

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

PREDIÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE TÓXICA DE ISOLADOS
DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER E EFEITO
SINERGÍSTICO NO CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes*
***aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE).**

Juliana Regina Vieira da Costa

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009

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

PREDIÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE TÓXICA DE ISOLADOS
DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER E EFEITO
SINERGÍSTICO NO CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes*
***aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE).**

Juliana Regina Vieira da Costa

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2009

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

JULIANA REGINA VIEIRA DA COSTA –

nascida em 25 de maio de 1977, na cidade de Jaboticabal – SP, é Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais, formada pelo Centro Universitário de Araraquara – UNIARA, Araraquara – SP, em 18 de fevereiro de 2000. O título de mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) foi obtido junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Jaboticabal, em 28 de novembro de 2003.

*“Não temas, porque eu sou contigo;
Não te assombres, porque eu sou teu Deus;
eu te fortaleço, e te ajudo,
e te sustento com a destra da minha justiça.”*

Is 41:10

À Deus e Jesus Cristo pela minha vida e pela infinita bondade.....

Aos meus pais, Neusa Aparecida e Benvindo, por acreditarem em mim, pela compreensão em todos os momentos difíceis, pela ajuda e pelo grande amor.

DEDICO

*À minha avó Amélia, por todo o amor, carinho, incentivo e presença constante em todas as etapas da
minha vida;*

*Aos meus irmãos, André, Hélio e Michele por toda ternura, afeto e cumplicidade que dividimos,
carinhosamente.*

Aos meus cunhados, Gyslaine, Débora e Júlio César, pelo apoio e carinho.

Aos meus sobrinhos Luanna, Brunna, Victor Hugo, Lucas e Maysa, por todo o amor, alegria e ternura.

*À Igreja Redenção e aos Pastores Gideoni de Moraes e William, pelos ensinamentos e por me mostrarem
o jeito diferente de ser Cristão.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, por acreditar em meu trabalho e lapidá-lo. Por representar a inteligência, perseverança e dedicação. Pela amizade sincera dentro e fora do laboratório... Obrigada!!!

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

À Renata Antonaci Gama e ao Prof. Dr. Álvaro Eduardo Eiras, por ter gentilmente cedido os ovos de *Aedes aegypti* utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraud, do Departamento de Ciências Exatas e ao amigo Haroldo Xavier Linhares Volpe, do Departamento de Entomologia da FCAV/Unesp, pelo auxílio nas análises multivariadas.

À Dra. Simone Cristina Picchi, pela imensa ajuda oferecida nas análises dos haplótipos e, sem dúvida, pela confiança e amizade sincera.

À Eliane Cristina da Cunha Alves ("Tá Ju"), pela amizade, eficiência e apoio a esta nossa pesquisa.

Aos Professores Dra. Cristina Lacerda S. Petrarolha Silva, Dr. Irlan Leite de Abreu, Dr. Sérgio Antonio de Bortoli e Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela participação e valiosas contribuições dadas no exame geral de qualificação deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Gislayne Fernandes Lemes Trindade Vilas-Boas, Profa. Dra. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva, Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos e Prof. Odair Aparecido Fernandes pela importante contribuição na avaliação deste trabalho.

À Suzana Cristina Marucci por toda a calma nas ajudas oferecidas a qualquer hora e amiga sincera que não foi por acaso que a encontrei.

À Elaine Aparecida da Silva Cícero e Viviane Cristina Vieira pelas conversas amigas e de bastante incentivo e pela amizade que construímos.

À Martinha por ser minha amiga e companheira em todos os aspectos. Mais uma etapa vencida. E claro que ainda virão muitas.

À Janaína e Juliana Xavier pelo agradável convívio e longas conversas.

À Juliana Rossi pela amizade e contribuição nos bioensaios com dípteros.

À Lucília Mandú Tremiliosi, pela amizade e agradável convívio dentro e fora do laboratório e também por proporcionar, através de sua dedicação, a oportunidade de implantarmos e organizarmos o Curso de Inverno de Genética da FCAV/Unesp.

Ao Rodrigo Agostini, pela ajuda, amizade e eternos votos de sucesso.

Aos colegas do LGBBA, Ana Maria, Ana Rita, Camila (Maritaka), Camila Figueiredo, Daniel, Emeline, Fernanda, Larissa ("Tia Lá"), Lúcia, Michele, Najara, Paula, Raquel, Rebeca

e Vivian, pela amizade e por todo o convívio de laboratório ao longo dos últimos anos de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas - LBMP, Denílson, Douglas (Assado), Eliamar, Lú Kishi, Maria Tereza, Renato (Kalado), Rodrigo (Poeta), Rosinha, Silvana e Téo, pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Aldo, Lucinda e Ivana, pela dedicação e amizade.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da FCAV/Unesp, pela dedicação e ao corpo docente do Programa de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq por ter proporcionado as condições financeiras necessárias para a realização deste trabalho.

Por fim, a todos aqueles que de maneira direta ou indireta, influenciaram meu caminhar e produção científica, minha sincera gratidão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. A espécie <i>Aedes aegypti</i>	04
2.2. Controle químico.....	07
2.3. Vantagens do entomopatógeno <i>B. thuringiensis</i> no controle biológico	08
2.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> e modo de ação das delta-endotoxinas.....	09
2.5. Sinergismo das toxinas.....	13
2.6. Resistência de insetos.....	14
2.7. Proteína Chi (Quitinase).....	17
2.8. Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
3.1.1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i>	21
3.1.3. Preparo dos estoques dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	21
3.2. Cultivo e extração de DNA total das bactérias.....	22
3.3. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	23
3.4. Identificação de genes <i>cry</i> , <i>cyt</i> e <i>chi</i> por PCR.....	24
3.5. Estrutura genética entre os isolados de <i>B. thuringiensis</i>	26
3.6. Bioensaios com larvas de <i>A. aegypti</i>	27
3.7. Insetos.....	27
3.8. Preparo das suspensões bacterianas.....	28
3.9. Bioensaios seletivos.....	29
3.10. Bioensaios quantitativos (CL ₅₀ e CL ₉₀).....	30
3.11. Análise exploratória de agrupamento.....	30

4. RESULTADOS.....	31
4.1. Caracterização morfológica dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
4.2. Presença de genes <i>cry</i> e <i>cyt</i>	31
4.3. Presença do gene <i>chi</i> (quitinase).....	37
4.4. Estrutura genética entre os isolados de <i>B. thuringiensis</i>	38
4.5. Bioensaio seletivo.....	41
4.6. Bioensaio quantitativo (CL ₅₀ e CL ₉₀).....	41
4.7. Análise exploratória de agrupamento.....	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes <i>cry4Aa</i> , <i>cry4Ba</i> , <i>cry10Aa</i> , <i>cry11Aa</i> , <i>cry11Ba</i> , <i>cyt1Aa</i> , <i>cyt1Ab</i> , <i>cyt2Aa</i> e quitinase (<i>chi</i>) de <i>B. thuringiensis</i> , seqüência de nucleotídeos e tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR.....	24
Tabela 2. Reagentes e concentrações necessárias para as reações de amplificação dos genes <i>cry4Aa</i> , <i>cry4Ba</i> , <i>cry10Aa</i> , <i>cry11Aa</i> , <i>cry11Ba</i> , <i>cyt1Aa</i> , <i>cyt1Ab</i> , <i>cyt2Aa</i> e quitinase (<i>chi</i>) de <i>B. thuringiensis</i>	25
Tabela 3. Conteúdo gênico das linhagens padrão e dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> e porcentagem de mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> submetidas ao bioensaio seletivo.....	35
Tabela 4. Composição e freqüência dos perfis de genes <i>cry</i> e <i>cyt</i> (díptero-específicos) presentes no isolados de <i>B. thuringiensis</i>	36
Tabela 5. Distribuição e freqüência de haplótipos dos isolados de <i>B. thuringiensis</i>	40
Tabela 6. Concentração letal (CL ₅₀ e CL ₉₀) dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> para larvas de <i>A. aegypti</i> após 1, 2, 3, 4 e 24 h da aplicação da suspensão bacteriana.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Larva (A) e Fase adulta (B) de <i>A. aegypti</i> . Fonte: http://www.bioqmed.ufrj.br/ciencia/Bromelias/bromelias.htm ; http://observatorio.doalgarve.com/cna/noticias_ver.asp?noticia=17460 . 07 janeiro 2008.....	06
Figura 2. Cristal tóxico e endósporo de <i>B. thuringiensis</i> (A); Endosporo e inclusão cristalina de <i>B. thuringiensis</i> (B). Fonte: http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture_syllabus.html . 07 janeiro 2008.....	10
Figura 3. Mecanismo de toxicidade de <i>B. thuringiensis</i>	12
Figura 4. Preparo da suspensão bacteriana dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> para estoque em fitas de papel filtro (A); Fitas de papel filtro impregnadas com esporos-cristal estocadas em tubos plásticos (B); Estoque das fitas de papel filtro ao Banco de isolados de <i>B. thuringiensis</i> do LGBBA (C).....	22
Figura 5. Ovos de <i>A. aegypti</i> depositados em folha de papel filtro (A); Larvas de 3º instar de <i>A. aegypti</i> (B).....	27
Figura 6. Cubas plásticas utilizadas para criação das larvas de <i>A. aegypti</i> em sala climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), U.R. de $75\% \pm 5\%$, e fotofase de 12 h.....	28
Figura 7. Disposição (A) e copos (B) contendo água e larvas de 3º instar de <i>A. aegypti</i> para os testes de bioensaios.....	29
Figura 8. Eletroforogramas da determinação dos genes: <i>cry4Aa</i> (A), <i>cry4Ba</i> (B), <i>cry10Aa</i> (C), <i>cry11Aa</i> (D) para uma amostra de isolados de <i>B. thuringiensis</i> ; M: marcador molecular “1 Kb DNA Ladder”.....	32
Figura 9. Eletroforogramas da determinação dos genes: <i>cry11Ba</i> (E), <i>cy1Aa</i> (F), <i>cry1Ab</i> (G), <i>cry2Aa</i> (H) para uma amostra de isolados de <i>B. thuringiensis</i> ; M: marcador molecular “1 Kb DNA Ladder”.....	33
Figura 10. Frequência de genes <i>cry</i> e <i>cyt</i> (díptero-específicos) nos 1073 isolados de <i>B. thuringiensis</i>	36
Figura 11. Eletroforograma da determinação do gene da quitinase (<i>chi</i>); Canaletas: (1) <i>B. thuringiensis</i> var. <i>alesti</i> ; (2) <i>B. thuringiensis</i> var. <i>sotto</i> ; (3) <i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> ; (4 a 16) amostras de isolados de <i>B.</i>	

<i>thuringiensis</i> ; CN: Controle negativo; M: marcador molecular “1 Kb DNA Ladder”.....	37
Figura 12. Dendrograma mostrando a ordenação dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> quanto à eficiência no controle de larvas de <i>A. aegypti</i>	45

**PREDIÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE TÓXICA DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*
E EFEITO SINERGÍSTICO NO CONTROLE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* (L.)
(DIPTERA: CULICIDAE)**

RESUMO - *Aedes aegypti* (Linnaeus), principal vetor da dengue no Brasil, tem sido combatido com o uso maciço de produtos químicos, contribuindo com o desenvolvimento de resistência e inviabilizando o controle do inseto. Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* vêm apresentando resultados satisfatórios no controle de dípteros, devido à produção de proteínas bioinseticidas denominadas Cry (cristal), Cyt (citolíticas) e Chi (quitinase) e os efeitos sinérgicos existentes entre elas. O presente trabalho objetivou a seleção de isolados de *B. thuringiensis*, portadores de genes *cry*, *cyt* e *chi* com alta eficiência no controle de *A. aegypti*. Uma coleção de 1073 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diversas regiões brasileiras, foi submetida à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com base nos iniciadores específicos para os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* e *chi*. Os isolados dípteros-específico foram avaliados quanto à estruturação genética e através de bioensaios seletivos e quantitativos, para determinação da CL₅₀ e CL₉₀. Apenas 45 (4,19%) apresentaram amplificação para os genes *cry* e *cyt* e destes, 25 (54,34%) eram quitinolíticos. Foram definidos 21 haplótipos entre os 45 isolados de *B. thuringiensis*, os quais foram submetidos aos bioensaios seletivos, indicando 13 isolados que causaram 100% de mortalidade às larvas de *A. aegypti*. Os bioensaios quantitativos e análise de agrupamento permitiram selecionar quatro isolados altamente tóxicos às larvas de *A. aegypti*. A identificação dos genes *cry*, *cyt* e *chi* de *B. thuringiensis* e análise dos efeitos sinérgicos entre as toxinas, associadas à análise da toxicidade a insetos vetores permitiram a seleção de isolados que poderão ser utilizados em formulações de novos bioinseticidas brasileiros, podendo contornar possíveis problemas de resistência.

Palavras-Chave: controle biológico, *cyt*, *cry*, dengue, quitinase

***In vitro* PREVISION OF THE TOXIC ACTIVITY OF ISOLATES OF *Bacillus thuringiensis* AND SYNERGISTIC EFFECT ON THE CONTROL OF *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE) LARVAE**

ABSTRACT – *Aedes aegypti* (Linnaeus), the main vector of dengue fever in Brazil, has been controlled with massive use of chemical products which, contributed to the development of resistance decreasing the insect control efficacy. Bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* is currently presenting satisfactory results on controlling dipterans, due to the production of Cry proteins (crystal proteins), Cyt (citolitic) and Chi (chitinase) with synergistic effects between them. The present work aimed to select *B. thuringiensis* isolates with *cry*, *cyt* and *chi* genes exhibiting high efficiency on *A. aegypti* larvae. A bacterial collection containing 1073 isolates of *B. thuringiensis*, obtained from different Brazilian locations, had their DNA isolated and submitted to PCR amplifications using specific primers for the genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* e *chi*. The dipterans-specific isolates were then evaluated for the genetic structure and through selective and latter to quantitative bioassays for the determination of LC₅₀ and LC₉₀. Forty five out of 1073 isolates (4.19%) presented amplicons for the *cry* and *cyt* genes and from these 25 (54.34%) were detected as chitinolytic. Twenty one haplotypes were identified among the 45 isolates of *B. thuringiensis*, which were submitted to the selective bioassays, indicating 13 isolates that caused 100% mortality of *A. aegypti* larvae. The quantitative bioassays and the statistical analysis have pointed four toxic isolates to *A. aegypti* larvae. The identification of the *cry*, *cyt* and *chi* genes of *B. thuringiensis* and the analysis of the synergistic effects among the toxins, along with the toxicity analysis towards the vector insects allowed the selection of a set of isolates that can be used for the formulation of new bioinsecticides from Brazilian origin, that would avoid or at least delay the appearance of resistance problems.

Keywords: biological control, *cyt*, *cry*, dengue fever, chitinase

1. INTRODUÇÃO

Os inseticidas químicos desempenham um importante papel no controle de insetos vetores mas, infelizmente, a habilidade notável de populações destes insetos desenvolverem resistência a todas as classes de inseticidas disponíveis, pode levar o controle ao fracasso. A resistência 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* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) é considerado um mosquito cosmopolita, com ocorrência nas áreas tropicais e subtropicais. No Brasil, está sempre associado ao domicílio humano e proximidades, embora possa ser encontrado longe dos aglomerados urbanos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil, o mosquito *A. aegypti* não pode ser controlado com os métodos tradicionalmente empregados (controle químico) no combate às doenças transmitidas por vetores em nosso país. Alguns programas têm demonstrado ineficiência em conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), tornando o combate de *A. aegypti* uma difícil tarefa que, no entanto, apresenta-se como ferramenta primordial para o controle da doença (REY, 2002).

Devido a problemas relacionados à ação dos inseticidas químicos sobre organismos não-alvos e ao meio ambiente, são necessários estudos que propiciem métodos alternativos de controle de insetos. Nesse contexto, os produtos biológicos representam aproximadamente 1% do mercado mundial de inseticidas. Podem ser mencionados como métodos de controle biológicos aqueles produtos os quais o ingrediente ativo são microrganismos, os quais são aplicados de maneira similar a um inseticida químico (MELO & AZEVEDO, 1998).

No gênero *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis* (Berliner) é considerada a espécie de maior interesse, pois é um entomopatógeno de várias ordens de insetos-praga, como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, além de dípteros vetores de doenças humanas

como os mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Simullium* (CAVADOS et al., 2001, DE MAAGD et al., 2003). *B. thuringiensis* é uma espécie bacteriana capaz de produzir, durante sua esporulação, inclusões cristalinas, compostas por proteínas denominadas delta-endotoxinas, as quais são especificamente tóxicas a diferentes insetos-praga (SCHNEPF et al. 1998). As proteínas inseticidas Cry de *B. thuringiensis* são codificadas por genes *cry*, que incluem mais de 400 proteínas Cry diferentes (toxin list at http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt; atualizado em 13 de fevereiro de 2009), e codificam proteínas 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).

As diversas linhagens de *B. thuringiensis* produzem, em adição às delta-endotoxinas, uma série de outras toxinas que podem participar da ação entomopatogênica. Destas, a principal é a proteína Cyt, de peso molecular 28 kDa. Esta toxina é uma citolisina de ação inespecífica, produzida, principalmente, pela variedade *israelensis*, sendo acumulada no cristal juntamente com as delta-endotoxinas típicas desta variedade (LERECLUS et al., 1993).

O modo de ação desse microrganismo está relacionado à solubilização das proteínas Cry no intestino dos insetos suscetíveis. Esse processo resulta na liberação de fragmentos tóxicos que se ligam a receptores específicos na membrana do epitélio intestinal levando à formação de poros e ao desequilíbrio osmótico da célula (FIÚZA, 2004; BRAVO et al., 2007). Em decorrência desse efeito o inseto tem sua alimentação inibida e, como consequência, morre.

Segundo REGEV et al. (1996), outra proteína que vem sendo estudada no controle biológico de insetos é a quitinase (Chi) (ARORA et al., 2003), presente em isolados de *B. thuringiensis*. Estudos têm demonstrado que a quitinase hidrolisa a quitina na membrana peritrófica do inseto, causando a formação de poros e facilitando o contato entre as delta-endotoxinas e seus receptores no epitélio intestinal, aumentando a toxicidade de *B. thuringiensis* (REGEV et al., 1996, LIN & XIONG, 2004).

Dessa mesma forma, BELTRÃO e SILVA-FILHA (2007) confirmaram o sinergismo entre as proteínas Cry e Cyt, necessário no aumento do nível de toxicidade contra larvas de *A. aegypti* (PONCET et al., 1995; HUGHES et al., 2005).

Por ser um microrganismo promissor, 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).

Nos últimos anos, conforme se observa na literatura, a caracterização e a identificação de genes *cry* de isolados de *B. thuringiensis* têm sido realizadas por meio da técnica de PCR (LIMA et al., 2002; FATORETTO et al., 2007; PINTO & FIUZA, 2003; NARIMAN, 2007). No entanto, as interações de proteínas produtoras de cristal podem afetar profundamente a toxicidade de um isolado, assim; os testes de bioensaios 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 *chi* (quitinase), 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. Em acréscimo, procurou-se correlacionar o efeito sinérgico das diferentes combinações gênicas dos isolados com a eficiência na mortalidade das larvas do mosquito, o que poderá, futuramente, indicar novos isolados para a formulação de bioinseticidas brasileiros, com a possibilidade de uso dos mesmos como fonte de genes para as toxinas inseticidas, via transferência em diversos microrganismos aquáticos, haja vista que, genes atuando de modos diferentes podem aumentar a toxicidade e diminuir as chances de o inseto tornar-se resistente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Aedes aegypti*

A espécie *A. aegypti* é responsável pela manutenção do ciclo em áreas urbanas e no Brasil, em particular, é considerada a única a transmitir a doença. O vírus da dengue é transmitido através da picada de mosquitos pertencentes ao subgênero *Stegomyia*. (MELO-SANTOS, 2001).

