

ÁREAS BÁSICAS

IDENTIFICAÇÃO DE GENES *CRY* DE *BACILLUS THURINGIENSIS* NO CONTROLE DE *SPHENOPHORUS LEVIS*, O BICUDO DA CANA-DE-AÇÚCAR ⁽¹⁾

ELAINE APARECIDA SILVA CÍCERO ⁽²⁾; ANTONIO SERGIO FERRAUDO ^(3*);
MANOEL VICTOR FRANCOLEMO ⁽²⁾

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* e *cry35* e determinar a patogenicidade contra *Sphenophorus levis*, uma das mais importantes pragas da cultura da cana-de-açúcar. Foram utilizados 1163 isolados de *B. thuringiensis* e com a observação em microscópio com contraste de fases foram confirmadas como pertencentes à espécie de *B. thuringiensis*. O material genético foi purificado pela matriz de troca iônica "Instagene Matrix" e submetido a PCR com iniciadores gerais *cry3* e *cry35* identificando-se 30 isolados contendo genes com potencial para o controle de coleópteros, os quais juntamente com as linhagens-padrão de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *morrissonae* e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* foram utilizados para a realização do bioensaio. Através de análise discriminante alocaram-se os isolados em quatro grupos quanto à toxicidade de *B. thuringiensis*. Os grupos ficaram assim definidos: um grupo que promove até 10% de mortalidade contendo as testemunhas e duas linhagens; um grupo que causou 39% de mortalidade contendo três linhagens padrão e dez isolados; um grupo com 52% de mortalidade contendo treze isolados e um grupo com 70% de mortalidade contendo cinco isolados, os quais devem ser considerados promissores no controle biológico de *S. levis*.

Palavras-chave: PCR, bioensaio, controle biológico.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em 13 de novembro de 2008 e aceito em 28 de maio de 2009.

⁽²⁾ Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária. E-mail: biologia_elaine@hotmail.com; mvictor@fcav.unesp.br

⁽³⁾ Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Ciências Exatas, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 Jaboticabal (SP). E-mail: ferraudofcav.unesp.br (*) Autor correspondente.

ABSTRACT**IDENTIFICATION OF CRY GENES FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* EFFECTIVE AGAINST *SPHENOPHORUS LEVIS*, THE SUGAR-CANE BORER**

Bacillus thuringiensis is well known for its ability to produce toxic proteins to different insect orders which are encoded by the *cry* genes. This work was carried out aiming to select among different *B. thuringiensis* isolates, by morphological and molecular characterization, identifying different classes of *cry3* and *cry35* genes, and to determine the level of pathogenicity against *Sphenophorus levis* larvae, which is one of the most important sugar-cane pests in Brazil. A total of 1163 bacterial isolates were used in this survey in which phase microscopy and molecular markers were used for evaluation that resulted in 30 isolates positive for *cry3* and *cry35* genes potentially active against coleopterans. These bacterial isolates together with type strains such as *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B.t.* var. *morrissone* e *B.t.* var. *tolworthi* were used in bioassays using *Sphenophorus levis* larvae. Using discriminating analysis four groups of isolates were produced when *B. thuringiensis* toxicity was taken into account. These groups involved one set of two isolates with up to 10% mortality; another set caused mortality of up to 39% and was made up of ten isolates and three type strains; another set caused mortality of up to 52% containing thirteen isolates and a last set of isolated whose mortality index was 70% containing only five isolates which were considered promising bacterial strains for biological control of *S. levis*.

Key words: PCR, bioassay, biological control.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área cultivada de 7,04 milhões de hectares em 2006 (IBGE, 2007). 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 do 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 (GCEA, 2007). 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 2010 (RODRIGUES, 2004).

Apesar da alta produtividade, o ataque de pragas é um dos fatores que mais afetam o rendimento dos canaviais. 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 (ALMEIDA, 2005).

O interesse crescente em utilizar tecnologias com menor impacto ambiental e suas propriedades entomopatogênicas, tornaram a bactéria *B. thuringiensis* um agente promissor para a supressão de populações de insetos que causam danos em lavouras, e tem impulsionado várias pesquisas selecionar isolados com atividade tóxica para diferentes espécies de insetos (SCHNEPF et al., 1998).

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 (HÖFTE e WHITELEY 1989). Mais de 40.000 cepas de *B. thuringiensis* já foram isoladas e cerca de 190 genes caracterizados. As informações sobre os genes já caracterizados estão disponíveis no endereço: http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

Atualmente, a procura dos genes *cry* de *B. thuringiensis* tem sido feita por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), técnica molecular que é uma ferramenta valiosa à predição da atividade inseticida de novos isolados de *B. thuringiensis* (JUÁREZ-PÉREZ et al., 1997; HANSEN e SALMITOU, 2000; SCHNEPF et al., 1998).

