

# Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos

Análises *in vitro* de receptores membranares de proteínas Cry em larvas de lepidópteros

## Lídia Mariana Fiuza

Dr<sup>a</sup> em Ciências Agrônômicas pela ENSAM - Montpellier (França)

Prof<sup>a</sup> Adjunta do PPG-Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre, Líder do Grupo de Pesquisa: Manejo de Populações de Insetos, Coordenadora do Laboratório de Microbiologia, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS  
Pesquisadora Consultora da Fitotecnia, EEA/ Instituto Rio-Grandense do Arroz, Cachoeirinha, RS.

fiuza@bios.unisinos.br

## 1. Introdução

A bactéria ubíqua, *Bacillus thuringiensis* tem ação entomopatogênica relacionada ao corpo de inclusão parasporal, que se forma durante a esporulação, sendo este constituído de proteínas Cry codificadas por genes *cry* (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf et al., 1998). As proteínas Cry têm mostrado atividade inseticida altamente específica entre as diversas ordens de insetos, como: Lepidoptera, Diptera, Coleoptera (Zhong et al., 2000); Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, Isoptera e Malophaga (Feitelson et al., 1992; De Maagd et al., 2001; Castilhos-Fortes et al., 2001), além de Nematóides (Marroquin et al., 2000), Ácaros, Protozoários e Fitopatógenos.

Os dados atuais, na escala mundial, revelam mais de 60.000 isolados de *B. thuringiensis*, correspondentes a 82 subespécies descritas até 1999, com cerca de 300 genes *cry* distribuídos em 34 classes (Pinto & Fiuza, 2002). A revisão da nomenclatura dos genes *cry* de *B. thuringiensis* foi publicada por Crickmore et al. (1998), a qual vem sendo atualizada no *Web Site*: [http://biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html).

Como mecanismo de ação, entre a ingestão das proteínas Cry de *B. thuringiensis* e a morte das larvas dos insetos suscetíveis, destacam-se as seguintes fases:

\* solubilização do corpo de inclusão parasporal em pH alcalino no intestino médio dos insetos, liberando as proteínas Cry com massa molecular de 130-140 kDa a 70 kDa (Schnepf et al., 1998). Essa fase é determinante à

especificidade do isolado de *B. thuringiensis* e à espécie-alvo, tanto pela alcalinidade do sistema digestivo quanto pela composição dos cristais (Aronson et al., 1991).

\* ativação das proteínas Cry pelas enzimas digestivas formando fragmentos tóxicos de 60-65 kDa (Schnepf et al., 1998). Nessa fase tanto a composição proteolítica quanto à estrutura protéica do cristal são importantes (Choma et al., 1990).

\* ligação das toxinas aos receptores específicos às microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas suscetíveis. Os estudos realizados com *Brush Border Membrane Vesicles* (BBMV) isoladas de larvas de lepidópteros mostram que ligações de forte afinidade entre as proteínas e os receptores são consideradas fatores determinantes do espectro inseticida (Hofmann et al., 1988; Van Rie et al., 1989 e 1990; Fiuza et al., 1996). Esses autores mostram que há uma correlação positiva entre a ligação, *in vitro*, da toxina no receptor intestinal e a toxicidade, *in vivo*. Por outro lado, outros estudos descrevem que o reconhecimento do receptor é necessário, mas não é suficiente para provocar a toxicidade, sugerindo a existência de outros fatores relacionados ao modo de ação das delta-endotoxinas (Wolfersberger, 1990). Em 1994, Knight et al. isolaram, das BBMVs de larvas de *Manduca sexta* (Lep., Sphingidae), uma aminopeptidase N implicada na interação da toxina Cry1Ac. Os modelos de receptores atualmente descritos mostram que um inseto pode apresentar quantidade variável de diversas classes de receptores, os quais podem ser reconhecidos por diferentes toxinas (Hua et al., 2001). Diversos autores



*Bacillus thuringiensis*

sugerem que estes modelos podem explicar a especificidade das proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

\* indução à formação de poros na membrana celular do epitélio intestinal (Höfte & Witeley, 1989; Schnepf et al., 1998).

