

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

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* COM POTENCIAL INSETICIDA PARA *Sphenophorus levis*

Elaine Aparecida Silva Cícero

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia Agropecuária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Dezembro de 2007

Cícero, E. A. S.
C568c CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E SELEÇÃO DE ISOLADOS DE
B. thuringiensis COM POTENCIAL INSETICIDA PARA
Sphenophorus levis.
Elaine Aparecida Silva Cícero -- Jaboticabal, 2001
xi, 76 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos.

Banca examinadora: Ricardo Antonio Polanczyk, Sabrina
Moutinho Chabregas, Janete Aparecida Desidério Sena, Antonio
Sergio Ferraud

Bibliografia

1. PCR 2. Bioensaio. 3. Controle Biológico. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ELAINE APARECIDA SILVA CÍCERO -

nascida em 06 de Setembro de 1971, na cidade de Paranaíba - MS, é licenciada em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas - MS, em 08 de Março 1997. Especializou-se em Ciências Ambientais, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus de Três Lagoas em 10 de Fevereiro de 1999. 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" Câmpus de Jaboticabal, em 21 de Novembro de 2003.

*Bom mesmo é ir à luta com determinação;
Abraçar os amigos e viver com paixão;
Perder com classe e vencer com ousadia.
Pois o triunfo pertence a quem mais se atreve...
E a vida é muito para ser insignificante."*

Charles Chaplin

*Ao meu namorado Danilo,
por todo amor que houver nessa vida.....*

*Ao meu sobrinho Gabriel,
por fazer meu coração pulsar forte de alegria....*

*Aos meus irmãos
Marlon, Anne e Maria Antonia
pelo amor incondicional....*

DEDICO

*Aos meus pais
Mairton e Maria Alice
por serem o maior presente de Deus na minha vida.....*

*A família Ferraudó,
Por toda gentileza, amor e respeito.....*

OFEREÇO

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela confiança depositada no projeto e a liberdade com que deixou que o mesmo fosse concretizado.

A Profa. Dra. Janete Aparecida Desiderio Sena (Janetinha) pela amizade firmada ao longo dos anos.

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraud, sempre solícito na contribuição desse trabalho.

Aos amigos do LGBBA, Juliana, Martinha, Simone, Viviane, Ana Maria, Paula, Suzana, Janaina, Paulo, pela convivência, aprendizado e amizade.

À técnica Eliane Alves por toda atenção dispensada.

A minha eterna amiga Eliana Aparecida Gomes de Oliveira, mesmo distante se manteve e mantém tão presente na minha vida.

Aos amigos da EMURJA/SP – Prof. Galbiatti, Lú de Jorge, Massashi Sobue, Marlene, Elyane, Rita de Cássia, Renata Petroucic, Bruna, Cláudia e Ana Cristina pelos bons momentos vividos e apoio em todos os momentos, minha gratidão.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira, localizado em Piracicaba – SP, na pessoa dos pesquisadores Luis Carlos de Almeida e Dra. Sabrina Moutinho Chabregas e a técnica Sueli, por dispor de toda atenção e estrutura necessária para a condução dos ensaios.

A todos, que de uma maneira ou outra, tornaram a conclusão deste trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	x
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Cultura da Cana-de-açúcar	04
2.2 Características da Família Curculionidae	05
2.2.1 Distribuição cosmopolita do gênero <i>Sphenophorus</i>	07
2.2.2 A espécie <i>Sphenophorus levis</i> no Brasil	08
2.2.3 Biologia da espécie <i>S. levis</i>	10
2.2.4. Monitoramento e controle do inseto	11
2.2.4.1 Monitoramento	11
2.2.4.2 Controle	12
2.3 O Entomopatógeno <i>B. thuringiensis</i>	13
2.3.1 A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> como fonte de toxinas	15
2.3.2 Atividade tóxica de <i>B. thuringiensis</i>	18
2.3.3 Nomenclatura e caracterização de <i>B. thuringiensis</i>	22
2.3.4 As δ -endotoxinas de <i>B. thuringiensis</i>	24
2.4 Plantas Geneticamente Modificadas com Genes de <i>B. turingiensis</i>	29
2.4.1 Plantas Geneticamente Modificadas	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Banco de Bactérias Entomopatogênicas	32
3.2 Caracterização Morfológica de <i>B. thuringiensis</i>	34
3.3 Isolados de <i>B. thuringiensis</i> e condições de cultivo	34
3.4 Extração do DNA Genômico para Utilização em PCR	34
3.5 Identificação de Genes cry de <i>B. thuringiensis</i> por PCR	35
3.6 Obtenção de Larvas de <i>S. levis</i>	38
3.7 Bioensaio	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Caracterização Morfológica dos Isolados de <i>B. thuringiensis</i>	43
4.2 Caracterização Molecular	43
4.3 Teste de Patogenicidade	46
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS	54

Lista de Tabelas

Tabela 1. Toxinas produzidas por <i>B. thuringiensis</i> , com respectivos subgrupos, atividade tóxica, controle positivo e peso molecular.	24
Tabela 2. Iniciadores elaborados pelo LGBBA e utilizados nas reações de RCR	34
Tabela 3. Ingredientes e medidas utilizados para o preparo da dieta artificial para as larvas <i>S. levis</i> (DEGASPARI et al., 1987).	37
Tabela 4. Iniciadores elaborados pelo LGBBA e utilizados nas reações de PCR.	41
Tabela 5. Classificação dos isolados segundo análise discriminante dos grupos de BAIXA, MÉDIA e ALTA mortalidade de larvas de <i>S. levis</i> .	44
Tabela 6. <i>Avaliação da Mortalidade em larvas de S. levis aos 21 dias após a aplicação da toxina de B. thuringiensis.</i>	45

Lista de Figuras

Figura 1. Adultos de <i>S. levis</i> ♂ (esquerda) e ♀ (direita)	08
Figura 2. Formação de galerias em colmos de cana-de-açúcar por larvas de <i>S. levis</i>	10
Figura 3. Ciclo biológico do Curculionidae <i>S. levis</i>	11
Figura 4. Mecanismo de toxicidade da bactéria <i>B. thuringiensis</i>	16
Figura 5. Criação massal de adultos de <i>S. levis</i>	39
Figura 6. Distribuição da suspensão de <i>B. thuringiensis</i>	41
Figura 7. Panorâmica dos tratamentos avaliados aos sete dias após a aplicação da toxina de <i>B. thuringiensis</i> .	42
Figura 8. Eletroforograma dos produtos obtidos por PCR para isolados de <i>B. thuringiensis</i> com fragmentos amplificados para o iniciador geral Gral cry35 Ba conservado (585 pb).	44
Figura 9. Distribuição dos 45 isolados e dos três isolados utilizados como padrão de <i>B. thuringiensis</i> em grupos, obtida da análise discriminante.	49
Figura 10. Dendrograma evidenciando a divisão em grupos dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> a partir dos escores canônicos da análise discriminante	50

RESUMO:

A bactéria *B. thuringiensis* caracteriza-se pela produção de proteínas tóxicas a representantes de diversas ordens de insetos, as quais são codificadas por genes *cry*. Este trabalho foi realizado com objetivo de selecionar isolados de *B. thuringiensis* por meio da caracterização morfológica e molecular identificando as diferentes subclasses dos genes *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35* e determinar a patogenicidade contra *Sphenophorus levis*, que é uma das mais importantes pragas da cultura da cana-de-açúcar. Foram utilizados 1128 isolados de *B. thuringiensis* e com a observação em microscópio com contraste de fases foram confirmadas como pertencentes à espécie de *B. thuringiensis* e três linhagens padrões. O material genético foi extraído pela matriz de troca iônica "Instagene Matrix" e submetido a PCR com iniciadores gerais *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35* identificando-se 45 isolados com produto de amplificação para coleópteros, os quais juntamente com as linhagens padrões de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *morrissone* e var. *tolworthi* e testemunhas foram utilizados para a realização do bioensaio. A análise discriminante alocou os isolados em três grupos quanto à toxicidade de *B. thuringiensis* e os grupos ficaram assim definidos: um grupo de BAIXA efetividade, com 19,60% do total dos isolados, nesse grupo ficaram as testemunhas e uma linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *morrissone* e isolados do LGBBA; um grupo de MÉDIA efetividade, com 66,67% do total dos isolados, nesse grupo ficaram duas linhagens padrões *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e var. *morrissone* e isolados do LGBBA e um grupo com ALTA efetividade com 13,72% do total dos isolados do LGBBA, os quais podem ser considerados promissores no controle biológico de *S. levis*.

Palavras chaves: PCR, bioensaio, análise discriminante.

Summary: Molecular characterization and selection of *B. thuringiensis* isolates exhibiting potential control on *Sphenophorus levis* larvae.

Bacillus thuringiensis is characterized by the production of toxic proteins to insects from a number of different orders which are coded by the *cry* genes. This work was developed aiming to select *B. thuringiensis* isolates using morphological and molecular analysis so as to identify different *cry* genes subclass for *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* and *cry35* and also to determine the pathogenicity levels against *Sphenophorus levis* larvae, that is one of the most important sugar-cane pests. As much as 1128 bacterial isolates together with three control strains were used and for the phase contrast microscopy and molecular analysis. The genetic materials were obtained using the Instagene Matrix that is an ionic matrix and the PCR primers used were developed for *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* and *cry35* genes. A total of 45 isolates were selected showing possible amplicons for coleopterans. These isolates together with the standard strains *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *morrissone* a var. *tolworthi* were used for bioassays. A discriminating analysis has allocated the bacterial isolates within three groups of *B. thuringiensis* toxicity and these groups were defined as one with LOW effectivity, comprising 19,6% of the isolates and the control strains together with one of the control strains *B. thuringiensis* var. *morrissone*. Another group has revealed a MEDIAN effectivity with a total of 66.7% of the isolates including two other control strains *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e var. *morrissone* and a third group with HIGH effectivity with 13.7% of the isolates which were considered as promising *B. thuringiensis* isolates for the control of *S. levis* larvae.

Key-words: PCR, bioassays and discriminating analysis

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área cultivada de 7,04 milhões de hectares no ano de 2006. A lavoura canavieira abastece as indústrias de açúcar e álcool, as quais são responsáveis por mais de 40% do mercado mundial de álcool, representando o maior programa de combustível renovável de planeta. Na safra de 2006, foram colhidos 427 milhões de toneladas de cana, permitindo a fabricação de 30,6 milhões de toneladas de açúcar e de 17,8 bilhões de litros de álcool. Devido à grandeza dos números do setor sucroalcooleiro no Brasil e o fato de cada tonelada de cana-de-açúcar ter o potencial energético de 1,2 barris de petróleo, pode-se tratar a cana-de-açúcar como o principal recurso de biomassa energética. A falta do petróleo no mercado mundial e as exigências ambientais do Protocolo de Kioto devem elevar em 70% o consumo mundial de álcool como combustível até o ano de 2010.

O expressivo crescimento da produção de cana-de-açúcar, no Brasil, nas últimas décadas, tem determinado importantes mudanças no que se refere ao controle de pragas. Dentre as pragas que danificam a cana-de-açúcar, o curculionídeo *Sphenophorus levis*, vem assumindo grande importância, principalmente por estar disseminando-se em áreas onde sua incidência ainda não havia sido registrada.

O bicudo da cana-de-açúcar, nome comum atribuído à espécie *S. levis* é responsável por danos vultuosos à cultura canavieira, ocasionando a redução da produtividade agrícola e da longevidade dos canaviais, pela destruição da base de

brotos, perfilhos e colmos, causando a morte destes, resultando em redução de “stand” e permitindo o desenvolvimento de plantas daninhas.

O interesse crescente em utilizar tecnologias com menor impacto ambiental e devido as suas propriedades entomopatogênicas, fez da bactéria *B. thuringiensis* um agente promissor para a supressão de populações de insetos que causam danos em lavouras, e tem impulsionado várias pesquisas com o objetivo de selecionar isolados com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos.

A bactéria *B. thuringiensis* atende aos requisitos de agente microbiano, tendo como principal característica a produção de cristais inseticidas durante a esporulação. Estes cristais consistem em proteínas codificadas por diferentes genes, denominados *cry*, os quais conferem a ação tóxica de *B. thuringiensis* a insetos de diversas ordens, principalmente Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Existem hoje, mais de 390 seqüências de genes *cry* que foram determinadas e classificadas em 54 famílias e diferentes subclasses (CRICKMORE et al., 2008).

Atualmente, a procura dos genes *cry* de *B. thuringiensis* tem sido feita por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), técnica molecular que tem se mostrado uma ferramenta valiosa à predição da atividade inseticida de novos isolados de *B. thuringiensis*.

O futuro das pesquisas com *B. thuringiensis* tem se direcionado à biotecnologia e biologia molecular, para obtenção de plantas geneticamente modificadas (BETZ et al., 2000) capazes de expressar genes de δ -endotoxinas caracterizados e com ação conhecida sobre os insetos.

Plantas geneticamente modificadas têm sido utilizadas por diversos países com o intuito de aumentar a produtividade agrícola. Neste contexto, empresas de biotecnologia e institutos de pesquisas têm desenvolvido PGMs com diversas características, como: resistência ao herbicida glifosato (gene *cp4 epsps*), resistência a pragas (gene *cryA1*), resistência a patógenos (gene da lisosima), alto teor de vitaminas (arroz dourado) dentre outras.

Visando contribuir com alternativas que sejam eficazes no controle do bicudo da cana-de-açúcar, e que sejam ambientalmente seguras, o presente trabalho teve por objetivo selecionar isolados de *B. thuringiensis* (que codificam para as δ -endotoxinas com atividade inseticida a Ordem Coleoptera) utilizando a caracterização molecular por PCR para identificar as subclasses dos genes *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35* (coleóptero-específicos), bem como determinar a eficiência na mortalidade de larvas de *S. levis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) engloba 30 espécies pertencentes à família Poaceae (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2005). Sua cultura é destaque no cenário agrícola brasileiro, sendo cultivada em vários tipos de ambientes (associação de clima e solo) (MALUE et al., 2001).

