



TOXICOLOGIA DE *BACILLUS THURINGIENSIS* ÀS PRAGAS AGRÍCOLAS

Diouneia Lisiane Bertitz

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Aline Olíboni de Azambuja

Bióloga (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Andresa Patrícia Regert Lucho

Engenheira Agrônoma (UFRGS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Neiva Knaak

Bióloga (UNISINOS) e Mestre e Doutoranda em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Rogério Schünemann

Biólogo (UNISINOS) e Mestre em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre (UNISINOS).

Jaime Vargas de Oliveira

Engenheiro Agrônomo (UFSM), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade/Entomologia (UFPEL),

Lidia Mariana Fiuza

Engenheira Agrônoma (UPF), Mestre em Fitotecnia – Fitossanidade (UFRGS), Doutora em Ciências Agrônomicas (ENSAM-Montpellier) e Pós-Doutora em Biotecnologia Vegetal (CIRAD-Montpellier).

O controle microbiano de insetos tem sido considerado um método de controle seguro aos humanos e ao meio ambiente, sendo assim nesse trabalho são apresentados dados de toxicidade de *B. thuringiensis* a insetos-praga, especialmente aos lepidópteros e coleópteros pragas de importância agrícola. Os trabalhos de pesquisa enfatizam os métodos de ensaios toxicológicos em laboratório e campo, utilizando o entomopatógeno *B. thuringiensis* e as formas imaturas das espécies-alvo.

1.1 Os insetos-praga

Entre os insetos-praga para os quais têm sido desenvolvidos estudos e aplicações de controle com *B. thuringiensis* estão os lepidópteros, *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*, e o coleóptero *Oryzophagus oryzae*, os quais serão apresentados como modelo de estudos de toxicidade com *B. thuringiensis*.

A lagarta militar, *S. frugiperda*, ata-

ca e causa danos a várias culturas de importância econômica, como: sorgo, milho, arroz, alfafa, cana-de-açúcar e algodoeiro (Cruz et al., 1999; Gallo et al., 2002), ao passo que, a lagarta da soja *A. gemmatilis* é praga-chave para essa cultura e também tem importância para culturas como amendoim, feijão e alfafa (Gallo et al., 2002). Já o gorgulho aquático, *O. oryzae*, cujas larvas são conhecidas como bicheira-da-raiz-do-arroz, é o principal inseto-praga da cultura do arroz irrigado no sul do Brasil (Martins et al., 2004) e, por isso, é também um dos mais estudados pelas instituições de pesquisa dessa região (Costa, 2003).

As lagartas de *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* podem ser criadas em laboratório, desde que respeitados determinados padrões de temperatura, umidade relativa e fotoperíodo (28°C, 70%U.R., 12h de fotoperíodo). O ciclo evolutivo desses insetos, em laboratório, ocorre em torno de 30 dias, desde a fase de ovo até a emergência do adulto. Os adultos são mantidos em gaiolas de acrílico com alimentação a base de glicose aquosa (10%), onde acasalam e realizam a postura. Os ovos são retirados diariamente e acondicionados junto à dieta artificial, sendo dieta de Poitout para *S. frugiperda* e dieta de Greene para *A. gemmatilis*. As lagartas desenvolvem-se nessa dieta até a formação da pupa, que então são separadas em macho ou fêmea até emergir o adulto, finalizando o ciclo.

No caso de *O. oryzae*, por se tratar de uma larva aquática, que se alimenta das raízes das plantas de arroz, não é descrito nenhum método de criação eficiente desse inseto, em laboratório. Portanto, quando realizados os bioensaios, esses insetos são coletados diretamente de áreas de plantio de arroz infestadas, trazidos ao laboratório para então se-