\* desequilíbrio iônico entre o citoplasma e o meio externo à célula (Gill et al., 1992; Knowles & Bow, 1993). As análises histopatológicas realizadas após a intoxicação dos insetos mostram a destruição das microvilosidades, hipertrofia das células epiteliais, vacuolização do citoplasma e lise celular, levando o inseto à paralisia e morte (Endo & Nishiitsuji-Uwo, 1981; Bravo et al., 1992a,b; Denolf et al., 1993a,b).

Considerando a especificidade inseticida das proteínas Cry de *B. thuringiensis*, de acordo com Meadows (1993), até o momento não foram descritos casos de intoxicações de mamíferos através dos alimentos. Por outro lado, em estudos com toxinas de *B. thuringiensis israelensis*, administradas via parenteral, foi observada a atividade citolítica para diversas células de mamíferos (Thomas & Ellar, 1983; Armstrong et al., 1985; Meadows, 1993). Face aos referidos dados, esse entomopatógeno tem sido considerado seguro ao homem e ao ecossistema.

Na seleção das proteínas inseticidas, sintetizadas por essa bactéria, as análises *in vitro* dos receptores membranares podem viabilizar uma rápida determinação do espectro de ação das proteínas Cry contra as espécies alvo, sendo em seguida efetuada a avaliação da toxicidade *in vivo*, apenas para os isolados pré-selecionados como ativos *in vitro*. Sendo assim, o presente trabalho trata de diferentes métodos de análise de receptores de proteínas de *B. thuringiensis* em formas imaturas de lepidópteros.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Tecidos dos insetos

As larvas de lepidópteros (*Cbilo suppressalis*, *Heliothis armigera* e *Plutella xylostella*) foram obtidas da criação massal de insetos mantida em laboratório, a 25±1°C, 70±5°C e 12h de fotofase. Os tubos digestivos foram dissecados e fixados durante 24h em

BHS a 10%, sendo em seguida lavados por 12h em água destilada e desidratados em séries crescentes de etanol, 70 a 100% (Brandtzaeg, 1982). Os tecidos foram impregnados em banhos mistos (etanol/tolueno/paraplasto) e incluídos em paraplasto 100% a 58°C. Os cortes longitudinais de 7 µm de espessura, preparados com micrótomo LKB, foram montados em lâminas de vidro, tanadas com *poly-L-lysina* (Sigma) a 10%, e conservadas a 4°C.

### 2.2. Purificação das proteínas Cry

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ba foram obtidas de *B. thuringiensis dendrolimus* HD 37, *B. thuringiensis kurstaki* HD 73 e *B. thuringiensis thuringiensis* 4412, respectivamente. Essas cepas contêm apenas um gene *cry* que codifica a referida proteína Cry inseticida, as quais foram cedidas para essa pesquisa pelo Instituto Pasteur (IEBC-Paris, França) e a Pant Genetics Systems (PGS-Ghent, Bélgica). As cepas de *B. thuringiensis* foram cultivadas conforme o método de Mahillon & Delcour (1984). Após a lise bacteriana foram centrifugadas e lavadas com tampão fosfato (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0,01 % Triton X-100; pH 6).

Os cristais foram separados dos esporos e das células bacterianas em gradiente de renografina por ultracentrifugação, conforme metodologia descrita por Sharpe et al. (1975). As bandas, contendo os cristais puros, foram lavadas e diluídas em água *milli-Q* esterilizada, contendo 0,1 mM *pbenzylmethylsulfonyl* (PMSF). As proteínas Cry foram solubilizadas em tampão fosfato (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 10 mM dithiothreitol; 0,1 mM PMSF; pH 10). O pH foi ajustado a 8,6 por diálise contra o tampão 20 mM Tris e as proteínas Cry foram clivadas por *bovinepancreatic trypsin* (Type I; Sigma), sendo a reação inativada com *trypsin inhibitor* (Type II-S; Sigma).

A pureza e a integridade das proteínas foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, SDS-PAGE (Laemmli, 1970). A concentração foi determinada pelo método Bradford (1976), usando a *bovine serum albumin* (BSA) como proteína padrão.