O cultivo da cana-de-açúcar começou no Brasil em 1522 na cidade de São Vicente e foi trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Souza. Posteriormente, em 1533, a cana-de-açúcar foi introduzida em Pernambuco por Duarte Coelho Pereira (BASTOS, 1987). Durante o período do Brasil colonial o cultivo da cana-de-açúcar estava restrito a produção de açúcar (SZMRECSANYI & MOREIRA, 1991). Entretanto, o crescimento da importância da cultura no Brasil teve início a partir de 1970 com o incentivo do governo federal para as agroindústrias canavieiras na tentativa de solucionar a crise energética emergente, frente à potencialidade da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (BARELA, 2005).

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída a sua múltipla utilização, sendo empregada *in natura* sob a forma de forragens, para a alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, água ardente, açúcar e álcool (BARELA, 2005). Segundo NOVARETTI (1981), a grande importância da cultura não deriva somente do seu significado

como volume de produção ou emprego de mão-de-obra, mas também porque constitui componente relevante da dieta brasileira.

O cultivo da cana-de-açúcar é bastante complexo, podendo ser obtido de um único plantio 5 a 7 colheitas, sendo que após cada ciclo deve se fazer investimentos para que a renovação do canavial proporcione boa produtividade da colheita seguinte. Dentre esses investimentos, encontra-se o custo com inseticidas para o controle de insetos praga, os quais provocam sérios prejuízos à cultura. Como insetos praga na cultura da cana-de-açúcar destacam-se as chamadas pragas de solo: a cigarrinha das raízes, *Mahanarva fimbriolata* (STÅL, 1855) (Hemiptera: Cercopidae), o Vesperídeo das raízes, *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863), a broca do rizoma, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae), larvas de escarabeídeos, curculionídeos, e lepidópteros, cupins, e percevejo castanho.

Para manter elevada produtividade nos canaviais muito tem sido investido no estabelecimento e condução da cultura destacando-se diversos aspectos como o Manejo Integrado de Pragas, principalmente pelo uso de novas alternativas de controle (GALLO et al., 2002). Mais recentemente, com a conscientização do uso de produtos sem agrotóxicos, diversos centros de pesquisa vêm estudando agentes biológicos para a supressão de pragas nas lavouras.

2.2 Características da Família Curculionidae

Curculionidae é a maior família de insetos do mundo, com cerca de 50.000 espécies descritas, distribuídas em aproximadamente 4.500 gêneros. Segundo OÍBRIEN & WIBMER (1979), a família apresenta aproximadamente, 4.237

gêneros e 44.883 espécies. Os Curculionidae são besouros que possuem a cabeça prolongada em um rostro de comprimento muito variável, antenas clavadas e conspicuamente geniculadas, uma das sinapomorfias da família (KUSCHEL, 1995). O corpo é compacto, de formato muito variável, e o tegumento bastante endurecido, glabro, pubescente ou revestido por escamas coloridas, às vezes metálicas. O comprimento pode variar de 0,5 a 90 mm (incluído o rostro). A grande maioria das espécies é de pequeno tamanho (2-3 mm) e de colorido sombrio. As larvas são podas, subcilíndricas, em geral levemente encurvadas e pouco esclerotinizadas; os tergitos abdominais possuem, em geral, 3 a 4 pregas transversais (COSTA et al., 1988).

A importância econômica do grupo é inquestionável. Muitas espécies são prejudiciais às plantas e grãos armazenados, sendo que algumas delas tornaram-se pantropicais ou mesmo cosmopolitas. Adultos de algumas espécies são considerados transmissores de doenças virais às plantas. No Brasil, algumas das espécies que constituem pragas sérias da agricultura são as seguintes: *Anthonomus grandis*, o bicudo do algodão; *Cratosomus* spp., brocas das laranjeiras e do abacateiro; *Eutinobothrus brasiliensis*, broca da raiz do algodoeiro; *Helodytes foveolatus* e *Oryzophagus oryzae*, gorgulhos aquáticos do arroz; *Sphenophorus levis*, bicudo da cana-de-açúcar; *Homalinotus coriaceus*, *Rhinostomus barbirostris* e *Rhynchophorus palmarum*, brocas das palmeiras; *Cosmopolites sordidus*, broca da bananeira, popularmente conhecida como moleque. A importância dos Curculionideos prende-se também a outros aspectos. Por serem insetos muito numerosos e freqüentes nos mais diversos ambientes, fazem parte de praticamente todas as teias alimentares terrestres.

2.2.1 Distribuição cosmopolita do gênero *Sphenophorus*

O gênero *Sphenophorus* compõe um complexo de espécies que danificam diversas culturas de importância econômica, mais precisamente as gramíneas. Só nos EUA ocorrem mais de 64 espécies desse gênero, sendo que 20 já foram registradas na Flórida (WOODRUFF, 1966).

No Arkansas, *S. maidis* foi descrito causando danos severos em plantas jovens de milho, sendo que as plantas sobreviventes ao ataque da praga foram danificadas posteriormente por escarabeídeos (HAYES, 1920). Essa mesma espécie foi relatada atacando milho em Oklahoma e em Missouri. Na Pensilvânia, *S. aequalis* é a principal espécie, dentre um complexo de pragas do gênero *Sphenophorus* que atacam a cultura do milho (GESELL, 1983).

Em Maryland (USA), *S. parvulus* e *S. venatus vestitus* são relatados como as principais pragas de gramados, sendo que a segunda espécie foi encontrada em diversas outras localidades dos Estados Unidos, incluindo a Flórida (WOODRUFF, 1966). Em Oregon, foi relatada a ocorrência de *S. venatus vestitus* juntamente com as espécies *S. cicatristriatus* e *S. sayi*. Já *S. parvulus* é a principal praga de gramado “bluegrass”, sendo que a espécie *S. minimus* também pode ser encontrada no estado de Oregon causando algum dano na planta.

No estado da Flórida, as espécies *S. coesifrons* e *S. venatus vestitus* foram listados como insetos fitófagos que ocorrem na cultura da cana-de-açúcar (HALL, 1988).

2.2.2 A espécie *S. levis* no Brasil

Na Figura 1, observa-se o bicudo da cana-de-açúcar *S. levis* (Coleoptera: Curculionidae) somente foi conhecida a partir de 1977, tendo sido descrita como espécie nova em 1978 (VARUIE, 1970) é uma das principais pragas da cana-de-açúcar no Estado de São Paulo (GALLO et al., 2002), onde seu potencial de dano e características de dispersão torna-se mais importante nesta região (ALMEIDA, 2005).



Figura 1. Adultos de *S. levis* ♂ (esquerda) e ♀ (direita).

Em 1990, *S. levis* foi mencionado ocorrendo na região de Piracicaba, sendo considerada praga primária por causar a morte de 50 a 60% dos perfilhos ainda na fase de cana-planta, com cinco a sete meses de crescimento (PRECETTI & ARIGONI, 1990). Esse inseto foi encontrado também em outros 41 municípios, sendo 119 municípios mais distantes da região de Piracicaba. Este fato se deve principalmente ao descuido no transporte de mudas infestadas, de uma região a

outra, já que o inseto possui baixa taxa de dispersão, sendo da ordem de 6,60 à 11,10 metros por mês (DEGASPARI et al., 1987).

Na cana-de-açúcar ocorrem dois picos populacionais da praga na forma adulta: o primeiro no período de fevereiro a março e o segundo nos meses de outubro e novembro. Com relação às larvas, ocorrem também dois picos populacionais, sendo um nos meses de maio e julho, e o outro no mês de novembro (TERÁN & PRECETTI, 1983). Portanto, nos períodos de maio a novembro, especialmente nos três primeiros meses, ocorrem os maiores danos nas plantas de cana-de-açúcar, já que a fase larval é a que causa maiores prejuízos na cultura (ALMEIDA, 2005).

Como as larvas do inseto, responsáveis pelo maior dano, se abrigam dentro do rizoma da cana, o uso de inseticidas químicos não proporciona um controle satisfatório da praga. No momento, apenas a destruição mecânica das soqueiras e restos culturais tem proporcionado resultados satisfatórios, porém até o primeiro corte da cana. Após esse período, como o rizoma da cana permanece para a próxima safra, não havendo destruição das soqueiras, a incidência da praga aumenta, sem que haja mecanismos que possam frear o aumento da população do inseto na área (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

O dano na planta é verificado no rizoma abaixo do nível do solo, local onde a larva se alimenta e abriga, abrindo galerias circulares e longitudinais na base da brotação (Figura 2). Esse ataque resulta no amarelamento da folha e morte do perfilho, conseqüentemente ocasionando em falha nas rebrotas das soqueiras. Também pode ser observado aumento na proliferação de plantas invasoras, que ocupam os espaços deixados pela falha no perfilho (PRECETTI & ARIGONI,

1990). Tudo isso resulta na redução da tonelagem de cana produzida por hectare (PRECETTI & TERÁN, 1983).



Figura 2. Formação de galerias em colmos de cana-de-açúcar por larvas de *S. levis*.

2.2.3 Biologia da espécie *S. levis*

Em laboratório a fêmea adulta de *S. levis* realiza a postura na parte interna do colmo utilizando o rostro para abrir um orifício, ovipositando ao longo da sua existência em torno de 60 a 70 ovos (PRECETTI & TERÁN, 1983). Na Figura 3, observa-se o ciclo do Curculionidae *S. levis*, onde o período de incubação aproximado é de 7 a 12 dias. Após a eclosão da larva, o inseto se apóia nas paredes das galerias abertas para se locomover. O período larval é de aproximadamente 35,5 dias. Pouco antes de a larva alcançar à fase de pupa, ela abre uma galeria, onde o inseto se instala, cessando sua alimentação e movimentação (DEGASPARI et al., 1987).

O período pupal é de 5 a 7 dias, emergindo o adulto de coloração castanho, que, em laboratório, pode permanecer vivo até 210 dias em média. No campo o adulto se abriga abaixo do nível do solo e raramente são encontrados voando

(PRECETTI & ARIGONI, 1990). O período médio de ovo a adulto é de 57,2 dias, sendo a razão sexual de 1:1 (BOTELHO et al., 1983).



Figura 3. Ciclo biológico do Curculionidae *S. levis*.

O surgimento da praga no campo está intimamente relacionado com a variação da temperatura, verificando-se que os picos populacionais de adultos ocorrem nos períodos mais quentes do ano.

2.2.4 Monitoramento e controle do inseto

2.2.4.1 Monitoramento

O monitoramento do inseto na fase adulta é realizado por meio de armadilhas formadas com iscas atrativas confeccionadas com toletes de cana de 1 metro, cortados ao meio e imersos em inseticida químico por 24 horas. Após este período, os toletes são colocados nas bases das touceiras e revestidos com palha da cana na razão de 100 toletes para cada hectare. Passados 20 dias, a avaliação

da incidência de adulto é feita com base na quantidade de insetos mortos (ALMEIDA, 2005). Esta armadilha também foi utilizada para o controle de adultos no campo, visando-se desviar a ovoposição das fêmeas recém emergidas, para as armadilhas atrativas (TERÁN et al., 1986).

2.2.4.2 Controle

O método de controle mais utilizado no manejo de *S. levis* é a destruição mecânica das soqueiras no período de plantio (momento da reforma do canavial), procurando-se expor ao máximo as larvas aos seus predadores e ao secamento dos rizomas, recomendando-se também eliminar o mato infestante que pode servir de alimento para larvas (PRECETTI & ARIGONI, 1990). Esta prática apresenta resultado satisfatório somente no 1º corte, pois muitas larvas do inseto conseguem sobreviver alimentando-se da matéria orgânica deixada no campo, após a destruição das soqueiras, não afetando também as formas adultas do inseto.

Com relação ao controle químico, o inseticida fipronil (Regent 800WG) é o produto atualmente recomendado tentando reduzir a incidência da praga no campo. Assim como na destruição das soqueiras, esta técnica é utilizada no plantio procurando-se evitar o ataque da praga na cana planta (ALMEIDA, 2005).

No controle biológico foi estudada a utilização do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana*, em associação com isca atrativa formada por tolete de cana, visando o controle da população de adultos (BADILLA & ALVES, 1989).

A sanidade das áreas de produção de mudas também deve ser considerada, procurando-se evitar a introdução da praga em locais onde ainda não há registro do inseto, ou reinfestação no campo. Mudas infestadas são as

principais propagadoras do inseto, por isso é muito importante verificar sempre o local de origem das mudas, observando-se a presença ou não da praga (PRECETTI & ARIGONI, 1990).

Entretanto, apesar de todas essas medidas, ainda tem ocorrido um incremento nas populações da praga, sendo freqüente, nos últimos anos, registros de novas áreas infestadas. Isso demonstra a dificuldade de controle desse inseto, ressaltando a importância de pesquisas na busca de alternativas mais eficazes (LEITE et al., 2006).

2.3 O entomopatógeno *B. thuringiensis*

A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada com afincos por vários laboratórios ao redor do mundo, devido à necessidade de uma agricultura mais sustentável e desenvolvida com maior preocupação com a preservação do meio ambiente (BOBROWSKI et al, 2003). O uso de bioinseticidas formulados a base de *B. thuringiensis*, vem contribuindo para o início da substituição ou redução dos inseticidas convencionais em diversas áreas e incentivo para novas pesquisas sobre a utilização desta bactéria na agricultura (van FRANKENHUYZEN, 1993).

O investimento em produção de agentes microbianos para controle biológico no Brasil vem crescendo desde a década de 80, devido às exigências ecológicas e ambientais da sociedade (ALVES, 1998). Dentre os agentes microbianos utilizados, as bactérias têm se destacado, especialmente, na família Bacillaceae, a espécie *B. thuringiensis* (BERLINER, 1915; VALADARES-INGLIS et al., 1998). *B. thuringiensis* é o principal agente de controle biológico utilizado

atualmente, sendo responsável por aproximadamente 2% do mercado anual de inseticidas (LAMBERT et al., 1992).

Devido à necessidade de métodos de controle menos agressivos ao meio ambiente, de produtos com menores níveis de resíduos e a pouca eficiência dos agroquímicos utilizados, levou o mercado a tomar grande impulso quando se verificou que novas isolados de *B. thuringiensis* apresentavam um amplo e variado espectro de ação, controlando insetos das ordens Lepdoptera, Diptera, Coleoptera e atualmente ácaros e nematóides (MELO & AZEVEDO, 1998), conforme as premissas do manejo integrado de pragas.

