



Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*

Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* e proteínas com potencial na agrobiotecnologia

Neiva Knaak

Mestre em Biologia
Laboratório de Microbiologia e
PPG-Biologia - UNISINOS

Lidia Mariana Fiuza

Doutora em Ciências Agrônomicas
Laboratório de Microbiologia e
PPG-Biologia - UNISINOS
Fitotecnia/EEA-IRGA, RS
fiuza@unisinis.br

A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada intensamente por diversos grupos de pesquisa no mundo todo, devido à necessidade de uma agricultura mais sustentável e mais comprometida com a preservação do meio ambiente (Bobrowski et al., 2003).

Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 50 anos no Brasil, são uma alternativa para o controle mais seletivo de insetos nocivos (Hilder e Boulter, 1999; Betz et al., 2000). Dentre os agentes de controle biológico destaca-se o *B. thuringiensis*, que é uma bactéria Gram-positiva, a qual sintetiza inclusões cristalinas durante a esporulação, denominadas proteínas Cry, que são codificadas por genes *cry*. As proteínas do cristal bacteriano apresentam ação tóxica a insetos de diversas ordens, principalmente aos lepidópteros, dípteros, coleópteros (Höfte e Whiteley, 1989; Schnepf et al., 1998).

As proteínas da classe Cry1 de *B. thuringiensis* têm um peso molecular em torno de 130-140 kDa (Höfte e Whiteley, 1989). Após a digestão por tripsinas, no intestino médio de insetos suscetíveis (Tojo e Aizawa, 1983), o fragmento tóxico corresponde a 60-70 kDa (Aronson et al., 1986; Höfte e Whiteley, 1989). Esses peptídeos tóxicos se ligam a receptores específicos nas membranas, onde se formam canais iônicos, aumentando o volume e lise celular, devido à pressão osmótica interna aumentada (Schnepf et al., 1998;

Fiuza, 2004). Por outro lado, Polanczyk et al. (2003) comentam que a morte do inseto, no caso de produtos à base de *B. thuringiensis*, representa a interação da atividade tóxica da proteína e dos esporos; e no caso de plantas-Bt, a causa da morte é somente a proteína.

Atualmente mais de 300 genes de *B. thuringiensis* foram clonados e seqüenciados (http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index), resultando em proteínas sintetizadas pelas plantas ou utilizadas em produtos para aplicações foliares. Em 1995, havia 182 produtos à base de *B. thuringiensis* registrados, porém até 1999 o total de vendas destes produtos era inferior a 2% do valor total de todos os inseticidas comercializados (Frutos et al., 1999).

Em 1981, o primeiro gene *cry* foi clonado e expresso em *Escherichia coli* (Schnepf e Whitley, 1981). Em 1987, foram produzidas as primeiras plantas-Bt modificadas geneticamente, as quais sintetizam as proteínas Cry, onde se destaca o tomate (Fischhoff, 1987) e o tabaco (Vaeck et al., 1987). Naquela ocasião, os genes cry1Ab e cry1Ac de *B. thuringiensis* foram utilizados em plantas para protegê-las contra insetos da ordem Lepidoptera (Vaeck et al., 1987).

Nesse contexto, o presente trabalho aborda tópicos relacionados as plantas transgênicas que expressam as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac de *B. thuringiensis* e os produtos comerciais ativos contra lepidópteros.

Plantas Transgênicas com genes *cry* de *Bt*

Atualmente, o milho-Bt é a planta transgênica mais cultivada no mundo, seguido pelo algodão-Bt (James, 2005). Além desses, a batata e o tomate destacam-se entre outras plantas cultivadas que expressam uma ou várias proteínas Cry para controle de insetos-praga (Oecd, 2001).

Na tabela 1, adaptado de Fontes et al. (2002), estão relacionadas às plantas cultivadas que foram transformadas com os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, visando à resistência a insetos-praga de importância econômica.

De acordo com Betz et al. (2000), as plantas transgênicas utilizando genes *cry* de *B. thuringiensis* não afetam insetos não-alvo ou vertebrados.