### 2.3. Proteínas Cry biotiniladas

As proteínas Cry foram preliminarmente biotiniladas conforme o método descrito por Bayer & Wilcheck (1990), onde a incorporação da biotina na parte N-terminal da proteína é feita usando o BNHS (biotinyl-N-hydroxy-succinimide éster - Amersham) em tampão de bicarbonato de sódio (100 mM NaHCO<sub>3</sub>; 150 mM NaCl; pH 9). O produto da reação foi purificado em *sephadex G-25* (Sigma) e as frações biotiniladas identificadas por *dot-blot*, onde foi utilizada membrana de nitrocelulose, o conjugado de estreptavidina-fosfatase-alcalina diluída no tampão *Tris-Saline-Triton* (10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Triton X-100; pH 7;6) e o substrato de revelação (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate e nitroblue tetrazolium, diluídos no tampão 100 mM Tris; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5). A concentração das proteínas Cry biotiniladas foi determinada pelo método Bradford (1976), usando a BSA como proteína padrão. A pureza e a integridade das proteínas marcadas foi avaliada em *western-blot*, usando membrana de nitrocelulose (Sigma) e o tampão *Toubin* (12,5 mM Tris, 96 mM glycine; pH 8,3 com 10% ethanol). As membranas foram reveladas usando a mesma técnica descrita no *dot-blot*.

### 2.4. Anticorpos policlonais

As proteínas, Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ba, foram preparadas conforme descrito anteriormente na purificação. Os anticorpos foram produzidos em coelhos (Eurogentec - Bélgica), sendo as imunoglobulinas (IgGs) separadas em colunas de *sepharose protein-A* e as frações purificadas por afinidade incubando os IgGs e as membranas de nitrocelulose, contendo os antígenos previamente transferidos por *western-blot* conforme descrito por Burke et al. (1982). A especificidade e sensibilidade dos anticorpos policlonais foi determinada pelo método de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e *dot-blot*.

### 2.5. Detecção *in vitro* dos receptores membranares

O estudo *in vitro* dos receptores foi efetuado sobre cortes histológicos do intestino dos insetos, utilizando as

toxinas sintetizadas pelas cepas de *B. thuringiensis* em estudo. A detecção propriamente dita corresponde a incubação dos tecidos, previamente desparafinados e reidratados, com as proteínas Cry.

Nas análises com proteínas Cry biotiniladas, os cortes histológicos foram incubados à temperatura ambiente, durante 1h, com as proteínas biotiniladas (10 µg/ml). As proteínas não ligadas aos sítios receptores foram removidas com TST (10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Triton X-100; pH 7,6). Em seguida, os tecidos foram tratados com estreptavidina conjugada a uma enzima (peroxidase ou fosfatase alcalina) ou fluorocromo (fluoresceína ou ficoeritrina), diluídos em tampão TST. O complexo da reação "proteína-receptor", usando o conjugado com enzimas foi revelado com substrato DAB para peroxidase e BCIP/NBT para fosfatase alcalina, sendo as seções montadas com *Per-tex*, entre lâmina e lamínula de vidro. Nas revelações com a fluoresceína ou ficoeritrina, as seções foram montadas com *Mowiol* e conservadas a 4°C.

Nas análises imunohistoquímicas com proteínas nativas (não biotiniladas), os receptores foram revelados com o complexo anticorpo primário (AC<sub>1</sub>, específico contra a proteína Cry) e anticorpo secundário (AC<sub>2</sub>, dirigido contra o AC<sub>1</sub>) conjugado a uma enzima ou fluorocromo, os quais foram revelados e montados de acordo com o método descrito anteriormente. Na imunodeteção, os cortes histológicos foram incubados com as proteínas nativas e na imunolocalização, as lagartas foram previamente tratadas *in vivo* com as proteínas Cry e posteriormente foram preparados os tecidos e as reações imunohistoquímicas.