A eficácia e especificidade de cepas de *B. thuringiensis* e suas toxinas no controle de insetos-praga, favoreceu a formulação de bioinseticidas à base deste patógeno e, desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de 100 formulações foram colocadas no mercado mundial, sendo atualmente responsáveis por mais de 90% do faturamento de bioinseticidas. O continente americano é responsável por 50% deste mercado, principalmente os Estados Unidos e Canadá e a América Latina representa apenas 8 a 10% do total (TAMEZ-GUERRA et al., 2001). HANSEN & SALAMITOU (2000) estimaram que a aplicação mundial anual de *B. thuringiensis* é de 13.000 toneladas.

O efeito das toxinas de *B. thuringiensis* sobre inimigos naturais dos insetos-praga como parasitóides ou predadores foi estudado em laboratório e a campo, indicando pouco ou nenhum efeito sobre estes organismos (SCHULER et al., 1999; WRAIGHT et al., 2000). Os inimigos naturais são extremamente importantes, pois pragas secundárias podem tornar-se um problema, caso a população de insetos benéficos for reduzida pelo uso de inseticidas químicos de

amplo espectro. XIA et al (1999) relataram que na China, o uso de algodão-Bt determinou a redução do uso de inseticidas químicos, resultando em aumento de 24% na população de inimigos naturais dos insetos-praga, quando comparado com campos de plantas de algodão não modificadas geneticamente e submetidas ao controle químico convencional.

2.3.1 A bactéria *B. thuringiensis* como fonte de toxinas

Vários agentes microbianos foram estudados para a supressão de populações de insetos que causam danos em lavouras e demais plantas (ARONSON et al, 1986; DEACON, 1983), porém entre os agentes entomopatogênicos de maior utilização na agricultura destaca-se a bactéria esporulante *B. thuringiensis*, que foi isolada pela primeira vez por um cientista japonês, S. Ishiwata, em 1901 a partir de larva do bicho-da-seda. Dez anos mais tarde, E. Berliner formalmente descreveu a espécie a partir de um isolado de *Anagasta kuehniella* coletado na Alemanha na região de Thuringia, a qual doou o nome à espécie (PORCAR & JUAREZ-PEREZ, 2003). Somente mais tarde, por volta de 1953-1956, é que Hannay detectou a presença de cristais em culturas esporuladas dessa bactéria (HABIB & ANDRADE, 1998) e associou a eles, a toxicidade aos invertebrados.

B. thuringiensis é uma espécie cosmopolita, a qual já foi isolada em diversos substratos, os quais variam desde solos, superfície foliar e até em insetos (DULMAGE, 1982), Gram-positiva, esporulante e anaeróbia facultativa. Segundo VALADARES-INGLIS et al.,(1998), a bactéria *B. thuringiensis* possui uma inclusão cristalina, composta por proteínas denominadas δ -endotoxinas, com ação

extremamente tóxica e altamente específica. Contaminam os insetos por via oral, multiplicando-se no seu interior. Essas toxinas sintetizadas como protoxinas, provocam lesões no epitélio intestinal dos insetos em seu estágio larval. Após a ingestão, os cristais são solubilizados dentro do tubo digestivo graças a um pH alcalino, o que explica a alta susceptibilidade dos insetos com pH intestinal acima de 8,0 e são ativados por proteases contidas no fluido intestinal. A toxina liga-se a receptores específicos presentes na superfície da membrana das células epiteliais, formando poros e causando o desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, em seguida, causa a lise celular e a morte da larva (Figura 4).

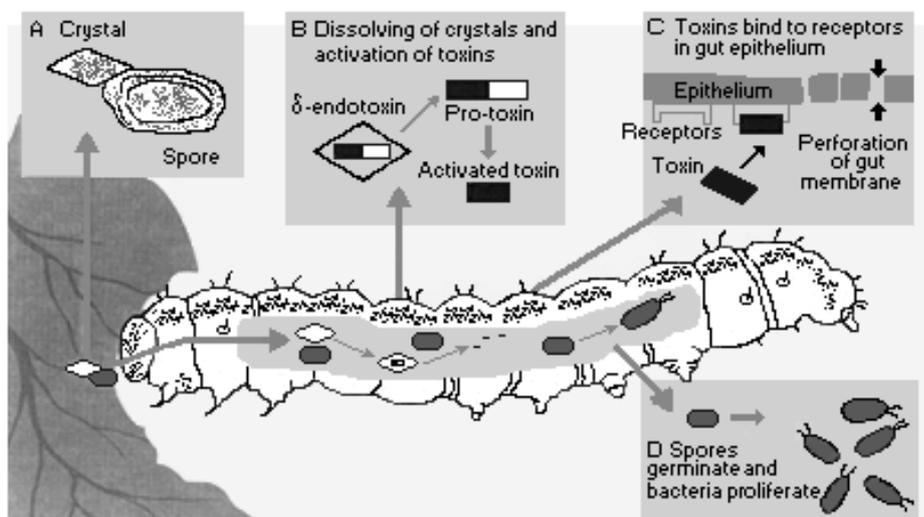


Fig. 1. Mechanism of toxicity of Bt

Figura 4. Mecanismo de toxicidade da bactéria *B. thuringiensis*.

A microflora bacteriana dos insetos, confinada no intestino, é rica, diversa e compreende bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Entre as bactérias Gram-positivas algumas auxiliam na digestão dos alimentos, porém outras são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisadores devido ao seu

magnífico potencial para o controle de pragas agrícolas e urbanas (PRIEST, 2000).

B. thuringiensis é uma bactéria geralmente móvel, possuindo flagelos peritríquios, encontrada principalmente no solo e em insetos doentes. É um dos agentes de biocontrole largamente utilizado para o controle de pragas, tanto na agricultura como em áreas de reflorestamento, assim como no controle de vetores de agente causal de doenças humanas e de animais (LEMOS & ALVES, 2000).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas como a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia). A PCR baseia-se na atividade da enzima DNA polimerase que é capaz de produzir uma cadeia de DNA complementando a outra já existente. Através da técnica é possível detectar indícios da presença de genes que codificam para as proteínas tóxicas já conhecidas, ou não; também dão idéia da patogenicidade dos isolados de *B. thuringiensis* (KUO & CHARK, 1996).

Segundo BAUER (1995), o isolamento das proteínas cristal vem proporcionando o desenvolvimento de vários inseticidas seletivos que possuem como vantagens: alta compatibilidade com inimigos naturais e organismo não alvo; inocuidade sobre os vertebrados; biodegradabilidade ao meio ambiente; alto potencial como fonte de genes para desenvolvimento de plantas transgênicas.

Em relação especificamente à inocuidade a vertebrados, estudos comprovam aumentos nos níveis de anticorpos em humanos (IgG e IgE), todavia não houve observação de desenvolvimento de doenças decorrentes da exposição ao patógeno (BERNSTEIN et al., 1999; SIEGEL, 2001).

Para MORAES et al., (1998), *B. thuringiensis* pode ser considerado como agente biológico de maior potencial inseticida devido, principalmente, às características de esporulação que lhe conferem resistência às condições adversas e de processamento industrial. A temperatura ótima para produção de esporos e cristais ocorre entre 28 e 32 °C, sendo que em temperaturas menores que 20 °C e maiores que 40 °C pode ocorrer perda das δ -endotoxinas (BENINTENDE & MARQUEZ, 1996).

2.3.2 Atividade tóxica de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis desenvolve-se, em condições aeróbias, em meios artificiais bastante simples. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria entra em processo de esporulação durante a fase estacionária. No início da esporulação *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pelas quais elas são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000). Estas toxinas são codificadas por genes *cry* e sua toxicidade está ligada à região N-terminal das cadeias polipeptídicas, enquanto que a porção C-terminal determina a forma da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

Uma determinada cepa de *B. thuringiensis* pode produzir um ou mais cristais e estes, por sua vez, podem conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. Por exemplo, *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 contém três Cry1 (130 kDa) e duas Cry2 (70 kDa), enquanto que *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* produz uma única toxina com peso molecular de 67 kDa. A forma do cristal é

determinada pelo número de δ -endotoxinas presentes, e uma relação parcial entre composição da proteína e sua estrutura molecular foi estabelecida por GLARE & O'CALLAGHAM (2000) e LERECLUS et al., (1993).

Os genes *cry* podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40-200 MDa) ou em ambos (GONZALEZ et al., 1982; SANCHIS et al., 1998). Sua expressão é regulada por dois mecanismos: o primeiro é dependente de fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry*, e outro independente do processo de esporulação, como o gene *Vip3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Algumas cepas de *B. thuringiensis* apresentam um único gene codificador (*B. thuringiensis kurstaki* HD-73), enquanto outras apresentam genes diferentes, porém relacionados (*B. thuringiensis* var. *aizawai* 7.29) (LERECLUS et al., 1993; SANCHIS et al., 1998).

As toxinas do cristal, denominadas também como proteínas Cry, são de constituição glicoprotéica, representando normalmente de 20 A 30% do peso seco da célula (BENINTENDE & MARQUEZ, 1996). Essas proteínas do cristal são altamente tóxicas e diversas ordens de insetos, principalmente para Lepdoptera, Coleoptera e Diptera (VALADARES-INGLIS et al., 1998; HERRERO, 2001). A quantidade de toxina produzida em laboratório (aproximadamente 0,5 mg de proteína/mL de meio de cultura) e o tamanho dos cristais indicam que cada célula tem que sintetizar de 10^6 a 2×10^6 moléculas de δ -endotoxina para formar o cristal (AGAISSE & LERECLUS, 1995).

De acordo com KNOWLES (1994), o intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos

ingeridos do patógeno. Porém as δ -endotoxinas causam 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. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria. COPPING & MENN (2000) ressaltam que diferentes toxinas ligam-se a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a especificidade destas toxinas. Devido a importância do esporo na patogenicidade desta bactéria, a maioria dos produtos comercializados possui esporos e as toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica.

KNOWLES (1994) descreve as etapas da patologia de *B. thuringiensis* sobre insetos: aumento da absorção de glicose e início de sintomas histopatológicos (1-5 minutos); paralisia do intestino médio, cessa a alimentação, membrana apical permeável a corantes, aumento do volume e formação de vesículas nas células, aumento do pH da hemolinfa, diminuição do transporte de glicose e leucina para a hemolinfa, colapso metabólico celular (10-30 minutos); lise celular e ruptura da membrana basal, paralisia geral ocorre em 1 a 7 horas; morte por falta de alimento ou septicemia (1-3 dias).

A primeira δ -endotoxina a ter sua estrutura molecular determinada foi a proteína Cry3A (LI *et al.*, 1991). As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, por isso são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000).

A toxicidade de *B. thuringiensis* a insetos é devida a presença das inclusões parasporais que apresentam formas variáveis e que se constituem de proteínas com massa variável entre 27 a 140 kDa (AUGUSTINIAK *et al.*, 1997; BERHNARD

et al., 1997). A maioria dos genes codificadores de δ -endotoxinas estão localizados em grandes plasmídeos. Alguns dos isolados de *B. thuringiensis* contêm mais de um gene de δ -endotoxina (KRONSTAD et al., 1983). O espectro de ação de diferentes isolados de *B. thuringiensis* depende da combinação de δ -endotoxinas individuais presentes no cristal (ESTRUCH et al., 1997). Enquanto o esporo, que representa a forma de resistência da bactéria, pode sobreviver durante vários anos, a durabilidade dos cristais é altamente variável, dependendo das condições ambientais (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

As δ -endotoxinas constituintes dos cristais são protoxinas solubilizadas e proteoliticamente convertidas em peptídeos menores no trato digestivo das larvas susceptíveis. Estes polipeptídeos associam-se a receptores específicos de ligação nas microvilosidades apicais das células do intestino dos insetos, causando lise osmótica por formação de poros na membrana (FIUZA et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998). O espectro de atividade inseticida destas toxinas é estreito devido ao seu modo de ação. Os sítios de ligação na semente estão envolvidos na especificidade das toxinas de *B. thuringiensis* como também representam um mecanismo de resistência dos insetos às δ -endotoxinas (FIUZA et al., 1996; de MAAGD et al., 2003).

A solubilização das proteínas depende do pH alcalino de lepidópteros e dípteros; uma menor efetividade destas proteínas em coleópteros pode ser devida ao pH neutro ou pouco ácido, necessitando, então, de uma ativação “*in vitro*” (SCHNEPF et al., 1998; de MAAGD et al., 2003). Diferenças na atividade proteolítica entre os insetos-alvo podem também ser responsáveis pela especificidade das proteínas. Por exemplo, a principal protease digestiva de

lepidópteros e dípteros é a serino-protease enquanto nos coleópteros ocorre principalmente cisteíno e aspartato-proteases (de MAAGD et al., 2003).

A busca de isolados de *B. thuringiensis* com alta atividade tóxica e diferentes especificidades a insetos é de extrema importância tanto para a produção de novos bioinseticidas como para utilização destas isolados para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos (BOBROWSKI et al., 2001).

2.3.3 Nomenclatura e caracterização de *B. thuringiensis*

No final da década de 80, HÖFTE & WHITELEY (1989) propuseram uma classificação para as toxinas de *B. thuringiensis*, baseada na combinação de suas seqüências de aminoácidos e espectro inseticida. Nesta classificação 38 toxinas foram agrupadas em 14 classes diferentes. As quatro principais classes continham toxinas com atividade contra Lepidoptera (I), Lepidoptera e Diptera (II), Coleoptera (III) e Diptera (IV). No entanto, esse esquema apresentou problemas, pois tentou relacionar toxinas com seqüências de aminoácidos similares, com diferentes atividades inseticidas. Durante a década de 90 uma nova classificação foi proposta por CRICKMORE et al., (1998), baseada somente nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Esta mudança permitiu uma alta relação entre as toxinas e eliminou necessidades de bioensaios contra um grande número de insetos. Até o momento mais de 390 genes *cry* foram seqüenciados (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) e agrupados em 54 grupos de toxinas Cry.