Atualmente o mosquito transmissor é encontrado nas Américas em uma larga faixa do continente, que se estende desde o Uruguai até o sul dos Estados Unidos, com registros de surtos importantes em vários países como Venezuela, Cuba, Paraguai e Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A disseminação do vírus da dengue, doença provocada por um flavivírus que se caracteriza por dores agudas de cabeça, articulações, músculos e febre alta (RODRÍGUEZ, 2002), está intimamente ligada à dispersão do mosquito *A. aegypti* no mundo, uma vez que ele é o principal vetor da doença. *A. aegypti* é originário do Egito e atualmente encontra-se distribuído dentro de zonas isotermas de 20°C em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, permanecendo onde as alterações antrópicas propiciaram a sua proliferação.

Estima-se que a cada ano, pelo menos 300 milhões de pessoas são afetadas pela malária, transmitida pelos mosquitos do gênero *Anopheles*, com aproximadamente um milhão de mortes; 160 milhões de pessoas são infectadas com parasitas da filariose, transmitidas pelos mosquitos do gênero *Culex* e aproximadamente 50 milhões de pessoas são infectadas pelo vírus do dengue, transmitido pelo mosquito *A. aegypti* (ARMENGOL et al., 2005).

A espécie foi introduzida no Brasil durante o período colonial, provavelmente durante o tráfico negreiro, por via marítima (OPAS, 1992, CONSOLI & de-OLIVEIRA, 1994). No Brasil, está sempre associado ao domicílio e peridomicílio humano, embora possa ser

encontrado longe dos aglomerados urbanos no velho mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A urbanização, rápida e desordenada, associada a uma distribuição desequilibrada dos níveis de renda, conduz a uma proporção cada vez maior de pessoas vivendo em áreas onde o abastecimento de água, esgotamento sanitário e coleta de lixo são precários ou inexistentes (TAUIL, 2001). Como a água é indispensável à sobrevivência, a população que habita esses locais vê-se obrigada a armazenar água em depósitos domésticos, que servem como criadouros do vetor. O acúmulo de lixo depositado em áreas peridomiciliares leva ao acúmulo de recipientes que servem de reservatórios do vetor, particularmente nos meses chuvosos do ano (CLARO et al., 2004).

Essas condições para a proliferação do *A. aegypti* tornam-se ainda mais comuns, na medida em que o crescimento das populações humanas não é acompanhado por uma ocupação racional do espaço urbano.

A. aegypti é um mosquito com curto ciclo de vida (de 8 a 12 dias em regiões tropicais), passando pelas seguintes fases: ovo, quatro estádios larvais, pupa e adulto alado. Os criadouros preferenciais das fêmeas de *A. aegypti* são os utensílios artificiais, utilizados pelo homem, como pneus, latas, vidros, cacos de garrafa, pratos de vasos e vasos de cemitério, além de caixas de água, tonéis, latões e cisternas destampadas ou mal tampadas, ou mesmo os lagos artificiais, piscinas e aquários abandonados. A proliferação de *A. aegypti* ocorre nestes recipientes quando a água acumulada nos mesmos estiver limpa (não turva) e pobre em matéria orgânica em decomposição e em sais, acumulada em locais sombreados com fundo ou paredes escuras. A fêmea grávida é atraída por recipientes escuros e sombreados, com superfície áspera (CONSOLI e de-OLIVEIRA, 1994). A oviposição não é feita diretamente na água, os ovos são depositados isoladamente na superfície (parede) do recipiente, cerca de 1 a 2 cm acima do nível da água (ROBERTS & HSI, 1977).

A fase larval do inseto (Figura 1A) é um período de nutrição e desenvolvimento pelo qual as larvas passam a maior parte do tempo se alimentando de matéria orgânica acumulada nas laterais ou no fundo de recipientes. As larvas possuem quatro estádios. A duração desta fase depende da temperatura, disponibilidade de alimento e densidade

das larvas no criadouro. Elas são compostas por cabeça, tórax e abdômem. Possuem movimento em forma de serpente, movendo-se em S ao se deslocarem. São sensíveis a movimentos bruscos na água e sob feixe de luz deslocam-se com rapidez buscando refúgio no fundo do recipiente (fotofobia). Para respirar as larvas vêm à superfície onde permanecem em posição vertical (BRASIL, 2001).

As pupas possuem o aspecto de vírgula e é nesta fase que elas cessam a alimentação, devido ao período de metamorfose do estágio larval para o adulto. São divididas em cefalotórax e abdômem. Normalmente ficam paradas na superfície da água e se movimentam ativamente quando perturbadas (MARCONDES, 2001).

Os adultos de *A. aegypti*, apresentam tórax enegrecido, freqüentemente ornamentado com manchas, faixas ou desenhos de escamas claras, geralmente branco-prateada (CONSOLI & de-OLIVEIRA, 1994). A principal característica da espécie é uma nítida faixa curva, branco-prateada de cada lado do tórax (mesonoto) e outra mais fina, reta, longitudinal, central, as quais formam a figura de uma lira (OPAS, 1986) (Figura 1B).

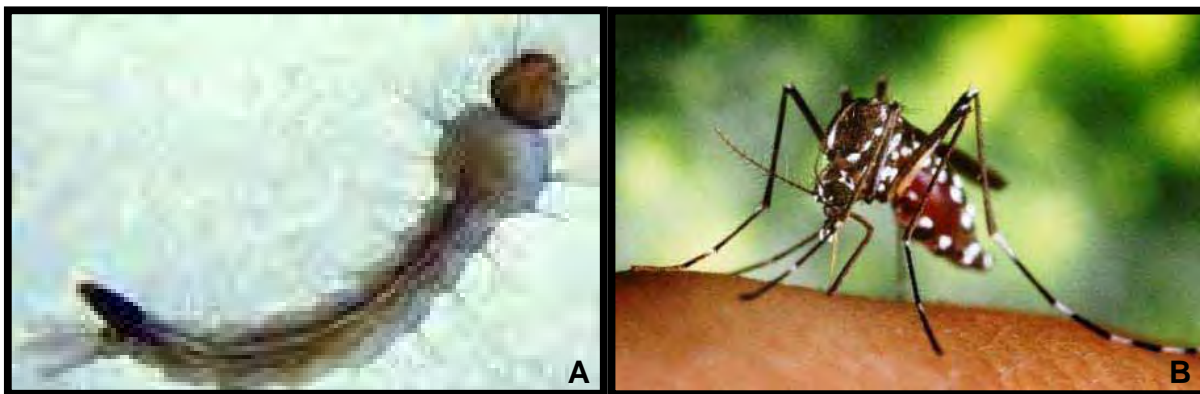


Figura 1. Larva (A) e Fase adulta (B) de *A. aegypti*. Fonte: <http://www.bioqmed.ufrj.br/ciencia/Bromelias/bromelias.htm>; http://observatoriodoalgarve.com/cna/noticias_ver.asp?noticia=17460. 07 janeiro 2008.

Outro fator determinante na epidemiologia desta doença é a resistência dos ovos à dessecação, uma vez que os mesmos podem permanecer viáveis no campo, por mais

de um ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Esta resistência é um dos principais obstáculos para o seu controle, pois esta condição permite que o ovo seja transportado por grandes distâncias em ambiente seco. O principal estímulo para a eclosão é o contato com a água ou a submersão nela. Este é o principal motivo da alta população de *A. aegypti* durante o período de chuvas (EIRAS, 2005).

A principal forma de infecção do mosquito acontece após o repasto sangüíneo das fêmeas de *A. aegypti* em seres humanos contaminados pelo vírus. Uma vez infectados, os mosquitos podem transmitir o vírus durante todo o seu ciclo de vida, inclusive aos seus descendentes por transmissão vertical ou transovariana (KHIN & THAN, 1983; JOSHI et al., 1995).

No Brasil, as condições sócio-ambientais favoráveis à proliferação do *A. aegypti* possibilitaram a dispersão do vetor, desde a sua reintrodução em 1976, bem como o avanço da doença. Essa reinvasão não pode ser controlada com os métodos tradicionalmente empregados (controle químico) no combate às doenças transmitidas por vetores em nosso país e no continente. Estes programas mostraram-se incapazes de conter um vetor com altíssima capacidade de adaptação ao novo ambiente criado pela urbanização acelerada e pelos novos hábitos da população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.2. Controle químico

O uso de inseticidas químicos é, seguramente, uma prática antiga. Entre 1920 e 1930, uma ampla variedade de compostos sintéticos foi descoberta como potencial arma para o controle de mosquitos, levando a uma massiva utilização desses produtos em todo o mundo (CREMLYN, 1978).

Com o seu uso bastante difundido na saúde pública, o malathion® é amplamente utilizado como adulticida, aplicado em ultrabaixo volume (UBV), para o controle de populações de mosquitos. O temephos® também tem sido bastante utilizado em programas de controle, porém como larvicidas.

Devido ao seu amplo espectro de ação, os inseticidas atingem espécies não-alvo, podendo provocar grande impacto ambiental. Entretanto, o uso intensivo de agentes químicos aumenta o custo de controle, pode afetar a saúde pública devido a sua toxicidade, causam desequilíbrio nos ecossistemas, contaminam alimentos, solo e água e podem promover o desenvolvimento de populações de insetos resistentes (VILARINHOS et al., 1998).

Efeitos adversos, principalmente pelo uso indiscriminado e excessivo de compostos químicos, levaram os cientistas a procurar novas alternativas para controlar vetores. Compostos alternativos, tais como reguladores de crescimento (IGRs), inibidores de quitina e modificadores de comportamento de insetos foram sintetizados e até hoje ainda são testados. Pesquisas extensivas também foram direcionadas ao uso de inseticidas biológicos à base de vírus, bactérias, fungos, parasitos, entre outros. Entretanto, até o momento, apenas os inseticidas à base de bactérias entomopatogênicas tornaram-se amplamente utilizados no controle de vetores (MULLA et al., 1990), devido a sua complexa estrutura, potência e seletividade. Nesse sentido, os agentes de controle biológico aparecem como uma alternativa econômica e ecologicamente viável.

2.3. Vantagens do entomopatógeno *B. thuringiensis* no controle biológico

Os microorganismos entomopatogênicos que mais chamam a atenção de pesquisadores e industriais em todo mundo, devido principalmente ao seu modo de ação e a sua especificidade, são as bactérias. Já foram identificadas bactérias patogênicas de diferentes espécies de insetos das ordens Diptera, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, e também de outros grupos de organismos como nematóides e protozoários (FEITELSON et al., 1992).

As principais bactérias entomopatogênicas pertencem às famílias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Streptococaceae e Achromobacteriaceae (ARONSON et al., 1986). Dentre elas destacam-se aquelas pertencentes à ordem Bacillales, mais

especificamente ao gênero *Bacillus*. *B. thuringiensis*, juntamente com *Bacillus sphaericus*, são os mais importantes entomopatógenos do ponto de vista científico e industrial devido a um conjunto de características desejáveis, que ambos apresentam. Até hoje a espécie mais estudada é *B. thuringiensis*, tendo sido isolados inúmeros sorotipos, em diferentes regiões do mundo. Destacam-se por sua importância como biolarvicidas algumas sorovariedades como a *israelensis*, *tenebrionis* e *kurstaki*. A primeira com importante aplicação na saúde pública para insetos da ordem Diptera como *A. aegypti* e o *Simulium pertinax* (Kollar, 1832) (Diptera: Simuliidae); a segunda e a terceira, por sua importância na agricultura, respectivamente tóxicos para alguns insetos das ordens Coleoptera e Lepidoptera.

Devido ao seu modo de ação, *B. thuringiensis* apresenta uma potência biológica quando comparada aos inseticidas químicos, destacando-se sua especificidade a insetos-alvos, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados e a ausência da toxicidade em plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

2.4. *Bacillus thuringiensis* e modo de ação das delta-endotoxinas

B. thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva e entomopatogênica, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada no solo (RASKO et al., 2005). É o principal agente de controle biológico utilizado atualmente, sendo responsável por aproximadamente 2% do mercado mundial de inseticidas (LAMBERT et al., 1992) e apresenta algumas vantagens como: a alta especificidade para insetos e não contaminação do meio ambiente. A sua atividade entomopatogênica está relacionada com a produção de cristais, que são sintetizados a partir da fase estacionária e acumulados no compartimento da célula mãe durante a esporulação, podendo corresponder a até 25% do peso seco de células. Cada cristal pode ser formado por uma ou mais proteínas codificadas pelos genes *cry* e conhecidas como delta-endotoxinas ou proteínas cristal. Os cristais podem ser formados de proteínas de dois tipos: as proteínas da família Cry, que apresentam atividade inseticida específica, e da

família Cyt, com atividade citolítica inespecífica (AGAISSE & LERECLUS, 1995). Por não apresentar homologia com as demais proteínas Cry, as toxinas Cyt não são classificadas como delta-endotoxinas (LERECLUS et al., 1993).

Dentro desta denominação se agrupam todas aquelas proteínas produzidas por *B. thuringiensis* que se acumulam na célula como um corpo de inclusão parasporal (cristal) e com atividade tóxica contra algum organismo alvo. A inclusão de uma nova proteína como delta-endotoxina dependerá do cumprimento de alguma destas características, ou da homologia de seqüências com algumas das atuais, independentemente da linhagem da qual foi isolada ou de que sua localização seja ou não parasporal (CRICKMORE et al., 2000).

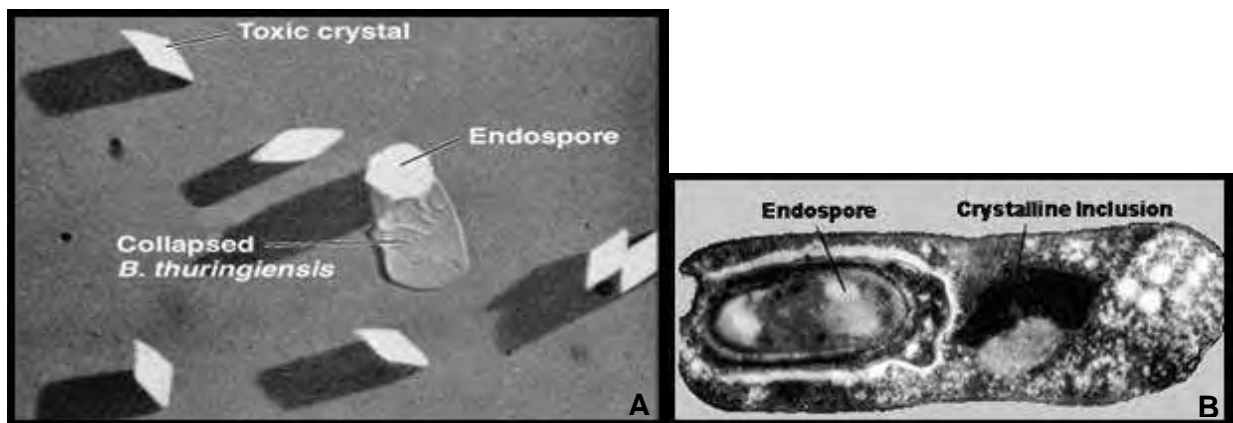


Figura 2. Cristal tóxico e endosporo de *B. thuringiensis* (A); Endosporo e inclusão cristalina de *B. thuringiensis* (B). Fonte: http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Lecture_syllabus.html. 07 janeiro 2008.

Estudos detalhados sobre estas toxinas, sua atividade e modo de ação (CRICKMORE et al., 1998; SILVA-WERNECK, 2001) permitiram identificar que, cada uma, apresenta especificidade contra uma determinada ordem de inseto.

Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, por isso pouco tóxicas para a maioria dos outros organismos, incluindo insetos benéficos (HERRERO et al., 2001). O espectro de atividade destas toxinas é estreito devido ao seu modo de ação. Os sítios

de ligação, não somente estão envolvidos na especificidade das toxinas de *B. thuringiensis*, sua ausência ou alteração, também representam um mecanismo de resistência dos insetos às delta-endotoxinas (de MAAGD et al., 2001).

A atividade tóxica de *B. thuringiensis* inicia-se com a ingestão das inclusões cristalinas pelas larvas dos insetos alvo. Após a ingestão, as proteínas que se encontravam insolúveis e presas umas às outras formando o cristal são solubilizadas em pH alcalino próximo a 10, que é encontrado no mesêntero da maioria dos insetos-alvo e constitui a primeira etapa da seletividade da ação de *B. thuringiensis*. Em seguida, as protoxinas são liberadas no intestino das larvas e convertidas em polipeptídeos tóxicos devido à ação proteolítica de enzimas digestivas. As toxinas ativas atravessam a membrana peritrófica e se ligam a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio. Elas agem interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. Estes eventos causam a lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio (ARONSON, 2001). De acordo com KNOWLES (1994), o pH elevado do intestino médio dos insetos susceptíveis evitaria a germinação dos esporos ingeridos de *B. thuringiensis*. Porém, as delta-endotoxinas causam a paralisia do intestino, retendo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos, que provocam um quadro de septicemia na larva. O inseto morto serve, então, como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria e reciclagem dos estoques, naturalmente.

O padrão de ligação a estes receptores é bastante variável, já que uma única proteína pode ter afinidade por mais de um receptor ou um único receptor pode ter afinidade por mais de uma proteína (KNOWLES, 1994). A ligação das toxinas aos receptores é importante, porém, não é um fator determinante de patogenicidade, pois, como foi mostrado por GARCZYNSKI et al. (1991), apesar da tolerância de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac, ocorre ligação desta toxina aos receptores presentes em “BBMV” - “Brush Border Membrane Vesicles” (Vesículas de Membrana de Borda em Escova) do intestino deste inseto.

Segundo SANCHIS et al. (1994), a atividade larvica não está correlacionada necessariamente com a concentração ou a afinidade do receptor pela delta-endotoxina.