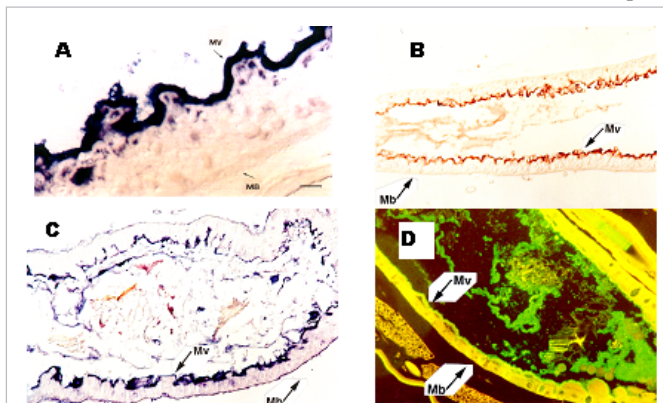
Em ambos os métodos, as testemunhas foram preparadas pela omissão alternada de cada etapa da reação, a fim de eliminar a hipótese de reações falso-positivas. As amostras reveladas com enzimas, tipo peroxidase e fosfatase alcalina, foram avaliadas em microscopia óptica de contraste de fase Nomarski (Leitz DMRB). Para as análises

onde foram utilizados os fluorocromos foi utilizada a microscopia de varredura laser (ACAS 570, Meridian).

### 3. Resultados

#### 3.1. Localização de receptores com proteínas Cry biotiniladas

Os cortes histológicos das lagartas de *Chilo suppressalis*, tratados com proteínas biotiniladas de Cry1Aa e Cry1Ac (Fig. 1A), revelaram uma marcação uniforme ao longo das microvilosidades intestinais. Na mesma espécie a marcação de Cry1Ba (Fig. 1B) também foi intensa. Os tecidos de



**Figura 1:** Detecção de receptores de proteína Cry1 de *Bacillus thuringiensis* em cortes longitudinais de lagartas de *Chilo suppressalis* (A e B), *Heliothis armigera* (C) e *Plutella xylostella* (D), analisados em microscopia óptica de contraste de fase Nomarski e Fluorescência.

*Heliothis armigera* também apresentaram marcação uniforme nas microvilosidades intestinais para a proteína Cry1Ac (Fig. 1C), sendo os mesmos resultados obtidos nos ensaios com as lagartas de *Plutella xylostella*, quando tratadas com as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac (Fig. 1D).

No caso dos tecidos tratados como controle, representantes da omissão alternada dos diferentes componentes da reação, observou-se a ausência de coloração nas microvilosidades das células do epitélio intestinal dos insetos em estudo. As marcações detectadas na região das microvilosidades das células do epitélio intestinal revelam a presença de receptores membranares às proteínas Cry, em estudo, nas referidas espécies de insetos alvo.

#### 3.2. Imunodeteção de receptores com proteínas Cry nativas

Os resultados das análises de imunohistoquímica, utilizando os anti-

corpos policlonais, confirmam a detecção dos receptores membranares intestinais nas lagartas de: *Chilo suppressalis* às proteínas nativas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ba; *Heliothis armigera* à proteína Cry1Ac; *Plutella xylostella* às proteínas Cry1Aa e Cry1Ac (Fig. 2).