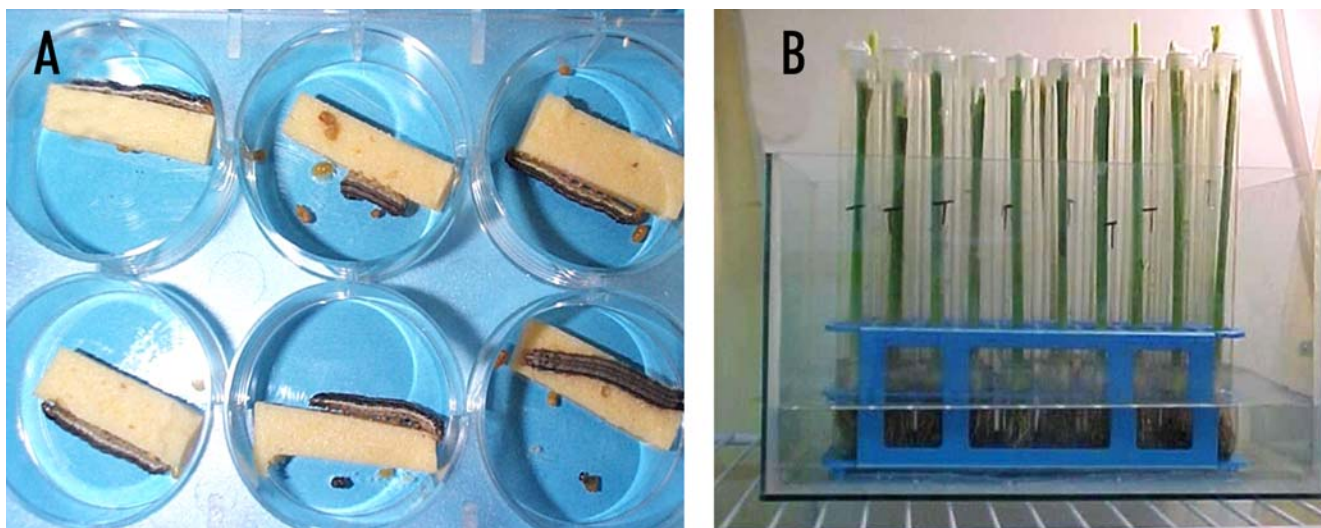


Figura 1. Bioensaios com lagartas de *Spodoptera frugiperda* (A) ou *Anticarsia gemmatalis* e larvas de *Oryzophagus oryzae* (B)

rem utilizados nos ensaios biológicos.

1.2 Bioensaios de *B. thuringiensis* com os insetos-praga

Para determinar a atividade inseticida de isolados bacterianos, os bioensaios podem ser classificados como preliminares ou seletivos. A utilização de suspensão de células e esporos bacterianos é uma forma de identificar isolados ativos cujas propriedades mostram eficiência no controle de insetos-praga.

Bioensaios também são utilizados para determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀), ou seja, a quantidade de entomopatógeno que deve ser utilizada para controlar a metade da população do inseto. Para esses, são usados os isolados que causaram um eficiente índice de mortalidade nos testes preliminares. Nesta análise são utilizadas suspensões contendo células e esporos ou a proteína purificada, dosados em diferentes concentrações. Os ensaios de toxicidade são importantes também, pois revelam injúrias e detrimimento morfológico, além de determinar em quanto tempo ocorre a morte do inseto, Tempo Letal Médio (TL₅₀). Esses dados são então analisados para que, quando aplicado em lavouras, o bioinseticida seja eficiente no controle dos insetos-alvo.

Os ensaios utilizando as lagartas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* podem ser realizados em mini-placas de acrílico, contendo dieta artificial, onde é aplicada a quantidade de inóculo pré-determinada para uma lagarta por placa (Figura 1A). A quantidade de insetos pode variar entre 20 e 50 e o número de repetições entre três e cinco. No caso

do coleóptero *O. oryzae*, os testes podem ser realizados em tubos de ensaio contendo uma planta de arroz, água e a suspensão bacteriana, com 5 larvas do inseto por tubo (Figura 1B). Todos os bioensaios utilizam placas ou tubos controle, contendo os insetos e sem adição dos tratamentos. Os ensaios são acondicionados em câmaras climatizadas nas mesmas condições de criação ou manutenção dos insetos em laboratório, descritas anteriormente. Os experimentos são avaliados até o 7º dia após a aplicação dos tratamentos e os dados são utilizados para o cálculo da mortalidade corrigida pela fórmula de Abbott (1970).