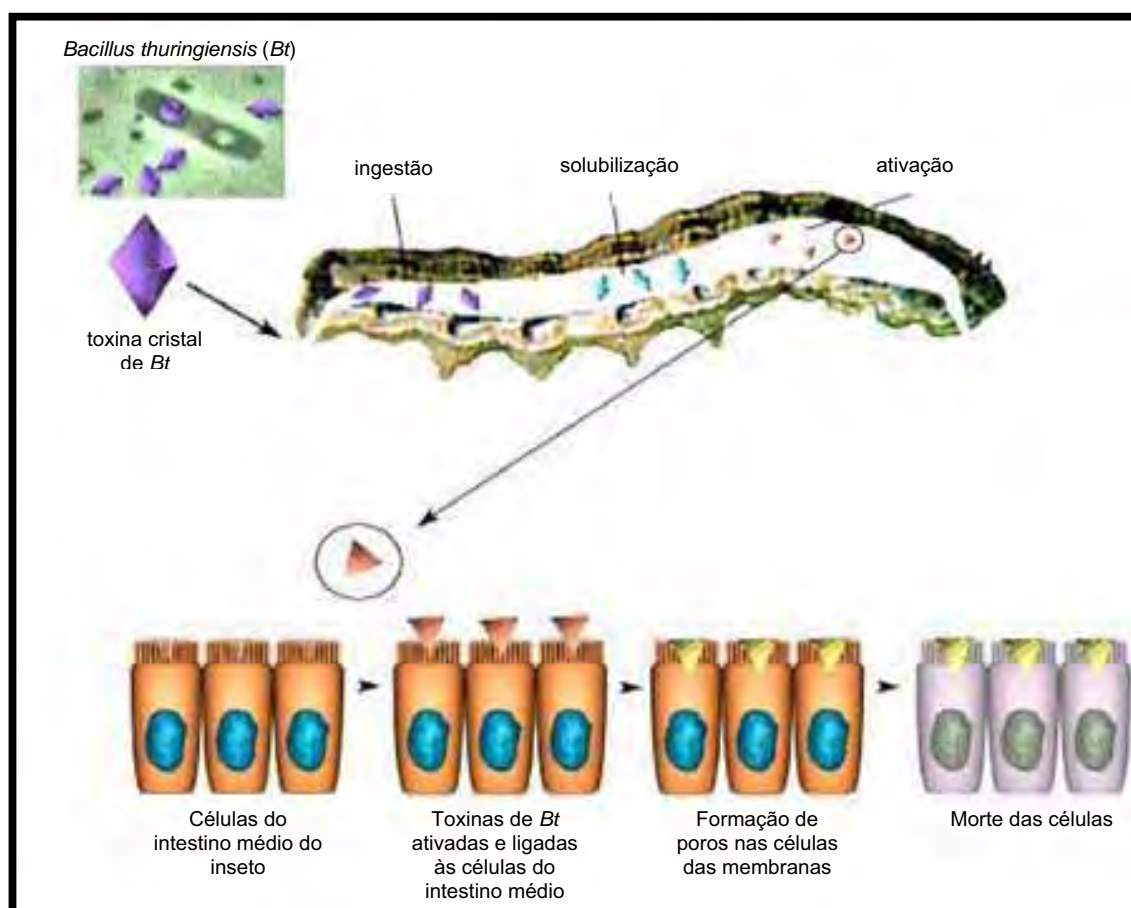


Figura 3. Mecanismo de toxicidade de *B. thuringiensis*.

A união das toxinas Cry à membrana epitelial das células do intestino médio se realiza através de receptores ou sítios de união específicos para cada uma delas (HOFMANN et al., 1988). Esta união se realiza em dois passos. O primeiro, de caráter reversível, consiste na interação entre a toxina e o receptor, e o segundo passo, de caráter irreversível, dá lugar ao complexo toxina-receptor (LIANG et al., 1995). Esta união, ainda que necessária, não é suficiente para determinar que uma proteína Cry seja tóxica contra um determinado inseto. Mediante o estudo da interação entre toxinas Cry e BBMV, tem-se conseguido determinar a especificidade das toxinas Cry em muitos

insetos, levando à aplicação de estratégias que possam evitar o possível surgimento de resistência à estas toxinas.

2.5. Sinergismo das toxinas

Diversos estudos têm sido realizados para encontrar a ação sinérgica combinadas entre patógeno-patógeno ou patógeno-inseticida para controlar insetos-praga, em especial utilizando-se *B. thuringiensis* (BRODERICK et al., 2000; BRICKLE et al., 2001).

Estudos foram realizados para determinar a contribuição de cada uma das proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* na toxicidade às larvas de *A. aegypti*, observando que elas apresentam uma ação em sinergismo. No entanto, a contribuição de cada componente ou combinações deles na atividade tóxica de *B. thuringiensis* var. *israelensis* para todos os gêneros de insetos suscetíveis, ainda não foi totalmente elucidada. Alguns estudos mostraram que a toxina Cry11Aa é a responsável por apresentar a maior toxicidade em *A. aegypti* (CRICKMORE et al., 1995) e, segundo GOULD (1998) e FERNÁNDEZ et al. (2006), esta toxina apresenta também maior toxicidade a *Anopheles stephensi* (Liston) e *Culex pipiens* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). Quanto à proteína Cyt1Aa, os autores relatam que é pouco tóxica, mas sinergiza o efeito tóxico das proteínas Cry. Um trabalho recente mostrou que as toxinas Cry11Aa e Cyt1A têm a capacidade de se ligar através de epítomos existentes em ambas as moléculas e, ensaios de interação mostraram que a ligação da toxina Cry11Aa às preparações ricas em microvilli intestinal (BBMF) – “Brush Border Membrane Fraction” Frações de Membran de Borda em Escova) de *A. aegypti* foi otimizada pela presença da Cyt1A (PÉREZ et al., 2005). O epítomo de Cyt1Aa na toxina Cry11Aa foi identificado em muitas regiões do domínio II que está envolvido na interação com o receptor de membrana da fosfatase alcalina (FERNÁNDEZ et al., 2005; PÉREZ et al., 2005). A toxina Cyt1Aa tem a propriedade de se inserir diretamente na membrana celular, sem ser mediada por receptores específicos, e pode agir como uma

molécula receptora do Cry11Aa. Evidências demonstraram que o bom sinergismo entre Cry11Aa e Cyt1Aa e alta toxicidade a larvas de *A. aegypti* foi positivamente correlacionado, assim como a alta afinidade no perfil de ligação dessas toxinas aos receptores (PÉREZ et al., 2005).

No trabalho de BELTRÃO e SILVA-FILHA (2007), os autores demonstraram, através de ensaios de competição, que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, unem-se especificamente à BBMF de *A. aegypti*, mas que a afinidade para os sítios de união foi alta e sugerem que o aumento na afinidade de união poderia ter sido dada por meio da interação sinérgica com a toxina Cyt1Aa, a qual não fez parte da análise pelos autores. Este 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*. Em outros estudos, as proteínas Cry4A e Cry4B também têm sido reportadas agindo sinérgicamente em larvas de mosquito (BRAVO et al., 2007).

2.6. Resistência de insetos

Um dos obstáculos mais sérios nos programas de controle de vetores de enfermidades humanas é o desenvolvimento de resistência aos inseticidas. Segundo a Organização Mundial de Saúde, dos 506 artrópodes de importância médica que existem, aproximadamente, 40% apresentam resistência a um tipo de inseticida. Destas espécies, cerca de 50% são espécies de mosquitos, os quais são vetores de muitas enfermidades que afetam a saúde humana (OMS, 1992). Infelizmente, a grande maioria desses registros foi realizada após falhas ao tentar controlar determinado inseto, e não como um estudo prévio antecipando-se a tais erros (GEORGHIOU et al., 1983).

Resistência é definida como a capacidade, adquirida por meio de um processo evolutivo, de um organismo sobreviver em resposta à pressão de seleção imposta pela exposição a algum agente tóxico (ILSI/HESI, 1998). Pragas alvo evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Dentre as conseqüências drásticas da evolução da resistência estão a aplicação mais freqüente de pesticidas; aumento da dosagem do produto; e substituição por um outro produto, geralmente de maior toxicidade (GEORGHIOU, 1983). Estes fatores comprometem os programas de controle de vetores em vista da maior contaminação do meio ambiente com pesticidas, destruição de organismos benéficos e elevação nos custos para obter os níveis aceitáveis de controle. Sendo assim, o manejo da resistência de artrópodes aos produtos químicos tem se tornado um importante componente do controle vetorial (CROFT, 1990; DENHOLM & ROWLAND, 1992).

A quantidade de insetos vetores resistentes nas populações depende do volume e da freqüência da aplicação dos inseticidas que se tem empregado contra eles e das características inerentes da espécie. Um exemplo são os mosquitos, que possuem ciclos de vida curtos com abundante descendência e características essenciais para o desenvolvimento de resistência (HEMINGWAY & RANSON, 2000).

A base molecular pela qual o mosquito, sob pressão de seleção de inseticidas químicos, apresenta um quadro de resistência, ainda está sendo elucidada. Esta elucidação está sendo bastante auxiliada pelo fato dos genomas de *Drosophila melanogaster*, de *Anopheles gambiae* e de boa parte de *A. aegypti* já estarem disponíveis em banco de dados, tais como GeneBank e o TIGR (HEMINGWAY et al., 2004).

No ano 2000, 16 populações de *A. aegypti* provenientes de municípios nacionais apresentaram os primeiros indícios de resistência ao temephos®. Em alguns estados como Rio de Janeiro, Ceará e Rio Grande do Norte, foi recomendada a substituição do temephos® por biolarvicidas à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis*, bactéria entomopatogênica considerada um dos agentes de controle biológico mais eficazes contra culicídeos (BRASIL, 2000).

Os casos de resistência de insetos de diferentes ordens não se limitam a inseticidas sintéticos, mas incluem uma ampla gama de produtos naturais incluindo reguladores de crescimento e agentes de controle biológico, entre eles a toxina produzida por *B. thuringiensis*. Formulações contendo a toxina de *B. thuringiensis* tinham sido usadas por mais de quarenta anos como inseticidas sem nenhuma

evidência de resistência em situações de campo. O primeiro relato de falhas de formulações *B. thuringiensis* no controle de pragas ocorreu nas Filipinas com *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (traça-das-crucíferas) (VAN RIE & FERRÉ, 2000). Populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros, têm desenvolvido resistência à toxina *B. thuringiensis* em condições de laboratório (NEPPL, 2001).

A ligação ao receptor é essencial na especificidade das toxinas de *B. thuringiensis*. A interação das toxinas com as células epiteliais de larvas intoxicadas foi demonstrada através de imunodeteção, assim como os potenciais receptores das toxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* em intestino de *A. stephensi* e *A. aegypti* (YAMAGIWA et al., 2002).

Com base no trabalho realizado por SENA et al. (2009), a proteína Cry1Fa ocupa o mesmo sítio de união que Cry1Ab em *S. frugiperda*, já que esta reduziu efetivamente a união de Cry1Fa marcada à BBMV deste inseto; ao mesmo tempo que Cry1Fa não foi deslocada pelas Vip3Af1 e Vip3Aa1, o que indica que estas toxinas ocupam um outro sítio de união em *S. frugiperda*. Estes resultados indicam que *S. frugiperda* apresenta um sítio de união para Cry1Fa, compartilhado por Cry1Ab e outro sítio diferente, compartilhado por Vip3Af1 e Vip3Aa1. Desse modo, as toxinas Cry1Fa e Cry1Ab não devem estar numa mesma planta transgênica por permitirem a possibilidade de ocorrência de resistência cruzada.

Sugere-se que o mecanismo de redução da ligação está relacionado com a modificação bioquímica e o decréscimo da suscetibilidade (resistência). Esta observação, junto com a variedade de sítios de ligação das proteínas Cry, em insetos, indica que delta-endotoxinas com diferentes especificidades de ligação devem ser consideradas para uso em estratégias de manejo de resistência (FERRÉ & VAN RIE, 2002).

Estudos são necessários para entender completamente as interações entre toxinas Cry e Cyt de *B. thuringiensis* e o sinergismo entre elas, responsáveis pela ação complexa e específica em larvas de *A. aegypti*, visando ao controle do surgimento de resistência destes insetos às toxinas *Bt*.

2.7. Proteína Chi (Quitinase)

B. thuringiensis pode também matar os insetos por meio de um mecanismo não mediado pelas toxinas Cry. O envolvimento da própria bactéria na morte dos insetos, fornece evidências da existência de fatores de virulência adicionais, permitindo a sobrevivência de *B. thuringiensis in vivo*, no trato digestivo, permanecendo imune às defesas do hospedeiro (FHEDILA et al., 2004).

A proteína quitinase (Chi) vem sendo estudada no controle biológico de insetos (ARORA et al., 2003) e está presente em isolados de *B. thuringiensis*. Patógenos como *B. thuringiensis*, que infectam diretamente o intestino, podem penetrar a barreira rica em quitina da membrana peritrófica. Estudos têm demonstrado que a quitinase hidrolisa a quitina na membrana peritrófica do inseto, causando a formação de poros e facilitando o contato entre as delta-endotoxinas e seus receptores no epitélio intestinal, aumentando a toxicidade de *B. thuringiensis* (SAMPSON e GOODAY, 1998).

GOODAY (1990) relata que a quitinase é uma hidrolase-glicosil que catalisa a degradação hidrolítica da quitina, encontrada em exoesqueletos de insetos e crustáceos, assim como em grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos, algas e animais.

O inseto tem o intestino médio internamente coberto de membrana peritrófica cuja estrutura é basicamente composta de proteínas e fortificada com fibras de quitina, constituindo uma barreira física para infecções bacteriana ou viral, mas permite o fluxo de nutrientes, minerais digeridos e água ao epitélio do intestino médio (REGEV et al., 1996).

O aumento nos níveis de endoquitinases no intestino médio larval ou a adição de quitinases nas preparações com toxinas Cry aumentam e potencializam 10 vezes mais sua eficácia, segundo REGEV et al. (1996) e DING et al. (2008).

Muitas bactérias quitinolíticas têm sido relatadas como potenciais agentes de controle biológico de doenças de plantas causadas por vários fungos fitopatogênicos e insetos-praga (THAMTHIANKUL et al., 2001, SUGINTA et al., 2005, BRATTACHARYA et al., 2007). Embora o mecanismo de como a quitinase exerce seu efeito sobre insetos

ainda seja hipotético, evidências de seu efeito sinérgico com as delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* já foram divulgadas (SAMPSON & GOODAY, 1998; WIWAT et al., 2000, LIU et al., 2002).

Segundo SMIRNOFF (1974), a ação sinérgica entre proteínas cristal e quitinase, a qual hidrolisa a ligação β -1,4 na quitina, ocorre durante a co-aplicação da proteína inseticida contendo suspensão de esporo junto com quitinase, aumentando o efeito inseticida da bactéria em larvas de insetos (REGEV et al., 1996, LIN & XIONG, 2004).

A co-expressão dos genes quitinases heterólogos em *B. thuringiensis* tem sido demonstrada, pelo fato de aumentar a atividade inseticida da bactéria (LERCANAWANICHAKUL & WIWAT, 2001).

O papel das quitinases endógenas produzidas por *B. thuringiensis* var. *aizawai* tem sido investigado na infecção de larvas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) por SAMPSON & GOODAY (1998), nas quais os autores demonstraram que a adição de um inibidor da quitinase aumentou os valores da CL_{50} da toxina.

Vários trabalhos têm relatado a clonagem dos genes das quitinases de *B. thuringiensis* e sua superexpressão em *Escherichia coli* de maneira a comprovar seu efeito sinérgico (ARORA et al., 2003; LIN & XIONG, 2004; ZHONG et al., 2005). Todos os autores detectaram um efeito positivo na patogenicidade de *B. thuringiensis* aos insetos pragas e alguns descreveram uma certa homologia de aminoácidos com o domínio de união de algumas celulasas, demonstrando que ambas podem ter um mecanismo comum de união ao substrato (MARIMOTO et al., 1997).

2.8. Técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Atualmente, já são conhecidas várias aplicações da tecnologia do DNA recombinante no controle biológico de insetos, sendo que a maioria dos exemplos

provém de bactérias, principalmente empregando *B. thuringiensis* e espécies correlatas (AZEVEDO, 1998). Com a caracterização é possível discriminar os diversos isolados de *B. thuringiensis* através do conhecimento de seus padrões de comportamento e do seu genoma (distribuição dos genes *cry*) (FRUTOS et al., 1994).

Avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem diferenciar cepas e isolados, podendo também ser empregados na determinação da presença/ausência de certos genes *cry* (POLANCZYK & ALVES, 2003).

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

A técnica de PCR é uma forma de caracterizar isolados de *B. thuringiensis* e é amplamente utilizada na detecção de novos genes *cry* (VALICENTE et al., 2000; HANSEN & HENDRIKSEN, 2001; VILAS BOAS & LEMOS, 2004) onde os “primers” podem ser desenhados a partir de regiões conservadas destes genes. Além disso, esta técnica permite comparar geneticamente, isolados pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (LIMA et al., 2002; PORCAR & JUARÉZ-PÉREZ, 2003), o que a tornou uma ferramenta de trabalho indispensável.

CAROZZI et al. (1991) utilizaram a técnica de PCR para identificar cepas de *B. thuringiensis* com atividade inseticida contra lepidópteros, coleópteros e dípteros, utilizando oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry1*, *cry3* e *cry4*. Trabalhos semelhantes têm sido realizados ao redor do mundo para caracterizar o perfil

genético das cepas de *B. thuringiensis*, prever a atividade inseticida das toxinas Cry e descobrir novos genes (MASSON et al., 1998; LI et al., 2002; WANG et al., 2003; VILAS BOAS & LEMOS, 2004).

A técnica requer quantidades pequenas de DNA e permite uma rápida e simultânea caracterização de muitas amostras. Todavia, o procedimento normal de PCR não pré-determina exatamente a atividade inseticida do isolado, assim como outros fatores como, por exemplo, o nível de expressão dos genes *cry* presentes que estão envolvidos no potencial inseticida de cada isolado (MARTÍNEZ et al., 2005). A avaliação da patogenicidade é um passo importante na seleção de novos isolados, fazendo-se necessário, os testes de bioensaios utilizando o entomopatógeno *B. thuringiensis* contra o inseto-alvo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados de *Bacillus thuringiensis*

Analisou-se 1073 isolados de *B. thuringiensis*, provenientes de diversas regiões brasileiras, dos quais, 310 (28,9%) foram cedidas pelo Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/Usp, Campus de Piracicaba/SP, provenientes de solo urbano e de cerrado, açudes, frutíferas, pastagem, fezes de animais, plantas, mata, terra arada e campos cultivados com banana, milho, laranja, trigo, algodão, cana-de-açúcar e soja; 640 (59,7%) provenientes do Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA – Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG, cujas amostras foram coletadas de pastagem, terra arada e campos cultivados com milho, mandioca, trigo e algodão; 123 (11,4%) pertencentes à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV/Unesp – Campus de Jaboticabal, provenientes de solo

urbano e arenoso, mata, grãos armazenados (milho e ração), lagartas do milho e campos cultivados com soja, algodão, milho, feijão, café, cana-de-açúcar e trigo.

A coleção dispõe, além dos isolados mencionados acima, 64 linhagens padrão, das quais, quatro foram utilizadas neste estudo: *B. thuringiensis* var. *israelensis*, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *alesti* e *B. thuringiensis* var. *sotto*, cedidas pelo “Bacillus Stock Center” (BSC), Ohio State University, EUA.

3.1.1. Caracterização morfológica dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Os isolados de *B. thuringiensis* foram caracterizados morfológicamente para constatação de inclusões cristalinas. Para isso, após o cultivo dos isolados de *B. thuringiensis* 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 incubação a 30°C por 5 dias, foram preparadas lâminas contendo 20 µl da suspensão bacteriana de cada amostra, cobertas com lamínula e uma gota de óleo de imersão. A caracterização morfológica foi efetuada por meio da observação de células vegetativas, esporos e cristais de cada amostra, visualizados em microscopia de contraste de fase (Leica®) (SILVA-WERNECK & MONNERAT, 2001). As amostras identificadas como *B. thuringiensis* foram devidamente identificadas e estocadas conforme item 3.1.3.

3.1.2. Preparo dos estoques dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Os isolados de *B. thuringiensis* foram estocados na forma de fitas de papel filtro e tubos contendo água destilada impregnados com uma suspensão de esporos/cristal e armazenados a 10°C, devidamente identificados.

Para tanto, os isolados bacterianos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Nutriente, as quais foram incubadas a 30 °C por 5 dias, para completa esporulação. Em seguida, foi adicionado 1 ml de água grau Milli-Q

autoclavada sobre as placas de Petri, as quais foram homogeneizadas, com auxílio de alça de platina, para obtenção da cultura bacteriana, a qual serviu para banhar as fitas de papel filtro, previamente esterilizadas, para a impregnação da solução de esporos/cristal e, posteriormente, estas foram armazenadas em tubos plásticos (2 ml).

Para o estoque em água dos isolados bacterianos, foi acondicionado uma fita de papel previamente impregnada com esporos/cristal, em tubos plásticos, contendo 1,5 ml de água grau Milli-Q autoclavada, para garantir a integridade dos esporos/cristal de cada isolado.