#### 3.3. Imunolocalização de receptores com proteínas Cry nativas

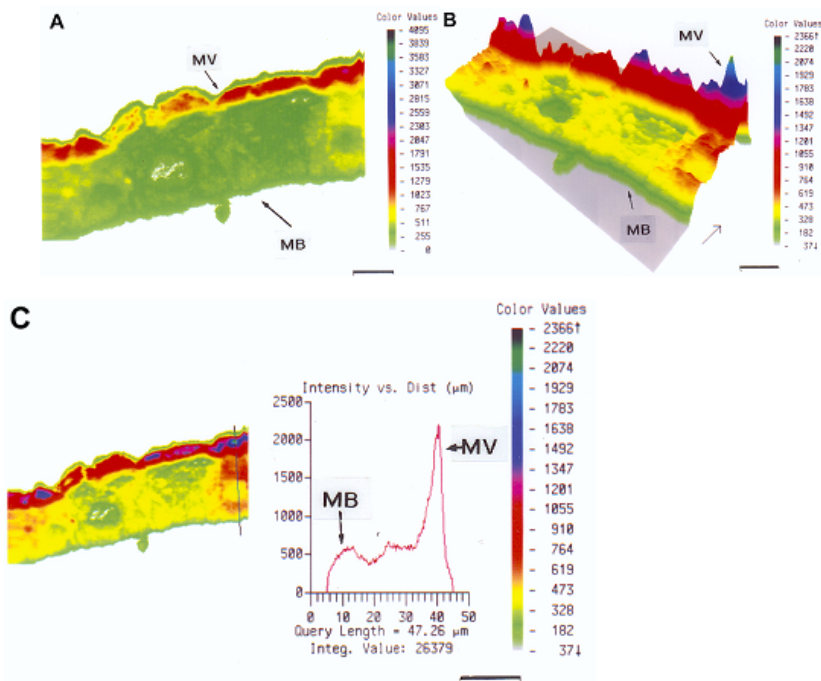
Nessas análises apenas a espécie *Chilo suppressalis* foi avaliada, demonstrando a localização de receptores intestinais às proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ba nos tecidos das lagartas previamente intoxicadas *in vivo*,

confirmando assim os dados obtidos nas análises *in vitro* de receptores por imunodeteção e biotinilação de proteínas.

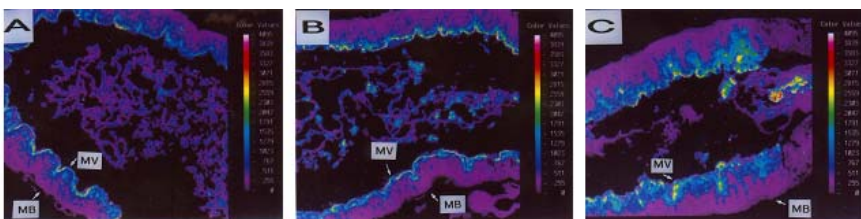
#### 3.4. Receptores membranares em microscopia de varredura laser

As amostras de imunodeteção (Fig. 2) e biotinilação de proteínas, reveladas com fluorocromos, foram avaliadas em microscopia de varredura laser, que permite uma análise semiquantitativa dos receptores através da varredura da totalidade das seções longitudinais dos tubos digestivos das lagartas, podendo-se obter imagens: bidimensional (Fig. 2A), tridimensional (Fig. 2B) ou um gráfico que representa o pico de fluorescência numa linha imaginária do epitélio intestinal (Fig. 2C).

Nos estudos com *Chilo suppressalis* foi avaliada a distribuição dos receptores das proteínas Cry1Aa e Cry1Ac ao longo do epitélio intestinal, cujos dados foram convertidos em valores numéricos correspondentes à intensidade de fluorescência e analisados estatisticamente pelo teste de homogeneidade de variância de Bartlett (Dagnelie, 1970), sendo as duas proteínas comparadas pelo teste de *Student-Neuuman-Keuls* em três porções intestinais. Os resultados revelaram uma diferença significativa na intensidade de fluorescência detectada para Cry1Aa e Cry1Ac (Fig. 3), sendo a primeira mais intensa, representando



**Figura 2:** Imunodeteção de receptores de proteína Cry1A de *Bacillus thuringiensis* em cortes longitudinais de lepidópteros, analisados em microscopia de varredura laser (barra = 35 µm).

