso de milho geneticamente modificado expressando a proteína Cry35Ba de *B. thuringiensis* nos grãos, protegendo-os contra larvas de *S. oryzae*.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, realizados com os isolados brasileiros da bactéria *B. thuringiensis*, evidenciam que:

- Da coleção de 1.073 isolados de *B. thuringiensis*, 60 demonstraram o gene *cry35Ba*, selecionando-os previamente para os bioensaios.
- Dos 60 isolados de *B. thuringiensis*, somente nos isolados 544, 573, 622 e 629 foi detectada atividade tóxica contra *S. oryzae* acima de 50%.
- Os cristais produzidos pelos isolados tóxicos de *B. thuringiensis* apresentam formato esférico em comum.
- O isolado 544 apresentou, além da forma esférica do cristal, cristais bipiramidais e cubóides.
- Os quatro isolados tóxicos de *B. thuringiensis* demonstraram um perfil protéico de 44 kDa referente ao *cry35Ba*.
- Com as evidências observadas neste trabalho, sobre a toxicidade dos isolados brasileiros de *B. thuringiensis* contra o coleóptero *S. oryzae*, apresenta possíveis relações entre a presença do gene *cry35Ba*, a morfologia esférica do cristal e o perfil protéico de 44 kDa.
- Portanto, a bactéria *B. thuringiensis* deve ser mais bem explorada pelos profissionais envolvidos no processo de transferência dessa tecnologia para o agricultor, ressaltando as vantagens ambientais de sua utilização.

REFERÊNCIAS

- ABBOT, W. S. A method of computing the effectiveness of on insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, n. 2, p. 265-267, 1925.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógeno de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap.23, p.765-778.
- ARONSO, A. I.; SHAY, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 1-8, 2001.
- ATHIÉ, I.; PAULA, D.C. de. **Insetos de grãos armazenados – aspectos biológicos e identificação**. 2. ed. São Paulo: Varela. 2002. 244p.
- BEEGLE, C. C. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* against Lesser Grain Borer *Rhizopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v. 6, n. 1, p.15-21, 1996.
- BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n. 4, p. 587-616, 1992.
- 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 Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4.883–4.890, 1997.

BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephesia kühniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, Hamburg, n. 2, p. 29-56, 1915.

BERLINER, E. Ueber die Schlattsucht der Mehlmottenraupe. **Zeitschrift für Gesamte Getreidewesen**, v. 25, p. 3.160-3.162, 1911.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of molecular biology**, London v. 348, n. 2, p. 363–382, 2005.

BRAVO, A., ARABIA, S.; LOPEZ, S. L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4.965-4.972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus Thuringiensis*: Mechanisms and use In:_____. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam:Elsevier BV, 2005. p. 175-206.

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

CARROZZI, 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 Environmental Microbiology**, Whashington, v. 57, n. 11, p. 3.057 3.061, 1991.

CHAK, K. F.; CHAO, D. C.; TSENG, M. Y.; KAO, S. S.; TUAN, S. J.; FENG, T. Y. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from

Taiwan. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 7, p. 2.415–2.420, 1994.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest management science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE. Disponível em:
<http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt>. Acesso em 14 jan. 2008.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 37, p. 409-433, 2003.

DESTÉFANO, R. H. R. Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea sacralis* por primers específico. 72p. Tese Doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP. Piracicaba, 2003.

ELLIS, R. T.; STOCKHOFF, B. A.; STAMP, L.; SCHNEPF, H. E.; SCHWAB, G. E.; KNUTH, M.; RUSSELL, J.; CARDINEAU, G. A.; NARVA, K. E. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1.137-1.145, 2002.

FONTES, L. S.; ALMEIDA FILHO, A. J. de; ARTHUR, V. Danos causados por *Sitophilus* (Linne, 1763) e *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Corculidae) em

cultivares de arroz (*Oriza sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 303-307, 2003.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GUARCERA, M. D. Differences in the midgut proteolytic activity on two *Heliothis virescens* strains, on susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 31, n. 3, p. 257-272, 1996.

GALLO, D.; HAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia econômica**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

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

HABIB, M. E. M.; ANDRDE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. cap. 12, p. 383-446.

HALL, I. M. Some fundamental aspects of applied insect pathology. **Advances in Pest Control Research**, New York, v. 4, p. 13-24, 1967.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, n. 3, p. 565-571, 1998.

HERMAN, R. A.; SCHERER, P. N.; YOUNG, D. L.; MIHALI AK, C. A.; MEADE, T.; WOODSWORTH, A. T.; STOCKHOFF, B. A.; NARVA, K. E. Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, p. 635-639, 2002.

HÖFTE H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN HOUTVEN, A.; VAN DERBRUGGEN, H.; VAECK, M. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 8, p. 2.010-2.017, 1988.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Inseticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Review**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

HUSZ, B. On the use oh *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corner borer. **Institute Corn Borer Investigation Scienci Reporter**, v. 2, p. 99-110, 1929.