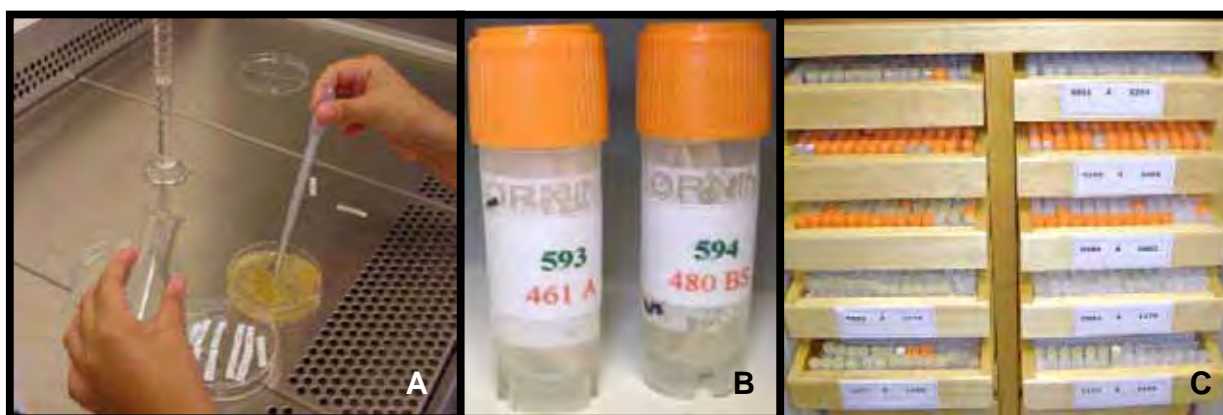


Figura 4. Preparo da suspensão bacteriana dos isolados de *B. thuringiensis* para estoque em fitas de papel filtro (A); Fitas de papel filtro impregnadas com esporos-cristal estocadas em tubos plásticos de 2 ml (B); Estoque das fitas de papel filtro ao Banco de isolados de *B. thuringiensis* do LGBBA (C).

3.2. 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 e incubados a 30°C por 12 h.

A extração de DNA total foi realizada utilizando-se o Kit InstaGene Matrix (BioRad), segundo as instruções do fabricante, em que: uma colônia de cada amostra foi ressuspensa em tubos de plástico de 1,5 ml contendo 1,0 ml de água Milli-Q estéril. As colônias foram centrifugadas por 1 min a 15.294 xg . O sobrenadante foi descartado

e o precipitado ressuspenso em 200 µl da resina InstaGene Matrix - BioRad (em constante agitação em agitador magnético). As suspensões obtidas foram incubadas a 56 °C por 25 min e os tubos agitados em vórtex por 10 s e incubados a 100 °C por 8 min. Em seguida, os tubos foram novamente agitados em vórtex por 10 s e, logo após, centrifugados por 2 min a 15.294 xg. O sobrenadante foi transferido para microplacas de polipropileno contendo 96 poços e armazenadas a -20°C.

3.3. Construção dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1) foram elaborados a partir das regiões conservadas de todas as seqüências dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt2Aa*, *cyt1Aa* e *cyt1Ab* para a ordem Diptera, depositadas no GenBank, obedecendo a lista de nomenclatura das delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* que são atualizadas constantemente e publicadas no site http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html. Para o alinhamento das seqüências utilizou-se os softwares 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).

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* e quitinase (*chi*) de *B. thuringiensis*, seqüência de nucleotídeos e tamanho esperado do fragmento amplificado por PCR.

Iniciadores	Seqüência de nucleotídeos (5'-3')	Produto (pb)	T° pareamento
<i>cry4Aa</i>	GAAGTGGGTATGGCACTCAAC(d) CTCACAACGATTAGACCCTTC(r)	777	48
<i>cry4Ba</i>	GCGAGGTTTCCCATGTCTAC(d) GTTGTAGGGTGAATTGTTATC(r)	347	52
<i>cry10Aa</i>	ATTGTTGGAGTTAGTGCAGG(d) AATACTTTGGATGTGTCTTGAG(r)	995	48
<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) CTATTTTCGCTAATGACG(r)	2027	45

(d) direto; (r) reverso

3.4. Identificação de genes *cry*, *cyt* e *chi* por PCR

As reações de amplificação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* (díptero-específicos) e quitinase (*chi*) foram otimizadas de acordo com as seqüências dos iniciadores, cujas concentrações dos reagentes utilizados para amplificação de cada gene estudado estão discriminados na Tabela 2.

Tabela 2. Reagentes e concentrações necessárias para as reações de amplificação dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* e quitinase (*chi*) de *B. thuringiensis*.

Reagentes	Iniciadores								
	<i>cry4Aa</i>	<i>cry4Ba</i>	<i>cry10Aa</i>	<i>cry11Aa</i>	<i>cry11Ba</i>	<i>cyt1Aa</i>	<i>cyt1Ab</i>	<i>cyt2Aa</i>	<i>chi</i>
Solução tampão	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl ₂	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,0 mM	2,5 mM	1,5 mM
dNTPs	0,25 mM	0,2 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
iniciadores	1,5 µM	4,0 µM	1,5 µM	1,5 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,25 µM	0,4 µM	0,2 µM
Taq DNA polimerase	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U	1,0 U
Amostra de DNA	2,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	2,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	3,0 µl	5,0 µl	2,0 µl
BSA (Albumina Sérica Bovina)	---	---	---	---	0,02%	0,02%	0,02%	---	---
Água destilada (q.s.p)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

O programa utilizado foi otimizado de acordo com a temperatura de pareamento de cada iniciador (Tabela 1), partindo-se do seguinte programa: um passo inicial de desnaturação de 5 min à 95 °C; 30-35 ciclos de: 1 min à 95 °C para desnaturação, 1,0-1,5 min à 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 .

Para o gene da quitinase (*chi*), o programa utilizado foi um passo inicial de desnaturação de 5 min à 94 °C; 30 ciclos de: 1 min à 94 °C para desnaturação, 1 min à 45 °C para pareamento dos iniciadores e 1,5 min a 72 °C para extensão; um passo adicional de 10 min a 72 °C para completa extensão. Ao fim do programa foi adicionado um passo para a manutenção das amostras a 10°C até a retirada dos tubos do termociclador.

As ampliações foram realizadas usando-se um aparelho termociclador marca MJ Research, modelo PTC 100, equipado com circuito Hot Bonnet.

Os fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores foram analisados em géis de agarose 1,5% para os genes *cry* e *cyt* e 1,0% para o gene da quitinase (*chi*), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e submetidos à eletroforese horizontal a 70 V por 2 h, conduzida em tampão TEB 1X (89 mM Tris; 2,5mM EDTA; 89 mM Ácido Bórico, pH 8,3), também adicionado brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Os fragmentos amplificados foram comparados com o marcador molecular “1kb DNA ladder” (Fermentas), o qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos após a reação de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em equipamento GEL DOC 2000 (BioRad), através do software Quantity-One.

3.5. Estrutura genética entre os isolados de *B. thuringiensis*

As análises da estrutura genética foram realizadas entre os isolados de *B. thuringiensis* portadores de genes díptero-específicos e quitinase. Os haplótipos foram definidos como a combinação de alelos para os loci. Para isso, foi construída uma matriz, com base nas combinações de genes *cry*, *cyt* e *chi* obtidas de cada isolado, no qual a análise de estrutura genética por esse método foi considerada da seguinte forma: o alelo que representa a presença do gene (1) e o alelo que representa sua ausência (0), ou seja, a não amplificação do mesmo por PCR.

A análise estatística F_{ST} foi calculada através da análise de variância molecular (AMOVA) usando o software ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 1992; SCHNEIDER et al., 2000). Como este tipo de análise estima os componentes de variância considerando o número de diferenças entre os haplótipos moleculares (WEIR & COCKERMAN, 1984, EXCOFFIER et al., 1992, WEIR, 1996), o parâmetro F_{ST} varia de 0.0 (quando as populações parecem homogêneas) a 1.0 (quando são totalmente heterogêneas), estimando assim toda a variação que ocorre entre os isolados.

3.6. 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, 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 (CL₅₀ e CL₉₀), por meio da análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando-se do programa POLO PLUS (LeOra Software Berkeley, CA).

3.7. Insetos

Utilizou-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), o qual mantém uma colônia de mosquitos desde a ano de 2000.

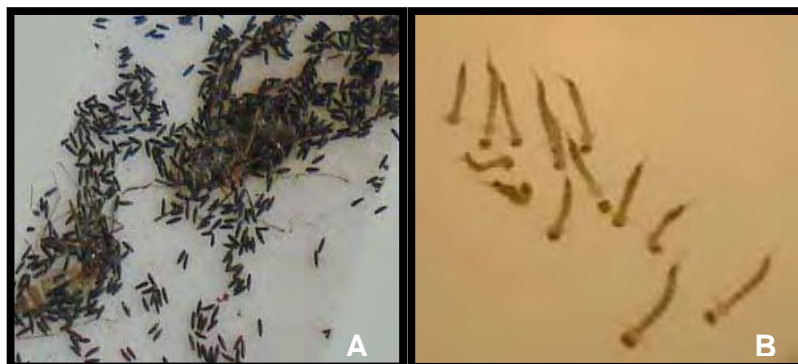


Figura 5. Ovos de *A. aegypti* depositados em folha de papel filtro (A); Larvas de 3º instar de *A. aegypti* (B).

Testes preliminares utilizando a técnica RT-PCR foram realizados pelo Laboratório de Vírus do Departamento de Microbiologia da UFMG, para verificar a ausência do vírus da dengue nos ovos coletados. Os ovos permaneceram no LGBBA, sob as seguintes condições: $27 \pm 1^\circ\text{C}$, U.R. de 75 a 80% e fotofase de 12 h (EIRAS, 1991).

Durante o desenvolvimento, as larvas foram mantidas em cubas plásticas com água sem cloro (aproximadamente 5 cm de profundidade), cobertas com telado fino, e alimentadas com ração em pélets para répteis (Reptolife®) durante todo o ciclo larval.



Figura 6. Cubas plásticas utilizadas para criação das larvas de *A. aegypti* em sala climatizada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), U.R. de $75\% \pm 5\%$, e fotofase de 12 h.

3.8. Preparo das suspensões bacterianas

Para o preparo das suspensões de esporos/cristal, os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo as linhagens padrão, foram cultivados em Placa de Petri com meio de cultura Agar Nutriente e incubados a 30°C durante 5 dias, permitindo assim a completa esporulação e liberação dos cristais. Após este período, todo o conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubos Falcon contendo 10 ml de água grau Milli-Q autoclavada e 0,05% de TWEEN20 (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada e, a partir desta, foram feitas duas suspensões seriadas, sendo a primeira 10^{-1} e a segunda 10^{-2} . A suspensão seriada 10^{-2} foi utilizada

para a contagem de esporos em microscópio óptico com auxílio da Câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998) para a padronização à concentração de $1,5 \times 10^7$ esporos-cristal/ml, constituindo a suspensão testada no bioensaio seletivo.

3.9. Bioensaios seletivos

Os bioensaios seletivos foram realizados distribuindo-se, com auxílio de um micropipetador, 1 ml de 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* imersas em cada copo, com auxílio de pipetas pipeta Pasteur, sendo que, cada copo foi coberto com tecido telado fino. 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 temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), U.R. de $75\% \pm 5\%$, e fotofase de 12 h, sendo a mortalidade larval avaliada nas quatro primeiras horas, 24 e 48 h após aplicação da suspensão bacteriana, sendo consideradas mortas as larvas totalmente inertes.

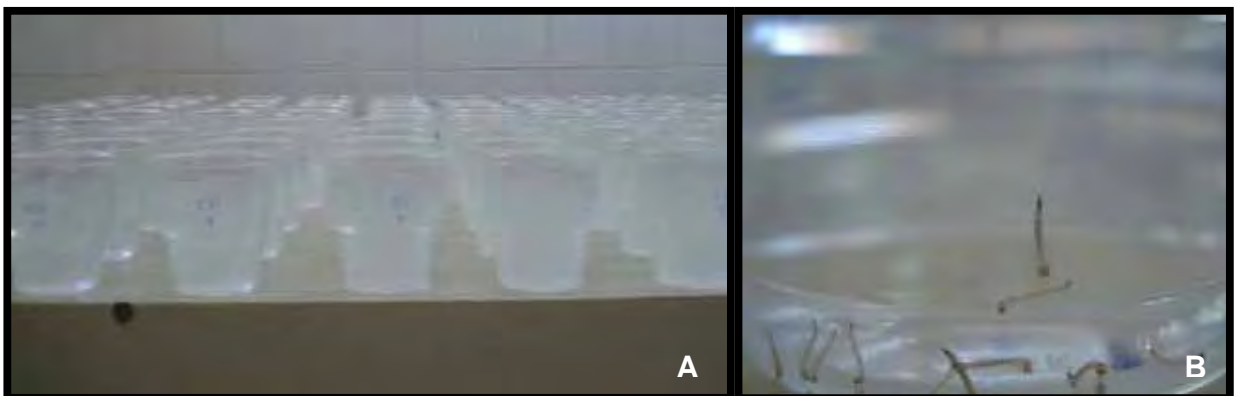


Figura 7. Disposição (A) e copos (B) contendo água e larvas de 3º instar de *A. aegypti* para os testes de bioensaios.

3.10. Bioensaios quantitativos (CL₅₀ e CL₉₀)

A CL₅₀ e CL₉₀ foram calculadas 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 10⁵ esporos-cristal/ml da cultura bacteriana de cada isolado, cultivada nas mesmas condições descritas no item anterior. Em seguida, adicionou-se a suspensão bacteriana de cada um dos isolados em copos, seguindo as mesmas condições dos bioensaios seletivos.

Nas 4 primeiras horas, 24 e 48 h após aplicação da suspensão foi realizada a contagem de larvas mortas, determinando-se a CL₅₀ e CL₉₀, por meio da análise de Probit (FINNEY, 1971), utilizando-se do programa POLO PLUS (LeOra Software Berkeley, CA).

3.11. Análise exploratória de agrupamento

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 larval para cada uma das quatro repetições de cada tratamento, nos tempos de exposição dos isolados, frente às concentrações das suspensões bacterianas. As análises foram processadas pelo software Statistica, versão 7 (STATSOFT, 2004).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização morfológica dos isolados de *Bacillus thuringiensis*

Através da microscopia com contraste de fase (1000 X) foi confirmado que os 1073 isolados utilizados neste trabalho, provenientes de diversas regiões brasileiras, eram pertencentes à espécie *B. thuringiensis*, devido às características morfológicas visualizadas, inerentes a essa espécie, como células vegetativas, esporos e cristais (HABIB & ANDRADE, 1998).

4.2. Presença de genes *cry* e *cyt*

A amplificação dos fragmentos de tamanho esperado foi obtida por PCR utilizando-se dos pares de oligonucleotídeos iniciadores que detectam os genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa* (Figuras 8 e 9), os quais são específicos contra insetos da ordem Diptera.

As análises permitiram verificar que, dos 1073 isolados submetidos a PCR, apenas 45 (4,19%) apresentaram amplificação para pelo menos um dos genes estudados ou para a combinação dos mesmos entre os isolados. Na Tabela 3, observam-se os perfis gênicos obtidos dos isolados de *B. thuringiensis*, bem como a porcentagem de mortalidade das larvas de *A. aegypti* obtidas por meio dos testes de bioensaio seletivo, com utilização de suspensões bacterianas contendo esporos-cristal (item 4.5.).

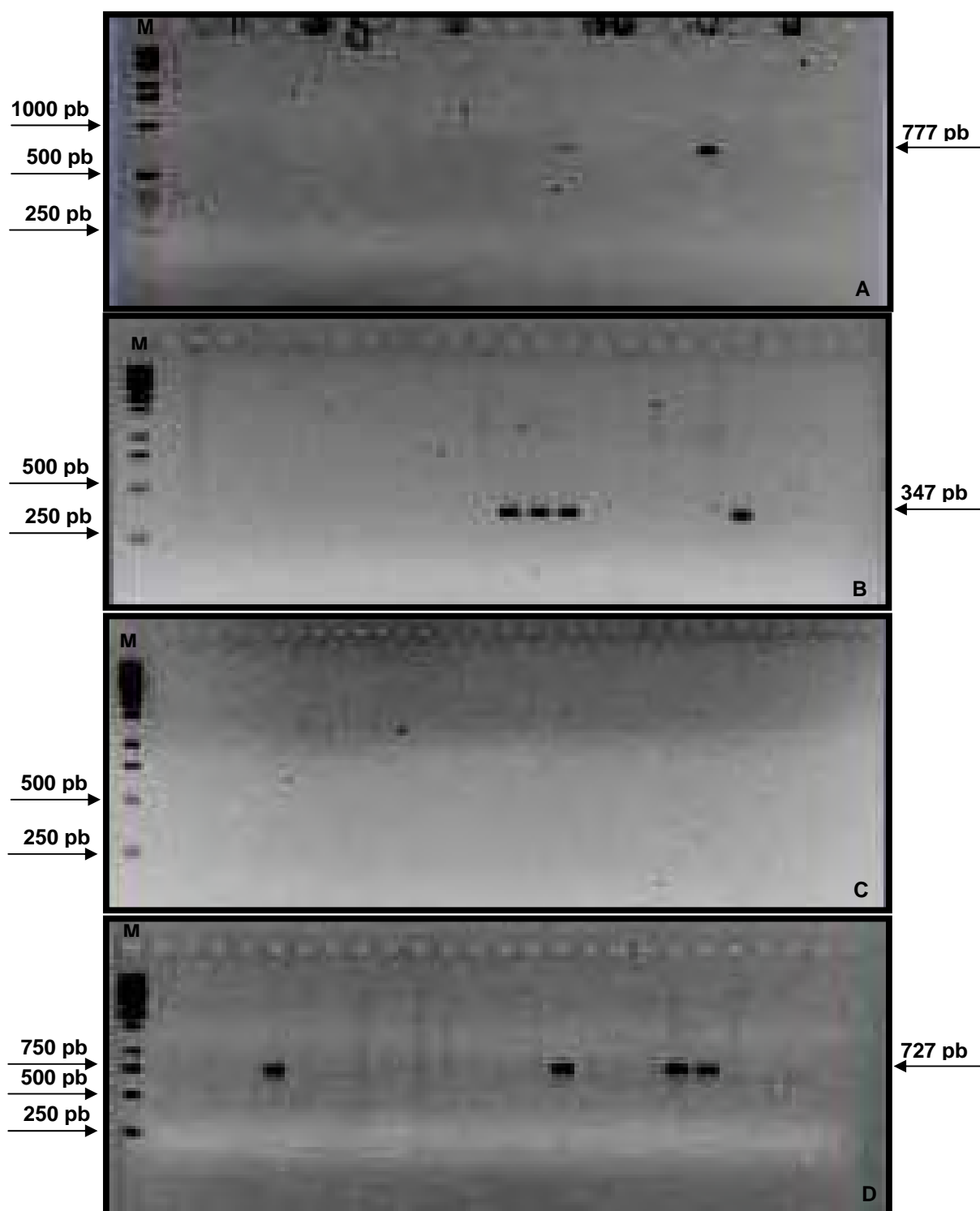


Figura 8. Eletroforogramas da determinação dos genes: *cry4Aa* (A), *cry4Ba* (B), *cry10Aa* (C), *cry11Aa* (D) para uma amostra de isolados de *B. thuringiensis*; M: marcador molecular “1 Kb DNA Ladder”.