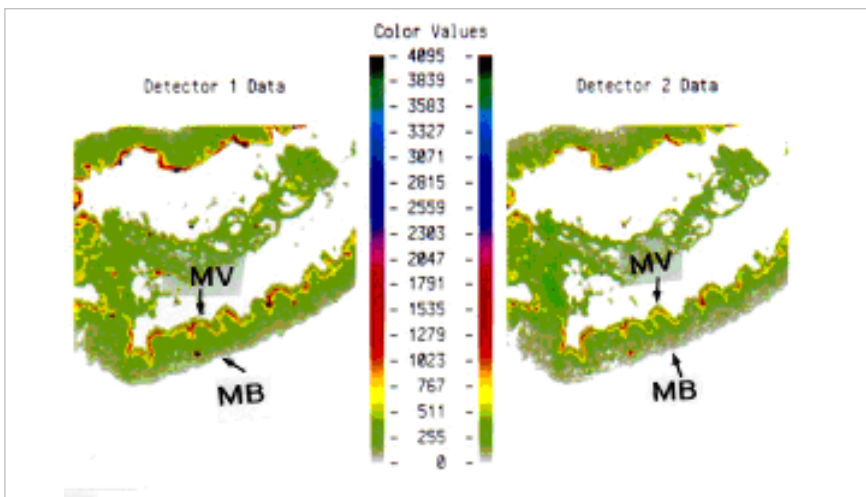


**Figura 3:** Distribuição de receptores de proteínas Cry1 ao longo intestino médio de lagartas de *Chilo suppressalis*, avaliadas em microscopia de varredura laser.

uma maior concentração de receptores intestinais na espécie em estudo. Por outro lado, ambas as proteínas revelaram uma maior quantidade de receptores na porção anterior (Fig. 3A) e posterior (Fig. 3C) do intestino mé-

dio, quando comparadas à porção central (Fig. 3B).

A microscopia de varredura laser permite a leitura simultânea de dois fluorocromos (fluoresceína e ficoeritrina), permitindo assim a análise da



**Figura 4:** Competição de proteínas Cry1 biotiniladas, reveladas com fluoresceína (Cry1Aa - detector1) e ficoeritrina (Cry1Ba - detector 2), na análise de receptores membranares intestinais de *Chilo suppressalis*, em microscopia de varredura laser.

competição de duas proteínas, como por exemplo Cry1Aa e Cry1Ba, reveladas com fluorocromos detectados em diferentes comprimentos de onda, sobre a mesma porção intestinal da lagarta (*Chilo suppressalis*), revelando assim que a fluorescência pode ser sobreposta (Fig. 4) e que essas proteínas se ligam aos mesmos receptores membranares intestinais.

#### 4. Discussão

As análises de receptores membranares intestinais, através de técnicas de imunohistoquímica e detecções de proteínas Cry biotiniladas, foram realizadas por diversos autores em larvas de diferentes espécies de lepidópteros (Bravo et al., 1992a; Denolf et al., 1993a; Estada e Ferre, 1994; Fiuza, 1995), dípteros (Ravoahangimalala et al., 1993) e coleópteros (Bravo et al. 1992a; Boets et al., 1994). Esses autores comprovaram que as ligações das proteínas Cry nas microvilosidades do intestino médio das larvas de insetos correspondem à existência de um receptor específico à referida proteína no inseto-alvo.

As análises *in vitro* de receptores de proteínas Cry de *B. thuringiensis* reveladas com enzimas mostram que em geral os receptores estão distribuídos uniformemente ao longo do intestino médio dos lepidópteros (Bravo et al., 1992b; Denolf et al., 1993a), porém Bravo et al. (1992b) revelaram que essas proteínas se ligam preferencialmente nas microvilosidades da porção posterior do intestino médio das larvas dos coleópteros. No presente estudo, as semiquantitativas dos receptores, avaliadas em microscopia de varredura laser, em larvas de lepidópteros, também revelaram que a distribuição desses receptores membranares intestinais foi diferenciada ao longo do epitélio, sendo mais concentrada nas porções anteriores e posteriores do intestino médio.

Nas avaliações de competição das proteínas de *B. thuringiensis*, as toxinas Cry1Aa e Cry1Ba mostraram-se em competição pelos receptores celulares de *Chilo suppressalis*, cujos dados também foram demonstrados em outras espécies de lepidópteros. Por outro lado, os estudos desenvolvi-

dos por Denolf et al. (1993a,b), utilizando as proteínas Cry1Ac e Cry1Ba (marcadas com moléculas de biotina e de iodo radioativo), em larvas de *Ostrinia nubilalis*, revelaram que essas toxinas se ligam a diferentes receptores intestinais, sugerindo que a utilização simultânea dessas proteínas pode apresentar um efeito inseticida sinérgico contra *O. nubilalis*.