A sorotipagem é o método mais comumente utilizado para diferenciar grupos de *B. thuringiensis*, mas a determinação do sorotipo nem sempre traduz a atividade inseticida de um isolado. Atualmente, 82 sorotipos são conhecidos, porém existem alguns problemas de reação cruzada com alguns isolados de *B. cereus*, cepas autoaglutinantes e também algumas cepas de *B. thuringiensis* que, por não produzirem cristais, são consideradas como *B. cereus* (LECADET et al, 1999).

A caracterização bioquímica é difícil, principalmente porque *B. thuringiensis* mostra variações nas respostas e por este tipo de caracterização não estar sempre associada a resultados de sorotipagem. Os meios seletivos também têm sido desenvolvidos para o isolamento de *B. thuringiensis* a partir de diferentes substratos. Entretanto, estes somente são capazes de separar *Bacillus* spp. e sua utilização não implica na obtenção de um número maior de isolados do que aquele obtido com métodos mais simples.

Os avanços recentes na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de métodos baseados no DNA, capazes de diferenciação inter e intraespecífica de *B. thuringiensis*. Tais métodos podem também ser empregados para determinar a presença/ausência de determinados genes *cry*.

Descrita na década de 1980 (MULLINS & FALOONA, 1987), a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) permite obter *in vitro* várias cópias de um determinado fragmento de DNA, obedecendo as seguintes etapas: a) extração do DNA que contém a região a ser amplificada, b) escolha do segmento a ser amplificado e obtenção de iniciadores específicos “primers” para o reconhecimento desse segmento, c) amplificação que dará origem a várias cópias, fazendo-se uso

de um termociclador e, por fim, d) leitura do produto amplificado após eletroforese e coloração.

Para *B. thuringiensis*, esta técnica tem muitas utilidades e pode ser empregada com a finalidade de amplificar regiões conhecidas do DNA, para comparar geneticamente isolados de *B. thuringiensis* pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (BRAVO et al., 1998; CAROZZI et al., 1991; PORCAR & JUÁREZ-PEREZ, 2003).

2.3.4 As δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*

Este grupo de toxinas, também chamado de proteínas Cry é um dos formadores do cristal protéico. Estas proteínas apresentam peso molecular variando de 65 a 138 kDa. Os estudos efetuados sobre a esporulação mostraram que o cristal é formado a partir do segundo estágio da esporulação e é liberado quando as células são lisadas. As etapas da esporulação e biogênese do cristal seguem os seguintes passos:

Estágio 1: A célula para seu crescimento e sua parede celular se modifica;

Estágio 2: O septo de esporulação é formado e a cromatina é dividida em duas partes. Começa nesse momento a aparição de uma estrutura condensada que é o cristal;

Estágio 3: Formação do pré-esporo;

Estágio 4: Crescimento do esporo e formação do cortex;

Estágio 5: Formação do envelope esporal que envolve o esporo. O cristal, fora deste envelope, continua seu crescimento;

Estágio 6: Maturação do esporo, o cristal atinge seu tamanho máximo;

Estágio 7: Ruptura da célula e liberação do cristal e do esporo.

A classificação das proteínas Cry baseia-se na similaridade das seqüências de aminoácidos (Tabela 1). Existem mais de 390 diferentes genes cry e as proteínas Cry estão agrupadas em 54 classes (CRICKMORE et al., 2008).

A atualização constante dessa nova classificação encontra-se disponível no site: [www: http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

Dentre as estirpes de *B. thuringiensis*, algumas apresentam um único gene codificador das proteínas Cry. Outras estirpes apresentam cinco genes diferentes, como é o caso da var. *aizawai* HD-137 e var. *israelensis* IPS-82. Esta última apresentou cinco genes codificadores da δ -endotoxina e outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um único plasmídeo de 72 MDa (BOURGOUIN et al., 1988).

Tabela 1. Toxinas produzidas por *B. thuringiensis*, com respectivos subgrupos, atividade tóxica, controle positivo e peso molecular.

<i>Toxina</i>	<i>Subgrupo</i>	<i>Atividade Tóxica</i>	<i>Controle Positivo</i>	<i>Peso Molecular</i>	<i>Referências</i>
Cry1	Cry1Ab	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	130 kDa	HAIDER & ELLAR, 1987 BRADLEY et al., 1995
	Cry1Ba	Lepidoptera e Coleoptera			
	Cry1C	<i>Spodoptera frugiperda</i>			
	Cry1Ca	Lepidoptera e Diptera			
	Cry1Cb	<i>Spodoptera exigua</i> e <i>Trichoplusia ni</i>			
	Cry1D	<i>S. exigua</i>			
Cry2	Cry1E	<i>Spodoptera</i> sp	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	65 kDa	DANKOCSIK et al, 1990
	Cry2A	<i>Limantria dispar</i>			
Cry3	Cry2B	<i>Heliothis virescens</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	73 a 75 kDa	CRICKMORE et al.,2002
	Cry3Aa	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>			
	Cry3Ba	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>			
	Cry3Bb	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>			
Cry4	Cry3Ca	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	128 a 135 kDa	LAMBERT et al., 1992 HÖFTE & WHITELEY, 1989
	Cry4Aa	Diptera			
	Cry4Ba	Diptera			
Cry5	Cry5Aa	Nematoide	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i>	142 a 152 kDa	CRICKMORE et al., 2002 MONNERAT & BRAVO, 2000
	Cry5 Ab	Acaros			
	Cry5Ac	Himenoptera			
Cry6	Cry5Ba	Coleoptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>dakota</i>	129 kDa	MONNERAT & BRAVO, 2000 CRICKMORE et al., 2000
	Cry6Aa	Nematoide			
Cry7	Cry6Ba	Acaro	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kumamotoensis</i>	131 a 134 kDa	HORI et al., 1994 SATO et al., 1994
	Cry7Aa	Lepidoptera			
Cry8	Cry7Ab	Coleoptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>japonensis</i> <i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>		
	Cry8Aa	Coleoptera e Afideos			
	Cry8Ba	Coleoptera			
Cry9	Cry8Ca	Coleoptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>		
	Cry9Aa	<i>Galleria mellonella</i>			
	Cry9Ba	<i>Ostrina nubialis</i> e <i>Choristoneura</i>			

Cry9	Cry9Ca	<i>fumerana</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>japonensis</i>	130 kDa	CRICKMORE et al., 2002
	Cry9Da	Coleoptera		132 kDa	
	Cry9Ea		<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>		
	Cry9Eb				
Cry 10	Cry10Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	78 kDa	DONOVAN et al., 1988
	Cry11Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	72 kDa	DELECLUSE et al., 1995
Cry 11	Cry11Ba	A. aegypti, Culex pipiens e	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i>		ORDUZ et al., 1998
	Cry11Bb	Anopheles stephensi	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>medellin</i>		
Cry12	Cry12Aa	Nematoides e ácaros		142 kDa	MONNERAT & BRAVO, 2000
	Cry13Aa	Nematoides		88 kDa	CRICKMORE et al., 2002
Cry14	Cry14Aa	Diptera e Coleoptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>sotto</i>	132 kDa	CRICKMORE et al., 2002
Cry15	Cry15Aa	Lepidoptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>thompsoni</i>	132 kDa	BROWN & WHITELEY, 1992
Cry16	Cry16Aa	A. aegypti, Culex pipiens e	<i>Clostridium bifermentans</i> var. <i>malaysa</i>	71 kDa	BARLOY et al., 1998
Cry17	Cry17Aa	Anopheles stephensi	<i>Clostridium bifermentans</i> var. <i>malaysa</i>	72 kDa	BARLOY et al., 1998
	Cry17Aa	Diptera			
Cry18	Cry18Aa	<i>Melolontha melolontha</i>	<i>Bacillus popilliae</i>	76 a 78 kDa	ZHANG et al., 1997
	Cry18Ba				
	Cry18Ca				
Cry19	Cry19Aa		<i>B. thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i>	75 kDa	ROSSO & DELECLUSE, 1997
	Cry19Ba	<i>C. pipiens</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>hiago</i>	78 kDa	
Cry20	Cry20Aa	A. aegypti e <i>C. quinquefasciatus</i>	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>fukuokaensis</i>	86 kDa	LEE et al., 1995
Cry21	Cry21Aa	Nematoides		79 kDa	
	Cry21Ba	Nematoides			
Cry22	Cry22Aa	Himenopteros		79 kDa	CRICKMORE et al., 2002
	Cry22Ab	Coleoptera			
	Cry22Ba	Coleoptera			
Cry25	Cry25Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>jegathesan</i>	76 kDa	CRICKMORE et al., 2002
Cry26	Cry26Aa	Alvo não determinado	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>		WOJCIECHOWASKA et al., 1999
Cry27	Cry27Aa	Alvo não determinado	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>hiago</i>	94 kDa	CRICKMORE et al., 2002

Cry28	Cry28Aa	Alvo não determinado	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>finitimus</i>		WOJCIECHOWASKA et al., 1999
Cry29	Cry29Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>medellin</i>		
Cry30	Cry30Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>medellin</i>		
Cry31	Cry31Aa	Alvo não determinado			
Cry32	Cry32Aa	Alvo não determinado	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>yunnanensis</i>		CRICKMORE et al., 2002
Cry33	Cry33Aa	Alvo não determinado	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>dakota</i>		CRICKMORE et al., 2002
Cry34	Cry34Aa	Coleoptera		14 kDa	CRICKMORE et al., 2002
	Cry34Ab				
	Cry34Ac				
	Cry34Ba				
Cry35	Cry35Aa	Coleoptera		44 kDa	CRICKMORE et al., 2002
	Cry35Ab				
	Cry35Ac				
Cry36	Cry36Aa	Coleoptera			CRICKMORE et al., 2002
Cry37	Cry37Aa	Alvo não determinado			CRICKMORE et al., 2002
Cry38	Cry38Aa	Coleoptera			CRICKMORE et al., 2002
Cry39	Cry39Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>		CRICKMORE et al., 2002
Cry40	Cry40Aa	Diptera	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>		CRICKMORE et al., 2002

2.4 Plantas geneticamente modificadas com genes de *B. thuringiensis*

As técnicas de engenharia genética permitiram o desenvolvimento de um sistema que consiste na transferência e expressão de genes que codificam δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* em plantas (AZEVEDO, 1998). Os primeiros resultados de transferência de genes de *B. thuringiensis* foram obtidos no fumo e tomate em 1987, desde então, vários genes *cry* foram introduzidos em diversas plantas como algodão, arroz, milho, batata, soja, canola entre outras (VAECK et al., 1987; BARTON et al., 1987; FISCHHOFF et al., 1987; JOUANIN, et al., 1998; BURKNESS et al., 2002; BAUER & BOETHEL, 2003; ZOERB et al., 2003). Nos EUA, em 1995, foram liberadas em nível comercial as primeiras plantas geneticamente modificadas expressando proteínas Cry (JOUANIN et al., 1998). Nas plantas, a produção de proteínas Cry oferece várias vantagens, pois é um sistema ambientalmente seguro, já que o produto pode ser expresso apenas em tecidos de interesse ficando retido no interior destes tecidos não deixando resíduos ambientais, além de não possuir relatos sobre a atividade contra insetos benéficos (RUUD, et al., 1999). Como as proteínas são produzidas continuamente persistem por algum tempo na planta, sendo necessário menor aplicação de outros inseticidas, reduzindo o custo da produção (JOUANIN et al., 1998; SCHNEPF et al., 1998; AZEVEDO, 1998).

Genes de *B. thuringiensis* de proteínas Cry foram isolados e introduzidos em plantas agronomicamente importantes utilizando diferentes métodos de transformação genética como aqueles que empregam *Agrobacterium*, transformação direta de protoplastos e bombardeamento de partículas ou

biobalística. Em 1981, o primeiro gene *cry* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (SCHNEPF & WHITLEY, 1981). Em 1987, foi produzida a primeira planta de tomate com genes de *B. thuringiensis* (FISCHHOFF, 1987). O milho Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto foram introduzidas no mercado norte-americano em 1995, sendo genericamente conhecidas como plantas-**Bt** (JOUANIN et al., 1998). Atualmente o milho-**Bt** é a planta transgênica mais cultivada no mundo, ocupando 15% da área global cultivada com transgênicos em países como a EUA, Canadá, Argentina, África do Sul, Espanha e França. O algodão-**Bt** ocupa o segundo lugar em áreas plantadas, representando aproximadamente 7% da área cultivada com transgênicos (JAMES, 2000). Além do milho, da batata, do tomate e do algodão, outras plantas cultivadas expressam uma ou várias proteínas Cry para o controle de lepidópteros e coleópteros e outras plantas-**Bt** de espécies cultivadas estão em fase de desenvolvimento em laboratórios ou em testes de campo (OECD, 2001).

Atualmente, existem mais de 200 seqüências de genes *cry* descritos (CRICKMORE, 2002). Especula-se que a próxima geração de plantas-**Bt** deverá apresentar múltiplos genes *cry*, oferecendo aos produtores um maior espectro de proteção das plantas.

2.4.1. Plantas Geneticamente Modificadas

O advento da engenharia genética em plantas vem criando cultivares geneticamente modificados com características específicas para a resistência a herbicidas, insetos, patógenos e estresse ambiental (LIU et al., 2005). Estas

características proporcionam aumento na produção e redução de gastos com controle de doenças e insetos, proporcionando maior rendimento econômico (LIU et al., 2005).

As primeiras plantas geneticamente modificadas foram desenvolvidas a partir de 1983, quando um gene de resistência a um antibiótico foi inserido em plantas de tabaco (GUERRANTE, 2003).

Em países aonde esta tecnologia vem sendo desenvolvida, a área utilizada para o cultivo comercial de PGMs cresceu consideravelmente de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 67,7 milhões em 2003 (JAMES, 2005). Entre os anos de 2003 e 2005 o aumento foi de 31% no cultivo mundial de PGMs, representando 90 milhões de hectares. Atualmente 21 países adotam o plantio de PGMs sendo principais produtores os Estados Unidos com 49,8 milhões de hectares, seguido por Argentina e Brasil com 17,1 e 9,4 milhões de hectares, respectivamente (JAMES, 2005). Segundo JAMES (2005), o cultivo de transgênicos nestes três países representa 82% de toda a produção de PGMs no mundo.