O futuro das pesquisas com *B. thuringiensis* tem se direcionado à biotecnologia e biologia molecular, visando à obtenção de plantas geneticamente modificadas (BETZ et al., 2000) capazes de expressar genes de δ -endotoxinas caracterizados e com ação conhecida sobre os insetos (ELY, 1993; PEFERÖEN, 1997; SCHULER et al., 1998).

Este trabalho objetivou a seleção de novos genes *cry* de *B. thuringiensis* que codificam δ -endotoxinas com atividade inseticida à ordem Coleoptera, utilizando a caracterização molecular, identificando as subclasses dos genes *cry3* e *cry35*, bem como determinando a patogenicidade desses isolados em larvas de *S. levis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *B. thuringiensis*

Para a realização deste trabalho foram utilizados 1163 isolados pertencentes à coleção de bactérias entomopatogênicas do Laboratório de Genética de Bactéria e Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (LGBBA) – UNESP, Jaboticabal, SP. Essas linhagens foram isoladas de solo, água e insetos mortos de várias regiões do Brasil, de acordo com método descrito no Protocolo da Organização Mundial da Saúde de 1987 (SILVA-WERNECK e MONNERAT 2001). Como padrões, foram utilizados três isolados de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *morrissone* e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* as quais foram cedidas pelo “Bacillus Genetic Stock Center” Columbus, Ohio, USA.

Caracterização Morfológica de *B. thuringiensis*

Os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados em placa de Petri com meio de cultura Ágar Nutriente (extrato de carne 3 g L⁻¹, peptona bacteriológica 5 g L⁻¹ e Ágar 15 g L⁻¹) e incubados a 30 °C, durante cinco dias, permitindo assim a completa esporulação e liberação dos cristais. Logo em seguida, foi realizada a caracterização morfológica por meio da microscopia óptica em contraste de fase para a observação das células vegetativas, esporos e cristais.

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

Os isolados de *B. thuringiensis* foram cultivados por 12 h a 30 °C em Ágar Nutriente (NA). Em seguida, os isolados e as linhagens-padrão foram submetidos à extração de DNA total pela matriz de

troca iônica “Instagene Matrix” (Bio-Rad), seguindo as instruções do fabricante. Nesse estudo, foram elaborados no LGBBA três pares de iniciadores, com o “software” Gene Runner: *cry3Aa*, *cry3Bb* e *cry35Ba*, os quais codificam proteínas inseticidas para a ordem Coleoptera. Cada reação de PCR foi realizada com volume final para 25 µL, sendo: 1 µL de amostra de DNA com o tampão de reação, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 a 0,5 µM de cada iniciador e 0,5 U de Taq DNA polimerase (GIBCO-BRL). A amplificação foi realizada em termociclador regulado para 35 ciclos, onde as amostras foram desnaturadas por 1 minuto a 94 °C, aneladas aos iniciadores por 45 segundos a 41 °C e a extensão dos produtos da PCR foi realizada por 60 segundos a 72 °C. Os isolados-padrão de *B. thuringiensis* já caracterizados molecularmente foram utilizados como controle positivo e as reações sem adição de DNA como controle negativo. Os fragmentos amplificados foram analisados em géis de agarose a 1,5 % e comparados com o marcador molecular (GIBCO BRL).

Na tabela 1, estão os isolados que amplificaram fragmentos para os iniciadores gerais citados acima, bem como suas respectivas linhagens.

Obtenção de larvas de *Sphenophorus levis*

Os insetos usados no experimento foram obtidos a partir de coletas, em cultura de cana-de-açúcar, localizada 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 uma, agrupadas em valas abertas (1 m x 1 m) entre as linhas da cultura (PRECETTI e TERÁN, 1983).

Tabela 1. Iniciadores elaborados pelo LGBBA e utilizados nas reações de PCR

Iniciadores	Sequências	Pares de bases amplificados	Linhagens amplificadas
Cry3Aa LGBBA	5' AGATGAAGAGGGTATGTGTAGC 3'(d) 5' GAACTCATAACATCGTCATTGGG 3' (r)	641	89, 93, 97, 99, 101, 106, 107, 115, 116, 121, 124, 129, 142, 177, 178, 147, 154, 187 e <i>B. t.</i> var. <i>tenebrionis</i> (padrão)
Cry3Bb Conservado	5' TACGCAACAATACTGACC 3' (d) 5' TCATCTGTTGTTTCTGGTGG 3' (r)	690	583 e <i>B. t.</i> var. <i>tolworthi</i> (padrão)
Cry35Ba Conservado	5' AACTGATGAAATACCTGAAG 3' (d) 5' TCAACAATAAATCCTACAGC 3' (r)	585	466, 606, 622, 629, 710, 923, 939, 940, 968, 1039, 1144 e <i>B. t.</i> var. <i>morrissone</i> (padrão)

(d) direto; (r) reverso.