Glare e O'Callaghan (2000) relatam estudos realizados sobre o efeito de várias subespécies e produtos à base de *B. thuringiensis* sobre 9 ordens de predadores, distribuídos em 25 famílias. Em relação aos parasitóides, os mesmos autores enumeram uma série de trabalhos realizados com as ordens Diptera e Hymenoptera, onde a segunda esta representada por 10 famílias. Em ambos os casos, embora os estudos tenham mostrado algumas variações nos resultados, os produtos formulados com *B. thuringiensis* e suas subespécies apresentam pouco ou nenhum efeito sobre estes inimigos naturais, sendo assim considerados seletivos.

Nesse sentido, Shelton et al. (2002) relatam que as toxinas de *B. thuringiensis* podem se acumular no solo durante o crescimento da planta, mas Saxena e Stotzsky (2000)

avaliaram o efeito de Cry1Ab liberada pela raiz e a biomassa de organismos do solo. Esses autores introduziram minhocas em solos com presença e ausência de *B. thuringiensis* os quais concluíram que apesar da proteína Cry1Ab estar presente no intestino das minhocas, o número total de nematóides, culturas de protozoários e bactérias não foram afetados pela referida toxina.

“Milho-Bt”

O Milho é cultivado em cerca de 17,8 milhões de hectares, sendo 11,3 de milho-Bt e 6,5 milhões de hectares de milho-Bt mais herbicidas (James, 2005). Diversos estudos têm mostrado que a resistência do milho-Bt às larvas de *S. frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) têm sido superior às linhagens não transgênicas (Williams et al., 1999; Lynch et al.,

Tabela 1. Plantas transgênicas resistentes aos lepidópteros através da expressão das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac de *B. thuringiensis*

Toxinas	Plantas	Insetos-alvo	Referências
Cry1Ab	Repolho	<i>Plutella xylostella</i> L.	Bhattacharya et al. (2002)
	Algodão	<i>Heliothis virescens</i> Fabr.	Perlak et al. (1990)
	Berinjela	<i>Leucinodes orbonalis</i> Guenée	Kumar et al. (1998)
	Milho	<i>Plodia interpunctella</i>	Giles et al. (2000)
		<i>HübnerOstrinia nubilalis</i> Hübner	Koziel et al. (1993)
	Batata	<i>Phthorimaea operculella</i>	Perforoen et al. (1992)
		<i>ZellerHeliothis armigera</i> Hübner	Chakrabarti et al. (2000)
	Arroz	<i>Chilo suppressalis</i> Walker	Fujimoto et al. (1993)
<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> Guenée		Ye et al. (2003)	
Fumo	<i>Manduca sexta</i> L.	Williams et al. (1993)	
Tomate	<i>Heliothis virescens</i> Fabr.	Fischhoff et al. (1987)	
Cry1Ac	Canola	<i>Trichoplusia ni</i> Hübner, <i>Spodoptera exigua</i> Hübner, <i>Heliothis virescens</i> Fabr., <i>Helicoverpa zea</i> Boddie	Stewart et al. (1996)
	Arroz	<i>Plutella xylostella</i> L.	Ramachandran et al. (1998)
	Feijão	<i>Chilo suppressalis</i> Walker	Cheng et al. 1998
	Fumo	<i>Heliothis virescens</i> Fabr., <i>Heliothis zea</i> Boddie, <i>Pseudaoplusia includens</i> Walker <i>Heliothis virescens</i> Fabr.,	Stewart et al. (1996)
		<i>Heliothis zea</i> Boddie, <i>Spodoptera litoralis</i> Boisduval	Mcbride et al. (1995)
	Tomate	<i>Heliothis armigera</i> Hübner	Mandaokar et al. (2000)
Algodão	<i>Pseudaoplusia includens</i> Walker	Beach and Todd (1986)	

1999). *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae) também teve seu desenvolvimento e a sobrevivência reduzidos quando alimentada com grãos de milho-Bt, expressando a toxina Cry1Ab, quando comparados com os insetos criados com o milho convencional (Giles et al., 2000). Ainda potencializado esse efeito, Singer et al. (2000) confirma que as plantas transgênicas produzem de 7 a 19% a mais que as correspondentes não transgênicas.

O uso dessa tecnologia resulta na diminuição do uso de inseticidas e aumento no rendimento de grãos, como ocorre com o milho e algodão comercializados por fazendeiros na Índia que tiveram uma redução de 70% na aplicação de inseticida representando uma economia de US\$ 30 por hectare, aumentando assim o rendimento em 80,87% (Qaim e Zilberman, 2003). As variedades de milho transformadas com *B. thuringiensis* também poderão reduzir a propagação de fungos no armazenamento de grãos, reduzindo os níveis de micotoxinas, além de aumentar a resistência a lepidópteros, como *Sitotroga cerealella* e *Corcyra cephalonica* (Uscha et al., 1993).