O plantio de cultivares geneticamente modificados está associado às culturas de maior importância econômica como: soja, com 55 milhões de hectares, milho com 18 milhões de hectares, algodão com 7 milhões de hectares e canola com 3 milhões de hectares. A grande maioria das plantas apresenta resistência a insetos ou resistência múltipla a insetos e herbicidas. (JAMES, 2005).

No caso da cana-de-açúcar brasileira, não existem ainda variedades liberadas para o plantio comercial, de modo que o plantio de cana-de-açúcar geneticamente modificada está restrita a pesquisa.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética de Bactéria e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) – UNESP, Campus de Jaboticabal/SP e no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba/SP.

3.1 Banco de Bactérias Entomopatogênicas

A coleção de bactérias entomopatogênicas de isolados de *B. thuringiensis* do LGBBA foi sistematizada, e conta, atualmente, com 1163 isolados. Essas bactérias foram isoladas do solo, água e insetos mortos de várias regiões do Brasil, de acordo com a metodologia descrita no Protocolo da Organização Mundial da Saúde (OMC) de 1987 (SILVA-WERNECK & MONNERAT, 2001) ou recebidas de outras instituições como: Núcleo de Biologia Aplicada da EMBRAPA Milho e Sorgo de Sete Lagoas, Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da ESALQ – Piracicaba e Universidade Estadual de Londrina, as quais também obedecem à mesma metodologia descrita na OMC, conforme citado acima. A Coleção de Bactérias Entomopatogênicas do LGBBA também possui 69 isolados utilizados como padrão, as quais foram cedidas pelo “Bacillus Genetic Stock Center” Columbus, Ohio, USA.

Em um fluxo laminar, os isolados de *B. thuringiensis* foram inoculados em placa de Petri com meio de cultura Ágar Nutriente (extrato de carne 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L e Ágar 15 g/L) e em seguida foram incubados em câmara incubadora tipo B.O.D., regulada para 28 °C, durante cinco dias, permitindo assim a completa esporulação.

Após este período de cinco dias, as placas de Petri foram retiradas da estufa B.O.D. e em fluxo laminar, foi colocado 1 mL de água grau Milli-Q autoclavada, em cada placa e todo conteúdo bacteriano foi raspado e misturado com a água com auxílio de alça de platina. Em seguida foram banhados nessa mistura seis pequenas tiras de papel de filtro, devidamente autoclavados, para a impregnação com os esporos. A seguir, os papéis foram colocados em outra placa de Petri estéril até que ficassem totalmente secos. Posteriormente, os papéis secos, contendo os esporos impregnados, foram armazenados em tubos tipo criogênico (2 mL) devidamente identificados da seguinte forma:

a) **estoque em água:** em um tubo foi acondicionado uma tira de papel filtro impregnada com esporos de *B. thuringiensis*, com 1,5 mL de água estéril, constituindo o estoque “trabalho”, e, para garantir a integridade e evitar a contaminação da coleção, também foi feita duplicata para cada um dos isolados, os quais foram armazenados somente em papel filtro, sem adição de água conforme descrito abaixo:

b) **estoque em papel:** Em cada tubo foram acondicionados cinco tiras de papel filtro impregnadas com esporos de *B. thuringiensis*, isso garante a reposição das isolados que compõem a coleção de bactérias entomopatogênicas. Todos os tubos foram guardados em uma estufa tipo B.O.D., com temperatura de 15 °C.

Todos os tubos (papel e água) que compõem a coleção de bactérias entomopatogênicas do LGBBA possuem uma etiqueta de identificação, contendo um código de origem e outro de controle interno do Laboratório. Também está à disposição do acervo um catálogo de identificação contendo informações referentes à procedência dos referidos isolados.

3.2 Caracterização morfológica de *B. thuringiensis*

Cada isolado de *B. thuringiensis* foi cultivado em placa de Petri com meio de cultura Ágar Nutriente (extrato de carne 3 g/L, peptona bacteriológica 5 g/L e Ágar 15 g/L) e incubados a 28 °C, durante cinco dias, permitindo assim a completa esporulação e liberação dos cristais. Logo em seguida foi realizada a caracterização morfológica por meio de microscopia óptica com contraste de fase (1000x) para a observação das células vegetativas, esporos e cristais.

3.3 Isolados de *B. thuringiensis* e condições de cultivo

Para a realização deste trabalho foram utilizados 1128 isolados pertencentes à coleção de bactérias entomopatogênicas do LGBBA – UNESP, Jaboticabal, e como padrão foram utilizadas três isolados de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *morrissoni* e var. *tolworthi*, descritas como coleóptero-específicas.

3.4 Extração do DNA genômico para utilização em PCR

Para realização das análises de PCR, o DNA total de cada um dos isolados e dos controles foi extraído pela matriz de troca iônica, “Kit Instagene Matrix”, produzida pela Bio-Rad, seguindo as instruções do fabricante, como descrito abaixo:

Os isolados de *B. thuringiensis* foram previamente cultivados em placas de Petri com meio de cultura semi-sólido denominado “Nutrient Agar” (NA), contendo extrato de carne 3g/L, peptona bacteriológica 5 g/L e Agar 15 g/L. Para o cultivo dos isolados nestas placas coletou-se uma alíquota de 20 µL do referido estoque

em água e inoculou-se o meio de cultura com a ajuda da alça de Drigalski para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas em câmara climatizada tipo B.O.D. por 12 h a 25°C.

Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1 mL de água estéril em tubos plásticos de microcentrifuga de 1,5 mL de capacidade e levados a centrifugação por 1 minuto a 15000 Xg a 20°C.

Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µL da Matriz InstaGene (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi agitado vigorosamente em aparelho tipo Vórtex por 10 s e incubado em água fervente (100°C) por 8 minutos. A amostra foi novamente agitada em Vórtex por 10 s e centrifugada a 20°C por 3 minutos. Posteriormente 200 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de microcentrifuga esterilizado. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a - 20°C.

3.5 Identificação de genes *cry* de *B. thuringiensis* por PCR

Para a confirmação da presença dos genes que codificam proteínas inseticidas para a ordem Coleoptera, foram sintetizados dez pares de iniciadores (Cry3Aa LGBBA, Cry3Ba Conservado, Cry3Bb Conservado, Cry7 geral Conservado, Cry8 Geral Conservado, Cry9 geral Conservado, Cry9 geral LGBBA, Cry35Aa Conservado, Cry35Ba Conservado), cujas seqüências e pares de bases estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores elaborados pelo LGBBA e utilizados nas reações de RCR.

<i>Iniciadores</i>	<i>Seqüências</i>	<i>pb</i>
Cry3Aa LGBBA	5' AGATGAAGAGGGTATGTGTAGC 3'(d) 5' GAACTCATAACATCGTCATTGGG 3' (r)	641
Cry3Ba Conservado	F 5' ACTTACGCAACAATACACTGAC 3' R 5' TAGGTTAGTGGTTGAAGCATAG 3'	1030
Cry3Bb Conservado	5' TACGCAACAATACACTGACC 3' (d) 5' TCATCTGTTGTTTCTGGTGG 3' (r)	690
Cry7 geral Conservado	F 5' CTGAGGAGAATGGTTGGTATG 3' R 5' TCGCTTGTGTTCCGTTGTC 3'	606
Cry7 geral LGBBA	F 5' TAGAAATAGGCGAAACAGAAGG 3' R 5' CCCTCATTGTTTGGACTTGC 3'	358
Cry8 Geral Conservado	F 5' CCGATCTTATAAATGCAGTTC 3' R 5' GCTTCTAAATCTTGTCCG 3'	499
Cry9 geral Conservado	F 5' GCATTGAAATAAGGATAGG 3' R 5' AACCGATAGATAATTTCCACC 3'	479
Cry9 geral LGBBA	F 5' GGACCTTACAAACACGATTAC 3' R 5' AATAAACTTCTTGACCAGC 3'	416
Cry35Aa Conservado	F 5' CAAAGTGATAATGGAAAGG 3' R 5' TACCTCCTCCTACTTCTGG 3'	496
Cry35Ba Conservado	5' AACTGATGAAATACCTGAAG 3' (d) 5' TCAACAATAAATCCTACAGC 3' (r)	585

(d) direito; (r) reverso

Para a otimização das reações de PCR utilizadas neste trabalho, utilizou-se como ponto de partida a reação e ciclo que estão descritos abaixo:

As reações de amplificação para estes iniciadores foram conduzidas em um volume de 20 μL contendo: 20 ng de DNA molde; 250 μM de uma solução de dNTPs (10 mM); 2,0 mM de MgCl_2 ; 0,4 μM de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada grau Milli-Q previamente esterilizada (q.s.p. 20 μL). Os reagentes foram misturados até completa homogeneização e, em seguida, 18 μL da mistura foram distribuídos em placas esterilizadas para PCR, com 96 poços. As amostras de DNA de cada isolado foram distribuídas num volume de 2 μL (20 ng) em cada poço da placa contendo a “mix” (mistura dos reagentes). Em todos os lotes de reação foi realizado um controle negativo na qual a quantidade de DNA foi substituída por água grau Milli-Q, previamente esterilizada.

As reações de amplificações foram realizadas em aparelho termociclador (PTC-100) (“Programmable Thermal Controller” – MJ Research, inc.), equipado com circuito “Hot Bonnet”, regulado para 35 ciclos de cada reação, onde as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 94°C, aneladas aos iniciadores por 45 s a 41°C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 60s a 72°C. Os isolados padrões de *B. thuringiensis*, já caracterizados molecularmente, foram utilizados como controle positivo e as reações sem adição de DNA como controle negativo.

Após as amplificações, 15 μL de cada amostra foram misturados a 2 μL de tampão da amostra (0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) e aplicados em gel de agarose 1,5%, contendo brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e submetidos a eletroforese horizontal por 2 horas a 80 V constante.

O sistema foi conduzido em tampão TEB 1x (Tris 89 mM; EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM, pH 8,3) também adicionado Brometo de Etídeo (0,5 µg/mL). O marcador de peso molecular utilizado foi 1 Kb Plus DNA Ladder da GIBCO/BRL. Os fragmentos foram visualizados sob luz UV em equipamento de fotodocumentação Gel-Doc 2000 (Bio-Rad).

3.6 Obtenção de larvas de *S. levis*

Os insetos usados no experimento foram obtidos a partir de coletas em cultura de cana-de-açúcar, na Fazenda Iracema, pertencente ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), situado em Piracicaba, SP. Para a coleta foram utilizadas armadilhas atrativas formadas por toletes de cana crua de um metro cada, agrupadas em valas abertas (1 m x 1 m) entre as linhas da cultura (PRECETTI e TERÁN, 1983).

A Figura 5 demonstra os insetos que foram coletados diariamente até atingir quantidade suficiente para compor a criação massal em laboratório e mantidos em recipientes de plástico (13 cm de largura, 13 cm de comprimento e 20 cm de altura) com a tampa furada e vedada com tecido fino “voile”, sendo alimentados com pedaços de colmo de cana-de-açúcar até a realização dos experimentos.

As larvas foram obtidas de criação massal em laboratório, cedidas pelo CTC e mantidas em dieta artificial (Tabela 3).



Figura 5. Criação massal de adultos de *S. levis*.

Tabela 3. Ingredientes e medidas utilizados para o preparo da dieta artificial para as larvas *S. levis* (DEGASPARI et al., 1987).

<i>Ingredientes</i>	<i>Quantidade</i>
Caseína	125,0 g
Sais de Wessom	35,0 g
Açúcar	76,0 g
Germe de trigo	108,0 g
Bagaço de cana-de-açúcar	30,0 g
Ácido Ascórbico	15,0 g
Wintonylom	2,5 mL
Caragenato	90,0 g
Solução Vitamínica	35,0 mL
Solução KOH	18,0 mL
Solução B	53,0 mL
Solução B	
Nipagim	70,0 g
Ácido Ascórbico	70,0 g
Álcool 70%	500,0 mL
Solução KOH	11,2 g
Água destilada	200,0 mL

3.7 Bioensaio

Os isolados de *B. thuringiensis* utilizados no bioensaio, fazem parte da coleção de isolados mantida no LGBBA, os quais são caracterizados como coleóptero-específicos.

Para a realização do bioensaio, partiu-se de 45 isolados de *B. thuringiensis*, previamente caracterizados pela técnica de PCR mais três isolados utilizados como padrão (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *morrisoni* e var. *tolworthi*) e testemunha. Tanto os 45 isolados quanto os isolados padrão apresentaram amplificação com iniciadores correspondentes aos genes *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35*, descritos como codificadores de proteínas com atividade inseticida para coleóptero-específicas.

Os isolados desta coleção estavam estocados na forma de fitas de papel filtro, impregnadas com uma suspensão de esporos, em tubos esterilizados com tampa, devidamente etiquetados e mantidos a 15 °C, conforme descrito anteriormente.

Para o preparo da suspensão esporo/cristal, os isolados de *B. thuringiensis*, incluindo as isolados padrão, foram cultivados em placa de Petri com meio de cultura Agar Nutriente e incubados a 28 °C, durante cinco dias, permitindo, assim, a completa esporulação e liberação dos cristais. Após este período, todo conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubo Falcon com 15,0 mL de capacidade contendo 10 mL de água grau Milli-Q autoclavada e 0,05% de Tween (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada em aparelho do tipo Vórtex e a partir desta, foram feitas duas diluições seriadas, sendo a primeira 10^{-1} e a segunda 10^{-2} . A diluição seriada 10^{-2} foi utilizada para a

contagem de esporos em microscópio óptico com auxílio da Câmara de Neubauer para a padronização a uma concentração de (3×10^8) esporos + cristal/mL, constituindo a suspensão testada no bioensaio (ALVES e MORAES, 1998).

Uma alíquota de 150 μ L de suspensão de *B. thuringiensis*, na concentração de (3×10^8) esporos + cristais, foi aplicada em 6 mL da dieta artificial, previamente distribuídos em 20 tubos de ensaio de fundo “chato” (Figura 6). Após a total impregnação da suspensão bacteriana nas dietas, as larvas de *S. levis* de segundo ínstar foram acondicionadas, individualmente, dentro de cada tubo de ensaio. Os bioensaios foram realizados com 20 larvas por tratamento sendo que cada larva foi considerada uma repetição.



