

# PROTEÍNAS BIOINSETICIDAS PRODUZIDAS POR BACILLUS THURINGIENSIS

GLÁUCIA MANOELLA DE SOUZA LIMA

*Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão, Pernambuco.*

---

## RESUMO

### PROTEÍNAS BIOINSETICIDAS PRODUZIDAS POR BACILLUS THURINGIENSIS

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica, que se caracteriza pela presença de inclusões cristalinas denominadas de  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry. Essas proteínas podem ser altamente tóxicas para insetos suscetíveis, não apresentando atividade para outros organismos. Nesta revisão são abordados aspectos relacionados com a variedade de proteínas produzidas por essa bactéria bem como o seu mecanismo de ação.

**Termos para indexação:** controle biológico de insetos, patologia de insetos, bacteriologia aplicada.

## ABSTRACT

### PROTEIN BIOINSECTICIDES PRODUCED BY BACILLUS THURINGIENSIS

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is a Gram positive, entomopathogenic bacteria that produces crystalline inclusions called  $\delta$ -endotoxins or Cry proteins. These proteins are highly toxic to susceptible insects, not showing activity against others organisms. This review report aspects of variability of proteins produced by these bacterium as well as the mode of action.

**Index terms:** biological control of insects, insect pathology, applied bacteriology.

## 1. INTRODUÇÃO

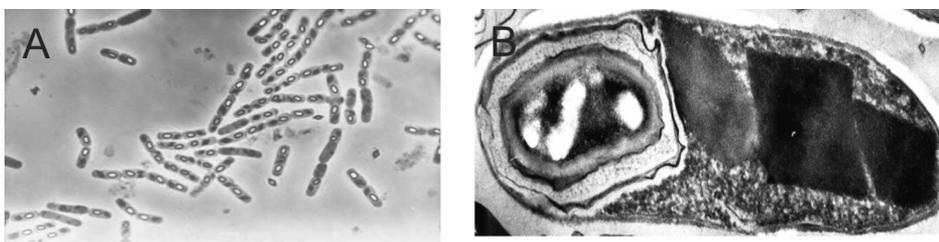
A busca por alternativas para tentar diminuir o uso de inseticidas químicos tem sido realizada em todo mundo com a finalidade de reduzir os impactos causados ao

meio ambiente por esses agentes que, além de poluir, causam desequilíbrio ecológico e promovem o surgimento de insetos resistentes (Estruch *et al.*, 1997).

Devido a essas restrições, o interesse por agentes biológicos para controle de insetos-praga e vetores de doenças tem aumentado. Dentre os bioinseticidas mais utilizados, *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria Gram-positiva, destaca-se como um agente favorável e seguro para o controle biológico de insetos por ser altamente específico e não apresentar atividade tóxica para mamíferos (Pang *et al.*, 1992; Schnepf *et al.*, 1998).

Essa bactéria é responsável por mais de 90% dos biopesticidas disponíveis em todo o mundo (Polanczyk & Alves, 2003). Estima-se que sejam aplicados, por ano, por volta de 13.000 toneladas de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (Hansen & Salamitou, 2000).

A atividade entomopatogênica do *B. thuringiensis* é devido à presença de inclusões cristalinas denominadas delta-endotoxinas ou proteínas Cry, que são produzidas na fase de estacionária e acumuladas no compartimento da célula mãe durante a esporulação, correspondendo a 25% do peso seco da célula (Figura 1) (Agaisse & Lereclus, 1995). Estas inclusões cristalinas podem conter uma ou mais proteínas Cry, que, por sua vez, apresentam um amplo espectro de ação, com atividade para diversas ordens de insetos (Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera), nematóides, ácaros e protozoários (Schnepf *et al.*, 1998).



**Figura 1.** — Microscopia de contraste de fase (A) e microscopia eletrônica (B) de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais, (e) esporos (adaptados de [www.futura-sciences.com/uploads/tx\\_oxcsfutura/comprendre/d/images/604/pintureau\\_03.jpg](http://www.futura-sciences.com/uploads/tx_oxcsfutura/comprendre/d/images/604/pintureau_03.jpg), e [www.ufrgs.br/laprotox/digestion-eng.htm](http://www.ufrgs.br/laprotox/digestion-eng.htm), respectivamente).

As proteínas Cry contidas no cristal, quando ingeridas pelo inseto suscetível, são solubilizadas pelo pH alcalino no intestino da larva e liberadas como pró-toxinas que serão ativadas por serino-proteases, formando toxinas ativas que se ligarão a receptores das microvilosidades intestinais. Após a ligação, as toxinas se inserem

na membrana formando poros e desestabilizando o gradiente osmótico levando à morte do inseto (Bravo *et al.*, 2007, de Maagd *et al.*, 2001, Schnepf *et al.*, 1998).

Uma das vantagens do uso dessa bactéria deve-se a atividade das suas toxinas serem específicas para insetos suscetíveis, sendo classificada como segura por ser inócua aos mamíferos, plantas e outros invertebrados. Esse fato torna *B. thuringiensis* excelente candidato para o controle de insetos, reduzindo o uso excessivo de agrotóxico que é prejudicial ao meio ambiente e a saúde do agricultor.

## 2. DIVERSIDADE DE TOXINAS PRODUZIDAS POR *B. THURINGIENSIS*

*B. thuringiensis* produz, além das proteínas Cry, várias toxinas com atividade inseticida dentre elas a  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas, VIPs (do inglês – “vegetative insecticidal proteins”) que podem atuar aumentando a toxicidade das  $\delta$ -endotoxinas. Além das toxinas, os esporos também podem contribuir com a patogenicidade através da ação sinérgica desempenhada junto com as proteínas Cry.