1.3 Controle de *S. frugiperda* com *B. thuringiensis*

Apesar de inúmeras pesquisas envolvendo esse lepidóptero e seu controle, há dificuldade em encontrar um isolado bacteriano patogênico a essa espécie. Essa afirmação é comprovada no trabalho de Polanczyky et al. (2003) que, utilizando 58 subespécies de *B. thuringiensis* em *S. frugiperda* demonstraram que apenas *B. thuringiensis morrisoni* apresentou 80% de mortalidade das lagartas. Também Silva et al. (2004), testaram 77 isolados sendo que somente 4 foram ativos a espécie-alvo.

Recentemente, Berlitz & Fiúza (dados não publicados) testaram 132 isolados onde apenas um apresentou alta toxicidade ao inseto, com 100% de mortalidade, quando utilizada a suspensão de células e esporos bacterianos. Em outro trabalho, Berlitz et al. (2003) testaram 24 isolados de *B. thuringiensis* provenientes de diversas regiões orizícolas do RS e obteve as maiores mortalidades entre 31,6 e 100%

com apenas cinco isolados, sendo que a cepa com maior potencial inseticida foi analisada quanto ao perfil protéico confirmando a presença de proteínas ativas contra lepidópteros. As reduzidas taxas de mortalidade podem estar relacionadas a diferentes fatores, como por exemplo, o modo de ação das proteínas bacterianas no intestino do inseto, ou modificações no sítio de ligação dessas toxinas na membrana intestinal. Além disso, cada isolado tem uma característica genética particular, ou seja, essas toxinas são codificadas por genes e esses têm uma determinada especificidade.

Em outro trabalho, Berlitz & Fiúza (2004) testaram *B. thuringiensis aizawai* proveniente do produto formulado Xentari® mostrando que a suspensão celular apresentou CL₅₀ de 1,9x10⁸ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia/mL) reduzindo em 56,7% o consumo alimentar das lagartas. Isso indica que a bactéria inibe a alimentação do inseto-praga, o que também está relacionado com a mortalidade das lagartas.

Entretanto o fato de um isolado causar mortalidade às lagartas não implica que, quando purificadas as proteínas tóxicas, essas serão ativas ao inseto. É o que ocorreu na pesquisa de Berlitz (2006), que, quando utilizada a suspensão de células e esporos bacterianos obtiveram 100% de mortalidade, entretanto quando purificadas as proteínas do isolado, essas causaram baixa mortalidade às lagartas apresentando CL₁₀ de 268µg/mL. Esse fato pode estar relacionado ao conjunto de fatores de virulência presentes na bactéria, ou então a presença de outras toxinas como, por exemplo, proteína Vip, exotoxinas, hemolisinas, quitinases, entre outras, que estão presentes na suspensão bacteriana.

A CL_{50} de proteínas Cry de *B. thuringiensis aizawai* para lagartas de 3º instar de *S. frugiperda* foi determinada por Lucho (2004). As proteínas Cry foram obtidas a partir de bioinseticida comercial (Xentari®), purificadas em gradiente de sacarose, solubilizadas em tampão fosfato (pH 10) e avaliadas em SDS-PAGE. Nos bioensaios foram avaliadas seis concentrações de proteínas Cry (0,27 a 8,80 µg/mL) e testemunha (água destilada e esterilizada), sendo aplicados 10 µL sobre a superfície de folhas de milho acondicionadas em mini-placas de acrílico, contendo um inseto. Cada tratamento foi constituído de 30 lagartas e 3 repetições, totalizando 630 insetos.

Os resultados obtidos por Lucho (2004) apontaram CL_{50} de 2,22; 0,41 e 0,18 µg/mL para 2, 3 e 4 dias após a aplicação dos tratamentos, respectivamente, e revelaram que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C e Cry1D sintetizadas por *B. thuringiensis aizawai* são altamente tóxicas à *S. frugiperda*.

Para a mesma espécie, *S. frugiperda*, os dados de Knaak et al. (2006) mostram que a toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac, sintetizadas por *B. thuringiensis thuringiensis* 407 (pH 408) e *B. thuringiensis kurstaki* HD-73, respectivamente, revelaram uma CL_{50} de 9,29 e 1,79 µg/cm² às lagartas de 1º instar.