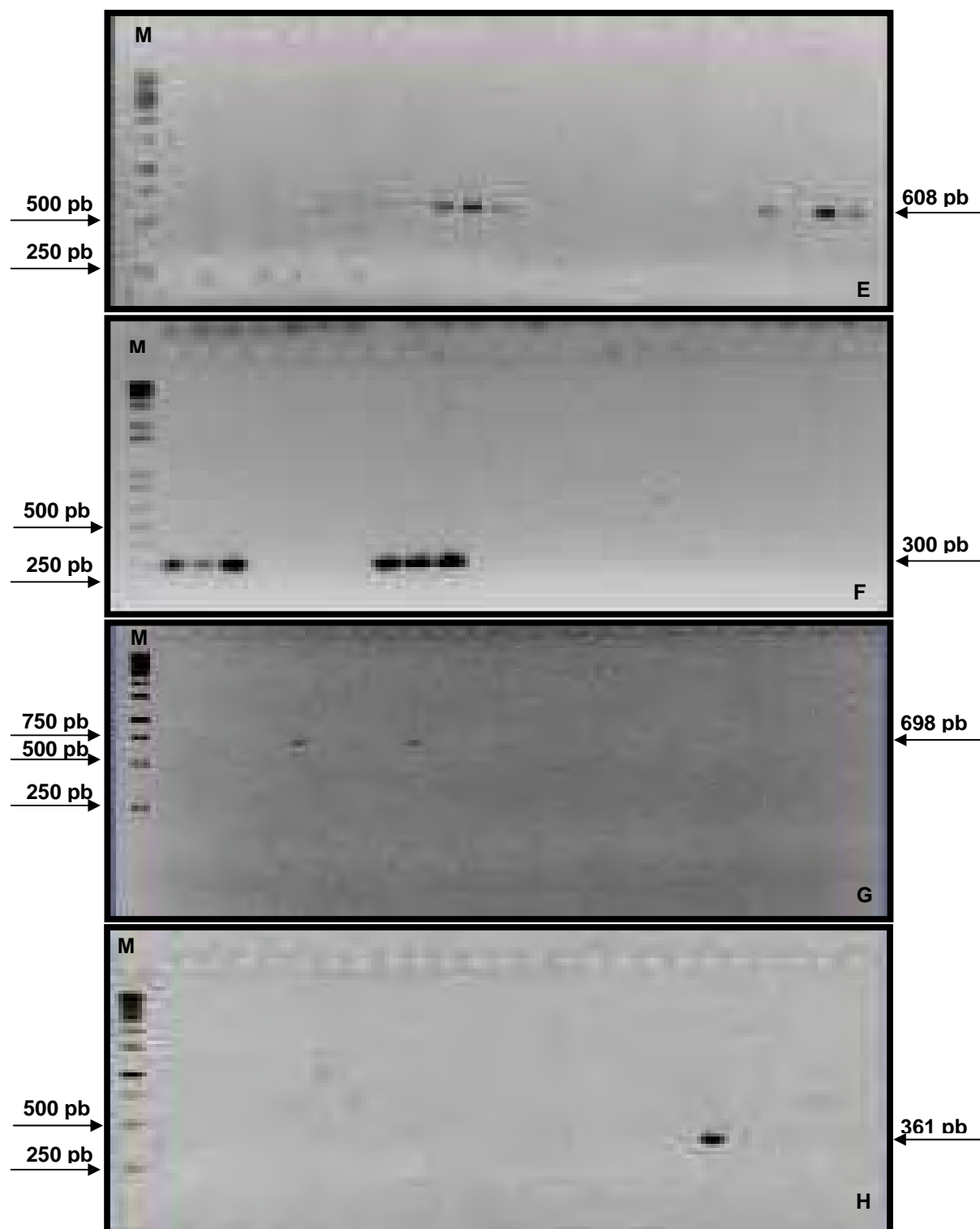


Figura 9. Eletroforogramas da determinação dos genes: *cry11Ba* (E), *cyt1Aa* (F), *cyt1Ab* (G), *cyt2Aa* (H) para uma amostra de isolados de *B. thuringiensis*; M: marcador molecular “1 Kb DNA Ladder”.

Dos 123 isolados de *B. thuringiensis* pertencentes à coleção de Jaboticabal – SP, 35 (28,45%) apresentaram-se como portadores de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) e, entre os 310 isolados provenientes de Piracicaba – SP, nove (7,31%) isolados apresentaram amplificação para um ou mais genes estudados. Já para a coleção de Sete Lagoas – MG, a partir de 640 isolados, apenas 1 (0,81%) isolado apresentou amplificação para o gene *cry11Ba*.

Nos 45 isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram amplificação pode-se verificar uma diversidade de haplótipos. Foi possível identificar a presença de apenas um gene em 25 isolados, dois genes em quatro, três em 10, 4 em quatro e cinco em dois, apresentando 14 diferentes combinações de genes. A identificação dos genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos), mediada por PCR, revelou que os perfis gênicos de maior frequência na coleção estudada foram para (*cry4Ba*), (*cyt1Ab*) e (*cry11Aa*, *cyt1Aa*, *cyt2Aa*) (Tabela 4).

Dentre os 1073 isolados de *B. thuringiensis*, as porcentagens de amplificação para os genes díptero-específicos foram relativamente baixas. Apenas sete isolados (0,65%) apresentaram amplificação para o iniciador *cry4Aa*, 25 (2,32%) para *cry4Ba*, 16 (1,49%) para *cry11Aa* e 6 (0,55%) para *cry11Ba*. Para o iniciador *cry10Aa*, nenhum isolado apresentou amplificação, fato este que pode estar relacionado à ausência deste gene nos isolados ou até mesmo a baixa expressão do gene, dificultando a detecção do mesmo pela técnica de PCR. Já para os iniciadores *cyt*, 17 (1,58%) amplificaram para o iniciador *cyt1Aa*, seguidos de 7 (0,65%) para *cyt1Ab* e 12 (1,11%) para *cyt2Aa* (Figura 10). Destes, 48% apresentaram combinações de genes *cry* e *cyt* (Tabela 4).

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) (Tabela 4). Apenas a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresentou amplificação para os oito genes *cry* e *cyt* estudados.

Tabela 3. Conteúdo gênico das linhagens padrão e dos isolados de *B. thuringiensis* e porcentagem de mortalidade de larvas de *A. aegypti* submetidas ao bioensaio seletivo.

Isolados	Genes									Mortalidade média (%)					
	cry					cyt			chi	Tempo após aplicação (h)**					
	cry4Aa	cry4Ba	cry10Aa	cry11Aa	cry11Ba	cyt1Aa	cyt1Ab	cyt2Aa	chi	1h	2h	3h	4h	24h	48h
Testemunha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
<i>B. t. tenebrionis</i> ^(a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
<i>B. t. israelensis</i> ^(b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	100	100	100	100	100	100
I_102*	+	+	-	+	-	+	+	-	+	100	100	100	100	100	100
I_106*	-	+	-	+	-	+	+	-	+	100	100	100	100	100	100
I_107*	+	+	-	+	-	-	-	+	+	100	100	100	100	100	100
I_115*	+	+	-	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_147*	+	+	-	+	-	-	-	-	+	100	100	100	100	100	100
I_154*	+	+	-	+	-	-	-	-	+	100	100	100	100	100	100
I_177*	+	+	-	+	-	-	-	-	-	100	100	100	100	100	100
I_178*	+	+	-	+	-	-	-	+	+	100	100	100	100	100	100
I_188*	-	-	-	+	+	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_531*	-	-	-	-	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_575*	-	-	-	+	-	+	-	+	+	100	100	100	100	100	100
I_576*	-	-	-	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_577*	-	-	-	+	-	+	-	+	-	100	100	100	100	100	100
I_522	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0	0	1,25	1,25	68,8	82,5
I_82	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	1,25	56,3	75,0
I_138	-	-	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0	0	63,8	65,0
I_119	-	-	-	-	-	-	+	-	+	0	0	0	0	58,8	62,5
I_153	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	35,0	55,0
I_72	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	45	51,3
I_67	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	46,3	50,0
I_70	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	42,5	48,8
I_79	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	41,3	48,8
I_534	-	-	-	+	-	+	-	-	-	0	0	0	0	37,5	43,8
I_118	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	1,25	25,0	43,7
I_69	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	32,5	41,3
I_68	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	27,5	36,3
I_71	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	25	31,3
I_77	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	25	26,3
I_582	-	-	-	+	-	+	-	+	-	0	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5
I_574	-	-	-	+	-	+	-	-	+	0	0	1,25	1,25	1,25	1,25
I_169	-	-	-	-	+	+	-	-	-	0	0	0	0	0	1,25
I_92	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0
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_166	-	-	-	-	-	+	-	-	+	0	0	0	0	0	0
I_168	-	-	-	-	+	+	-	+	-	0	0	0	0	0	0
I_186	-	-	-	-	+	+	-	-	+	0	0	0	0	0	0
I_189	-	-	-	-	+	+	-	+	-	0	0	0	0	0	0
I_559	-	+	-	-	-	-	-	-	+	0	0	0	0	0	0
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_585	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
I_1119	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0

^(a) isolado utilizado como controle negativo; ^(b) isolado utilizado como controle positivo; (+) presença do gene; (-) ausência do gene.

* Isolados que foram selecionados para avaliação de CL₅₀ e CL₉₀ nos bioensaios quantitativos.

** A mortalidade das larvas foi avaliada com 1, 2, 3, 4, 24 e 48 h após aplicação.

Tabela 4. Composição e freqüência dos perfis de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) presentes no isolados de *B. thuringiensis*.

Número de isolados	Genes	Deteção (%)
17	<i>cry4Ba</i>	36,95
5	<i>cyt1Ab</i>	10,86
5	<i>cry11Aa, cyt1Aa, cyt2Aa</i>	10,86
3	<i>cry4Aa, cry4Ba, cry11Aa</i>	6,52
2	<i>cry11Ba, cyt1Aa, cyt2Aa</i>	4,34
2	<i>cry4Aa, cry4Ba, cry11Aa, cyt2Aa</i>	4,34
2	<i>cyt1Aa</i>	4,34
2	<i>cry11Ba, cyt1Aa</i>	4,34
2	<i>cry11Aa, cyt1Aa</i>	4,34
1	<i>cry4Aa, cry4Ba, cry11Aa, cyt1Aa, cyt1Ab</i>	2,17
1	<i>cry4Ba, cry11Aa, cyt1Aa, cyt1Ab</i>	2,17
1	<i>cry4Aa, cry4Ba, cry11Aa, cyt1Aa, cyt2Aa</i>	2,17
1	<i>cry11Aa, cry11Ba, cyt1Aa, cyt2Aa</i>	2,17
1	<i>cry11Ba</i>	2,17

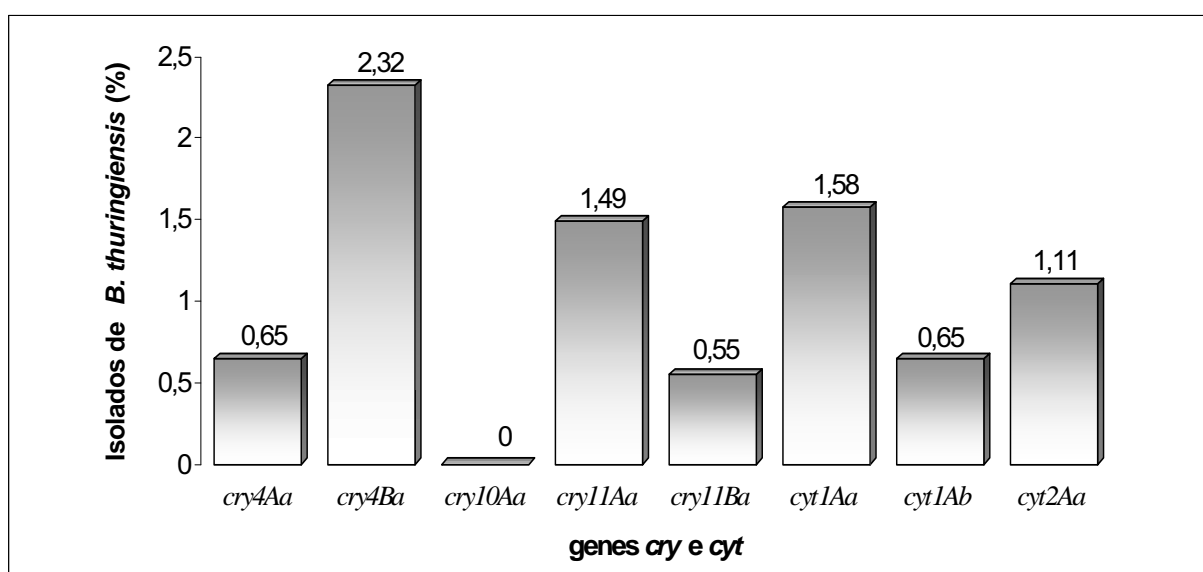


Figura 10. Freqüência de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) nos 1073 isolados de *B. thuringiensis*.

4.3. Presença do gene *chi* (quitinase)

Neste trabalho, os 45 isolados previamente caracterizados como díptero-específicos (Tabela 3) foram submetidos a PCR para detecção da presença do gene *chi*, obtendo-se 25 isolados quitinolíticos (54,34%), que amplificaram fragmentos de DNA de aproximadamente 2.1 kb (Figura 11).

As linhagens padrão utilizadas como controle positivo foram *B. thuringiensis* var. *alesti*, *B. thuringiensis* var. *sotto* e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, que carregam o gene da quitinase.

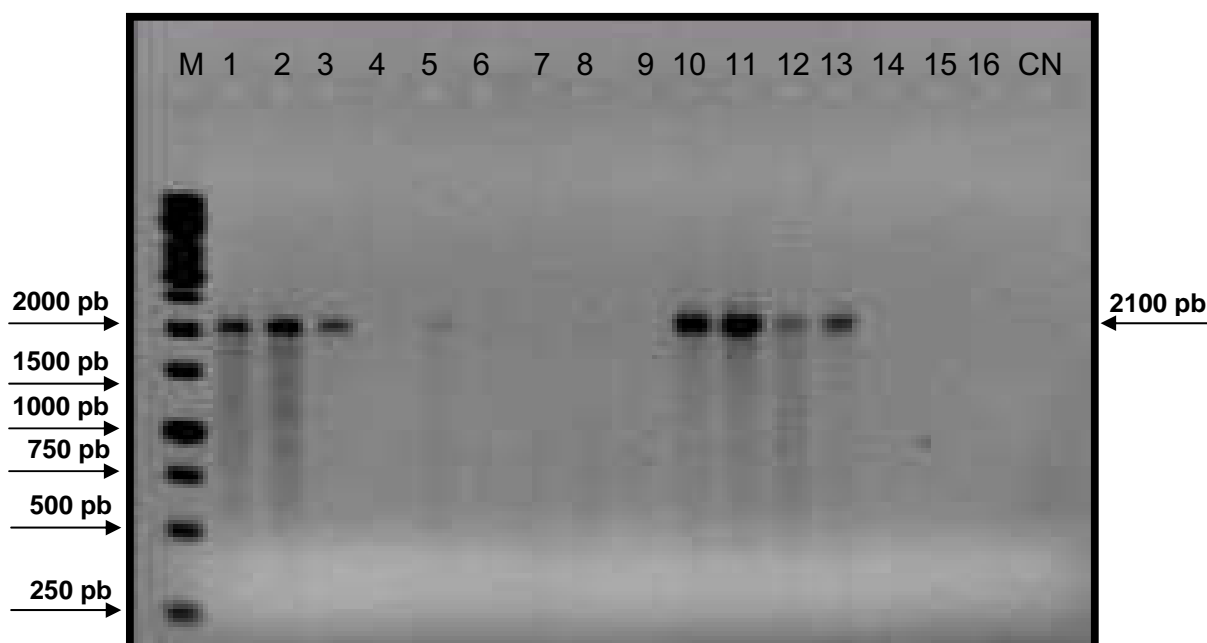


Figura 11. Eletroforograma da determinação do gene da quitinase (*chi*); Canaletas: (1) *B. thuringiensis* var. *alesti*; (2) *B. thuringiensis* var. *sotto*; (3) *B. thuringiensis* var. *israelensis*; (4 a 16) amostras de isolados de *B. thuringiensis*; CN: Controle negativo; M: marcador molecular “1 Kb DNA Ladder”.

4.4. Estrutura genética entre os isolados de *B. thuringiensis*

A análise de estrutura genética, com auxílio do software Arlequin permitiu a caracterização haplotípica dos isolados de *B. thuringiensis*. Na Tabela 5 estão listados os diferentes haplótipos, obtidos após a definição alélica (amplificação) dos genes *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry10Aa*, *cry11Aa*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* e *chi*, em que foi possível identificar 21 haplótipos num agrupamento dos 45 isolados, revelando as maiores freqüências para as combinações (*cry4Ba*, *chi*); (*cry4Ba*) e (*cry11Aa*, *cyt1Aa*, *cyt2Aa*).

A distribuição dos isolados de *B. thuringiensis*, nos seus respectivos haplótipos foi calculada, assim como a freqüência com que cada haplótipo aparece. Um maior número de isolados foi definido com o haplótipo 1, seguidos de 5 e 4 isolados com os haplótipos 9 e 16, respectivamente.

As maiores freqüências haplotípicas entre os isolados foram encontradas para os haplótipos 6 (6,67%), 9 (11,11%) e 16 (8,89%). Para os demais haplótipos foram encontradas as menores freqüências haplotípicas, como mostra a Tabela 5.

Dentre os 21 haplótipos observados nos 45 isolados de *B. thuringiensis*, pode-se observar que, 13 haplótipos são exclusivos dos isolados pertencentes à coleção de Jaboticabal – SP, quatro haplótipos de isolados provenientes de Piracicaba – SP e, apenas um haplótipo do isolado de Sete Lagoas – MG. Os outros três haplótipos são compartilhados entre isolados de Jaboticabal e Piracicaba – SP.

Tal fato denota a ocorrência de variabilidade genética populacional dentro da população de *B. thuringiensis* proveniente de Jaboticabal – SP, considerando a mesma situação para a população de Piracicaba – SP. Além disso, também pode-se afirmar que cada uma dessas populações exibem características genéticas próprias, distinguindo-se entre si. Como observou-se, entre os haplótipos, apenas um isolado proveniente de Sete Lagoas – MG, não pode-se afirmar se há diversidade na população de *B. thuringiensis* proveniente desta localidade. Nesse caso, é fato que tal isolado possui características genéticas próprias que o distinguiu dos demais isolados das localidades de Jaboticabal e Piracicaba – SP.

Dentro cada um dos haplótipos constituídos por dois ou mais isolados buscou-se verificar se havia coerência entre as porcentagens de mortalidade larval, observadas nos bioensaios. Nesse caso, verificou-se que todos os isolados alocados nos haplótipos 4, 8 e 16 causaram 100% de mortalidade. Pode-se inferir, portanto, que as combinações gênicas observadas nesses três haplótipos são especialmente favoráveis para a efetividade da atividade tóxica dos isolados de *B. thuringiensis* sobre as larvas de *A. aegypti*.

Verificou-se também que, todos os isolados dos haplótipos 7 e 11 comportaram-se homogeneamente, não exibindo nenhum grau de toxicidade larval. Portanto, pode-se considerar que a combinação de genes compartilhadas nestes haplótipos por esses isolados não é efetiva no controle de *A. aegypti*.