### 2.1. $\alpha$ -exotoxina

É uma enzima com atividade citolítica que age sobre os fosfolípidos presentes nas membranas celulares. É termolábil, solúvel em água, sendo altamente tóxica para alguns insetos, seja por administração oral ou intra-hemocélica, e também para ratos, causando degeneração e lise das células. Essa toxina também é conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase (Hansen & Salamitou, 2000).

### 2.2. $\beta$ -exotoxina

Esta toxina, também chamada de Thuringiensina, é produzida durante a fase vegetativa e secretada no meio de cultura. É termolábil, com baixa massa molecular. Existem dois tipos de  $\beta$ -exotoxinas: A toxina tipo I que é um análogo de ATP, composto por adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico (Farkas *et al.*, 1969). Sua atividade tóxica está relacionada com a inibição da RNA polimerase através da competição com ATP, apresentando um amplo espectro de toxicidade para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, provocando efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen & Salamitou, 2000); A toxina do tipo II é

um análogo de UTP e é mais tóxica que a do tipo I, principalmente para insetos da ordem Coleoptera (Levinson *et al.*, 1990). Devido a sua alta toxicidade frente a mamíferos, um dos critérios indispensáveis em alguns países para a produção comercial é a seleção de estirpes de *B. thuringiensis* que não produzam essa toxina (McClintock *et al.*, 1995).

### 2.3. Exoenzimas

*B. thuringiensis* produz um grande número de exoenzimas que desempenham um papel importante na patogenidade a insetos. Dentre as exoenzimas estão as quitinases e as proteases. Essas exoenzimas são liberadas pela bactéria e vão provocar ruptura da membrana peritrófica favorecendo o acesso das  $\delta$ -endotoxinas ao epitélio intestinal (Reddy *et al.*, 1998; Sampson & Gooday, 1998).

### 2.4. Proteínas vegetativas inseticidas (VIP)

Um grupo de proteínas denominadas VIP é produzido por algumas estirpes de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de crescimento e de esporulação (Estruch *et al.*, 1996). Essas proteínas são secretadas e não formam inclusões cristalinas, por esse motivo e também por não apresentarem homologia de seqüência ou de estrutura, as VIPs foram excluídas da nomenclatura das proteínas Cry (Schnepf *et al.*, 1998). O modo de ação dessas proteínas ainda não foi totalmente elucidado, sabe-se que a VIP3A une-se às células epiteliais do intestino médio do inseto provocando posteriormente, a lise celular. As manifestações tóxicas são semelhantes às que ocorrem com as proteínas Cry (Yu *et al.*, 1997). As proteínas VIPs apresentam uma massa molecular variando de 88 a 100 kDa e apresentam atividade contra insetos pouco sensíveis à maioria das proteínas Cry como *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua* e *Helicoverpa zea* (Yu *et al.*, 1997).

### 2.5. $\delta$ -endotoxina

Quando *B. thuringiensis* encontra-se em condições nutricionais desfavoráveis, a divisão celular é interrompida e inicia-se o processo de esporulação. Durante a fase de esporulação, ocorre a produção de inclusões cristalinas denominadas  $\delta$ -endotoxinas ou proteínas Cry (do inglês – “crystal”). Essas delta-endotoxinas vão sendo acumuladas no compartimento da célula-mãe. No final da esporulação,

o cristal é liberado juntamente com o esporo. Existem dois tipos de  $\delta$ -endotoxinas: as proteínas Cry e as proteínas Cyt. O espectro de ação das  $\delta$ -endotoxinas é normalmente restrito a uma determinada ordem de insetos, Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera ou nematóides e ácaros (Schnepf *et al.*, 1998). Essa bactéria pode produzir uma ou mais proteínas Cry com massa molecular variando de 40 a 140 kDa (Serafini *et al.*, 2002). A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das  $\delta$ -endotoxinas presentes, podendo apresentar-se nas formas bipiramidal, cubóide, ovóide, rombóide, esférico ou até mesmo sem uma forma definida (Habib & Andrade, 1998; Polanczyk & Alves, 2003).

As proteínas Cyt não apresentam homologia com as proteínas Cry, possuem atividade citolítica, apresentando afinidade para ácidos graxos insaturados na porção lipídica da membrana celular (Thomas & Ellar, 1983). As proteínas Cyt são constituídas pelos grupos Cyt1 e Cyt2, onde a classe Cyt1 apresenta três tipos: Cyt1Aa, Cyt1Ab e Cyt1Ba (Ward *et al.*, 1988; Thiery *et al.*, 1997), enquanto a classe Cyt2 possui cinco integrantes: Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca. Apresentam massa molecular de 27 – 30 kDa e todas são tóxicas para insetos da ordem Diptera. Além disso, a proteína Cyt2Ca apresenta também atividade contra insetos da ordem Coleoptera (Crickmore *et al.*, 1998).

### 3. CLASSIFICAÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM AS $\delta$ -ENDOTOXINAS

*B. thuringiensis* pode conter de um até dezessete elementos extracromossomais, com massa molecular entre 1 a 300 MDa (Carlson *et al.*, 1996). Os genes *cry*, que codificam as  $\delta$ -endotoxinas, estão localizados em plasmídeos. A maioria desses plasmídeos tem função atribuída à produção das inclusões cristalinas (Schnepf *et al.*, 1998).