Além da eficiência no controle de pragas, as plantas transgênicas têm sido consideradas como seguras, pois Pilcher et al. (1997) avaliando o efeito da ingestão de pólen de milho-Bt que expressa a toxina Cry1Ab sobre três predadores: *Coleomegilla maculata* (Coleoptera, Coccinellidae), *Orius insidiosus* (Hemiptera, Anthocoridae) e *Chrysoperla carnea* (Neuroptera, Chrysopidae), não encontraram diferença significativa no efeito tóxico, para nenhum dos três insetos, quando comparados com a ingestão do milho não transgênico.

“Algodão-Bt”

O algodão é cultivado em 8,5 milhões de hectares, sendo 4,9 milhões de hectares com algodão-Bt e 3,6 milhões de hectares com algodão-Bt mais herbicidas (James, 2005). Stewart et al. (2001) realizaram uma série de ensaios de laboratório para comparar o impacto relativo do cul-

tivar algodão, *Gossypium hirsutum* L., expressando zero, uma, ou duas proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* a vários lepidópteros. Nesses ensaios, os autores constataram que as larvas alimentadas com o tecido da planta que expressa Cry1Ac e Cry2Ab de *B. thuringiensis* foram mais tóxico a *Helicoverpa zea* (Boddie), *S. frugiperda*, e *S. exigua* que cultivares que expressam uma única proteína (Cry1Ac).

Algodão expressando Cry1Ac de *B. thuringiensis*, comercializado para controlar *H. virescens* no campo, mostrou ser uma tecnologia eficiente e com segurança ambiental (Betz et al., 2000). O uso de algodão-Bt resultou em diminuições significativas no uso de inseticidas em países em desenvolvimento, e em alguns casos, também em aumento na rentabilidade (Qaim e Zilberman, 2003).

“Arroz-Bt”

O Irã é o primeiro país a comercializar arroz modificado geneticamente com *B. thuringiensis*, este foi testado em laboratórios onde o arroz-Bt era crescido em estufa e em experimentos de campo de 99 a 10/2004, num total de 6 gerações, matando de 12 a 100% das quatro espécies de insetos que se alimentaram do arroz-Bt. Além disso, o arroz-Bt não mostrou padrão anormal de crescimento e valor nutricional comparada ao arroz não-Bt (www.genetinfo.org/genet/2005/May/msg00078.html).

Algumas variedades japônicas de arroz foram transformadas com os genes que codificam as proteínas Cry (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba e Cry2A) que podem ser tóxicas a vários lepidópteros, entre eles *C. suppressalis*, *Scirpophaga incertulas*, *Marasmia* spp. e *C. medinalis* (Pathak e Khan, 1994). No campo, os ensaios com cultivares de arroz transgênico começaram na China em 1998 (Shu et al., 2000; Tu et al., 2000) e na Índia em 2001.

Os genes sintéticos *crv1Ab* e *cry1Ac* de *B. thuringiensis* foram inseridos em cultivares de arroz e as linhas transformadas expressaram

resistência contra *S. incertulas*, *C. suppressalis* e *C. medinalis*, no laboratório, em casa de vegetação (Fujimoto et al., 1993; Cheng et al., 1998) e também em condições de campo (Tu et al., 2000).

Produtos Comerciais à base de Bt para Lepidópteros

A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável, e bioinseticidas formulados à base de *B. thuringiensis* vêm apresentando resultados satisfatórios no controle de lepidópteros. Na tabela 2 estão relacionados os produtos comerciais de *B. thuringiensis* que contém as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, conforme dados publicados por Navon (2000) e Capalbo et al. (2005).

O emprego de *B. thuringiensis* é altamente desejável em programas de controle de insetos que atacam diversas culturas, devido a sua alta especificidade e a rápida degradação no ambiente (Polanczyk et al., 2003). Entre as vantagens da utilização das proteínas Cry destacam-se sua especificidade aos insetos sensíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos mamíferos e vertebrados, além da ausência de toxicidade às plantas (Whiteley e Schnepf, 1986). Apesar do sucesso das formulações comerciais de *B. thuringiensis*, essas têm várias desvantagens quando aplicadas em condições de campo (Cohen, 1991), pois podem sofrer com a fotoinativação através de luz ultravioleta, da temperatura, do orvalho ou da chuva (Dunkle e Shasha, 1988; McGuire e Shasha, 1990).