Figura 6. Distribuição da suspensão de *B. thuringiensis*

No lote correspondente às testemunhas aplicou-se água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados. Os tratamentos permaneceram em temperatura ambiente, e as avaliações foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação da toxina de *B. thuringiensis* (Figura 7).



Figura 7. Panorâmica dos tratamentos avaliados aos sete dias após a aplicação da toxina de *B. thuringiensis*.

Para as análises estatísticas foi criada uma matriz de mortalidade e sobrevivência indicando por 0 (não mortalidade) e 1 (mortalidade) para cada uma das 20 repetições de cada tratamento. O conjunto de dados foi dividido em três grupos de acordo com a mortalidade de cada tratamento: BAIXA (0 a 7 mortes), MÉDIA (8 a 14 mortes) e ALTA (15 a 20 mortes). A caracterização e qualidade desses grupos foram determinadas utilizando-se de técnicas estatísticas conhecidas por análise discriminante e análise de agrupamento, que foram processadas utilizando a distância euclidiana como medida de semelhança e o método de Wards como estratégia de agrupamento (HAIR, 2005). As análises foram feitas utilizando-se do programa computacional STATISTICA, versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização Morfológica dos isolados de *B. thuringiensis*

Através da microscopia com contraste de fases foi confirmado que todos os isolados utilizados eram pertencentes à espécie *B. thuringiensis*, devido às características morfológicas visualizadas, inerentes a essa espécie, como células vegetativas, esporos e cristais (HABIB e ANDRADE, 1998).

4.2 Caracterização molecular

Na Tabela 4 estão presentes as seqüências, o tamanho em pares de bases e os números referentes aos isolados que apresentam amplificação com os iniciadores *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35*, os quais os caracterizam como coleópteros-específicos. O conteúdo das subclasses estudadas para os genes *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35*, os quais amplificaram fragmentos de DNA homólogos aos genes *cry* estudados, foi determinado para 45 isolados, o que representa apenas 3,9 % do total de isolados utilizados nesse estudo.

Os iniciadores foram elaborados no LGBBA com o “software” Gene Runner e revelaram padrões de amplificação distintos, proporcionando fragmentos visíveis para cada gene entre os diferentes isolados de *B. thuringiensis*. Na Figura 8, estão os produtos amplificados com o iniciador *Cry35Ba Conservado*, o qual apresentou produtos de amplificação no tamanho esperado, 585 pares de bases (pb).

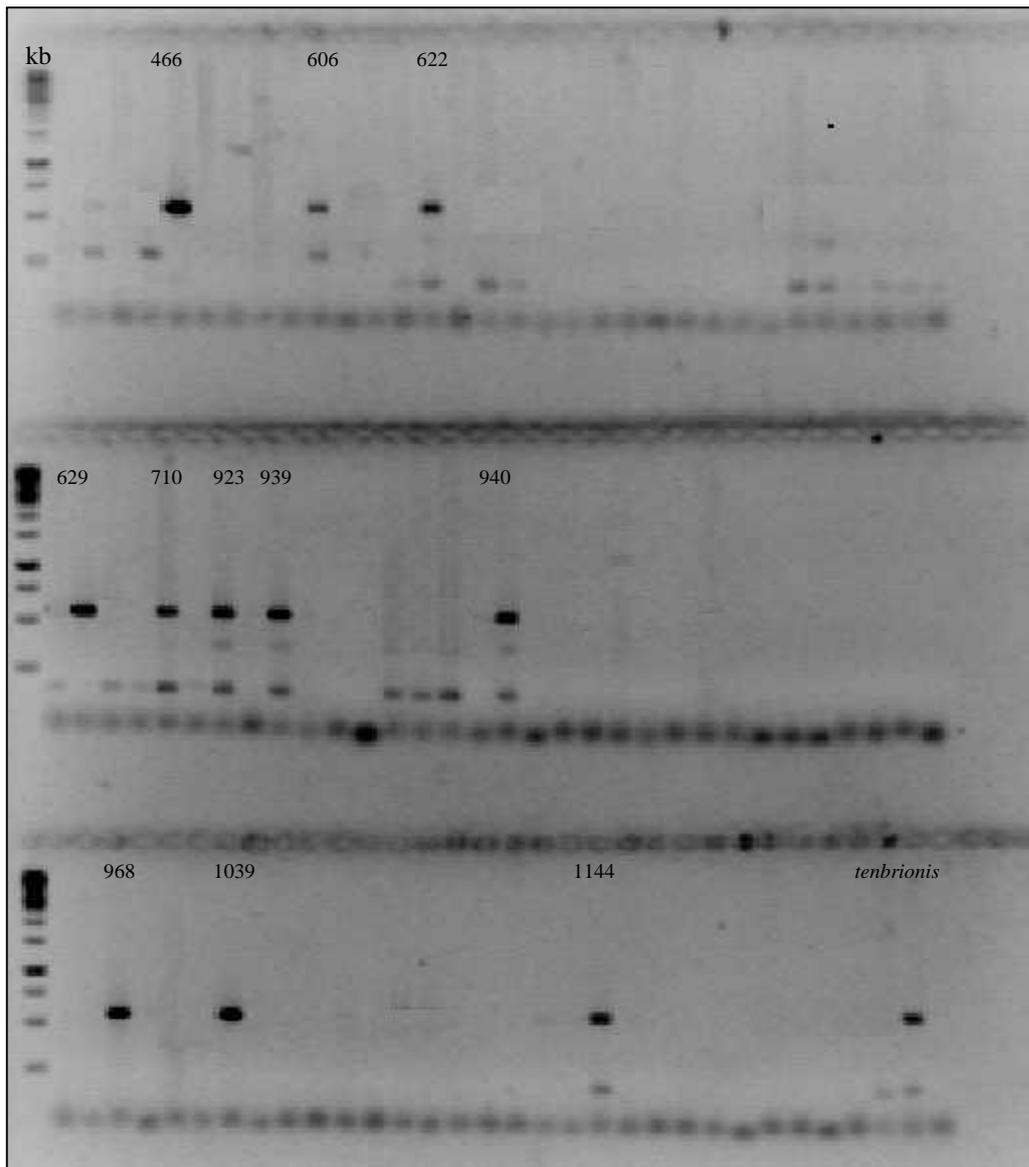


Figura 8. Eletroforograma dos produtos obtidos por PCR para isolados de *B. thuringiensis* com fragmentos amplificados para o iniciador geral Gral cry35 Ba conservado (585 pb).

Tabela 4 – Iniciadores elaborados pelo LGBBA e utilizados nas reações de PCR.

Iniciadores	Seqüências	pb	Isolados amplificadas
Cry3Aa LGBBA	5' AGATGAAGAGGGTATGTGTAGC 3' (d) 5' GAACTCATACATCGTCATTGGG 3' (r)	641	89, 93, 97, 99, 101, 106, 107, 115, 116, 121, 124, 129, 142, 147, 154, 177, 178, 187 e var. <i>tenebrionis</i>
Cry3Ba Conservado	F 5' ACTTACGCAACAATACTGAC 3' R 5' TAGGTTAGTGGTTGAAGCATAG 3'	1030	750 e var. <i>tenebrionis</i>
Cry3Bb Conservado	5' TACGCAACAATACTGACC 3' (d) 5' TCATCTGTTGTTCTGGTGG 3' (r)	690	583 e var. <i>tolworthi</i>
Cry7 geral Conservado	F 5' CTGAGGAGAATGGTTGGTATG 3' R 5' TCGCTTGTGTTCCGTTGTC 3'	606	788, 906, 921, 1108 e var <i>tolworthi</i>
Cry7 geral LGBBA	F 5' TAGAAATAGGCGAAACAGAAGG 3' R 5' CCCTCATTTGTTGGACTTGC 3'	358	913, e var. <i>tolworthi</i>
Cry8 Geral Conservado	F 5' CCGATCTTATAATGCAGTTC 3' R 5' GCTTCTAAATCTTGTCCG 3'	499	689, 912, 1101 e var. <i>morrissone</i>
Cry9 geral Conservado	F 5' GCATTGAAATAAGGATAGG 3' R 5' AACCGATAGATAATTTCAAC 3'	479	915, 918, 1100 e var. <i>tenebrionis</i>
Cry9 geral LGBBA	F 5' GGACCTTACAAACACGATTAC 3' R 5' AATAAACTTCTTGACCAGC 3'	416	704, 1110 e var. <i>tenebrionis</i>
Cry35Aa Conservado	F 5' CAAAGTGATAATGAAAAGG 3' R 5' TACCTCCTCCTACTTCTGG 3'	496	706 e var. <i>morrissone</i>
Cry35Ba Conservado	5' AACTGATGAAATACCTGAAG 3' (d) 5' TCAACAATAAATCCTACAGC 3' (r)	585	466, 606, 622, 629, 710, 923, 939, 940, 968, 1039, 1144 e var. <i>morrissone</i>

(d) direito; (r) reverso.

4.3 Teste de Patogenicidade

No presente trabalho foram testados em bioensaio 45 isolados de *B. thuringiensis*, quanto as subclasses dos genes *cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry9* e *cry35* (coleóptero-específicos) que apresentaram produto de amplificação para os genes da Ordem Coleoptera, três isolados padrão *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *morrisoni*, var. *tolworthi* e testemunha.

Durante os bioensaios, os sintomas observados nas larvas que se alimentaram da dieta contendo a toxina de *B. thuringiensis* foram: redução ou parada alimentar e não desenvolvimento das larvas. Não foi observada a mudança de ínstar (ocorrido provavelmente devido à inanição). As larvas ficaram moribundas com pouca mobilidade e, finalmente, morreram devido a uma infecção generalizada. Esses sintomas estão coerentes com aqueles já descritos por MONNERRAT e BRAVO, (2000); HABIB e ANDRADE, (1998).

Os isolados de *B. thuringiensis* causaram níveis variados de mortalidade e para uma melhor discussão dos resultados foi feita uma classificação da mortalidade em três grupos com base nos valores expressos pela patogenicidade, onde foi possível, através da análise multivariada discriminante, discriminar os isolados com maior e/ou menor grau de efetividade.

De acordo com REIS, (1988); MARCUS, (1990) e HAIR et al. (2005), as funções discriminantes obtidas são combinações de variáveis que melhor discriminam grupos definidos previamente. Assim, considerando a matriz de sobrevivência e morte das larvas, foram estimadas as funções discriminantes que confirmaram a divisão dos isolados em três grupos conforme resultados descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Classificação dos isolados segundo análise discriminante dos grupos de BAIXA, MÉDIA e ALTA mortalidade de larvas de *S. levis*.

	Classificação (%)	BAIXA (19,60%)	MÉDIA (66,67%)	ALTA (13,72%)
BAIXA	90,00	9	1	0
MÉDIA	100,00	0	34	0
ALTA	100,00	0	0	7
TOTAL	98,04	10	35	7

Dos nove isolados que formam o grupo de baixa mortalidade, apenas um isolado foi classificado pela função discriminante como pertencente ao grupo de média mortalidade. Quanto aos 34 isolados pertencentes ao grupo de média de e aos sete de alta mortalidade, foram 100% classificados corretamente pelas funções discriminantes. O teste Wilks'Lambda ($p < 0,0047$) comprovou a diferença entre os grupos de baixa, média e alta mortalidade. Na Figura 9 têm-se a distribuição dos isolados conforme a divisão em três grupos pelas funções discriminantes.

Na Tabela 6 estão apresentados a divisão pelas funções discriminantes (alta, média e baixa) e a procedência da maioria dos isolados, sendo que os melhores isolados testados em bioensaio em larvas de *S. levis*, são provenientes da região de Minas Gerais.

Tabela 6. Avaliação da Mortalidade em larvas de *S. levis* aos 21 dias após a aplicação da toxina de *B. thuringiensis*.

Isolado	Local de Isolamento	Classificação dos isolados
var. <i>tenebrionis</i>	não identificado	MEDIA
var. <i>tolworthi</i>	não identificado	MEDIA
var. <i>morrisoni</i>	não identificado	BAIXA
89	Valcoop	MEDIA
93	Cotia-SP	MEDIA
97	Valcoop	ALTA
99	Valcoop	MEDIA
101	Valcoop	MEDIA
106	Valcoop	MEDIA
107	Trigo-solo Bela Vista	BAIXA
115	Bonazopolis	MEDIA
116	Bela Vista	MEDIA
121	Soja	MEDIA
124	Milho	MEDIA
129	Sul-Brasil	MEDIA
142	Silo-milho	MEDIA
147	Não identificado	BAIXA
154	Não identificado	MEDIA
177	Não identificado	MEDIA
178	Não identificado	MEDIA
187	Não identificado	MEDIA
466	Não identificado	BAIXA
583	Não identificado	MEDIA
606	Nova Alvorada-Ms	BAIXA
622	Gurolandia-SP	BAIXA
629	Eralia-MG	MEDIA
689	Patos de Minas-MG	ALTA
704	Presidente Olegário-MG	MEDIA
706	Presidente Olegário-MG	MEDIA
710	Presidente Olegário-MG	MEDIA
750	Viçosa - MG	ALTA
788	Eralia-MG	ALTA
906	Uberaba-MG	MEDIA
912	Uberaba-MG	MEDIA
913	Uberaba-MG	MEDIA
915	Uberaba-MG	MEDIA
918	Uberaba-MG	MEDIA
921	Uberaba-MG	ALTA
923	Teixeiras-MG	MEDIA
939	Teixeiras-MG	MEDIA
940	Uberaba-MG	MEDIA
968	Uberaba-MG	MEDIA
1039	Coqueiral-MG	BAIXA
1100	Coqueiral-MG	ALTA
1101	Coqueiral-MG	MEDIA
1108	Coqueiral-MG	MEDIA
1110	Coqueiral-MG	ALTA
1144	Jatai-GO	MEDIA

Quanto à efetividade média das repetições dos isolados foram encontrados os seguintes valores: 27,72% para o grupo considerado de BAIXA mortalidade

contendo duas testemunhas, sete isolados (107, 147, 466, 606, 622, 1039) e uma linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *morrisoni*. Conforme SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001 as testemunhas devem sempre conter menos de 10% de mortalidade de isolados o que comprova a qualidade as testemunhas neste estudo, pois ambas tiveram mortalidades inferior a 10%; 54,23% para o grupo considerado de MÉDIA mortalidade contendo as isolados padrões var. *tolworthi* e var. *tenebrionis* e as isolados pertencentes ao LGBBA, 89, 93, 99, 101, 106, 115, 116, 121, 124, 129, 142, 154, 177, 178, 187, 583, 629, 704, 706, 710, 906, 912, 913, 915, 918, 923, 939, 940, 968, 1101, 1108 e 1144 e 80,0% para o grupo de ALTA mortalidade contendo as sete isolados de *B. thuringiensis*, (97, 689, 750, 788, 921, 1100 e 1110).