O primeiro gene *cry* de *B. thuringiensis* foi clonado e seqüenciado em 1981 por Schnepf & Whiteley e desde então, o número de seqüências tem aumentado consideravelmente. Inicialmente, a caracterização desses novos genes não tinha uma nomenclatura adequada e os mesmos eram classificados de maneira arbitrária (Crickmore *et al.*, 1998), demonstrando a necessidade de uma padronização. Foi então que no final da década de 80, percebendo a necessidade de organizar melhor a nomenclatura desses genes, Höfte & Whiteley (1989) propuseram uma nomenclatura para os genes *cry*, onde a classificação dos genes era baseada na combinação de seqüências de aminoácidos e no espectro de atividade da proteína cristal. Os autores agruparam 14 tipos de genes diferentes, os quais foram distribuídos em

quatro classes que apresentavam atividade contra Lepidoptera (*cryI*), Lepidoptera e Diptera (*cryII*), Coleoptera (*cryIII*) e Diptera (*cryIV*) e uma quinta classe, *cytA*, que foi agrupada separadamente por não apresentar homologia de seqüência ou atividade tóxica com as outras classes (Tailor *et al.*, 1992; Crickmore *et al.*, 1998). À medida que novos genes foram isolados e caracterizados, começaram a observar que o sistema de classificação de Höfte & Whiteley não era muito eficiente, uma vez que não era possível acomodar nessas diferentes classes os genes que apresentavam seqüências de aminoácidos similares, porém, não mostravam toxicidade com o mesmo espectro de ação. Foi então que em 1998, Crickmore *et al.* apresentaram uma nova classificação baseando-se apenas nas relações entre as seqüências de aminoácidos. Nessa nova proposta, a classificação é feita pelo nome da toxina (Cry ou Cyt) seguido de número (números romanos foram trocados por arábicos para comportar melhor o grande número de novas proteínas), letra maiúscula, letra minúscula e número (ex: Cry2Aa4) dependendo da sua localização na árvore filogenética (de Maagd *et al.*, 2001). Até o momento, já foram descritos mais de 400 genes *cry* e agrupados em 67 grupos de proteínas Cry (Cry1 a Cry67) ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt\\_toxins2.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt_toxins2.html)) (atualizado em 13/09/2010).

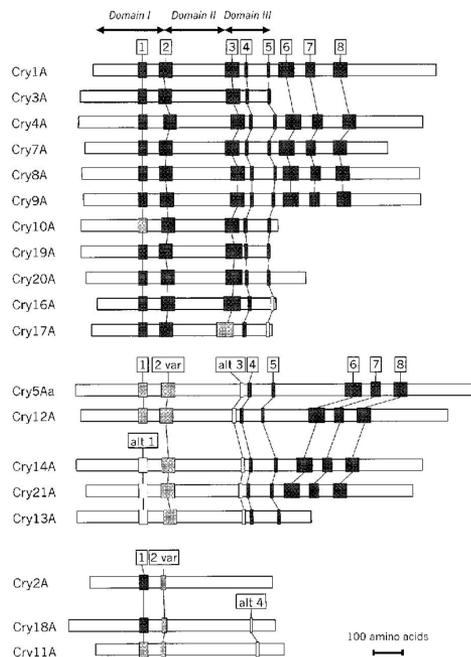
#### 4. ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS CRY DE B. THURINGIENSIS

A maior parte das  $\delta$ -endotoxinas apresentam-se como uma pró-toxina com massa molecular variando de 130–140 kDa, que para serem ativadas devem ser processadas por proteases do intestino médio dos insetos, liberando um fragmento entre 55–65 kDa (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989). A pró-toxina possui duas regiões distintas: uma porção amino-terminal, normalmente variável e que está associada à toxicidade, e uma porção carboxi-terminal, mais conservada entre as proteínas, relacionada geralmente à formação do cristal (Chestukhina *et al.*, 1982).

Experimentos realizados com genes trucados na região 5' ou 3' revelaram que a região do DNA necessária para a síntese da proteína tóxica é a partir do códon 29 ao 607 ou 615. Além disso, a proteína truncada mantém a especificidade tóxica da  $\delta$ -endotoxina nativa. O papel do domínio carboxi-terminal dessas proteínas está relacionado com a estrutura, formação e solubilização do cristal. Essa hipótese é mantida pela presença de resíduos de cisteína localizados na porção C-terminal, responsáveis pelas pontes dissulfeto que mantêm as proteínas juntas e estáveis na inclusão cristalina (Höfte & Whiteley, 1989; Lereclus *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).

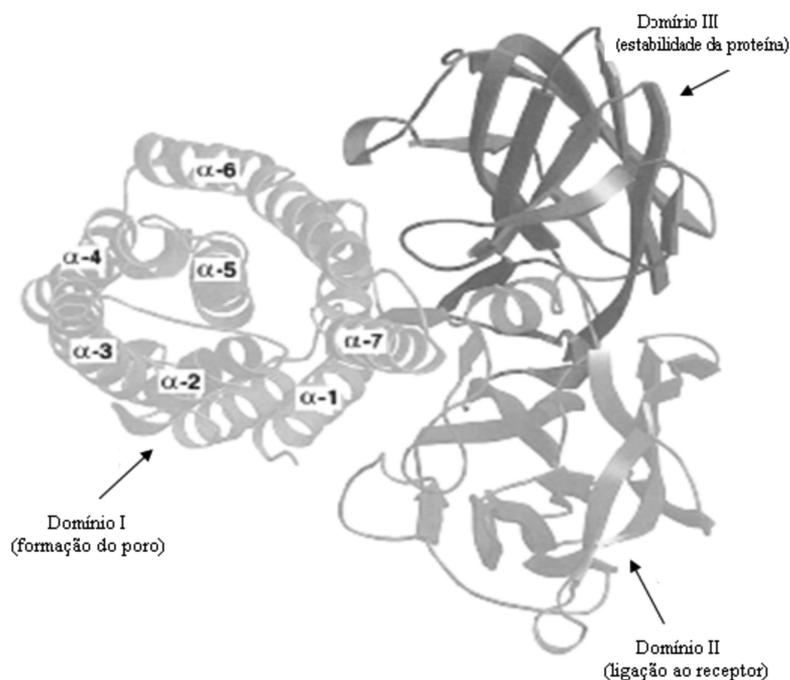
Höfte & Whiteley (1989), analisaram algumas regiões que são altamente conservadas entre as proteínas Cry e, após o alinhamento de seqüências de aminoácidos, revelaram a presença de cinco blocos conservados na região que codifica a toxina. Schnepf *et al.* (1998) descreveram outros três blocos localizados na região da pró-toxina. Esses resultados são importantes para comprovar a função biológica dessas proteínas e também sugerem que as proteínas Cry formam famílias com blocos similares e mecanismos de ação semelhantes (Monnerat & Bravo, 2000).