Dentre os 12 isolados que compartilharam o haplótipo 1, 83% apresentaram toxicidade larval, causando de 26 a 75% de mortalidade, com média de $44,9\% \pm 4,2$. Entretanto, dois isolados que compartilharam esse mesmo haplótipo não foram efetivos. Fato semelhante foi observado com os isolados dos haplótipos 6 e 9. Dentre três isolados que possuem o haplótipo 6, dois foram efetivos, causando mortalidade larval de aproximadamente 60% e, um isolado mostrou-se ineficiente. Já entre os cinco isolados que compartilham o haplótipo 9, apenas dois foram efetivos contra as larvas de *A. aegypti*.

Deve-se considerar que os haplótipos 1, 6 e 9 são constituídos por apenas um ou dois genes estudados. Sabe-se que, atualmente, mais de 400 genes *cry* de *B. thuringiensis* são conhecidos e, o número desses genes que está presente nos isolados de *B. thuringiensis* é variável. Portanto, é de se esperar que os isolados alocados nos haplótipos possuem, além dos genes *cry* e *cyt*, outros genes que atuam na toxicidade de *B. thuringiensis*. Tal situação justifica a diferença de comportamento dos isolados pertencentes a um mesmo haplótipo.

Outro fato importante para tal resultado pode ser ocorrência de mutação ou repressão da atividade gênica de um dos genes do isolado não patogênico, locado no mesmo haplótipo dos isolados com atividade entomopatogênica. Sabe-se, ainda, que a

presença do gene não é condição suficiente para a sua expressão, o qual depende de diferentes fatores que regulem e modulem sua atividade.

Tabela 5. Distribuição e frequência de haplótipos dos isolados de *B. thuringiensis*.

Haplótipo	Isolado	Definição haplotípica	Frequência	Frequência relativa	Coleção	Origem
1	67				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	68				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	69				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	70				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	71				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	72				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	77				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com milho
	79				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com feijão
	82				Jaboticabal - SP	Solo
	92				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	118				Jaboticabal - SP	Solo
	559	0 1 0 0 0 0 0 0 1	12	0,267	Jaboticabal - SP	Solo
2	102	1 1 0 1 0 1 1 0 1	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Solo
3	106	0 1 0 1 0 1 1 0 1	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Silo
4	107				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com trigo
	178	1 1 0 1 0 0 0 1 1	2	0,0444	Jaboticabal - SP	Não identificado
5	115	1 1 0 1 0 1 0 1 0	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Solo
6	119				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com trigo
	138				Jaboticabal - SP	Campo cultivado com soja
	145	0 0 0 0 0 0 1 0 1	3	0,0667	Jaboticabal - SP	Campo cultivado com café
7	143				Jaboticabal - SP	Mata
	144	0 0 0 0 0 0 1 0 0	2	0,0444	Jaboticabal - SP	Mata
8	147				Piracicaba - SP	Não identificado
	154	1 1 0 1 0 0 0 0 1	2	0,0444	Piracicaba - SP	Não identificado
9	153				Piracicaba - SP	Não identificado
	522				Piracicaba - SP	Não identificado
	579				Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
	580				Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
	585	0 1 0 0 0 0 0 0 0	5	0,111	Jaboticabal - SP	Não identificado
10	166	0 0 0 0 0 1 0 0 1	1	0,0222	Piracicaba - SP	Não identificado
11	168				Piracicaba - SP	Não identificado
	189	0 0 0 0 1 1 0 1 0	2	0,0444	Jaboticabal - SP	Não identificado
12	169	0 0 0 0 1 1 0 0 0	1	0,0222	Piracicaba - SP	Não identificado
13	177	1 1 0 1 0 0 0 0 0	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Não identificado
14	186	0 0 0 0 1 1 0 0 1	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Não identificado
15	188	0 0 0 1 1 1 0 1 0	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Não identificado
16	531				Piracicaba - SP	Não identificado
	576				Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
	577				Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
	582	0 0 0 1 0 1 0 1 0	4	0,0889	Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
17	534	0 0 0 1 0 1 0 0 0	1	0,0222	Piracicaba - SP	Lavoura
18	574	0 0 0 1 0 1 0 0 1	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
19	575	0 0 0 1 0 1 0 1 1	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
20	581	0 0 0 0 0 1 0 0 0	1	0,0222	Jaboticabal - SP	Lagarta do milho
21	1119	0 0 0 0 1 0 0 0 0	1	0,0222	Sete Lagoas - MG	Cana-de-açúcar

(1) alelo que representa a presença do gene; (0) alelo que representa ausência do gene.

Linhas destacadas demonstram os isolados que obtiveram 100% de mortalidade nos bioensaios seletivos.

4.5. Bioensaio seletivo

Dos 45 isolados (díptero-específicos) de *B. thuringiensis* submetidos aos testes de bioensaios seletivos, 13 (28,88%), representados na Tabela 3, causaram 100% de mortalidade das larvas de *A. aegypti*, sendo estes submetidos aos testes de bioensaios quantitativos para cálculo da CL₅₀ e CL₉₀.

Dos 13 isolados que apresentaram 100% de eficiência de controle larval, 10 (76,92%) pertenciam à coleção de Jaboticabal – SP e, quatro isolados (30,76%) que apresentaram toxicidade superior a 50%, também são oriundos de Jaboticabal – SP. Na coleção de Sete Lagoas – MG, apenas um isolado (7,69%) apresentou um único gene díptero-específico (*cry11Ba*), o qual não apresentou efetividade de controle do inseto, sugerindo que essa coleção pode apresentar-se como fonte de isolados portadores de genes específicos a outras ordens de insetos.

Entre os isolados analisados, 17 apresentaram-se pouco tóxicos, alcançando apenas 2,5% de mortalidade larval, seguidos de nove isolados com mortalidade até 50% e, 6 isolados apresentaram toxicidade considerável, com até 82,5% de mortalidade após 48 h da aplicação da suspensão bacteriana.

4.6. Bioensaio quantitativo (CL₅₀ e CL₉₀)

A avaliação da toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* foi realizada para caracterização dos mais tóxicos. Fizeram parte dessa análise, os isolados que apresentaram 100% de mortalidade contra larvas de *A. aegypti* nos bioensaios seletivos.

Na Tabela 6 estão os resultados das CL₅₀ e CL₉₀ dos 13 isolados de *B. thuringiensis* submetidos aos bioensaios quantitativos com larvas de *A. aegypti*. O padrão para comparação dos resultados foi a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

No primeiro período avaliado, após 1 h da aplicação da suspensão bacteriana, os isolados 188 e 577 foram os mais eficazes, apresentando os menores valores de

concentração ($0,116$ e $0,133 \times 10^5$ esporos/ml) para CL_{50} e ($0,350$ e $0,485 \times 10^5$ esporos/ml) para CL_{90} , evidenciando atividade tóxica superior à da linhagem padrão, que apresentou os valores de $0,332$ e $4,975 \times 10^5$ esporos/ml para CL_{50} e CL_{90} respectivamente, e que foram semelhantes ao isolado 107 ($0,294$ e $3,176 \times 10^5$ esporos/ml).

No segundo período de avaliação, realizado após 2 h após a aplicação das suspensões bacteriana, os isolados 102 e 107 foram os mais eficazes quando considerados os valores de CL_{50} , que foram $0,022$ e $0,016 \times 10^5$ esporos/ml, respectivamente. Já para os valores da CL_{90} , os isolados mais eficazes foram 188 e 577 ($0,169$ e $0,113 \times 10^5$ esporos/ml, respectivamente). O isolado 178 ($CL_{50} = 0,078$ e $CL_{90} = 0,351 \times 10^5$ esporos/ml) foi o que mais se aproximou dos valores da linhagem padrão.

No terceiro período avaliado, 3 h após a aplicação da suspensão bacteriana, não foi possível determinar os valores de CL_{50} e CL_{90} dos isolados 102, 107, 115, 188 e 577, pois os mesmos apresentaram índices de mortalidade superiores à 50%, mesmo utilizando baixas concentrações de esporos/cristal, podendo ser considerados os mais eficazes no período. Ainda assim, dois isolados (106 e 531) apresentaram baixos valores ($0,015$ e $0,024 \times 10^5$ esporos/ml) para CL_{50} e ($0,087$ e $0,083 \times 10^5$ esporos/ml) para CL_{90} , respectivamente. Os isolados, cuja eficiência assemelhou-se à linhagem padrão foram 147, 154 e 576. Neste período, 177 e 575 apresentaram os maiores valores de CL_{50} e CL_{90} , caracterizando-se como os de menor toxicidade no período.

Alguns valores de CL_{50} e CL_{90} não foram determinados no quarto e quinto período de avaliação (4 e 24 h após a aplicação da suspensão bacteriana, respectivamente), devido aos altos índices de mortalidade das larvas, superiores à 50%. No mesmo período, pode-se inferir que, os isolados 154, 177 e 575, além da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*, apresentaram-se como os de menor toxicidade nestes dois períodos, devido à alta concentração de esporos-cristal determinada para a eficiência de controle das larvas.

Tabela 6. Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) dos isolados de *B. thuringiensis* para larvas de *A. aegypti* após 1, 2, 3, 4 e 24 h da aplicação da suspensão bacteriana.

Isolados	CL50* (IC 95%)	CL90* (IC 95%)	Slope ± SE
1 h após aplicação			
<i>B. t. israelensis</i>	0,332 (0,060-1,015)	4,975 (1,515-15,516)	1,090 ± 0,123
I_102	0,194 (0,128-0,283)	0,902 (0,566-1,927)	1,919 ± 0,252
I_106	0,197 (0,131-0,286)	0,841 (0,533-1,792)	2,031 ± 0,270
I_107	0,294 (0,101-0,646)	3,176 (1,290-22,493)	1,240 ± 0,150
I_115	0,218 (0,091-0,422)	2,079 (0,965-9,155)	1,309 ± 0,163
I_147	0,256 (0,149-0,415)	1,343 (0,762-3,581)	1,781 ± 0,217
I_154	0,522 (0,301-0,896)	2,385 (1,298-7,404)	1,941 ± 0,227
I_177	0,487 (0,330-0,707)	1,713 (1,100-3,696)	2,345 ± 0,310
I_178	0,253 (0,184-0,352)	0,745 (0,505-1,433)	2,733 ± 0,372
I_188	0,133 (0,085-0,196)	0,485 (0,305-0,164)	2,276 ± 0,337
I_531	0,214 (0,115-0,362)	1,446 (0,765-4,586)	1,543 ± 0,196
I_575	1,732 (1,352-2,212)	4,580 (3,389-7,348)	3,035 ± 0,445
I_576	0,229 (0,161-0,327)	0,739 (0,482-1,569)	2,515 ± 0,349
I_577	0,116 (0,074-0,179)	0,350 (0,218-10,13)	2,684 ± 0,423
2 h após aplicação			
<i>B. t. israelensis</i>	0,077 (0,034-0,127)	0,314 (0,181-1,225)	2,107 ± 0,369
I_102	0,022 (0,001-0,058)	0,330 (0,150-1,550)	1,084 ± 0,236
I_106	0,031 (0,002-0,075)	0,371 (0,171-2,127)	1,186 ± 0,242
I_107	0,016 (0,000-0,059)	0,535 (0,201-2,894)	0,847 ± 0,171
I_115	0,030 (0,002-0,086)	0,608 (0,250-3,481)	0,986 ± 0,181
I_147	0,069 (0,019-0,137)	0,577 (0,274-2,567)	1,416 ± 0,228
I_154	0,098 (0,040-0,137)	0,422 (0,222-2,614)	2,027 ± 0,332
I_177	0,145 (0,104-0,201)	0,430 (0,291-0,851)	2,716 ± 0,395
I_178	0,078 (0,036-0,130)	0,351 (0,197-1,452)	1,965 ± 0,341
I_188	0,046 (0,026-0,065)	0,169 (0,117-0,342)	2,286 ± 0,505
I_531	0,055 (0,030-0,079)	0,250 (0,168-0,508)	1,942 ± 0,384
I_575	1,067 (0,826-1,384)	3,114 (2,258-5,057)	2,756 ± 0,371
I_576	0,057 (0,029-0,084)	0,186 (0,122-0,462)	2,473 ± 0,476
I_577	0,047 (0,031-0,060)	0,113 (0,085-0,200)	3,345 ± 0,759
3 h após aplicação			
<i>B. t. israelensis</i>	0,047 (0,012-0,080)	0,159 (0,093-0,694)	2,121 ± 0,416
I_102	--	--	--
I_106	0,015 (0,000-0,032)	0,087 (0,047-0,214)	1,664 ± 0,581
I_107	--	--	--
I_115	--	--	--
I_147	0,038 (0,011-0,062)	0,158 (0,099-0,481)	2,075 ± 0,489
I_154	0,044 (0,020-0,066)	0,165 (0,110-0,396)	2,235 ± 0,500
I_177	0,087 (0,068-0,110)	0,204 (0,152-0,339)	3,438 ± 0,593
I_178	0,027 (0,007-0,048)	0,186 (0,116-0,449)	1,518 ± 0,380
I_188	--	--	--
I_531	0,024 (0,004-0,039)	0,083 (0,056-0,191)	2,418 ± 0,788
I_575	1,039 (0,810-1,326)	1,039 (0,810-1,326)	3,034 ± 0,440
I_576	0,032 (0,006-0,057)	0,159 (0,098-0,451)	1,854 ± 0,473
I_577	--	--	--

continuação...

Isolados	CL50* (IC 95%)	CL90* (IC 95%)	Slope ± SE
4 h após aplicação			
<i>B. t. israelensis</i>	0,046 (0,032-0,060)	0,081 (0,062-0,156)	5,312 ± 1,163
I_102	--	--	--
I_106	--	--	--
I_107	--	--	--
I_115	--	--	--
I_147	--	--	--
I_154	0,017 (0,001-0,035)	0,106 (0,062-0,254)	1,614 ± 0,505
I_177	0,058 (0,040-0,077)	0,168 (0,121-0,313)	2,799 ± 0,567
I_178	--	--	--
I_188	--	--	--
I_531	--	--	--
I_575	0,059 (0,334-0,946)	2,574 (1,413-7,579)	1,932 ± 0,222
I_576	--	--	--
I_577	--	--	--
24 h após aplicação			
<i>B. t. israelensis</i>	0,027 (0,011-0,036)	--	1,617 ± 0,833
I_102	--	--	--
I_106	--	--	--
I_107	--	--	--
I_115	--	--	--
I_147	--	--	--
I_154	0,003 (0,000-0,011)	--	0,484 ± 0,535
I_177	0,020 (0,008-0,032)	--	0,000 ± 0,633
I_178	--	--	--
I_188	--	--	--
I_531	--	--	--
I_575	0,121 (0,043-0,218)	0,279 (0,205-0,467)	3,018 ± 0,490
I_576	--	--	--
I_577	--	--	--

CL₅₀ Concentração letal necessária para matar 50%;

CL₉₀ Concentração letal necessária para matar 90%;

IC 95% Intervalo de confiança a 95%

4.7. Análise exploratória de agrupamento

Os isolados de *B. thuringiensis* contendo genes com atividade díptera-específica, provenientes das três coleções e regiões brasileiras causaram níveis variados de mortalidade e, para uma melhor discussão dos resultados, foi feita uma análise da mortalidade com base nos valores expressos pela patogenicidade, onde foi possível, por meio da análise de agrupamento, selecionar os isolados com maior e/ou menor

grau de efetividade. Nesse caso, a ordenação dos isolados quanto à mortalidade larval em diferentes tempos de exposição é mostrada na Figura 12.

A linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, utilizada como controle negativo, e a testemunha, as quais não apresentaram eficiência de controle estão separadas num grupo à direita da figura. Os isolados 575 e 177 estão discriminados à esquerda e são os menos tóxicos nessa ordem. Os demais isolados se subdividem em dois grupos: um grupo contendo os isolados 107, 115, 147, 154, 178, 531, 576 e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, com média de mortalidade 1170 larvas, e um outro grupo contendo os isolados 102, 106, 188 e 577, que apresentaram melhor eficiência de controle às larvas, utilizando as menores concentrações de esporos-cristal/ml, com média de mortalidade 1217.

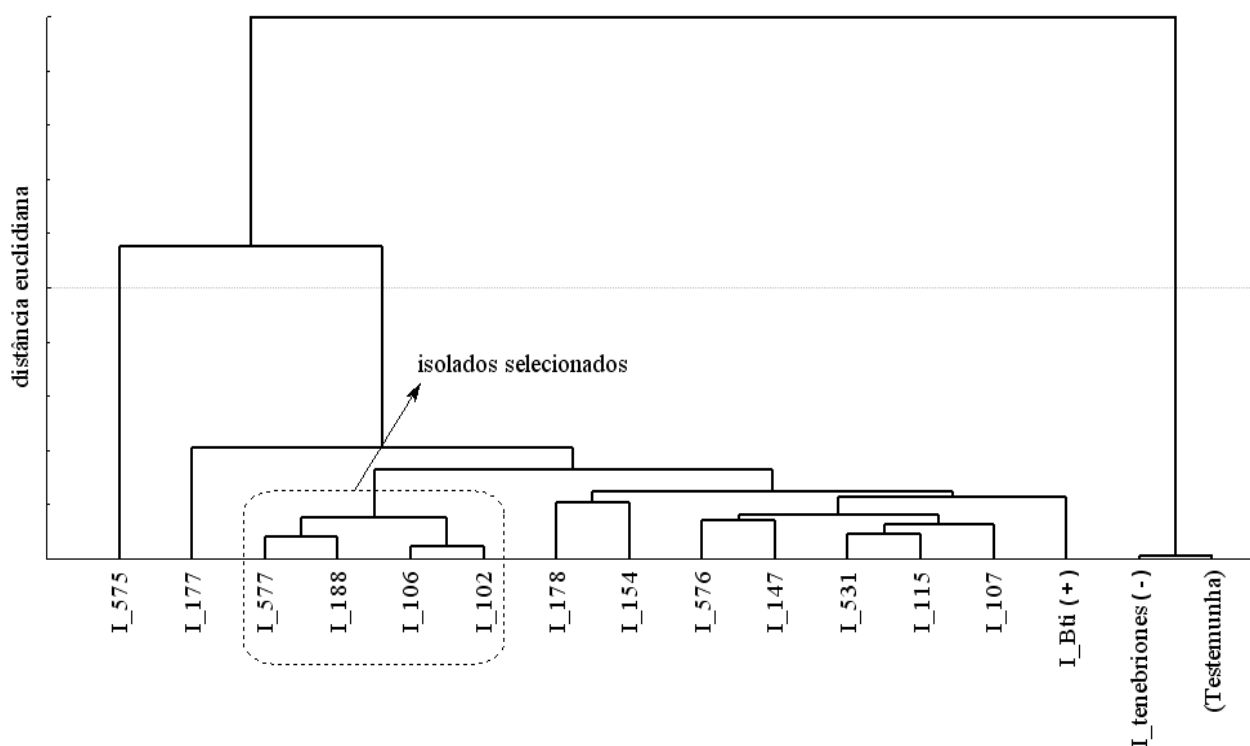


Figura 12. Dendrograma mostrando a ordenação dos isolados de *B. thuringiensis* quanto à eficiência no controle de larvas de *A. aegypti*.

5. DISCUSSÃO

Poucos estudos têm relatado caracterização detalhada de coleções de *B. thuringiensis* em termos de conteúdo de genes *cry* e *cyt* para a ordem Diptera. IBARRA et al. (2003), por meio de PCR, utilizaram 27 iniciadores para detectar 17 diferentes genes *cry* e *cyt* em uma coleção de 6.531 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de países da América Latina, encontrando diferentes combinações entre os genes díptero-específicos *cry4*, *cry10*, *cry11* e *cyt*. A combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* foi encontrada em três isolados, onde a presença do *cry10* foi ausente e, a combinação *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2* em apenas um isolado, as quais são semelhantes à aquelas encontradas em *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Os autores demonstraram a alta eficiência desses isolados a larvas de *A. aegypti*.