Os insetos foram retirados diariamente até atingir quantidade suficiente 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 voile, sendo alimentados com pedaços de colmo de cana-de-açúcar até a realização dos experimentos. As larvas foram obtidas de criação em laboratório, mantidas em dieta artificial (DEGASPARI et al., 1987), sendo fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Bioensaio

As linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas 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 30 linhagens de *B. thuringiensis*, previamente caracterizados pela técnica de PCR mais três linhagens utilizados como padrão (*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* e *B. thuringiensis* var. *tolworthi*) e testemunha. Tanto nos 30 isolados quanto nas linhagens-padrão observou-se amplificação com iniciadores correspondentes aos genes *cry3Aa*, *cry3Bb* e *cry35Ba* descritos como codificadores de proteínas com atividade inseticida para coleóptero-específicas.

As linhagens desta coleção estavam estocadas 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, as linhagens de *B. thuringiensis*, incluindo as linhagens-padrão, foram cultivadas em placa de Petri com meio de cultura Ágar 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 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 + cristais/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 distribuídas em 20 tubos de ensaio de fundo "chato". 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 cada larva considerada uma repetição.

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*.

Para a análise estatística 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. A caracterização e qualidade desses grupos foram determinadas utilizando-se a técnica estatística conhecida por análise discriminante (HAIR, 2005), que foi processada utilizando a distância euclidiana como medida de semelhança e o método de Wards como estratégia de agrupamento. As análises foram feitas utilizando-se programa computacional STATISTICA, versão 7.0 (STATSOFT, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização Morfológica dos isolados de *B. thuringiensis*

Através da microscopia com contraste de fase foi confirmado que os 1163 isolados pertencem à espécie *B. thuringiensis*, devido às características morfológicas visualizadas, inerentes a essa espécie, como células vegetativas, esporos e cristais (HABIB e ANDRADE, 1998).

Caracterização molecular

Com a utilização dos iniciadores gerais *cry3Aa*, *cry3Bb* e *cry35Ba*, foi possível identificar isolados de *B. thuringiensis* contendo genes com potencial para o controle de coleópteros. O conteúdo das subclasses estudadas para os genes *cry3Aa*, *cry3Bb* e *cry35Ba* foi determinado para 30 isolados, o que representa 2,6% do total (1163 isolados).

Os iniciadores foram elaborados no LGBBA e revelaram padrões de amplificação distintos, proporcionando fragmentos visíveis para cada gene entre os diferentes isolados de *B. thuringiensis*.

Teste de Patogenicidade

O bioensaio foi realizado com os 30 isolados cujo produto de amplificação para os genes específicos para a ordem Coleoptera foram três linhagens-padrão 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 MONNERAT e BRAVO (2000); HABIB e ANDRADE (1998).

Dentre as três avaliações do bioensaio, a melhor leitura de mortalidade causada pelos isolados pôde ser observada aos sete dias após a aplicação da toxina de *B. thuringiensis*, e aos 14 e 21 dias após a aplicação da suspensão bacteriana, a taxa de mortalidade foi inferior. Pela análise multivariada discriminante, identificaram-se os isolados com maior grau de toxicidade presentes na coleção de bactérias entomopatogênicas.

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, foi possível discriminar os acessos em quatro grupos estatisticamente distintos, quanto a efetividade de cada isolado (Figura 1). No grupo A contendo as testemunhas e dois isolados 606 e 622, não houve nenhuma efetividade contra larvas de *S. levis*. É importante salientar que as larvas utilizadas como testemunhas tiveram, durante os bioensaios, bom desenvolvimento, com mortalidade abaixo do limite, ou seja, menos de 10% do total de insetos testados (SILVA-WERNECK e MONNERAT 2001). O grupo B (39% de efetividade), contendo as três linhagens-padrão (*B. thuringiensis* var. *tolworthi*, *B. thuringiensis* var. *morrissone* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*) e dez isolados pertencentes ao LGBBA (968, 1039, 1144, 710, 466, 147, 107, 115, 116 e 99) ficou caracterizado como tendo linhagens de baixa efetividade no controle das larvas de *S. levis*. No grupo C (52% de efetividade) contendo 13 isolados de *B. thuringiensis* (178, 154, 187, 583, 939, 940, 106, 121, 124, 129, 142, 177 e 93) a eficiência foi moderada. O grupo D (70% de efetividade), contendo cinco linhagens de *B. thuringiensis* (89, 97, 101, 629 e 923), por ser o mais distante do grupo A, ficou caracterizado como tendo alta eficiência contra as larvas de *S. levis*.