Na figura 2, é possível distinguir os três grupos de proteínas Cry. O primeiro é formado pelas proteínas Cry1, Cry3, Cry4, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry16, Cry17, Cry19 e Cry20 que apresenta os cinco blocos conservados na porção tóxica. O segundo contém Cry5, Cry12, Cry13, Cry14 e Cry21 que se caracteriza por ter regiões homólogas aos blocos 1, 2, 4 e 5, apresentando uma variante do bloco 2 e ausência do bloco 3. O terceiro grupo é composto pelas proteínas Cry2, Cry11 e Cry18 que possui o bloco 1 conservado e apresenta uma variante truncada do bloco 2 e não apresenta os blocos 3, 4 e 5 (Lereclus *et al.*, 1989; Schnepf *et al.*, 1998).



**Figura 2.** — Posição dos blocos conservados entre as proteínas Cry. Os retângulos em preto, cinza claro e branco indicam, respectivamente, alto, moderado ou baixo grau de homologia entre os blocos (Schnepf *et al.*, 1998).

A partir da estrutura tridimensional da proteína Cry3A, foi determinado que estas moléculas estão organizadas em três domínios (Li *et al.*, 1991). O domínio I N-terminal é composto por 7  $\alpha$ -hélices onde uma hélice central ( $\alpha$ 5 – hidrofóbica) está rodeada por outras 6  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Estudos realizados com a toxina Cry3Bb, tóxica para insetos da ordem Coleoptera, mostraram que o domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro (Prieto-Samsónov *et al.*, 1997). Os domínios II e III são formados principalmente por folhas  $\beta$ . O domínio II contém três folhas  $\beta$  antiparalelas dispostas ao redor de um núcleo hidrofóbico (Aronson & Shai, 2001). O domínio III C-terminal, também chamado de  $\beta$  – prisma consiste de duas folhas  $\beta$  antiparalelas. Os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Além disso, o domínio III pode estar relacionado com a estabilidade estrutural da toxina e na formação do poro (de Maagd *et al.*, 2001) (Figura 3).



**Figura 3.** — Representação da estrutura tridimensional da toxina Cry. (A) Toxina Cry3A. A toxina apresenta três domínios. O domínio I está envolvido na inserção na membrana e formação de poro, os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. O domínio III é também responsável pela estabilidade da proteína (Adaptado de Aronson & Shai, 2001).

## 5. MECANISMO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY

As proteínas Cry apresentam-se como pró-toxinas e para desencadear efeitos tóxicos necessitam ser ativadas por proteases. O modo de ação dessas proteínas envolve uma série de etapas (solubilização e processamento da toxina, ligação ao receptor, inserção na membrana e citólise) que se inicia a partir do momento que o cristal e o esporo são ingeridos pela larva suscetível (Schnepf *et al.*, 1998).

A solubilização da pró-toxina ocorre em pH alcalino no intestino médio da maioria das larvas de insetos suscetíveis (Lepidoptera, Diptera e alguns insetos Coleoptera) (Knowles, 1994). Diferenças na solubilização podem contribuir para determinar as alterações no grau de toxicidade entre as proteínas Cry (Aronson *et al.*, 1991).

Após a solubilização, muitas pró-toxinas são processadas por proteases que estão presentes no intestino médio do inseto, liberando o fragmento tóxico (Tojo & Aizawa, 1983). A proteína Cry1A (130 – 140 kDa), após a digestão, é clivada nos primeiros 28 resíduos da extremidade N-terminal e nos últimos 500 resíduos da extremidade C-terminal liberando um fragmento de 55 – 65 kDa. A clivagem proteolítica é um fator importante que pode contribuir para determinar a especificidade; a principal protease digestiva de Lepidoptera e Diptera é serino-protease, enquanto que para Coleoptera são principalmente cisteíno e aspártico-proteases (de Maagd *et al.*, 2001).

Alguns autores sugerem que o mecanismo de resistência desenvolvido no inseto está relacionado com a redução de solubilidade e proteases envolvidas (Aronson *et al.* 1991). Esse fato deve-se a diferenças presentes no intestino dos insetos. Haider & Ellar (1989), mostraram que dependendo da enzima proteolítica presente, uma pró-toxina pode ser clivada em uma toxina ativa para lepidópteros ou dípteros. Os autores chegaram a esta conclusão após tratamento de uma proteína de 130 kDa tóxica para dípteros e lepidópteros de *B. thuringiensis* sorovar *aizawai* com extrato de intestino médio do lepidóptero *Pieris brassicae*. A toxina, após o tratamento, mostrou-se tóxica para ambas as larvas de *P. brassicae* e *Aedes aegypti*. Porém, quando ativada por proteases do intestino de larvas de *A. aegypti*, a toxina ativa apresentava toxicidade apenas para larvas de dípteros.