As possibilidades de utilização do *B. thuringiensis* no controle biológico foram reconhecidas em 1938, na França, a partir da formulação da “Sporeína” (Weiser, 1986). Desde os anos 50, diversos países como a Rússia, a França, a Alemanha e os Estados Unidos começaram a produzir inseticidas biológicos à base do referido entomopatógeno (Weiser, 1986). Nos anos 60 foi isolada uma cepa de *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, a qual apresentou uma toxicidade de 2 a 200 vezes superior

Tabela 2. - Biopesticidas à base de cepas de *B. thuringiensis* que sintetizam proteínas Cry1Ab e Cry1Ac ativas contra lepidópteros

Ingredientes ativos	Empresas produtoras	Nomes comerciais
<i>Bt kurstaki</i> HD-1	Sumitomo (Abbott)	Biobit, Dipel, Foray
<i>Bt kurstaki</i> HD-1	Thermo Trilogy Corp	Javelin, Steward, Thuricide, Vault
<i>Bt kurstaki</i> HD-1	Iharabras/ Novartis S.A.	Thuricide
<i>Bt kurstaki</i>	Iharabras/ Novartis S.A.	Thuricide PM
<i>Bt kurstaki</i>	Sumitomo (Abbott)	Bactospeine, Futura
<i>Bt kurstaki</i>	Thermo Trilogy Corp	Able, Costar, Florbac
<i>Bt kurstaki</i>	BioDalia, Dalia	Bio-Ti
<i>Bt galleriae</i>	Tuticorin Alkali Chemicals & Fertilizers	Spicturin
YB-1520	Huazhong Agric. University	Mainfeng pesticide
CT-43	Huazhong Agric. University	Shuangdu
<i>Bt aizawai</i> , GC 91	Novartis S.A.	Agree
<i>Bt kurstaki</i> , 3a, 3b	Agri-control	Bac-control PM

àquelas normalmente utilizadas nos produtos comerciais na época (Dulmage, 1970). A partir desse período, a procura por outras cepas foi estimulada e atualmente diversos laboratórios continuam trabalhando nas coleções de novos isolados bacterianos. Entre esses Crickmore et al. (1998) relatam a eficácia de *B. thuringiensis* contra diversas ordens de insetos (lepidópteros, dípteros e coleópteros) e outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários).

Conforme mostra a Tabela 2, os produtos comerciais contendo toxinas específicas para lepidópteros são os mais importantes, pois a maioria dos biopesticidas à base de *B. thuringiensis* usados para controlar pragas agrícolas são formulações de *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, devido à alta toxicidade e amplo espectro de ação dessa cepa às lagartas (Navon et al., 1993). Produtos à base desta bactéria para o controle de pragas agrícolas são comercializados há mais de cinquenta anos, sendo o seu mercado anual estimado em 100 milhões de dólares. Sendo assim há uma previsão de aumento na utilização desse biopesticida bacteriano à medida que as legislações de proteção ambiental mais rigorosas forem adotadas e os

produtos mais eficientes e baratos forem lançados no mercado (Schnepf et al., 1998).

Considerações

Como parte de uma proposta de manejo integrado, a utilização de bioinseticidas, infere a aplicação de produtos sintéticos menos tóxicos e poluentes de forma integrada às plantas transgênicas. Ainda há a possibilidade de numa mesma planta, serem transferidos dois genes diferentes, expressando duas toxinas de *B. thuringiensis* que apresentem diferentes mecanismos de ação. Estas ações poderão prorrogar o surgimento de populações de insetos resistentes às proteínas Cry. Além disso, recomenda-se a utilização de métodos de controle biológico à base de entomopatógenos, que representam um baixo impacto ao ambiente e uma melhor relação custo - benefício ao produtor.

Referências Bibliográficas

ARONSON, A.I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev., 50:1-24.
 BEACH, R.M.; TODD, J.W. 1986.

Comparison of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) populations in soybean and cotton / soybean agroecosystems. J. Entomol. Sci., 21:21-25.

BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharm., 32:156-173.
 BHATTACHARYA, R.C.; VISWAKARMA, N.; BHAT, S.R.; KIRTI, P.B.; CHOPRA, V.L. 2002. Development of insect-resistant transgenic cabbage plants expressing a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis*. Curr. Sci., 83:146-150.
 BOBROWSKI, V.L.; FIUZA, L.M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. 2003. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. Ciência Rural, 34(1):843-850.
 CAPALBO, D.M.F.; VILAS-BÔAS, G.T.; ARANTES, O.M.N.; SUZUKI, M.T. 2005. *Bacillus thuringiensis*: Formulações e Plantas transgênicas. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 34:78-85.
 CHAKRABARTI, S.K.; MANDAOKAR, A.D.; SHUKLA, A.;

- PATTANAYAK, D.; NAIK, P.S.; SHARMA, R.P.; KUMAR, P.A. 2000. *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene confers resistance to potato against *Helicoverpa armigera* (Hubner). Potato Res., 43:143-152.
- CHENG, X.; SARDANA, R.; ALTOSSAR, I. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to yellow stem borer and striped stem borer. Proc. Natl. Acad. Sci., 95:2767-2772.
- COHEN, E. 1991. Photoprotection of B.t. kurstaki from ultraviolet irradiation. Journal of Invertebrate Pathology, 57:343-351.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. 1998. Revision of the literature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Mol. Biol. Rev., 62:807-813.
- DULMAGE, H.D. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. Alesti. J. Invertebr. Pathol., 15:232-239.
- DUNKLE, R.L.; SHASHA, B.S. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environmental Entomology, 17:120-126.
- FISCHHOFF, D.A. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. Biotechnology, 5:807-813.
- FIUZA, L.M. 2004. Receptores de *Bacillus thuringiensis* em insetos. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 32:84-89.
- FONTES, E.M.G.; PIRES, C.S.S.; SUJII, E.R.; PANIZZI, A.R. 2002. The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. Neotropical Entomol., 31(4):497-513.
- FOOD AGRIC. ORGAN. UN (FAO). 2000. Agriculture data. (<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>)
- FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, M. 1999. Managing resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Crit. Ver. Biotechnol., 19:227-276.
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Biotechnology, 11:1151-1155.
- GILES, K.L.; HELLMICH, R.L.; IVERSON, C.T.; LEWIS, L.C. 2000. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* maize grain on *B. thuringiensis*-susceptible *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology, 92(3):1011-1016.
- GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 350p.
- HILDER, V.A.; BOULTER, D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance a critical review. Crop Protection, 18:177-191.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53:242-255.
- JAMES, C. 2005. Uptake of GM crops in 2005: 2005. ISAAA Briefs, ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications), Ithaca, nº 17.
- KOZIEL, M.G.; BELAND, G.L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N.B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, M.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; MEC PHERSON, D.; MEGHIJI, M.R.; MERLIN, E.; RHODES, R.; WARREN, W.G.W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S.V. 1993. Field performance of elite transgenic corns plants expressing insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio Technology, 11:194-200.
- KUMAR, P.A.; MANDAOKAR, A.; SREENIVANU, K.; CHAKRABARTI, S.K.; BISARIA, S.; SHARMA, S.R.; KAUR, S.; SHARMA, R.P. 1998. Insect-resistant transgenic brinjal plants. Mol. Breed, 4:33-37.
- LYNCH, R.E.; WISEMAN, B.R.; PLAISTED, D.; WARNICK, D. 1999. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1Ab toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 92(1):246-252.
- MANDAOKAR, A.D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R.P.; ALTOSAAR, I.; KUMAR, P.A. 2000. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera* Hübner). Crop. Prot., 19:307-312.
- MCBRIDE, K.E.; SVAB, Z.; SCHAAF, D.J.; HOOGAN, P.S.; STALKER, D.M.; MALIGA, P. 1995. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal preprotein in tobacco. Bio Technology, 13:362-365.
- MCGUIRE, M.R.; SHASHA, B.S. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology, 93:1813-1817.
- NAVON, A. 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. Crop Protection, 19:669-676.
- NAVON, A.; HARE, J.D.; FEDERICI, B.A. 1993. Interactions among *Heliothis virescens* larvae, cotton condensed tannin and the Cry1Ac endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Chem. Ecol., 19:2485-2499.
- OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. 2001. Transgenic plants registration. Capturado da internet em fevereiro de 2006. On-line. Disponível no site: <http://www.oecd.gov>.