Relacionando o estudo dos receptores *in vitro* e a análise da toxicidade *in vivo*, pode-se inferir que os métodos de detecção de receptores membranares podem ser aplicados na seleção das proteínas ativas contra insetos, havendo uma correlação positiva entre as análises *in vitro* e *in vivo*. Porém, para determinar a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) de uma proteína Cry faz-se necessário o bioensaio uma vez que as ligações das proteínas aos receptores podem variar em concentração e afinidade, como já descrito por diversos autores, para diferentes espécies de insetos (Denolf et al., 1993a; Van Rie et al., 1990; Fiuza et al., 1996; Lee et al., 1996; Hua et al., 2001). Também há estudos demonstrando que as proteínas Cry tóxicas aos insetos correspondem àquelas que se ligam de forma irreversível aos receptores das células epiteliais do inseto-alvo (Liang et al., 1995).

No contexto, controle microbiano de insetos, a espécie *Bacillus thuringiensis* oferece as melhores alternativas à produção de biopesticidas e à engenharia genética de plantas. Sendo assim, é fundamental avaliar o espectro de ação e a especificidade das proteínas potencialmente inseticidas e, nesse sentido, a análise *in vitro* dos receptores membranas pode ser considerada uma ferramenta indispensável face ao grande número de isolados, cepas e proteínas de *B. thuringiensis* já identificados, que representam um potencial no manejo de insetos-praga.

## 5. Agradecimentos

À equipe Biotrop do *Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement* (Montpellier, França), especialmente a Dr<sup>a</sup> Nicole Michaux-Ferriere, assim como aos pesquisadores Dr. Jeroen Van Rie (*Plant Genetic Systems*, Ghent, Bélgica) e ao

Dr. Jean-François Charles (*Institut Pasteur*, Paris, França), por suas contribuições nessa pesquisa.

## 6. Referências Bibliográficas

- ARMSTRONG, J. L.; ROHRMANN, G. F. & BEAUDREAU, G. S. 1985. Delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis*. *Journal Bacteriology*, 161: 39-46.
- ARONSON, A.; HAN, E.; MCGAUGHEY, W. & JOHNSON, D. 1991. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is depend upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Applied Environmental Microbiology*, 57:981-986.
- BAYER, E. & WILCHECK, M. 1990. Protein biotinylation. *Methods in Enzymology*. 184: 138-159.
- BOETS, A.; JANSSENS, S.; DENOLF, P.; PEFFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. 1994. Sequential observations of toxin distribution and histopathological effects of CryIIIa in the gut of intoxicated *Leptinotarsa decemlineata* larvae. XXVIIth *Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, p. 377.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 : 248-254.
- BRANDTZAEG, P. 1982. Tissue preparation methods for immunocytochemistry. In: Bullock G. & Petruz P., *Techniques in immunocytochemistry*. Academic Press, London. pp. 49-51.
- BRAVO, A.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M. 1992a. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebr. Pathol* 60:237-246.
- BRAVO, A.; HENDRICKX, K.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol* 60:247-253.
- BURKE, B.; GRIFFIHS, G.; REGGIO, H.; LOUWARD, D. & WARREN, G. 1982. A monoclonal antibody against a 135-K Golgi membrane protein. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1: 1621-1628.
- CASTILHOS-FORTES, R.; MATSUMURA, A. T. S.; DIEHL, E. & FIUZA, L. M. 2002. Susceptibility of *Nasutitermes ebhardtii* (Isoptera: Termitidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 221-224.
- CHOMA, C. T. & KAPLAN, H. 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: Evidence that the Toxic Moiety is present in a Active Conformation. *Biochemistry*, 29: 10971-10977.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHENEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 62(3):807-813.
- DAGNELIE, P. 1975. Théorie et Méthodes statistiques, applications agronomiques. *Les Presses Agronomiques de Gembloux*, vol. II, pp. 56-57.
- DEMAAG, R.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. 1999. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 9-13.
- DENOLF, P.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. 1993a. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Appl. Environ. Microbiol* 59(6):1828-1837.
- DENOLF, P.; JANSSENS, S.; VANHOUDT, S.; PEFFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. 1993b. Biotinylation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(6):1821-1827.
- ENDO, Y. & NISHIITSUTSUJI-UWO, J. 1980. Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Histopathological Changes in the Silkworm Midgut. *Journal*