Nesse sentido, os dados de Lambert et al. (1996) revelam que a proteína Cry1Ac é muito tóxica para *Heliothis virescens*, mas não mostra nenhuma atividade contra *Helicoverpa armigera*. Os mesmos autores relatam que Cry1Ca exibe uma atividade forte contra *S. exigua* e *S. littoralis*, mas não contra *S. frugiperda*. Peyronnet et al. (1997) utilizaram Cry1Aa em *Lymantria dispar* causando uma depolarização rápida e irreversível da membrana intestinal, mas Cry1Ab e Cry1Ac eram inativas. Estes resultados estão de acordo com Van Frankehyzen et al. (1991) que demonstraram um nível alto de toxicidade para Cry1Aa, mas nenhuma atividade às outras duas toxinas, confirmando assim a especificidade das proteínas Cry de *B. thuringiensis* aos lepidópteros.

Considerando os isolados brasileiros, Praça et al. (2004) selecionando cepas de *B. thuringiensis* efetivas contra lagartas de 2º instar de *S. frugiperda*, compararam novas cepas ao *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 (CL_{50} de 0,285 µg/cm²), obtendo CL_{50} de 0,09 e 0,52 µg/cm², para S234 e S997, respectivamente, que revelou a nova cepa S234 como a mais tóxica à *S.*

frugiperda. Já nos estudos com proteínas Cry, Aranda et al. (1996) determinaram que a CL_{50} para *S. frugiperda* das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac foram superiores a 2 µg/cm².

1.4 Controle de *A. gemmatalis* com *B. thuringiensis*

As análises de mortalidade de isolados de *B. thuringiensis* às lagartas de *A. gemmatalis*, realizados por Schünemann (2006), mostraram que entre os 158 isolados testados, 138 foram ativos e 20 inativos. Entre os isolados patogênicos, 39 deles causaram até 29% de mortalidade, 93 entre 30 e 69% e 6 entre 70 e 100%. Análises similares foram encontrados por Bobrowski et al. (2001) com o mesmo banco de bactérias.

Azambuja & Fiuza (2003) obtiveram 37 e 50% de mortalidade corrigida contra a lagarta-da-soja utilizando dois isolados naturais de *B. thuringiensis* provenientes de regiões rizícolas do RS. Nas avaliações de patogenicidade realizadas com isolados primitivos, Souza et al. (1999) e Silva et al. (2004), revelam grandes índices de isolados patogênicos a mesma ordem de inseto. Por outro lado, a ocorrência de isolados inativos a lepidópteros é bastante frequente. As variações entre as concentrações de proteínas inseticidas presentes em cada suspensão bacteriana pode ser a causa dessas diferenças entre a atividade inseticida dos isolados.

A ausência de patogenicidade de isolados de *B. thuringiensis* pode estar relacionada à classe de proteínas sintetizadas pelo mesmo, a qual não apresenta especificidade ao inseto praga-alvo. Porém, Fiuza (2003) e Praça et al. (2004) destacam que o mesmo isolado bacteriano pode ter atividade inseticida sobre espécies da mesma ordem, ou até mesmo a outras ordens de insetos.

Em muitos casos a diferença de toxicidade das cepas de *B. thuringiensis* pode estar relacionada ao próprio inseto, onde, por exemplo, a extensão da variação genética de *A. gemmatalis* pode estar relacionada a transferência de genes entre populações geográficas e o tempo em que essas populações encontram-se separadas, onde o mecanismo de isolamento reprodutivo se torna uma barreira efetiva (Sosa-Gómez, 2004). Sendo assim, os dados da suscetibilidade de *A. gemmatalis* aos diferentes isolados de *B. thuringiensis* são importantes para um manejo local ou regional desse inseto-praga, pois em m trabalhos envolvendo cepas de *B. thuringiensis kurstaki*, por exemplo, Mascarenhas et al. (1998) e Dias et al. (1999) encontraram diferentes índices de mortalidade

da mesma espécie.

1.5 Controle de *O. oryzae* com *B. thuringiensis*

Para *O. oryzae* são relacionados poucos dados na literatura a respeito da ação de proteínas de *B. thuringiensis*. Por se tratar de uma larva que se alimenta das raízes da planta de arroz, portanto fica submersa, é difícil o acesso de bioinseticidas ao local. Os atuais métodos de controle dessa praga restringem-se aos inseticidas químicos que são utilizados basicamente no tratamento de semente ou distribuídos em cobertura na água de irrigação.