Verificou-se neste trabalho que, com a aplicação da análise multivariada discriminante, foi possível selecionar isolados de *B. thuringiensis*, podendo ser aplicada na seleção de novos isolados em grandes bancos de bactérias entomopatogênicas, para as diferentes ordens de insetos. Dessa forma, os acervos poderão ter pré-diagnóstico do material que possuem para a realização de novas pesquisas, tanto para formulação de novos bioinseticidas como até mesmo, para outros trabalhos em engenharia genética.

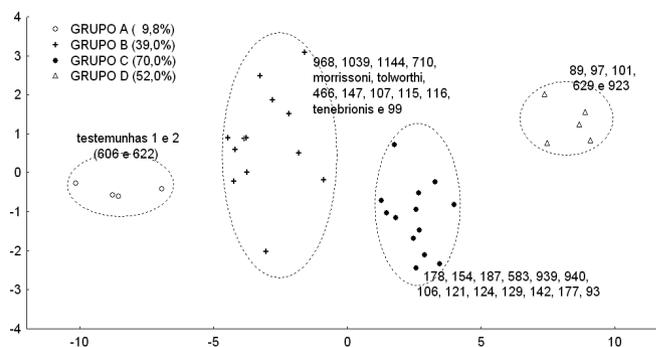


Figura 1. Estrutura de grupos resultantes da análise multivariada demonstrando a efetividade dos isolados de *B. thuringiensis*

A variação da eficiência dos isolados pode ser explicada por fatores ligados ao modo de ação desta bactéria, principalmente pela ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo este fator determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (POLANCZYK 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 sendo expresso em níveis muito baixos não contribuindo para o efeito letal do isolado. Além dessa técnica, o emprego de bioensaio é o teste 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.

4. CONCLUSÕES

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

2. Os ensaios apresentados neste trabalho revelam que dos 30 isolados pertencentes ao LGBBA, testados nos bioensaios, cinco 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*, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* e *B. thuringiensis* var. *tolworthi*) recomendados para o controle de insetos da ordem Coleoptera.

3. Os isolados do grupo D (89, 97, 101, 629 e 923) atingiram altos níveis de mortalidade, sendo índices suficientes para serem considerados promissores para o fornecimento de genes para a transgenia.

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

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. C. **Bicudo da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. p.1-3. (Boletim Técnico C.T.C)
- ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inoculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-778.
- BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G. & FUCHS, R. L. Safety and Advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v.32, p.156-173, 2000.
- 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**, v. 22, p. 553-558, 1987.
- GCEA - GRUPO DE COORDENAÇÃO DE ESTATÍSTICAS AGROPECUÁRIAS - IBGE, DPE, COAGRO - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Abril 2007.
- ELY, S. The engineering of plants to express *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. In: P. ENTWISTLE, J. S.; CORY, M. J.; BAILEY, S. HIGGS (Ed.). **Bacillus thuringiensis: an environmental biopesticide: theory and practice**, Chichester, U. K.: John Wiley & Sons, 1993. p.37-69.
- HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.E.S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1998. p.383-446.
- HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. **Análise multivariada de dados**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 600p.
- HANSEN, B. M.; SALMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* IN: CHARLES, J. F., DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Amsterdam: Kluwer Academic, 2000. p.41-64.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v.53, p.242-255, 1989.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 5/3/2007.
- JUÁREZ-PÉREZ, V. M., FERRANDIS, M. D; FRUTOS, R. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.2997-3002, 1997.
- MARCUS, L. Traditional morphometrics. In: ROHLF, F. J.; BOOKSTEIN, F. L. (Eds). **Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop**. Ann Arbor, Michigan: The University of Michigan, Museum of Zoology, 1990. p.77-122.
- MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000. v.3, p.163-200.
- PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Tibtech**, v. 15, p.173-177, 1997.
- POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, v.7, p.1-10, 2003.
- PRECETTI, A. A. C. M.; ARRIGONI, E. D. B. **Aspectos bioecológicos e controle do besouro *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera; Curculionidae) em cana-de-açúcar**. São Paulo: Copersucar 1990. 15p. (Boletim Técnico Copersucar Edição Especial)
- REIS, S. F. Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, p. 571-580, 1988.
- RODRIGUES, R. Cenário internacional é favorável para o setor sucroalcooleiro brasileiro. In: Brasil@agro. Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?cod=17215&tipo=clipping>. Acesso em 14 de setembro de 2004.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; RIE, J. van; LERECLUS D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.775-806, 1998.

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

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

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