Após serem ativadas, as proteínas Cry ligam-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades das células colunares do intestino médio das larvas de insetos suscetíveis, sendo um fator importante para a toxicidade e especificidade

das  $\delta$ -endotoxinas (de Maagd *et al.*, 2001). Até o momento foram descritos quatro receptores que estão situados na superfície das células intestinais de larvas da ordem Lepidoptera. Uma aminopeptidase N (APN), que está ancorada à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma proteína do tipo caderina, uma proteína glicoconjugada de 270 kDa e uma fosfatase alcalina ancorada à GPI. O GPI é suscetível à ação de uma fosfatase C específica endógena do inseto e permite sua união com a toxina de maneira específica. Em lepidópteros, a Cry1A se liga a APN de 120 kDa e as proteínas do tipo caderina (Bt-R1) de 210 kDa. As caderinas e as APN interagem de modo consecutivo com diferentes estruturas da toxina. Inicialmente, a toxina ativa se liga a caderina provocando a primeira modificação conformacional onde expõe a região da  $\alpha$ -hélice para ser clivada por proteases da membrana. Após a clivagem ocorre a formação de um complexo pré-poro (na forma de um tetrâmero) (Bravo *et al.*, 2007). Este oligômero se liga a APN, que está ancorada a membrana pela sua ligação ao GPI, e em seguida, ocorre a inserção da toxina ativa na membrana de forma irreversível e induzindo a abertura ou formação de poros que provocam uma quebra no balanço osmótico da célula e conseqüente lise celular (Knowles & Ellar, 1987; Knowles *et al.*, 1994). A etapa de união aos receptores é importantíssima para determinação do espectro de ação das delta-endotoxinas e tem sido alvo de vários estudos (Bravo *et al.*, 2007).

A intoxicação nos insetos da ordem Lepidoptera manifesta-se por uma paralisação imediata do tubo digestivo e peças bucais, levando à lise celular e à interrupção da alimentação. As células colunares e caliciformes são destruídas e propiciam a entrada dos esporos que germinam (Du & Nickerson, 1996), conduzindo à lise do intestino médio, inanição e posterior septicemia, levando o inseto à morte (Daí & Gill, 1993; Monnerat & Bravo, 2000).

## 6. CONTROLE BIOLÓGICO UTILIZANDO *B. THURINGIENSIS*

A utilização de microrganismos vem se destacando com uma alternativa para o controle de insetos-praga nocivos à saúde e à agricultura. Os bioinseticidas são agentes mais seguros por não poluírem o meio ambiente e não causarem danos à saúde do aplicador como os agrotóxicos. Dessa forma, representam uma alternativa sustentável que visa contribuir na manutenção do equilíbrio biológico.

*B. thuringiensis* é o principal agente do controle biológico de insetos, sendo responsável por aproximadamente 1% do mercado mundial de inseticidas (Navon, 2000). Dentre os bioinseticidas utilizados, *B. thuringiensis* é responsável por

aproximadamente 90% do faturamento mundial. A aplicação de *B. thuringiensis* é por volta de 13.000 toneladas por ano, gerando um mercado anual de 60 a 90 milhões de dólares (Hansen & Salamitou, 2000; Gitahy *et al.*, 2006).

Essa bactéria é considerada um agente seguro devido à sua alta especificidade aos insetos-alvo, sendo inócuo aos mamíferos e vertebrados e por não poluir o meio ambiente. (Polanczyk & Alves, 2003). Experimentos *in vivo* realizados utilizando altas concentrações da proteína Cry em outros organismos, que não são insetos, não demonstraram nenhuma alteração na atividade, comprovando a inocuidade dos mesmos aos demais organismos (Shimada *et al.*, 2003). Esse fato torna *B. thuringiensis* excelente candidato para o controle de insetos, reduzindo o uso excessivo de agrotóxico que é prejudicial ao meio ambiente e a saúde do agricultor.

Essas características influenciaram no desenvolvimento de uma formulação de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (Whiteley & Schnepf, 1986; Vilarinhos *et al.*, 1998). A primeira formulação foi produzida na França em 1938 e desde então mais de 100 formulações já foram colocadas no mercado mundial (Polanczyk & Alves, 2003; Polanczyk, 2004).

O bioinseticida à base de *B. thuringiensis* com maior aplicação é o Dipel®, à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Essa estirpe foi selecionada para a produção do bioinseticida porque apresentou toxicidade até 200 vezes superior às cepas utilizadas nos outros produtos comerciais. O Dipel® é altamente eficiente para mais de 170 lepidópteros-praga, sendo pouco tóxico para insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Hymenoptera, e algumas espécies de ácaros (Dulmage, 1970; Glare & O'Callaghan, 2000).

Devido às vantagens do uso do *B. thuringiensis* como agente de controle biológico, aumentaram nos últimos anos o número de estirpes isoladas e a busca por outras cepas mais tóxicas é crescente no mundo inteiro (Monnerat *et al.*, 2001). A descoberta de linhagens bacterianas com amplo espectro de ação é de extrema importância para o desenvolvimento de novos bioinseticidas contra diferentes insetos-praga, reduzindo a probabilidade dos mesmos desenvolverem resistência.

A preocupação em criar e manter coleções de *B. thuringiensis* é importante para a caracterização de novas  $\delta$ -endotoxinas que sejam eficazes contra diversas ordens de insetos e também contra outros invertebrados, nematóides e protozoários. Estima-se que existam mais de 40.000 isolados de *B. thuringiensis* em coleções espalhadas pelo mundo (Miralles & Pérez, 2004).