Geralmente, a frequência de isolados díptero-específicos em uma coleção de *B. thuringiensis* é baixa quando comparada à frequência de isolados lepidóptero-específicos. A partir de 38 isolados de *B. thuringiensis*, CAVALEIRO et al. (2005) identificaram 14 isolados patogênicos, sendo 13 a insetos da ordem Lepidoptera (*S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *P. xylostella*), e um a insetos da ordem Diptera (*A. aegypti*), com 100% de mortalidade, o qual, através da técnica de eletroforese de proteínas-cristal, apresentou perfil protéico semelhante ao *B. thuringiensis* var. *israelensis*, apresentando os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10*, *cry11*, *cyt1* e *cyt2*, que são conhecidas por desempenharem um papel fundamental no controle de mosquitos (BRAVO et al., 1998; IBARRA et al., 2003). GOBATTO (2006), em testes de toxicidade contra *A. gemmatalis* e *C. quinquefasciatus*, utilizando isolados de *B. thuringiensis* encontrou percentual maior de isolados lepidóptero-específicos (61,1%) quando comparado ao percentual de isolados díptero-específicos (22,6%).

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 também foi para

os genes lepidóptero-específicos, não encontrando os genes *cry4A*, *cry4B*, *cry10A* e *cry11A* nos isolados analisados.

THULER (2007), ao caracterizar o conteúdo de genes lepidóptero-específicos dos isolados da mesma coleção analisada neste trabalho, verificou que 57,8% pertenciam à 16 diferentes subclasses do gene *cry1*, sugerindo que, as diferenças ecológicas do local de origem e/ou as relações de co-evolução tenham favorecido a expressão de diferentes padrões de genes *cry1*. Assim como FERRANDIS et al. (1999), na Espanha, encontraram, em uma coleção de 223 isolados de *B. thuringiensis*, 121 (54,3%) isolados que continham o gene *cry1*.

Tendo em vista os casos freqüentes 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 destes diferentes genes não significa que eles estejam sendo expressos; no entanto, dão um forte indício de que estes isolados poderão ser empregados na formulação de novos bioinseticidas comerciais efetivos para dípteros.

Devido à alta diversidade e espectro de ação das toxinas produzidas, isolados de *B. thuringiensis* têm sido coletados e caracterizados em diversas regiões do mundo (BERNHARD et al., 1997). Várias pesquisas utilizando *B. thuringiensis* em ensaios entomopatogênicos têm sido precedidas da caracterização molecular dos mesmos, a fim de identificar os genes *cry* responsáveis pela síntese de proteínas específicas às diversas espécies de insetos (VALICENTE et al., 2000). Esta etapa de seleção *in vitro* dos isolados, a qual antecede os ensaios *in vivo* com insetos alvo, tem mostrado resultados satisfatórios e, assim, impulsionando mais estudos. Por outro lado, a atividade biológica de um isolado não pode ser completamente determinada com base, somente, no conteúdo de genes *cry*. Este pode ser importante na predição da atividade inseticida do mesmo, sendo que, a avaliação da toxicidade *in vivo* dos isolados é que vai determinar aqueles isolados mais efetivos no controle de determinado inseto.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de avaliar a efetividade de isolados de *B. thuringiensis* no controle de insetos-praga e outros, procuram associar a

mortalidade ocasionada ao conteúdo de genes *cry* e *cyt*. Tais estudos podem levar ao conhecimento de novos isolados com potencial inseticida promissor no controle de insetos.

Deve-se considerar que a técnica de PCR não permite afirmar se todos os genes estão sendo expressos nos isolados estudados, ou se algum está sendo bloqueado por ação de outro. No entanto, tal técnica proporciona uma resposta rápida sobre a presença e ausência de genes *cry*, *cyt* ou *chi* mas, um gene detectado pode estar interrompido, mutado ou sob controle de um promotor defeutivo, ou então, estar presente em níveis muito baixos, não contribuindo para o efeito letal do isolado. É uma técnica que realiza uma predição da atividade inseticida dos isolados (BRAVO et al., 1998). O emprego do bioensaio é a estratégia mais importante para definir a toxicidade de um isolado de *B. thuringiensis* e, dessa forma, seleciona o isolado com maior efetividade para o controle de insetos.

Segundo HABIB & ANDRADE (1998), a morte das larvas aquáticas de Diptera (culicídeos e simúlídeos), ocorre rapidamente (20 min à três horas após a ingestão da bactéria *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14). Segundo os mesmos autores, as larvas de *Culex declarator* (Dyar & Knab, 1906) (Diptera: Culicidae), ao ingerirem o patógeno *B. thuringiensis* var. *israelensis* perdem gradativamente sua agilidade, sendo constatada também a redução rápida nos movimentos das peças bucais, que revelam a perda de apetite ou dificuldade de alimentação, resultando na parada total da ingestão. A velocidade destes sintomas está relacionada com a dosagem do patógeno, idade e grau de suscetibilidade do inseto infectado.

Nas avaliações de patogenicidade dos isolados que apresentaram-se com efetividade inferior à 100%, devem ser considerados outros parâmetros. Um tempo letal superior ao avaliado neste trabalho poderia mostrar uma maior eficiência de mortalidade destes isolados, ou até mesmo prejudicar o desenvolvimento das larvas, afetando a emergência das larvas e, a malformação ou a fecundidade das fêmeas. Segundo GORE et al. (2005), em larvas de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1778) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dietas

constituindo concentrações de proteínas Cry1Ac e Cry2Ab, observaram atraso no desenvolvimento larval, em dosagens elevadas.

A variabilidade genética encontrada nas coleções estudadas destaca a coleção de Jaboticabal – SP como uma excelente fonte de isolados promissores para uso em programas de controle de *A. aegypti*, pois, dos 13 isolados que apresentaram 100% de eficiência de controle larval, 10 (76,92%) pertenciam à tal coleção, além de quatro isolados (30,76%) que apresentaram toxicidade superior a 50%, diferentemente do observado na coleção de Sete Lagoas – MG, na qual apenas um isolado (7,69%) apresentou um único gene díptero-específico (*cry11Ba*) e não apresentou efetividade de controle do inseto, sugerindo que essa coleção pode apresentar-se como fonte de isolados portadores de genes específicos a outras ordens de insetos.

A grande extensão do Brasil, o qual apresenta diferentes regiões com diferenças climáticas, assim como a grande diversidade de insetos, dá a oportunidade do isolamento de novas bactérias entomopatogênicas. Os isolados de *B. thuringiensis* analisados neste trabalho podem representar esse exemplo de diversidade.

A variação da eficiência dos isolados pode ser explicada por uma série de fatores ligados ao modo de ação desta bactéria, principalmente pela ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo que, este fator é determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (POLANCZKY e ALVES, 2003).

Segundo PRAÇA et al. (2004), a toxicidade de alguns isolados a insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas de *B. thuringiensis* encontradas, ou mesmo pela interação destas com os esporos.

Nesse caso, a relação entre toxicidade e conteúdo de genes dos isolados de *B. thuringiensis* estudados sugere uma ação sinérgica na atuação das toxinas no controle de *A. aegypti*. Os isolados que carregam três ou mais genes díptero-específicos (*cry* e *cyt*), os quais estão definidos nos haplótipos 2, 3, 4, 5, 8, 13, 15, 16 e 19, 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), cujos haplótipos são 11, 14, 16 e 18, 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, o que pode sugerir a falta de sinergismo entre eles.

SCHENEPEF et al., 1998 afirmaram a idéia de que, embora houvesse uma grande variabilidade de genes *cry* que codificam diferentes toxinas específicas a mosquitos existentes na natureza, uma das combinações mais efetivas de proteínas é aquela presente na linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*, a qual apresenta os genes *cry4*, *cry10*, *cry11* e toxinas Cyt.

IBARRA et al. (2003) identificaram novos isolados de *B. thuringiensis* com atividade tóxica a *A. aegypti*. Dentre eles, quatro foram superiores à *B. thuringiensis* var. *israelensis*, apresentando perfil protéico similar à ela e um, com atividade tóxica similar, apresentou quatro proteínas diferentes (Cry11, Cyt1, Cyt2 e Cry30). Esses isolados mostram-se interessantes quanto à utilização no manejo da resistência em populações de mosquito.

A importância da proteína Cry11Aa1 na toxicidade contra larvas de mosquito é também conhecida (FEDERICI et al., 1990). Em alguns estudos a toxina Cry11Aa apresenta maior toxicidade em *A. aegypti*, *A. stephensi* e *C. pipiens*, enquanto a proteína Cyt1Aa é pouco tóxica, mas sinergisa o efeito tóxico das proteínas Cry (GOULD, 1998; PROMDONKOY & ELLAR, 2000; FERNÁNDEZ et al., 2006). As proteínas Cry4A e Cry4B também têm sido reportadas agindo sinergisticamente 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, havendo um forte indício de que, nos testes de toxicidade, a proteína Cry11Aa atue em sinergismo com, pelo menos, uma das proteínas Cyt.

A combinação de pelo menos um gene *cry* com um dos genes *cyt* esteve presente na maioria dos isolados que apresentaram 100% de mortalidade. Dos três genes *cyt* (*cyt1Aa*, *cyt1Ab* e *cyt2Aa*), os mais freqüentes foram *cyt1Aa* e *cyt2Aa*.

As proteínas Cyt são toxinas hemolíticas e citolíticas produzidas por muitas linhagens de *B. thuringiensis* que, particularmente demonstram atividade inseticida para mosquitos. A toxicidade de Cyt1Aa a larvas de mosquitos é baixa em comparação à 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 (Tabela 3). No entanto, quando presentes em bioensaios, as proteínas Cyt sinergizam a 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 e, ensaios de interação mostraram que a ligação de Cry11Aa à BBMF de *A. aegypti* foi otimizada pela presença da Cyt1A. Já o trabalho de BELTRÃO e SILVA-FILHA (2007), com ensaios de competição, mostrou que as toxinas Cry11Aa, Cry4Aa e Cry4Ba, unem-se especificamente à BBMF de *A. aegypti*, sendo a afinidade para os sítios de união alta, sugerindo que o aumento na afinidade de união poderia ter sido dada por meio da interação sinérgica com a toxina Cyt1Aa, a qual não fez parte da análise pelos autores. Este 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*.

A mistura de toxinas permite o manejo de resistência em populações de mosquitos. Estudos realizados com *B. sphaericus* mostram que seu modo de ação, baseado na presença de uma única toxina, favorece o aparecimento de larvas de *C. quinquefasciatus* resistentes. WIRTH et al. (2004) testaram combinações da toxina binária de *B. sphaericus*, que apresenta duas proteínas (42 kDa e 51 kDa), com as toxinas do *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. Avaliou-se 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-se que, larvas expostas à toxina binária apresentavam resistência, enquanto a mistura da toxina binária e Cyt1A não provocavam 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 ele esteve presente nas combinações e, as combinações dos genes *cry4Aa* e *cry4Ba* mostraram-se como a segunda contribuição mais importante na toxicidade.

No entanto, é importante que se façam os testes de toxicidade utilizando as proteínas Cry11Aa e Cyt1Aa individualizadas e, posteriormente, seqüenciar tais genes para identificar diferenças responsáveis pelo aumento da toxicidade, assim como cloná-los e expressá-los, determinando seu potencial inseticida.

DELÉCLUSE et al. (1995) testaram a atividade larvicida com inclusões purificadas de um isolado de *B. thuringiensis*, da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *jegathesan* e de uma linhagem recombinante produzindo unicamente a proteína Cry11A, contra *A. aegypti*, *A. stephensi* e *C. pipiens*. O polipeptídeo Cry11B do isolado foi tóxico contra as três espécies testadas, com alta atividade contra *C. pipiens*, sendo mais tóxico do que a linhagem padrão contra *A. aegypti* e igualmente tóxico a *C. pipiens* e *A. stephensi*. Embora Cry11B tenha similaridade com Cry11A, ele apresentou-se mais tóxico a *A. aegypti*, o que não foi possível verificar neste trabalho, no qual os isolados 168, 169, 186 e 189 apresentaram o gene *cry11Ba* em combinação com genes *cyt* e não apresentou atividade inseticida satisfatória, evidenciando que, nesse caso, os genes *cyt* não corroboram na receptividade de membrana.

A eficiência de mortalidade dos isolados 107, 115 e 178 pode estar relacionado aos genes *cry4Ba* e *cyt2Aa*. PROMDONKOY et al. (2005) verificaram que a co-expressão das toxinas Cry4Ba e Cyt2Aa, produzidas em *E. coli* incrementou a toxicidade para larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, demonstrando, com isto, a alta atividade sinérgica entre as toxinas combinadas.

A efetividade bioinseticida de isolados de *B. thuringiensis* pode estar relacionada a um mecanismo mediado não somente pelas proteínas Cry, como exemplo, a

produção de quitinases, a qual pode aumentar o efeito inseticida de isolados de *B. thuringiensis*.

Quanto à importância da detecção do gene *chi* nos isolados, alguns trabalhos relatam que a co-aplicação de delta-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 pelo sinergismo dado pelas outras toxinas envolvidas (Tabela 3).

Efeitos larvicida de enzimas quitinolíticas e inseticidas microbianos são conhecidos desde 1970 (SMIRNOFF, 1974; LISENKO, 1976). Muitos experimentos foram realizados com a mistura de quitinases de microrganismos com a bactéria *B. thuringiensis*. A aplicação da suspensão de esporos-cristal de uma linhagem de *B. thuringiensis* var. *israelensis* juntamente com culturas contendo quitinase resultou no aumento de 3 a 50 vezes a atividade inseticida contra larvas de 3º instar de *A. aegypti* (SIRICHOTPAKORN et al., 2001) onde, provavelmente, as enzimas quitinolíticas causaram perfuração da membrana peritrófica e aumentou o contato das toxinas de *B. thuringiensis* com seus receptores epiteliais de membrana (REGEV et al., 1996).

Uma linhagem recombinante de *B. thuringiensis* expressando altos níveis do gene da quitinase (ChiA) isolado de *Serratia marcescens* e de Cry3Aa mostra-se promissora no uso como bioinseticida contra larvas e adultos de insetos-praga (OKAY et al., 2008), assim como BARBOZA-CORONA et al. (2008) sugerem que o gene da endoquitinase de *B. thuringiensis* var. *kurtaki* HD-73 pode ter aplicações biotecnológicas no controle de insetos, particularmente em sinergismo com proteínas cristal inseticidas de *B. thuringiensis*.

A produção de quitinase em isolados de *B. thuringiensis* é pouco estudada. A primeira pesquisa que objetivou analisar a distribuição da quitinase em *B. thuringiensis* foi realizada por LIU et al. (2002), demonstrando que a quitinase foi altamente produzida por linhagens de *B. thuringiensis* e algumas delas com potencial em

aumentar a toxicidade da bactéria para larvas de *S. exigua* (Lepidoptera:Noctuidae). Das 70 linhagens testadas, 38 tiveram atividade detectada, revelando potencial uso em sinergia com outras proteínas cristal de *B. thuringiensis*.

Outros trabalhos também reportaram o efeito sinérgico de quitinases e cristais inseticidas de *B. thuringiensis* em uma linhagem (MORRIS, 1976; REGEV et al., 1996; WIWAT et al., 2000), inferindo que a produção de quitinase por *B. thuringiensis* pode desenvolver um importante papel na atividade como bioinseticida, contribuindo para a formulação de um bioinseticida.

Ao relacionar os haplótipos aqui encontrados com o índice de mortalidade nos bioensaios, observou-se que os isolados que ocasionaram 100% de mortalidade larval no período de 48 h após a aplicação da suspensão bacteriana, apresentam haplótipos com amplificação do gene *cry11Aa*, combinado a um outro estudado (*cry4Aa*, *Cry4Ba*, *cry11Ba*, *cyt1Aa*, *cyt1Ab*, *cyt2Aa* ou *chi*). Desta forma, este estudo define alguns haplótipos como possíveis marcadores moleculares para serem usados em pré-seleção de novos isolados de *B. thuringiensis* no controle de dípteros.

Alguns trabalhos vêm sendo realizados neste tipo de análise de diversidade. Os resultados obtidos por PICCHI et al. (2006) permitiram detectar níveis de diversidade genética variáveis no sistema de restrição de *Xylella fastidiosa*, em função do hospedeiro e/ou localidade de origem da bactéria, utilizando análises de estruturação de grupos genéticos. O estudo de THULER (2007) analisou a estrutura genética de 650 isolados de *B. thuringiensis* de diferentes coleções e regiões brasileiras, com base nos resultados de amplificação e restrição dos genes *hblA*, *plcR*, *nheBC* e *cry1*, onde obteve 78 haplótipos definidos para as populações de diferentes regiões brasileiras.

Os isolados de um mesmo grupo, que compartilham o mesmo haplótipo não estão associados a uma maior ou menor eficiência de mortalidade verificada em *S. frugiperda* (FATORETTO, 2007) e em *P. xylostella* (THULER et al., 2007), visto que, dentro de todos os haplótipos, existem isolados altamente eficientes, pouco eficientes ou até mesmo com eficiência nula no controle desses insetos, assim como foi verificado no presente trabalho.

O presente trabalho permitiu relacionar a diversidade haplotípica com as regiões dos isolados e definir marcadores moleculares que auxiliam na seleção de novos isolados eficientes em controle biológico de *A. aegypti*.

Nas análises dos bioensaios quantitativos, foram determinados valores de CL_{50} e CL_{90} em cinco períodos de avaliação, devido à importância do manejo da resistência em populações de insetos, no qual é necessário que se faça uso das menores concentrações de esporos/cristal, necessárias para o controle. A baixa concentração de aplicação oferece a possibilidade de manter os custos operacionais mais controlados, devido à falta de atividade residual da bactéria.

Segundo PRAÇA et al. (2004), apesar das linhagens de *B. thuringiensis* (S234 e S997) terem apresentado toxicidade nos bioensaios seletivos contra *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*, seus valores de CL_{50} foram semelhantes entre si e maiores que o padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo, portanto, menos efetivas.

O isolado 575 deste estudo pode ser considerado o de menor eficiência tóxica, pois apresentou valores de CL_{50} e CL_{90} elevados nos três períodos avaliados em comparação aos outros isolados e à linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sendo os valores de mortalidade desse isolado, não suficiente para a seleção de isolados de maior eficiência.

Em trabalhos em que são realizadas comparações entre a toxicidade de isolados comparados a linhagens padrão, normalmente são encontrados isolados de menor toxicidade (PRAÇA et al., 2004; MARTÍNEZ et al., 2004), apresentando maiores valores de CL_{50} quando comparados às linhagens padrão. Já JARA et al. (2006) identificaram isolados cujo valor de CL_{50} foi inferior em relação à linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*, necessitando de uma menor concentração de esporos-cristal para matar as larvas.

O fato da linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis* apresentar valores relativamente mais altos de CL_{50} e CL_{90} em relação à alguns isolados estudados, os quais foram mais tóxicos, pode estar relacionado com o surgimento de resistência de população de insetos de *A. aegypti* ao tratamento com essa linhagem. Resistência às

delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* têm sido reportada nos mosquitos *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* (GEORGHIOU et al., 1983).

Os resultados apontam os isolados 102, 106, 188 e 577, como os mais promissores para servirem como base na formulação de um novo bioinseticida eficaz no controle de *A. aegypti*, pois, nos três períodos avaliados, atingiram altos índices de mortalidade utilizando uma baixa concentração de esporos/cristais para seu controle. Dessa forma, esses isolados de *B. thuringiensis* devem continuar sendo avaliados, na tentativa de expressar as proteínas envolvidas na efetividade de controle do inseto, permitindo a disponibilização de genes para novas formulações de bioinseticidas ou até para transferência dos genes das toxinas estudadas para diversos microrganismos aquáticos que habitam em camadas superficiais, permitindo um maior controle de *A. aegypti*, de difícil combate por meio de métodos convencionais.