- PATHAK, M.D.; KHAN, Z.R. 1994. Insect Pests of Rice, International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.
- PERFOROEN, M. 1992. Engineering of insect-resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. *Biotech. Agri.*; 7:135-153.
- PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.O.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; FISHHOLFF, D.A. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio Technology*, 8:939-943.
- PILCHER, C.D.; OBRZYCKI, J.J.; RICE, M.E.; LEWIS, L.C. 1997. Preimaginal development, survival, and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environmental Entomology*, 26(2):446-454.
- POLANCZYK, R.A.; MARTINEZ, S.; OMOTO, C.; ALVES, S.B. 2003. *Bacillus thuringiensis* no manejo integrado de pragas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 31:18-27.
- QAIM, M.; ZILBERMAN, D. 2003. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*, 299:900-902.
- RAMACHANDRAN, S.; BUNTIN, G.D.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; STEWART, C.N. 1998. Greenhouse and field evaluations of transgenic canola against diamondback moth, *Plutella xylostella*, and corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Entomol. Exp. Appl.*; 88:17-24.
- SAXENA, D.; STOTZSKY, G. 2001. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 33:1225-1230.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FIETELSON, J.; ZIEGLER, D. R.; DEAN, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticide crystal proteins. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 62:775-806.
- SCHNEPF, E.; WHITELEY, H.R. 1981. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78:2893-2897.
- SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSCH, R.T. 2002. Economic, Ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annu. Rev. Entomol.*, 47:845-81
- SHU, Q.; YE, G.; CUI, H.; CHENG, X.; XIANG, Y.; WU, D.; GAO, M.; XIA, Y.; HU, C. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Mol. Br.*, 6(4): 433-439.
- SINGER, J.W.; HECKMAN, J.R.; INGERSON MAHAR, J.; WESTENDORF, M.L. 2000. Hybrid and nitrogen source affect yield and European corn borer damage. *Journal of Sustainable Agriculture*, 16(1):5-15.
- STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; RAMACHANDRAN, S.; PARROTT, W.A. 1996. Insect control and dosage effects in transgenic canola containing synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene. *Plant Physiol.*, 112:115-120.
- STEWART, S.D.; ADAMCZYK, J.J. Jr; KNIGHTEN, K.S.; DAVIS, F.M. 2001. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. *J Econ Entomol.*, 94(3):752-60.
- TOJO, A.; AIZAWA, K. 1983. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:576-580.
- TU, J.; ZHANG, G.; DATTA, K.; XU, C.; HE, Y.; ZHANG, Q.; KHUSH, G.S.; DATTA, S.K. 2000. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Nat. Biotechnol.*, 18:1101-1104.
- USHA, C.M.; PATKAR, K.L.; SHETTY, H.S.; KENNEDY, R.; LACEY, J. 1993. Fungal colonization and mycotoxin contamination of developing rice grain. *Mycol. Res.*, 97:795-798.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; BEUCKELEER, M.D. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, 328:33-37.
- WEISER, J. 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in the Soviet Union. *In: Krieg and Huger. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land. Heft*, 233:37-50.
- WHITELEY, H.R.; SCHNEPF, H.E. 1986. The Molecular Biology of Parasporal Crystal Body Formation in *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Microbiology*, 40:549-576.
- WILLIAMS, S.; FRIEDRICH, L.; DINCHER, S.; CAROZZI, N.; KESSMANN, H.; WARD, E.; RYALS, J. 1993. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expression in transgenic plants. *Bio Technonology*, 7:194-200.
- WILLIAMS, W.P.; DAVIS, F.M.; OVERMAN, J.L.; BUCKLEY, P.M. 1999. Enhancing inherent fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) resistance of corn with *Bacillus thuringiensis* genes. *Florida Entomologist*, 82(2):271-277.
- YE, G.Y.; YA, H.W.; SHU, Q.Y.; CHENG, X.; HU, C.; XIA, Y.W.; GAO, M.W.; ALTOSAAR, I. 2003. High levels of stable resistance rice with a cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to rice leafhopper *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) under field conditions. *Crop Protection*, 22:171-178.