Na década de 80, a manipulação genética se tornou uma importante ferramenta

molecular no estudo de combinações de proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* em um único produto (Navon, 2000). A capacidade de transferência de genes em *B. thuringiensis* torna possível o uso de proteínas recombinantes com melhores características permitindo melhorar a atividade, o rendimento e a estabilidade, expressando vários genes de toxinas dessa bactéria, gerando novos produtos ativos. As modificações genéticas obtidas em estirpes de *B. thuringiensis* são: cura plasmidial, conjugação, transformação, recombinação e construções de proteínas híbridas (Navon, 2000; Céron, 2004).

Existem vários relatos de que combinações de proteínas exibem uma atividade sinérgica contra pragas aumentando o espectro de ação (Crickmore *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996). Um dos exemplos dessa manipulação é o produto Foil®, da cepa EG2424, que produz as proteínas Cry1Ac e Cry3A exibindo toxicidade para lepidópteros e coleópteros (Gawron–Burke & Baum, 1991.).

Um outro processo que permitiu o controle de insetos–praga foi a inserção de genes *cry* de *B. thuringiensis* em plantas (Adang *et al.*, 1993). Gheysen *et al.* (1987), foram os primeiros a relatar a introdução de genes da  $\delta$ –endotoxina em plantas de tabaco produzindo grandes quantidades de proteínas para o controle de larvas de *Manduca sexta*. Vários trabalhos demonstram a importância das plantas transgênicas expressando genes de *B. thuringiensis* como ferramenta no manejo integrado de pragas (Vaeck *et al.*, 1987; Koziel *et al.*, 1993; Pielcher *et al.*, 1997; Kota *et al.*, 1999).

A introdução de genes *cry* em plantas com interesse econômico representa uma boa estratégia para o controle de insetos–praga (Betz *et al.* 2000, De cosa *et al.* 2001). A proteína Cry2Aa é tóxica para vários insetos–praga tais como *H. armigera* and *H. punctigera* (Lião *et al.*, 2002), *Plutella xylostella* (Tabashnik *et al.*, 1993) e *S. frugiperda* (Greenplate *et al.*, 2003). Kota *et al.* (1999) construíram plantas transgênicas Cry1Ac e Cry2Aa e mostraram que a expressão de Cry2Aa em cloroplasto de folhas transgênicas de tabaco resultou em 100% de mortalidade de *H. virescens*, *H. zea* e *S. exigua* resistentes a Cry1Ac. Portanto, devido à diferença na estrutura e atividade inseticida das proteínas Cry1 e Cry2A, as proteínas Cry2A.

O algodão Bt, ou seja, o algodão geneticamente modificado que contém gene da bactéria *B. thuringiensis* já vem sendo comercializado em todo o mundo. Segundo a Cotton Advisory Board (2008), na Índia houve um aumento de 50% no uso de algodão Bt, reduzindo dessa forma as aplicações de inseticida.

Outra alternativa para o controle biológico, principalmente de pragas de difícil controle, como é o caso da *Diatrea saccharalis*, que se alimenta do tecido interno da

planta, é o uso de bactérias endofíticas transgênicas. Salles *et al.* (2000), relataram a expressão de gene *cry3A* em bactéria diazotrófica (*Gluconoacetobacter diazotrophicus* BR11281 e *Herbaspirillum seropedicae* BR11335) que se mostraram eficientes vetores, sendo capazes de colonizar endofiticamente os tecidos das plantas, permitindo controlar as pragas que se alimentam dos tecidos internos.

Outra estratégia envolvendo os genes *cry* é a possibilidade de expressão em organismos recombinantes heterólogos. Vários grupos têm inserido no genoma do baculovírus genes *cry* na forma intacta, truncada ou fusionada à poliedrina, principal proteína produzida pelo baculovírus (Merryweather *et al.*, 1990; Pang *et al.*, 1992; Ribeiro & Crook, 1993, 1998; Martens *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2003; Martins, 2005, 2008; Aguiar, 2006, 2007; Corrêa, 2007; Lima *et al.*, 2008; Lima, 2009).

Lima (2009) expressou genes *cry2Aa* e *cry11A* de *B. thuringiensis* no genoma do baculovírus AcMNPV e as proteínas recombinantes expressas, Cry2Aa e Cry11A, apresentaram toxicidade para larvas de lepidóptero e díptero, respectivamente. O uso de baculovírus como vetor de expressão permite estudar proteínas Cry isoladamente, ou em associação com outras proteínas, podendo contribuir para o desenvolvimento de bioinseticidas mais potentes e menos suscetíveis ao aparecimento de resistência nos insetos-alvo.

A manipulação de genes *cry* oferece uma alternativa para melhorar a sua eficácia e a persistência da proteína no meio ambiente, eliminando certas características indesejáveis dos cristais tais como rápida degradação quando expostos a radiação ultravioleta, instabilidade na água e a incapacidade no controle de insetos que se alimentam do tecido interno da planta (Navon, 2000; Salles *et al.*, 2000).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANG, M.J., BRODY, M.S., CARDINEU, G., EAGAN, N., ROUSH, R.T., SJHEWMAKER, C.K., JONES, A., OAKER, J.V. & McBRIDE, K.E. The reconstruction and expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIII gene in protoplasts and potato plants. *Plant Mol.Biol.* 21:2329–2342. 1993.

AGAISSE, H. & LERECLUS, D. Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII gene is not dependent on sporulation specific sigma factor and is increased in a spoOA mutant. *J. Bacteriol.* 176: 4734–4741. 1994.

AGAISSE H. & LERECLUS D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology* 177:6027–6032. 1995.

AGUIAR, R.W.S., MARTINS, E.S., VALICENTE, F.H., CARNEIRO, N.P., BATISTA, A.C., MELATTI, V.M, MONNERAT, R.G. & RIBEIRO, B.M. A recombinant truncated Cry1Ca protein is toxic to lepidopteran insects and forms large cuboidal crystals in insect cells. *Current Microbiology* 53:287–292. 2006.