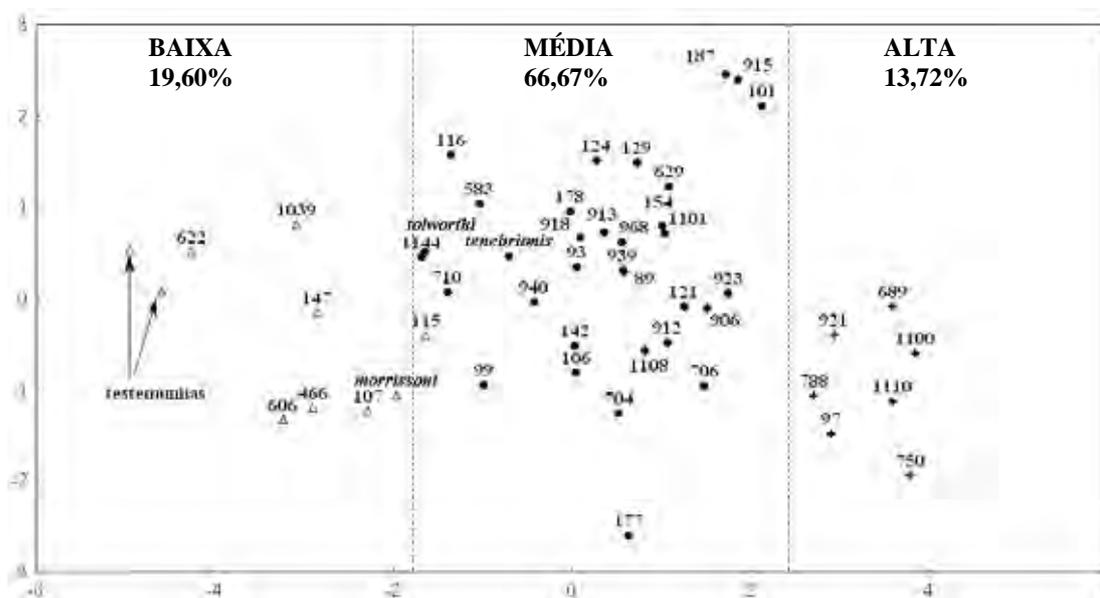


Figura 9. Distribuição dos 45 isolados e dos três isolados utilizados como padrão de *B. thuringiensis* em grupos, obtida da análise discriminante.

A análise multivariada discriminante é uma ferramenta importante na discriminação de grupos o que foi comprovado neste estudo, devendo ser utilizada

sempre em estudos de seleção de isolados em grandes bancos de bactérias entomopatogênicas, para as diferentes ordens de insetos. Dessa forma, os acervos poderão ter um pré-diagnóstico do material que possuem para a condução de novas pesquisas, tanto para formulação de novos bioinseticidas como, até mesmo, para outros trabalhos em engenharia genética.

Considerando os escores canônicos dos isolados gerados pela análise discriminante foi construído o dendrograma contido na Figura 10.

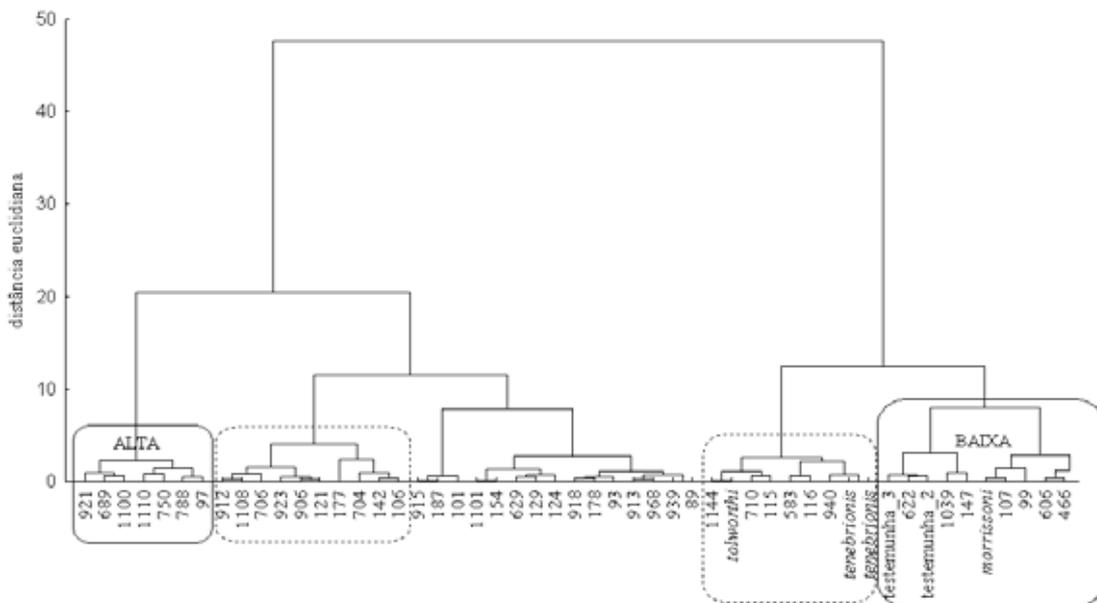


Figura 10. Dendrograma evidenciando a divisão em grupos dos isolados de *B. thuringiensis* a partir dos escores canônicos da análise discriminante

Observa-se a formação de dois grupos, sendo que nos extremos ficaram agrupados os isolados de ALTA e BAIXA mortalidade. No entanto, é possível observar que próximo ao grupo de alta mortalidade, existe uma tendência dos isolados (912, 1108, 706, 923, 906, 127, 177, 704, 142 e 106) a migrarem para

esse grupo, portanto, são isolados que também merecem uma atenção, podendo também ser utilizado em futuros bioensaios para confirmação da efetividade dos mesmos, enquanto que no grupo de baixa mortalidade, foi observada uma tendência dos isolados (1144, var. *tolworthi*, 710, 115, 583, 116, 940 e var. *tenbrionis*), a migrarem para o grupo de baixa efetividade, confirmando mais uma vez, a baixa efetividade dos isolados utilizados com padrão nesse bioensaio.

É importante ressaltar que, para os isolados com o mesmo conteúdo gênico, mas não com a mesma eficiência contra *S. levis*, poderia estar existindo ação sinérgica de outros genes que o produto da PCR não demonstrou, como também competindo pelo sítio receptor. 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).

Deve-se considerar que a técnica da PCR não permite afirmar se todos os genes estão sendo expressos nos isolados estudados, ou se algum está sendo bloqueado por ação de outro. Assim, o conteúdo genético destes isolados que causaram alta mortalidade precisam ser verificados mais detalhadamente para afirmar quais são as toxinas envolvidas ou mesmo se a população de *S. levis* é suscetível.

A caracterização molecular através da técnica de PCR proporciona uma resposta rápida sobre a presença e ausência de genes *cry*, mas não detecta se os genes são expressos ou não. Assim, um gene detectado pode estar interrompido, mutado ou sob controle de um promotor defectivo, 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 de bioensaio é a estratégia mais importante para definir a toxicidade de um isolado de *B. thuringiensis* e, dessa forma, selecionar o isolado com maior efetividade para o controle da praga.

Este trabalho demonstrou ser promissor no controle de *S. levis*, uma vez que esses isolados de *B. thuringiensis* continuarão a ser avaliados, buscando-se pesquisas futuras, conhecimentos sobre a expressão das proteínas e seus respectivos genes codificadores. Conhecidos os genes, estes poderão ser clonados e expressados em cultivares de cana-de-açúcar numa tentativa de controlar o *S. levis*, que é um inseto endofítico e de difícil combate por métodos convencionais.

5. CONCLUSÕES

Deve-se ter sempre a associação de bioensaios e caracterização molecular para a seleção de novos isolados efetivos contra insetos.

Os ensaios apresentados neste trabalho mostraram que dos 45 isolados pertencentes ao LGBBA, testados nos bioensaios, sete são isolados que possuem alto potencial para o controle do bicudo da cana-de-açúcar, cujos resultados foram superiores aos utilizados como padrão (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, var. *morrisoni* e var. *tolworthi*) recomendados para o controle de insetos da ordem Coleoptera.

As análises multivariadas discriminantes mostraram ser poderosas ferramentas que devem ser utilizadas na classificação de coleções de bactérias entomopatogênicas, como é o caso dos isolados de *B. thuringiensis*.

6. REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, L. C. Bicudo da cana-de-açúcar. **Boletim Técnico C. T. C.**, Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, p. 1-3, 2005.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ,1998. 1163p.

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

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W. & DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens, **Microbiology Review**, 50: 1-24, 1986.

AUGUSTYNIAK, J.; DABERT, M.; WYPIJEWSKI, K. Transgenes in plants: protection against viruses and insects. **Acta Physiologia Plantarum**, Lund, v.19, n.4, p. 561-569, 1997.

AZEVEDO, J. L. Controle microbiano de insetos-praga e seu melhoramento genético. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.69-93.

BADILLA, F. F.; ALVES, S. B. Patogenicidade de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Isolado 447 ao gorgulho da cana-de-açúcar *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera Curculionidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., 1989, Belo Horizonte. **Resumos**.... Belo Horizonte, 1989. p.257.

BARELA, J. F. **Seletividade de herbicidas para cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) afetada pela interação com nematicidas aplicadas no plantio.** 2005. 82p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BARLOY, F.; LECADET, M.; DELECLUSE, A. Cloning and sequencing of three new putative toxin genes from *Clostridium bifermentans* CH18. *Gene*: 211: 293-299, 1998.

BARTON, K.; WHITELEY, H. R.; YANG, N. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidoteran insects. **Plant Physiology**, v.85, p. 1103 - 1109, 1987.

BASTOS, E. **Cana-de-açúcar, o verde mar de energia.** São Paulo: Ed. Ícone, 1987. 130p.

BAUER, L. S. Resistance: a threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Fl. Entom.**, v. 78, n. 3, p. 414-443, 1995.

BAUER, M. E., BOETHEL, D. J. Effect of Bt-cotton expressing Cry1A(c) on the survival and fecundity of two hymenopteran parasitoids (Baconidae, Encyrtidae) in the laboratory. **Biological Control**, v. 26, n.3, p.325-332, 2003.

BEN-DOV, E.; WANG, O.; ZARITSKY, A.; MANASHEROB, R.; BARAK, Z.; SCHNEIDER, B.; KHAMRAEV, A.; BAIZHANOV, M.; GLUPOV, V.; MARGALITH, Y. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology.**, 65(8): 3714-3716, 1999.

BENINTENDE, G.; MARQUEZ, A. Bactérias Entomopatógenas. In: LECUONA, R. E. **Microrganismos Patógenos Empleados em el Control Microbiano de Insectos Plaga**. cap. 4, Argentina, 1996. 337p.

BERHNARD, K. et al. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v.70, p.59-68, 1997.

BERLINER, E. Uber die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift fur angewandte Entomologie**, n.2, p.29-56, 1915.

BERNSTEIN, I. L. et al. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. **Environ. Health Perspect.**, v. 107, n. 7, p.575-582, 1999.

BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v.32, p.156-173, 2000.

BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34. p.843-850, 2003.

BOBROWSKI, V.L. et al. Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.105-109, 2001.

BOTELHO, P. S. M.; DEGASPARI, N.; ARAUJO, S. M. S. S.; ARAUJO, J. R & ALMEIDA, L. C. Ciclo biológico do *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), praga da cana-de-açúcar, em dieta artificial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., 1983, Brasília, Resumos... Brasília: 1983. p. 004.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal Bacteriology**. 170:3575-3583, 1988.

BRADLEY, D.; HARKEY, M. A.; KIM, M.-K.; BREVER, D.; BAUER, L. S. The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *Thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *Journal Invertebrate Pathology*. 65: 162-173, 1995.

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**, v.64, p.4965-4972, 1998.

BROWN, K. L. & WHITELEY, H. R. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. **Journal Bacteriology**. 174: 549-557, 1992.

BURKNESS, E. C.; HUTCHISON, W. D.; WEINZIERL, R. A.; WEDBERG, J. L.; WOLD, S. J.; SHAW, J. T. Efficacy and risk efficiency of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for Lepidopteran pest management in the Midwestern US. **Crop Protection**, v.21, n.2, p.157-169, 2002.

CAROZZI, N. B. et al. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Applied. Environ. Microbiol.**, v. 57, p. 3057-3061, 1991.

CASTRO, P. R. C. & KLUGE, R.A. ; EDS. . **Ecofisiologia de culturas extrativas**. Cosmópolis: Stoller, 2001. 138 p.

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

COSTA, C., VANIN S.A. & CASARI-CHEN, S.A. **Larvas de Coleoptera do Brasil**. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, vi + 282p., 165 est., 1988.

CRICKMORE N., ZEIGLER D. R., E. SCHNEPF, J. VAN RIE, D. LERECLUS, J. BAUM, A. BRAVO, AND D. H. DEAN. 2005. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [online] http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. (acessado em 14 Janeiro de 2008).

CRICKMORE N., ZEIGLER D.R., FEITELSON J., SCHNEPF E., VANRIE J., LERECLUS D., BAUM J., DEAN D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus*

thuringiensis pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 62:807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em: 26 nov. 2002.

DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W. P. & IANY, C. S. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Molecular Microbiology**. 4(12): 2087-2094, 1990.

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

DEACON, J. W. Microbial control of plant pests and disease. Aspects of Microbiology, nº.7. **American Society of Microbiology**, Washington, DC., 1983.

DEGASPARI, N.; BOTELHO, P. S. M.; ALMEIDA, L. C.; CASTILHO, H. J. Biologia de *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Col.: Curculionidae), em dieta artificial e no campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 6, p. 553-558, 1987.