Pela análise de agrupamento, os isolados 102, 106, 188 e 577, os quais apresentaram melhor eficiência de controle às larvas, ficaram ordenados em um grupo, onde nota-se entre os isolados, a presença dos genes *cry11Aa* e *cyt1Aa*, os quais evidenciaram um sinergismo na efetividade a larvas de *A. aegypti*.

Conforme SILVA-WERNECK & MONNERAT (2001), as testemunhas devem sempre conter menos de 10% de mortalidade, o que comprova a qualidade dos ensaios de patogenicidade deste estudo, no qual o isolado *B. thuringiensis* var. *tenebriones*, utilizado como controle negativo do experimento, não apresentou mortalidade.

A análise de agrupamento é uma ferramenta importante na discriminação de grupos, o que foi comprovado neste estudo, podendo também ser utilizada nos estudos de seleção de isolados entomopatogênicos em grandes bancos de bactérias.

6. CONCLUSÕES

- Os ensaios conduzidos neste trabalho mostram que os isolados entomopatogênicos de *B. thuringiensis*, provenientes de diversas regiões do território brasileiro, principalmente os provenientes da coleção de Jaboticabal – SP são bastante diferenciados, apresentando diferentes combinações de genes *cry* e *cyt* (díptero-específicos) e *chi*, o qual foi amplamente encontrado nos isolados de *B. thuringiensis* e que, atuando em sinergia, podem aumentar a toxicidade destes isolados.
- A análise de amplificação por PCR dos nove genes estudados de *B. thuringiensis* permitiu a detecção de 21 haplótipos, dos quais três foram definidos como marcadores moleculares que auxiliam na seleção de novos isolados com eficiência de mortalidade a larvas de *A. aegypti*.
- A associação da predição tóxica *in vitro* e *in vivo* de *B. thuringiensis* contra *A. aegypti*, permitiu, na coleção estudada, selecionar quatro isolados (102, 106, 188 e 577) de *B. thuringiensis* altamente tóxicos às larvas de *A. aegypti* e três isolados (107, 115 e 531) com potencial inseticida superior à linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *israelensis*, sugerindo uma possível ocorrência de sinergismo entre as toxinas Cry11Aa e Cyt1Aa nestes isolados, que representam uma alternativa eficiente no controle de *A. aegypti*, com a possibilidade de uso dos mesmos como fonte dos genes para as toxinas inseticidas, tanto para produção de novos bioinseticidas, como para transferência em diversos microrganismos aquáticos, que possam vir a ser empregados no controle biológico desse inseto.

7. REFERÊNCIAS

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

ALVES, S. B. & MORAES S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: S. B. ALVES (ed), **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: Fealq, p. 765-777, 1998.

ARMENGOL, G.; GUEVARA, O. E.; ORDUZ, S.; CRICKMORE, N. Expression of the *Bacillus thuringiensis* mosquitocidal toxin Cry11Aa in the aquatic bacterium *Asticcacaulis excentricus*. **Current Microbiology**, Medellín, Colômbia, v. 51, p. 430-433, 2005.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUM, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 50, p. 1-24, 1986.

ARONSON, A. I. & Y. SHAI. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, p. 1-8, 2001.

ARORA, N.; AHMAD, T.; RAJAGOPAL, R.; BHATNAGAR, R. K. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New Delli, India, v. 307, p. 620-625, 2003.

AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 239-268, 1998.

BARBOZA-CORONA, J. E.; REYES-RIOS, D. M.; SALCEDO-HERNANDEZ, R.; BIDESHI, D. K. Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. **Molecular Biotechnology**, Irapuato, México, v. 39, p. 29-37, 2008.

BELTRÃO, H. B. M. & SILVA-FILHA, M. H. N. Interaction of *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* Cry toxins with binding sites from *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 266, p. 163-169, 2007.

BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H. D. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 70, p. 59-68, 1997.

BHATTACHARYA, D.; NAGPURE, A.; GUPTA, R. K. Bacterial chitinases: properties and potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, p. 21–28, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Monitoramento da Resistência das Populações de *Aedes aegypti* do País. Brasília, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas**. 3. ed. Brasília, 2001. 84 p. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsasv/p/fulltext/manual/manual.pdf>>. Acesso em: 02 agosto 2007.

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

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. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BRICKLE, D. S.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, J. Efficacy of insecticides of different chemistries against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic *Bacillus thuringiensis* and conventional cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 86-92, 2001.

BRODERICK, A. N.; GOODMAN, K. F.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Synergy between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 29, n. 1, p. 101-107, 2000.

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

CAVADOS, C. F. G.; FONSECA, R, N.; CHAVES, J. Q.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. Identification of Entomopathogenic *Bacillus* Isolated from *Simullium* (Diptera, Simuliidae) Larvae and Adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 1017-1021, 2001.

CAVALEIRO, H.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; MEDEIROS, P. T.; GOMES, A. A. M. M.; MONNERAT, R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 87, p. 1-22, 2005.

CLARO, L. B. L.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. G. Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudos sobre conhecimentos, crenças e práticas da população. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1447-1457, 2004.

CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO-de-OLIVEIRA, R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, Fiocruz, 228p., 1994.

CREMLYN, R. *Pesticides. Preparation and mode of action*. John Wiley e Sons, New York, 240 p., 1978.

CRICKMORE, V.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the d-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 131, p. 249-254, 1995.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; 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**, Washington, v. 62, p.807 - 813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H.. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, 2000.
http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_crickmore/Bt/index.html

CROFT, B. A. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. Em: B. E. Tabashnik and R. T. Roush, editors, **Pesticide Resistance in Arthropods**, New York: Chapman and Hall, p. 277-296, 1990.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M. L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquicidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4230-4235, 1995.

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

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

DENHOLM, I. & ROLLAND, M. W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 91-112, 1992.

DING, X.; LUO, Z.; XIA, L.; GAO, B.; SUN, Y.; ZHANG, Y. Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant *cry1Ac* gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology**, New York, v. 56, p. 442-446, 2008.

EIRAS, A. E. The role of human odours in host location behaviour by female *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). Tese Ph.D., University of Southampton, Inglaterra, 122 p., 1991.

EIRAS, A.E. Culicídeos. p. 355-367 In: **Parasitologia Humana**. Eds. Neves, D.P., de Melo, A.L., Genaro, O. & Linardi, P.M. 11th Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, Brazil. 494p., 2005

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

FATORETTO, J. C.; SENA, J. A. D.; BARRETO, M. R.; LEMOS, M. V. F.; JUNIOR, A. L. B. Associação de Bioensaios e Caracterização Molecular para Seleção de Novos Isolados de *Bacillus thuringiensis* Efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 36: 737-745, 2007.

FEDERICI, B. A.; LUTHY, P.; IBARRA, J. E. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: Structure protein composition and toxicity. In: "Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies: Biochesmistry. Genetics & Applications of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus*". p. 16-44. In BARJAC, H. D. & SUTHERLAND, D. D. J. (Eds.),. Rutgers Univ. Press. New Brunsck, N.J., 1990.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insect and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M. H.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae through loop a-8 of domain II. **FEBS Letters**, Amsterdam. v. 579, p. 3508–3514, 2005.

FERNÁNDEZ, L. E.; AIMANOVA, K. G.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. A. GPI-anchored alkaline phosphatases is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemical Journal**, v. 394, p. 77-84, 2006.

FERRANDIS, M. D.; JUÁREZ-PÉREZ, V. M.; FRUTOS, R.; BEL, Y.; FERRÉ, J. Distribution of *cryI*, *cryII* and *cryV* genes within *Bacillus thuringiensis* isolates from Spain. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 22, n. 2, p.179-185, 1999.

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

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 501-533, 2002.

FINNEY, D. J. *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, 333p., 1971

FIUZA, L. M. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 84-89, 2004.

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

GARCZYNSKI, S. F.; CRIM, J. W.; ADANG, M. J. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by protein blot analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2816-2820, 1991.

GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. Em: G.P. Georghiou and T. Saito, editors. **Pest Resistance to Pesticides**. New York, Plenum, p. 769-792, 1983.

GEORGHIOU, G. P.; LAGUNES, A.; BAKER, J. D. Effect of insecticide rotations on evolution of resistance. p. 183-189. **IUAPAC Pesticide Chemistry**. Human Welfare and the Environment. J. Miyamoto, ed. Oxford: Pergamon, 1983.

GOBATTO, V. Isolamento, avaliação e caracterização de *Bacillus thuringiensis*, com potencial para controle de Diptera e Lepidoptera. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2006.

GOODAY, G. W. The ecology of chitin decomposition. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 11, p. 387-430, 1990.

GORE, J.; ADAMCZYK, J. J.; BLANCO, C. A. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 1, p. 88-94, 2005.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 3, p. 701-26, 1998.

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

HAIR, J. J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. *Análise Multivariada de dados*. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 593 p., 2005.

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

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

HEMINGWAY, J.; RANSON, H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 371-91, 2000.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N. J.; MCCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 653-665, 2004.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1085-1089, 2001.

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

HUGHES, P. A.; STEVENS, M. M.; PARK, H. W.; FEDERICI, B. A.; DENNIS, E. S.; AKHURST, R. Response of larval *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae) to individual *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins and toxin mixtures. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 88, p. 34-39, 2005.

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.; PENA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Latin America with Insecticidal Activity against Different Mosquito Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE INSTITUTE. An evaluation of the insect resistance management in *Bt* field corn - a science based framework for risk assessment and risk management: report of an expert panel. Washington: **ILSI Press**, 78p., 1998.

JARA, S.; MADUELI, P.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strain in the maize and bean phytoplane and their respective soils in Colombia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, p. 117-124, 2006.

JOSHI, V.; SINGHI, M.; CHAUDHARY, R. C. Transovarian transmission of dengue 3 by *Aedes aegypti*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 4, p. 324-330, 1995.

KHIN, M. M. & THAN, K. A. Transovarian transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v. 3, p. 590-594, 1983.

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

LAMBERT, B.; HÖFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S.; SOETART, P.; PEFFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2536-2542, 1992.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, 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. West Sussex: WILEY, J. p. 37-69, 1993.

LI, M. S.; JE, Y. H.; LEE, I. H.; CHANG, J. H.; ROH, J. Y.; KIM, H. S.; OH, H. W.; BOO, K. S. Isolation and characterization of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* containing a new δ – endotoxin gene. **Current Microbiology**, New York, v. 45, p. 299-302, 2002.

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins to Grypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 270, p. 24719-24724, 1995.

LIMA, A. S. G.; GUIDELLI, A. M.; ABREU, I. L.; LEMOS, M. V. F. Identification of new isolates de *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxins electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, p. 225-229, 2002.

LIN, Y. & XIONG, G. Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p. 635-639, 2004.

LISENKO, O. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 27, p. 385-386, 1976.

LIU, M.; CAI, Q. X.; LIU, H. Z.; ZHANG, B. H.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, p. 374-379, 2002.

MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, São Paulo: Atheneu, 2001. p. 59-103, 2001.

MARIMOTO, K.; KARITA, S.; KIMURA, T.; SAKKA, K.; OHMIYA, K. Cloning, sequence, and expression of the genes encoding *Clostridium paraputrificum* chitinase ChiB and analysis of the functions of novel ,cadherin-like domains and a chitin-binding domain. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, p. 7306-7314, 1997.

MARTÍNEZ, C. & CABALLERO, P. Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, p. 745-752, 2002.

MARTÍNEZ, C.; PORCAR, M.; LÓPEZ, A.; EXSUDERO, I. R.; CABALLERO, P. Characterization of the *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 11, p. 71-77, 2004.

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

MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ, V.; FRUTOS, R. Aholistic approach for detection the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4782-4788, 1998.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, EMBRAPA, 264p, 1998.

MELO-SANTOS, M. A. V. Eficiência de larvicidas à base de *Bacillus thuringiensis* sorovar. *israelensis* no controle de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Recife: Universidade Federal de Pernambuco, (Dissertação, Mestrado em Biologia Animal), 74p., 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em <http://www.saude.gov.br> Acesso em 23 de novembro de 2007, 2007.

MONNERAT, R. S. & BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v. 3, p. 163-200, 2000.

MORRIS, O.N. A 2-year study of the efficacy of *Bacillus thuringiensis*-chitinase combinations in spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) control. **Canadian Entomology**, Ottawa, v. 18, p. 225–233, 1976.

MULLA, M. S.; DARWAZEH, H. A.; ZGOMBA, M. Effect of some environmental factors on the efficacy of *Bacillus sphaericus* 2362 and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against mosquitoes. **Bulletin of the Society of Vector Ecology**, Santa Ana, v. 15, p. 166-175, 1990.

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

NEPPL, C. C. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Chicago. 35p. Thesis (B.A.) – University of Chicago, 2001.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Aedes aegypti*: Biología & Ecología. Washington, 50p., 1986.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE LA SALUD. El dengue y la fiebre hemorrágica de dengue en las Américas: una vision general del problema. **Bol. Epidemiol**, Washington, v. 13, n. 1, 1992.

OKAY, S.; TEFON, B. E.; OZKAN, M.; OZCENGIZ, G. Expression of chitinase A (chiA) gene from a local isolate of *Serratia marcescens* in Coleoptera-specific *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v. 104, p. 161-70, 2008.

OMS. Fifteenth report. WHO Expert Committee on vector biology and control. **WHO Tech Report Series**, 1992

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L. E.; SUN, J.; FOLCH, J. L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 102, p. 18303-18308, 2005.

PICCHI, S.C.; VILAS-BOAS, L.A.; CERESINI, P.C.; LEMOS, E.G.M.; LEMOS, M.V.F. Strains variability in the DNA immigration control region (ICR) of *Xylella fastidiosa*, **Research in Microbiology**, Paris, v. 157, n. 3, p. 254-262, 2006.

PINTO, L. M. N. & FIUZA, L. M. PCR and bioassays screening of *Bacillus thuringiensis* isolates from rice fields of Rio Grande Do Sul specific to lepidopterans and coleopterans **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 305-310, 2003.

POLANCZYK, R. & ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**. Montecillo, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B.*

thuringiensis subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 66, p. 131-135, 1995.

PORCAR, M. & JUÁREZ-PÉREZ. PCR-based identification of *B. thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology**, v. 26, p. 419-132, 2003.

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

PROMDONKOY, B. & ELLAR, D. J. Membrane pore architecture of a cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Journal**, London, v. 350, p. 275-282, 2000.

PROMDONKOY, B.; PROMDONKOY, P.; PANAYIM, S. Co-expression of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cyt2Aa2 in *E. coli* revealed high synergism against *A. aegypti* and *C. quinquefasciatus* larvae. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 252, p. 121-126, 2005.

RASKO, D. A.; ALTHER, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 303-329, 2005.

REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SENEH, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3581-3586, 1996.

REY, L. Dípteros Nematóceros: Anofelinos e Culicíneos. **Bases da Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (ed). p. 312-323, 2002.

ROBERTS, D. R. & HSI, B. P. Method of evaluating *Aedes* ovipositional attractants. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 14, p. 129-131, 1977.

RODRÍGUEZ, R. Estrategias para el control del dengue y del *Aedes aegypti* en las Américas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, Ciudad de La Habana, v. 54, p. 189-201, 2002.

SAMPSON, M. N. & GOODAY, G. W. Involvement of chitinase of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**, v. 144, p. 2189-2194, 1998.

SANCHIS, V.; CHAOFAX, J.; PAURON, D. A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CryIC δ -endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 353, p. 259-263, 1994.

SCHNEIDER, S.; ROESLLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin: **A software for population genetics data analysis**. Version 2.000. Switzerland: University of Geneva. Free program distributed by the authors over the Internet from the website [Http://anthro.unige.ch/arlequin](http://anthro.unige.ch/arlequin), 2000.

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**, Washington, v. 62, p. 775-806, 1998.

SENA, J.A.D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins to *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 10, p. 2342-2348, 2009.

SILVA-WERNECK, J. & MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 4 p., (Circular técnica 10), 2001.

SIRICHOTPAKORN, N.; RONGNOPARUT, P.; CHOOSANG, K.; PANBANGRED, W. Coexpression of chitinase and the *cry11Aa1* toxin genes in *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 78, p. 160-169, 2001.

SMIRNOFF, W. A. & VALERO, J. A. Determination of the chitinolytic activity of nine subspecies of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 30, p. 265–266, 1977.

SMIRNOFF, W. A. Three years of aerial field experiments with *Bacillus thuringiensis* plus chitinase formulation against the spruce bud worn. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 24, p. 344-348, 1974.

STATSOFT, Inc. STATISTICA, version 7. Disponível em: www.statsoft.com, 2004.

SUGINTA, W.; VONGSUWAN, A.; SONGSIRIRITTHIGUL, C.; SVASTI, J.; PRINZ, H. Enzymatic properties of wild-type and active site mutants of chitinase A from *Vibrio carchariae*, as revealed by HPLC-MS. **FEBS Journal**, v. 272, p. 3376–3386, 2005.

TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3342-3346, 1992.

TAUIL, P. L. Urbanization and dengue ecology. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, suppl. 17, p. 99-102, 2001.

THAMTHIANKUL, S.; SUAN-NGAY, S.; TANTIMAVANICH, S.; PANBANGRED, W. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 395-401, 2001.

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**, v. 22, p. 4673-80, 1994.

THULER, A.M.G. *Bacillus thuringiensis*: Diversidade gênica, estrutura genética de populações e eficiência no controle de *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, (Tese de Doutorado, Doutorado em Microbiologia Agropecuária), 115p., 2007.

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

VAN RIE, J. & FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins, p. 219-237. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (ed.), **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2000.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simulídeos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 447-480, 1998.

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

WANG, J.; BOETS, A.; VAN-RIE, J.; REN, G. CHARACTERIZATION of *cry* 1, *cry* 2, and *cry* 9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 82, p. 63-71, 2003.

WEIR, B.S.; COCKERMAN, C.C.. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis**. 2nd. Ed. Suntherland, MA: Sinauer, 445p., 1996.

WHITELEY, W. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 549-576, 1986.

WIRTH, M. C.; FERRARI, J. A.; GEORGHIOU, G. P. Baseline susceptibility to bacterial insecticides in population of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from Mediterranean islands of Cyprus. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 4, p. 920-928, 2004.

WIRTH, M. C.; JIANNINO, J. A.; FREDERICI, B. A.; WALTON, W. E. Evolution of resistance toward *Bacillus sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 88, p. 154-162, 2005.

WIWAT, C., THAITHANUN, S., PANTUWATANA, S. & BHUMIRATANA, A. Toxicity of chitinase producing *Bacillus thuringiensis* sp. *kurtaki* HD-1 toward *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 79, p. 270-277, 2000.

YAMAGIWA, M., KAMAUCHI, S., OKEGAWA, T., ESAKI, M., OTAKE, K., AMACHI, T., KOMANO, T. & SAKAI, H. Binding properties of *Bacillus thuringiensis* Cry4A toxin to the apical microvilli of larval midgut of *Culex pipiens*. **Biosciences Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 11, p. 2419–2427, 2001.

ZHONG, W.F.; FANG, J.C.; CAI, P.Z.; YAN, W.Z.; WU, J.; GUO, H.F. Cloning of the *Bacillus thuringiensis* serovar *sotto* chitinase (Schi) gene and characterization of its protein. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão preto, v. 28, p. 821-826, 2005.