AGUIAR, R.W.S. Estudo da toxicidade de proteínas (Cry) recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto. (Tese de doutorado). Brasília. Universidade de Brasília. 2007.

ARONSON, A.I. Flexibility in protoxins composition of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letter* 117: 21–28. 1994.

ARONSON, A.I, HAN, E., MCGAUGHEY, W. & JOHNSON, D. The solubility if the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is depend upon protoxin composition and is a factoring toxicity to insects. *Applied and Environmental Microbiology* 57:981–986. 1991.

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

BETZ, F.S., HAMMOND, B.G. & FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pest. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 15:375–380. 2000.

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

CARLSON, C.R., JOHANSEN, T., LECADDEC, M.M. & KOLSTØ, A.B. Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1719–1725. 1996.

CÉRON, J. Productos Comerciales: Nativos y recombinantes In: Bravo, A. & Ceron, J. (Eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá, Colombia, 2004. pp.127–147.

CHANG, J.H., CHOI, J.Y., JIN, B.R., ROH, J.Y., OLSZEWSKI, A., SEO, S.J., O'REILLY, D.R. & JE, Y.H. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *Journal of Invertebrate Pathology* 84:30–37. 2003.

CHESTHUKINA, G.G., KOSTINA, I.I., MIKHAILOVA, A.I., TYURIN, S.A., KLEPIKOVA, F.S. & STEPANOV, V.M. The main features of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin structure. *Archives of Microbiology* 132: 159–162. 1982.

CORRÊA, R.F.T. Estudo da atividade tóxica para *Aedes aegypti* das proteínas Cry4Aa e Cry4Ba de *Bacillus thuringiensis* expressas em baculovírus recombinantes. (Dissertação de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. 2007.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J. & DEAM, D.H. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62:807–813. 1998.

De COSA, B., MOAR, W., LEE, S.B., MILLER, M. & DANIELL, H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology* 19:71–74. 2001.

de MAAGD, R.A., BRAVO, A. & CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genetic* 17:193–199. 2001.

DAI, S.M. & GILL, S.S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis CryIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochemical and Molecular Biology* 23: 273–283. 1983.

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

DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of HD–1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. *Journal Invertebrate Pathology* 15:232–239. 1970.

ESTRUCH, J.J., CAROZZI, N.B., DESAI, N., NICHOLAS, B., DUCK, N.B., WARREN, G.W. & KOZIEL, M.G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15:137–141. 1997.

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

FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLIJS, J. & SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 34: 1118–1120. 1969.

GAWRON–BURKE, C. & BAUM, J.A. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria. *Genetic Engennerinf.* 13:237–263. 1991.

GHEYSEN, G., VAN MONTAGU, M. & ZAMBRYSKI, P. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T–DNA) involves rearrangements of target plant sequences. *Proceedings of the National Academy Science* 84:6169–6173. 1987.

GITAHY, P.M., GALVÃO, P.G., SIMÕES DE ARAÚJO, J.L. & BALDANI, J.I. Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. Série Documentos n.124. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. 2006.

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

GREENPLATE, J.T., MULLINS, J.W., PENN, S.R., DAHM, A., REICH, B.J., OSBORN, J.A., RAHN, P.R., RUSCHKE, L. & SHAPPLEY, Z.W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. *Journal of Applied Entomology* 127:340–347. 2003.

HABIB, M.E.M. & ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (ed) Controle microbiano de insetos. Piracicaba. FEALQ. 1998. pp.383–446.

HANSEN, B.M. & SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: Charles, J.F., Delecluse, A. & Nielsen–Le Roux, C. (eds). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherland. Kluwer Academic Publishers. 2000. pp.41–44.

HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Review* 53:242–255. 1989.

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal  $\delta$ -endotoxins. *Advances in insect Physiology* 24: 275–308. 1994.

KNOWLES, B.H. & ELLAR, D.J. Colloid–osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin with different insect specificity. *Biochemical and Biophysical Acta*. 924: 509–518. 1987.

KOTA, M., DANIELL, H., VARMA, S., GARCZYNSKI, S.F., GOLD, F. & MOAR, W. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proceedings of the National Academy Science* 96:1840–1845. 1999.

KOZIEL, M.G., BELAND, G.L., BOWMAN, C., CAROZZI, N.B., CRENSHAW, R., CROSSLAND, L., DAWSON, J., DESAI, N., HILL, M., KADWELL, S., LAUNIS, K., LEWIS, K., MADDOX, D., MCPHERSON, K., MEGHJI, M.R., MERLIN, E., RHODES, R., WARREN, G.W., WRIGHT, M. & EVOLA, S.V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing and insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11:194–200. 1993.

LEE, M.K., CURTIS, A., ALCANTARA, E. & DEAN, D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac on the gypsi moth, *Lymantria dispar*. *Applied Environmental Microbiology* 62:583–586. 1996.

LERECLUS, D., BOURGOUIN, C., LECADET, M.M., KLIER, A. & RAPOPORT, G. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. In: Smith, I., Slepecky, R.A. & Setlow, P. (eds) Regulation of prokaryotic development: structural and functional analysis of bacterial sporulation and germination. Washington. American Society for Microbiology. 1989. pp.255–276.

LEVINSON, B.L., KASYAN, K.J., CHIU, S.S., CURRIER, S. & GONZALEZ JR., J.M. Identification of  $\beta$ -exotoxin production, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *Journal of Bacteriology* 172: 3172–3179. 1990.

LI, J., CARROLL, J. & ELLAR, D.J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815–821. 1991.