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

DONOVAN, W. P., GONZALEZ, J. G., JR., GILBERT, M. P. & DANKOCSIK, C. Isolation and characterization of EG 2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. **Mol. Gen.** 214: 365-372. 1988.

DULMAGE, H. (1982) ***B. thuringiensis Cultures Available from the U.S.D.A.***, USDA/ARS/ARM-S-30, Brownsville, TX 78520.

ELLIS, R. T.; STOCKHOFF, B. A.; STAMP, L.; SCHNEPF, H. E.; SCHWAB, G. E.; KNUTH, M.; RUSSELL, J.; CARDINEAU, G. A.; NARVA, K. E. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Appl. Environ. Microbiol.** 68(3), 1137-1145, 2002.

ELY, S. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins, p.105-124 In: P. Entwistle, J. S.; CORY, M. J.; BAILEY & S. HIGGS (ed.), ***Bacillus***

thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U. K. p.37-69. 1993.

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

FAHL, J.I.; CAMARGO, N.B.P.; PIZZINATTO, M.A.; BETTI, J.A.; MELO, A.M.T.; DEMARIA, I.C. & FURLANI, A.M.C. (eds.). Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas , **Boletim 200**, ed. 6, IAC, 396p. 1998.

FISCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; MCCORMICK, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**, v. 5, p. 807 - 813, 1987.

FIUZA, L.M., et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidea): evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.5, p.1544-1549, 1996.

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

GCEA - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Abril 2007. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 29 abr 2007.

GESELL, S. G. Billbugs.1983. Disponível em: <http://www.ento.psu.edu/extension/fact_sheets.htm>. Acesso em 8 jan.2006.

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

GONZÁLES, J. M. J. ; BROWN, B. S.;CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 79, p. 6951-6955, 1982.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE. C. F. S. Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. In S.B. Alves (ed.), **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p. 1998.

HAIDER, M.Z. Y D.J. ELLAR. Characterization of the toxicity and cytophatic specificity of a cloned *Bacillus thuringiensis* crystal protein using insect cell culture. **Mol. Microbiol.** 1, 59-66. 1987.

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

HALL, D. G. Insects and mites associated with sugarcane in Florida. Florida Entomologist, Florida, v. 71, n. 2, p. 138-150, 1988.

HANSEN, B.M. & SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.41-64.

HAYES, W. P. The maize billbug or elephant bug (*Sphenophorus maidis* Chittn.). Technical Bulletin, Kansas State Printing Plant, Kansas, v. 6, p. 1-27, 1920.

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, n.3, p.1085-1089, 2001.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, p.242-255, 1989.

HORI, H.; SUZUKI, N.; OGIWARA, K.; HIMEJIMA, M.; INDRASITH, L. S.; MINAMI, M.; ASANO, S.; SATO, R.; OHBA, M.; IWAHANA, H. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. **Journal Applied Bacteriology**. 76:307-313, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. www.ibge.gov.br. (acessado em: 05/03/2007).

JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops: 2000. **ISAAA Briefs**, ISAAA, Ithaca, n.21, p.45, 2000.

JANSENS, S.; VAN VLIET, A.; DICKBURT, C; BUYSSE, L.; PIENS, C.; SAEY, B.; DE-WULF, A.; GOSSELE, V.; PAEZ, A.; GOEBEL, E.; PEFEROEN, M. Transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. **Crop Science**. 37:1616-1624, 1997.

JOUANIN L.; BONADE-BOTTINO M.; GIRARD C.; MORROT G.; GIBAND M. Transgenic plants for insect resistance – review. **Plant Science**, Shannon, v.131, p.1-11, 1998.

JUÁREZ-PÉREZ, V. M., FERRANDIS, M. D. & FRUTOS, R., 1997, PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Applied Environmental Microbiology**, 63: 2997-3002.

KALMAN, S.; KIEHNE, J. L.; LIBS, J. L.; YAMAMOTO, T. Cloning of a novel *cry1C* type gene from a strain of *B. thuringiensis* subsp *galleriae*. **Applied Environmental Microbiology**., 04: 1131-1137, Vol. 59, No. 4, 1993.

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

KRIEG A., HUGER A. M., LANGENBRUCH G. A., SCHNETTER W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. *Zeitschrift fur Ang. Entomology*., 96, 500-508. 1983.

KRONSTAD, J.W.; SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Diversity of locations for *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.154, n.1, p.419-428, 1983.

KUO, W. A.; CHARK, K. F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, n.4, p. 1369-1377, 1996.

KUSCHEL, G. A phylogenetic classification of Curculionoidea to families and subfamilies. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 14:5-33, 1995.

LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSENS, S.; SOETAERT, P.; PEFFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2536-2542, 1992.

LECADET, M.M. et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiol.*, v.86, p.666-72, 1999.

LEITE, L. G.; MACHADO, L. A.; AMBRÓS, C. M. & TAVARES, F. M. O uso de nematóides entomopatogênicos no controle de pragas da cana-de-açúcar. Ribeirão Preto: **Biocontrol**, 2006 (Boletim Técnico).

LEMOS, M. V. F. & ALVES, L. M. C. . Methodology for fast evaluation of *Bacillus thuringiensis* crystal protein content. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 31, p. 216-219, 2000.

LERECLUS, D.; BOURGOUIN, C.; LECADET, M.M.; KLIER, A. AND RAPOPORT, G. Role Structure, and Molecular Organization of the Genes Coding for the Parasporal d-Endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Regulation of Procaryotic Development. Issar Smith, Ralph A. Slepecky and Peter Setlow (Ed.). **American Society for Microbiology**, Washington, DC. 1989.

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

LI, J.; CARREL, J.; ELLAR, D. J. C rystal structure of insecticide delta-endotoxina from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, v.353 n.7, p.815-821,1991.

LIMA, G.A. **Cultura da cana-de-açúcar**. 159p. 1984.

LOGUERCIO, L. L.; SANTOS, C. G.; BARRETO, M. R.; GUIMARAES, C. T. & PAIVA, E. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Letters in **Applied Microbiology.**, 32: 362-367, 2001.

MALUE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA, G. B. Produtividade Agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, n.2, p. 295-301, 2001.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. de. **Controle biológico**. Jaguariúna : Embrapa-CNPMA, 264 p, 1998.

MIOCQUE, J. Y. J. & MACHADO JR., G. P. R Review of sugarcane varieties and breeding in Brazil. **Sugarcane Journal**, v. 23, p.9-13, 1977.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência**. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, Vol. 3, p.163-200, 2000.

MORAES, I. O.; CAPALBO D. M. F. & ARRUDA, R. O. M. Produção de bactérias entomopatogênicas, in ALVES, S. B (Ed.) **Controle microbiano de insetos**, Piracicaba, FEALQ/USP , 1998. 1163p.

MULLIS, K. B. & FALLONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzimol.** v. 155, p. 335-350, 1987.

NUNES JR, D. M. S. Variedades de cana-de-açúcar. In: Paranhos, S. B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. São Paulo: Fundação Cargill, 1987. 856p. cap.2 v.1, p.187-259.

OECD, 2001. **Transgenic plants registration**. <<http://www.oecd.gov>>. Acesso em 20 dez. 2001.

OÍBRIEN, C. W. & WIBMER, G. J. The use of trend curves of rates of species descriptions: examples from the Curculionidae (Coleoptera). **The Coleopterists Bulletin** 33(2): 151-166. 1979.

ORDUZ, S.; REALPE, M.; ARANGO, R.; MURILLO, L. A.; DELECLUSE, A. Sequence of the cry11Bb11 gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. **Biochim. Biophys. Acta** 1388: 267-272, 1998.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 15, p.173-177, 1997.

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

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

PRECETTI, A. A. C. & ARIGONI, E. DE B. Aspectos bioecologicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera, Curculionidae) em cana-de-açúcar. **Boletim Técnico COPERSUCAR**, Cooperativa de Produtores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo, São Paulo, p. 3-15, 1990.

PRECETTI, A. A. C. & TERAN. F. O. Gorgulhos da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 e *Metamasius hemipterus* (L., 1765) (Col., Curculionidae). In: **REUNIÃO TÉCNICA COPERSUCAR**, 1983, Piracicaba, Reunião Técnica Agronômica... São Paulo: 1983. p.32-37.

PRIEST, F. G. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria**: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.1-22. 2000.

REIS, S. F. dos. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva.

Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v.5, n.4, p. 571-580, 1988.

RODRIGUES, R. Energia tipo exportação. *Jornal O Globo*. Rio de Janeiro, 30 jan.

2005. Caderno Economia.

ROS, P. B. 2004. **Avaliação da resistência de variedades de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira com base na taxa de colonização dos colmos por**

Leifsonia xyli* subsp. *xyli. 2004. 58f. Dissertação (mestrado), Piracicaba/SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 2004.

ROSSO, M. L.; DELECLUSE, A. Contribution of the 65-kilodalton protein encoded by the cloned gene Cry19a to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4449-4455, 1997.

RUUD, A. M.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trend in Plant Science**, v.4. n.1, p.9-13, 1999.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. Multiplicity of d-endotoxinas genes with different inseticidal specificities in *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, v.2, n.2, p.393-404.

1998.

SATO, R.; TAKEUCHI, K.; OGIWARA, K.; MINANI, M.; KAJI, Y.; SUZUKI, N.; HORI, H.; ASANO, S.; OHBA, M.; IWAHANA, H. Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain buibui toxic to scarabaeid insects. **Curr. Microbiol.** 28: 15-19, 1994.

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

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.78, p.2893-2897, 1981.

SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R. & DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Tibtech.**, v. 16, p.168-174, 1998.

SCHULER, T.H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.17, p.210-215, 1999.

SICK, A.; GAERTNER, F. H.; WONG, A. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi*. *Nucleic Acids Res.* 18: 1305-1305, 1990.

SIEGEL, J.P. The mammalian safety of *Bacillus thuringiensis* - based insecticides. *Journal of Invertebrate Pathology*, New York, v.77, p.13-21, 2001.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Circular Técnica nº 10 - Embrapa 4p, 2001.

SMITH, G. P.; MERRICK, J. D.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Mosquitocidal activity of the CryIC - endotoxin from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. *Appl. Environmental Microbiology*. 62:680-684, 1996.

STATSOFT, INC. STATISTICA (data analyses software system), version 7. São Caetano do Sul. Copyright statsoft, 2004.

SZMRECSANYI, T.; MOREIRA, E. P. O desenvolvimento da agroindústria canavieira do Brasil desde a segunda guerra mundial. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 5, n.11, p. 57-79, 1991.

TAMEZ-GUERRA, P.; GALÁN-WONG, L.J.; MEDRANO- ROLDÁN, H.; GARCIA-GUTIÉRREZ, C.; RODRIGUEZ-PADILLA, C.; GOMEZ-FLORES, R. A.; TAMEZ-

GUERRA, R.S. Bioinseticidas: su empleo, producción y comercialización en México. **Ciencia UANL**, v.4, p.143-152, 2001.

TERÁN, F. O. & PRECETTI, A. A. C. M. *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus*, como praga de cana-de-açúcar. **Boletim Técnico Copersucar**, São Paulo, 18: 24-6. 1982.

TERÁN. F. O. & PRECETTI, A. A. C. M. Flutuação populacional e outros aspectos bioecológicos de *Sphenophorus levis* e *Metamasius hemipterus* (Col., Curculionidae); pragas da cana-de-açúcar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 8., 1983, Brasília, Resumos... Brasília: 1983. p. 005.

TERÁN. F. O.; PRECETTI, A. A. C. M.; HENRIQUE, B. C. Desenvolvimento de armadilhas específicas para *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., 1986, Rio de Janeiro, Resumos... Rio de Janeiro: 1986. p.361.

VAECK, M. et. al. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, New York, v. 327, p. 33-37, 1987.

VALADARES-INGLIS, M. C.; SOUZA, M. T. & SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO,

J. L. de (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 208-217.

Van FRANKENHUYZEN K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. *Bacillus Thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice* (ed. by P F Entwistle, S Cory, M J Bailey & S Higgs), pp. 1–23. Wiley, Chichester, UK, 1993.

VAURIE, P. Revision of the genus *Sphenophorus* in South America. *American Museum Novitates*. New York, 2656: 1-30. 1970.

WOJCIECHOWSKA, J. A.; LEWITIN, E.; REVINA, L. P.; ZALUNIN, I. A. & CHESTUKHINA, G. G. Two Novel Delta-Endotoxin Gene Families *Cry26* And *Cry28* From *Bacillus Thuringiensis* Ssp. *Finitimus*. *FEBS Lett.* 453:46-48, 1999.

WOODRUFF. R. E. The hunting billbug, *Sphenophorus venatus vestitus* Chittenden, in *Sphenophorus venatus vestitus* Chittenden, in Florida (Coleoptera, Curculionidae). Flórida: Flórida Departament of Agriculture, 1966. p. 1-2
(Entomology Circular)

WRAIGHT, C.L.; ZANGERL, A. R.; CARROLL, M. & BERENBAUM, M. R. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.97, n.14, p.7700-7703, 2000.

WU, D.; CAO, X. L.; BAI, Y. Y & ARONSON, A. I. Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 65(1): 31-35, 1991.

XIA, J.Y., CUI, J.J., MA, L.H., DONG, S.X., & CUI, X.F. The role of transgenic Bt cotton in integrated insect pest management. **Acta Gossypium Symposium**, Pequim, v.11, p.57-64,1999.

YAMAMOTO, T. & DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pest. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria. From laboratory to field application. Netherlands. Kluwer **Academic Plubishers**, p. 81-100. 2000.

ZHANG, J., HODGMAN, T.C., KRIEGER, L., SCHNETTER, W.; H.V. SCHAIRER. Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. **Journal Bacteriology**. 179, 4336-4341. 1997.

ZOERB, A. C.; SPENCER, T.; HELLMICH, R. L.; WRIGHT, R. J. & SIEGFRIED, B. D. Larval distribution and survival of second generation European corn borer, *Ostrina nubilalis* (Hubner) (Lepdoptera: Crambidae) on Event 176 Bt Corn. **Crop Protection**, v. 22, n.1, p.179-184, 2003.