Na busca de métodos alternativos de controle desse inseto, o entomopatógeno *B. thuringiensis* mostra-se promissor na obtenção de plantas transgênicas resistentes à praga-alvo. Nesse sentido, Pinto et al. (2003), selecionaram 6 isolados de *B. thuringiensis* com a presença de genes da classe *cry3* ou *cry7*, que sintetizam as proteínas inseticidas à ordem dos coleópteros, e avaliaram sua atividade inseticida à *O. oryzae*. Dentre os isolados testados pelos autores, dois causaram mortalidade corrigida de 100%, três entre 59 e 67% e um em torno de 50%.

Esses dados foram utilizados por Berlitz (2006) que selecionou um isolado com a presença do gene *cry3* que causou 53% de mortalidade com a suspensão de células e esporos bacterianos, onde as proteínas inseticidas foram purificadas, dosadas e aplicadas nos bioensaios com os insetos (Figura 1B). Os resultados dessa pesquisa podem ser aplicados na utilização de genes *cry*, uma vez que causou a mortalidade das larvas do coleóptero, quando utilizadas às proteínas purificadas, obtendo uma CL_{50} de 5,4µg/mL. Em estudos preliminares com essa espécie-alvo, Steffens et al. (2000) obtiveram 53,41% de mortalidade às larvas do gorgulho aquático com um isolado de *B. thuringiensis* contendo genes *cry 3*, específicos a coleópteros. Considerando os dados mencionados, os resultados obtidos pelos diferentes autores confirmaram a predição da atividade inseticida de *B. thuringiensis* possivelmente devido à presença dos genes *cry3* e *cry7*, os quais codificam toxinas específicas a coleópteros (Ben-Dov et al., 1997).

1.6 Referências

- Abbott, W. S., 1925, A method of computing the effectiveness of insecticide. J. Econ. Ent. v.18, p.265-67.
- Aranda E.; Sanchez, J.; Peferon, M.; Gue-reca, L.; Bravo, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Midgut Epithelial Cells