- Invertebrate Pathology*, 36:90-103.
- ESTADA, U.; FERRE, J. 1994. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni* and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10):3840-3846.
- FEITELSON, J.; SPAYNE, J. & KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology*, 10: 271-275.
- FIUZA, L. M. 1995. Etude des sites récepteurs et de la toxicité des delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* Berliner chez les larves de la Pyrale du riz, *Chilo suppressalis* Walker. *Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques*, ENSA-M, Montpellier, France. 180p.
- FIUZA, L. M.; NIELSEN-LEROUX, C.; GOZE, E.; FRUTOS, R.; CHARLES, J-F 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera, Pyralidae): evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1544-1549.
- GILL, S.; COWLES, E. & PIETRANTONIO, P. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review Entomology*, 37:615-636.
- HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. 1988. Specificity of Bt delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academic Sciences of U.S.A.*, 85: 7844-7848.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bt*. *Microbiological Reviews*, 53: 242-255.
- HUA, G.; MASSON, L.; JURAT-FUENTES, J. L.; SCHWAB, G.; ADANG, M. J. 2001. Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(2):872-879.
- KNIGHT, P.; CRICKMORE, N. & ELLAR, D. 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAC delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* aminopeptidase N. *Molecular Microbiology*, 11: 429-436.
- KNOWLES, B.H. & BOW, J.T. 1993. The delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*, 15: 469-476.
- LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). 227: 680-685.
- LEE, M. K.; YOU, T. H.; YOUNG, B. A.; COTRILL, J. A.; VALATIS, A. P.; DEAN, D. H. 1996. Aminopeptidase N purified from Gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2845-2849.
- LIANG, Y., PATEL, S. S.; DEAN, D. H. 1995. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins to Gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270:24719-24724.
- MAHILLON, J. & DELCOUR, J. A. 1984. A convenient procedure for the preparation of highly purified parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. *J. Microbiol. Methods*, 3:69-76.
- MARROQUIN, L.D., ELYASSNIA, D., GRIFFITTS, J.S., FEITELSON, J.S., & AROIAN R.V. 2000. *Bacillus thuringiensis* toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 155: 1693-1699.
- MEADOWS, M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the Environment: Ecology and Risk Assessment. p. 193-213. In: ENTWISTLE P. (ed.). *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide : Theory and Practice. John Wiley & Sons, New York, USA.
- PINTO, L. M. N. & FIUZA, L. M. 2002. Genes cry de *Bacillus thuringiensis*: uma alternativa biotecnológica aplicada ao manejo de insetos. *Biociências*, 10 (2): 03-13.
- RAVOAHANGIMALALA, O.; CHARLES, J-F.; SCHOELLER-RACCAUD, J. 1993. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis toxins in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambi* larvae (Diptera: Culicidae). *Res. Microbiol.* 144:271-278.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3):775-806.
- SHARPE, E.; NICKERSON, K.; BULLA, L. & ARONSON, J. 1975. Separation of spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* in gradients of certain x-ray contrasting agents. *Applied Microbiology*, 30(6): 1052-1053.
- THOMAS, W. & ELLAR, D. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cell Science*, 60:181-197.
- VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.* 186:239-247.
- VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. 1990. Receptors on the brush border membrane insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385
- WOLFERSBERGER, M. 1990. Specificity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to lepidopteran larvae: recent insights from studies utilizing midgut brush border membrane vesicles. *Vth Int. Coll Invertebrate Pathology*, pp.278-282.
- ZHONG, C.; ELLAR, D.J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S. & HART, E.R. 2000. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin which is toxic to insects in three orders. *J. Invertebr. Pathol.*, 76: 131-139.