IRABAGON,T. A. Rice reewil damage to stored corn. **Journal of Economyc Entomology**, Lanham, v. 52, n. 6, p. 1.130-1.136, 1959.

ISHAWATA, S. On a severe flacherie (sotto disease). **Dainihon Sanshi Kaiho**. v. 114, p. 1-5, 1901.

JUÁREZ-PÉREZ, V.; GUERCHICOFF, A.; RUBINSTEIN, C.; DELÉCLUSE, A. Characterization of Cyt2Bc Toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medelin*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1.228-1.231, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5.259, p. 680-685, 1970.

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, Washington, v. 42, n. 2, p. 112-122, 1992.

LERECUS 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: J. Wiley e Sons, 1993. p.37-70.

LI, CARREL, J. J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 6.347, p.815-821, 1991.

MATIOLI, J. C.; ALMEIDA, A. A. de; MATIOLI, C. H. Efeitos da infestação do *Sitophilus oryzae* L. (1763) sobre a germinação de sementes de milho armazenado. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa. v. 3, n. 4, p. 15-18, 1978.

MATTES, O. Parasitre Krankheiten der Mehlmotenlaven und Versuche ber ihre Verwendbarkeit als biologisches. **Gesellschaft Zur Berforderung der Gesamten Naturwissenschaftenzu Marburg**, Marburg, v. 62, p. 381-417,1927.

MEDEIROS, P. T.; SONE, E. H.; SOARES, C. M. S.; DIAS, J. M. C. S.; MONERAT, R. G. Evaluation of inseticides based on *Bacillus thuringiensis* in control of the diamondback moth. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 245-248, 2006.

MOELLENBECK, D. J.; PETERS, M. L.; BING, J. W.; ROUSE, J. R.; HIGGINS, L. S.; SIMS, L.; NEVSHEMAL, T.; MARSHALL, L.; ELLIS, R. T.; BYSTRAK, P. G.; LANG, B. A.; STEWART, J. L.; KOUBA, K.; SONDAG, V.; GUSTAFSON, V.; NOUR, K.; XU, D.; SWENSON, J.; ZHANG, J.; CZAPLA, T.; SCHWAB, G.; JAYNE, S.; STOCKHOFF, B. A.; NARVA, K.; SCHNEPF, H. E.; STELMAN, S. J.; POUTRE, C.; KZIEL, M.; DUCK, N. Inseticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. **Nature Biotechnology**, New York, v. 19, p. 668-672, 2001.

OHBA, M.; AIZAWA, K.; SUDO, S. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural faros of Fukuoka Prefecture, Japan. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, Kyushu. v. 30, p. 152-155, 1984.

PARKER, M. W.; FIEL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

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

PIRES, V. M.; HENSHAW, J. L.; PRATES, J. A.; BOLAM, D. N.; FERREIRA, L. M.; FONTES, C. M.; HENRISSAT, B.; PLANAS, A.; GILBERT, H. J.; CZJZEK, M. The crystal structure of the family 6 carbohydrate binding module from *Cellvibrio mixtus* endoglucanase 5a in complex with oligosaccharides reveals two distinct binding sites with different ligand specificities. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 20, p. 2.1560–2.1568, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* berliner. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 464-468, 2005.

PORCAR, M.; JUARÉZ-PERÉS, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 5, p. 419-432, 2003.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C., MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S. D.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

SAADE, F. E.; DUNPHY, G. B.; BERNIER, R. L. Response of the carrot weevil *Listronotus oregonensis* (Coleoptera: Curculionidae), to strains of the *Bacillus thuringiensis*. **Biological Control**, Orlando, v. 7, n. 3, p. 293-298, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. v. 1.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCHNEPF, H. E.; LEE, S.; DOJILLO, J.; BURMEISTER, P.; BAUM, J.; FENCIL, K.; MORERA, L.; NYGAARD, L.; NARVA, K. E.; WOLT, J. D. Characterization of Cry34/Cry35 binary insecticidal proteins from diverse *Bacillus thuringiensis* strain collections. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1.765-1.774, 2005.

SINHA, R. N. Interrelations of physical, chemical and biological variables in the deterioration of stored grains. In: SINHA, R. N., MUIR, W. E. (Eds.). **Grain storage**: part of system. Westport: 1973. p. 15-47.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; EDWARDS, J. M. Field Measures of Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) Mortality Caused by Cry34/35Ab1 Proteins Expressed in Maize Event 59122 and Implications for Trait Durability. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 4, p. 1.381-1.387, 2006.

TAYLOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 6, n. 9 p. 1.211-1.217, 1.992.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4.673-4.680, 1994.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DESOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J.L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 201-230.

YAMAMOTO. T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE. A.; NIELSEN-LE ROUX . C. (Ed). **Etmopathogenic bacteria**: from laboratory to field application. Netherlands: kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.