- of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Journal Invertebrate Pathology, 68:203–212.
- Azambuja, A.O.; Fiuza, L.M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* e patogenicidade à *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). In: Mostra de Iniciação Científica da Unisinos. Junho, São Leopoldo, RS. 2003.
- Ben-Dov, E.; Zaritski, A.; Dahan, E.; Barak, Z.; Sinai, R.; Manasherob, R.; Khamraev, A.; Troitskaya, E.; Dubitsky, A.; Berezina, N. & Margalith, Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 63: 4883-4890, 1997.
- Berlitz, D.L.; Azambuja, A.O.; Antonio, A.C.; Oliveira, J.V.; Fiuza, L.M. Novos Isolados e Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* Aplicados no Controle de Lagartas de *Spodoptera frugiperda*. In: III Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXV Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Agosto, Camboriú, SC. 2003.
- Berlitz, D.L.; Fiuza, L.M. 2004. Avaliação toxicológica de *Bacillus thuringiensis aizawai* para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), em laboratório. Biociências 12(2): 115-119.
- Berlitz, D.L. 2006. Toxicologia de *Bacillus thuringiensis* e *Melia azedarach* em organismos associados a orizicultura. Dissertação (Mestrado), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2004. São Leopoldo: UNISINOS, 2006, 83p.
- Bobrowski, V. L.; Pasquali, G.; Zanettini, M. H. B.; Fiuza, L. M., 2001: Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Brazilian Journal of Microbiology. 32: 105–109.
- Costa, E.L.N. Controle de *Oryzophagus oryzae* (Lima, 1936) com formulações comerciais de fungos entomopatogênicos. Porto Alegre: UFRGS, 2003. Dissertação (Mestrado – Fitossanidade) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003. 64p.
- Cruz, I.; Figueiredo, M.L.C.; Matoso, M.J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Circular Técnica nº 30. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1999. 40 p.
- Dias, S. C.; Sagardoy, M. A.; Silva, S. F.; Dias, J. M. C. S. 1999. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from Argentinean soils. Biological Control. 44 (1): 59-71.
- Fiuza, L.M. *Bacillus thuringiensis* no controle de insetos: diversidade, especificidade e impacto ambiental. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8. São Pedro, 2003. Resumos... Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 2003. p. 47.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Baptista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.
- Knaak, N.; Franz, A.R.; Santos, G.F.; Fiuza, L.M. 2006. Efeito *in vitro* de cepas e proteínas cry de *Bacillus thuringiensis* em fungos fitopatogênicos da cultura do arroz irrigado.. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 57p.
- Lucho, A.P.R. Manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz irrigado. Dissertação (Mestrado em Diversidade e Manejo da Vida Silvestre), Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2004. São Leopoldo: UNISINOS, 2004, 73p.
- Lambert, B.; Buysse, L.; Decock, C.; Janssens, S.; Piens, C.; Saey, B.; Seurinck, J.; Audenhove, K.V.; VanRie, J.; Vliet, A.V.; Peferoen, M. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. Applied Environmental Microbiology 62: 80-86.
- Martins, J.F.S.; Grützmacher, A.D.; Cunha, U.S. Descrição e manejo integrado de insetos-praga em arroz irrigado. In: Gomes, A. da S.; Magalhães JR., A.M. (Editores). Arroz irrigado no Sul do Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004a. p.635-675.
- Mascarenhas, R. N., D. J.; Boethel, B. R.; Leonard, M. L.; Boyd, And. G. Clemens. 1998. Resistance monitoring to *Bacillus thuringiensis* insecticides for Soybean Loopers (Lepidoptera: Noctuidae) collected from soybean and transgenic *Bt* cotton. Journal Economic Entomology. 91: 1044-1050.
- Peyronnet, O.; Vachon, V.; Brousseau, R.; Baines, D.; Schwartz, J.L.; Laprade, R. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* Toxins on the Membrane Potential of Lepidopteran Insect Midgut Cells. Applied Environmental Microbiology 63: 1679-1684.
- Pinto, L.M.N.; Azambuja, A.O.; Oliveira, J.V.; Menezes, V.G.; Fiuza L.M. Toxicidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* pré-selecionados por PCR, contra *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). In: III Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXV Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Agosto, Camboriú, SC. 2003.
- Polanczyk, R.A.; Silva, R.F.P.; Fiuza, L.M. 2003. Screening of *Bacillus thuringiensis* isolates to *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Arquivos do Instituto Biológico 70(1): 69-72.
- Praça, L.B.; Batista, A.C.; Martins, E.S.; Siqueira, C.B.; Dias, D.G.S.; Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R.; Monnerat, R.G. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens lepidoptera, coleoptera e diptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39(1):11-16.
- Schünemann, Rogério, L.M. 2006. *Bacillus thuringiensis* Aplicado no Manejo de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos. 54p.
- Souza, M. T. De; Lima, M. I.; Silva-Werneck, J. O.; Dias, J. C. S.; Ribeiro, B. M. 1999. Ultrastructural and molecular characterization of the paraesporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. Biocell. 23: 43-49.
- Sosa-Gómez, Daniel R. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Genetics and Molecular Biology, v. 27, p. 378-384, 2004.
- Silva, S. M. B.; Silva-Werneck, J. O.; Falcão, R.; Gomes, A. C.; Fragoso, R. R.; Quezado, M. T.; Neto, O. B. O.; Aquiar, J. B.; De Sá, M. F. G.; Bravo, A.; Monnerat, R. G. 2004. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. Journal Applied Entomology. 128: 102-107.
- Steffens, C.; Azambuja, A. O.; Pinto, L. M. N.; Oliveira, J. V.; Menezes, V. G.; Fiuza, L. M. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* às larvas de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae) In: II Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado e XXIV Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Agosto, Porto Alegre, RS. 2001.
- Van Frankenhayzen, K.; Gringorten, J.L.; Milne, R.E.; Gauthier, D.; Pusztai, M.; Brousseau, R.; Masson, L. 1991. Specificity of activated CryIA proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 for defoliating forest Lepidoptera. Applied Environmental Microbiology 57:1650–1655.