LIÃO, C., HECKEL, D.G. & AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. *Journal of Invertebrate Pathology* 80:55–63. 2002.

LIMA, G.M.S. Toxinas recombinantes Cry2Aa e Cry11A de *Bacillus thuringiensis* expressas em células de inseto são tóxicas para larvas de Lepidoptera e Diptera. (Tese de doutorado). Brasília. Universidade de Brasília. 2009.

LIMA, G.M.S., AGUIAR, R.W.S., CORRÊA, R.F.T., MARTINS, E.S., GOMES, A.C.M., NAGATA, T., DE SOUZA, M.T., MONNERAT, R.G. & RIBEIRO, B.M. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cell are toxic to two lepidopteran insects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2941–2948. 2008.

MARTENS, J.W., HONÉEE, G., ZUIDEMA, D., VAN LENT, J.W.M., VISSER, B. & VLAK, J.M. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. *Applied and Environmental Microbiology* 56:2764–2770. 1990.

MARTENS, J.W., KNOESTER, M., WEIJTS, F., GROFFEN, S.J., HU, Z., BOSH, D. & VLAK, J.M. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 66:249–257. 1995.

MARTINS, E.S. Clonagem, expressão e análise da patologia de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga. (Dissertação de Mestrado). Brasília. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. 2005.

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

McCLINTOCK, J.T., SCHAFFER, C.R. & SJOBLAD, R.D. A comparative review of mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Journal of Pest Science* 45: 95–105. 1995.

MERRYWEATHER, A.T., WEYER, U., HARRIS, M.P.G., HIRST, M., BOOTH, T. & POSSEE, D. Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 delta-endotoxin. *Journal of General Virology* 71:1535–1544. 1990.

MIRALLES, M.P. & PÉREZ, V.J. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: Bravo, A. & Ceron, J. (Eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bogotá. Colombia. 2004. pp.207–232.

MOAR, W.J., TUMBLE, J.T., HICE, R.H. & BACKMAN, P.A. Insecticidal activity of the CryIIA protein from NRD–12 isolate *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and leaf-colonizing strain of *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 60: 896–902. 1994.

MONNERAT, R.G. & BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo, J. L. (ed). Controle Biológico. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 3:163–200. 2000.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection– reality and prospects. Crop Protection 19:669–676. 2000.

PANG, Y., FRUTOS, R. & FEDERICI, B.A. Synthesis and toxicity of full length and truncated bacterial CryIVD mosquitocidal proteins expressed in lepidopteran cells a baculovirus vector. Journal of General Virology 73:89–101. 1992.

PIELCHER, C.D., RICE, M.E. & OBRYCKI, J.J. Field and laboratory evaluations of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn on secondary lepidopteran pests (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 90:669–678. 1997.

POLANCZYK, R.A. Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda*. (Tese de Doutorado). Piracicaba. ESALQ. 2004.

POLANCZYK, R.A & ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. Agrociência 7:1–10. 2003.

PRIETO–SAMSÓNOV, D.S., VÁZQUEZ–PÁDRON, R.I., AYRA–PARDO, C., GONZÁLEZ–CABRERA, J. & RIVA, G.A. *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology 19:202–219. 1997.

REDDY, S.T., KUMAR, N.S. & VENKATESWERLU, G. Comparative analysis of intracellular proteases in sporulates *Bacillus thuringiensis* strains. Biotechnology Letter 20:279–281. 1998.

RIBEIRO, B.M. & CROOK, N.E. Expression of full length and truncated forms of crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in baculovirus and pathogenicity of the recombinant viruses. Journal of Invertebrate Pathology 62:121–130. 1993.

RIBEIRO, B.M. & CROOK, N.E. Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length cry1Ab and cry1Ac genes from *Bacillus thuringiensis*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31:763–769. 1998.

SALLES, J.F., GITAHY, P.M., SKOT, L. & BALDANI, J.I. Use of endophytic diazotrophic

bacteria as a vector to express the cry3A gene from *Bacillus thuringiensis*. Brazilian Journal of Microbiology 31:154–160. 2000.

SAMPSON, M.N. & GOODAY, G.W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. Microbiology 144:2189–2194. 1998.

SCHNEPF, H.E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R. & DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Review 62:775–806. 1998.

SERAFINI, L.A., BARROS, N.M. & AZEVEDO, J.A. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul. EDUCS. 2002.

TAILOR, R., TIPPET, J., GIBB, G., PELLIS, S., PIKE, D., JORDAN, L. & ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Molecular Microbiology 6:1211–1217. 1992.

THIERY, I., DELECLUSE, A., TAMAYO, M.C. & ORDUZ, S. Identification of a gene for Cyt1A-like hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and expression in a crystal-negative *B. thuringiensis* strain. Applied and Environmental Microbiology 63:468–472. 1997.

THOMAS, W.E. & ELLAR, D.J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. Journal of Cell Science 60:181–197. 1983.

TOJO, A. & AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. Applied and Environmental Microbiology 45:576–580. 1983.

VAECK, M., REYNAERTS, A., HÖFTE, H., JANSENS, S., BEUKELLER, M., DEAN, C., ZABEAU, M., Van MONTAGU, M. & LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328:33–37. 1987.

VILARINHOS, P.T.R., DIAS, J.M.C.S. & ARAÚJO-COUTINHO, C.J.P.C. Uso de bactérias para o controle de Culicídeos e Simulídeos. In: Alves, S.B (ed). Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba. FEALQ. 1998. pp.447–480

WHITELEY, H.R. & SCHNEPF, H.E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annual Review in Microbiology 40:549–576. 1986.

YU, G.G., MULLINS, M.A., WARREN, G.W., KOZIEL, M.G. & ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Applied and Environmental Microbiology 63:532–536. 1997.