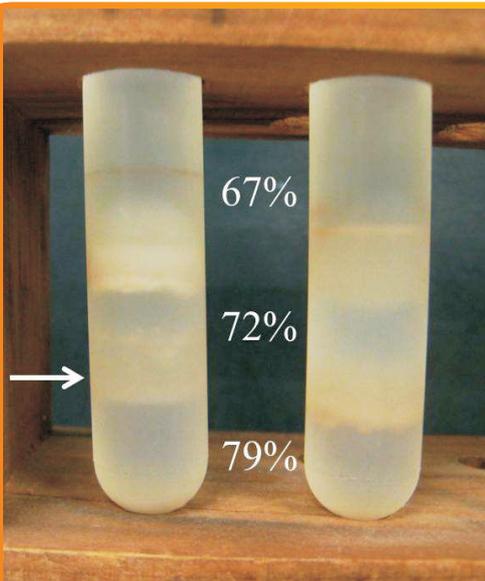


Isolamento de Proteínas Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* por Gradiente de Sacarose



ISSN 1679-0154

Dezembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 37

Isolamento de Proteínas Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* por Gradiente de Sacarose

Maria Lucília Machado da Costa
Luciano Vilela Paiva
Fernando Hercos Valicente

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Maria Lucília Machado da Costa

1ª edição

1ª impressão (2011): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Milho e Sorgo

Costa, Maria Lucília Machado da.

Isolamento de proteínas Cyt de *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* por gradiente de sacarose / Maria Lucília Machado da Costa, Luciano Vilela Paiva, Fernando Hercos Valicente. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

17 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619-0154; 37).

1. Controle biológico. 2. Praga de planta. 3. Milho. I. Paiva, Luciano Vilela. II. Valicente, Fernando Hercos. III. Título. IV. Série. CDD 632.96 (21. ed.)

© Embrapa 2011

Sumário

Introdução	7
Material e Métodos	9
Agradecimentos	14
Referências	14

Isolamento de Proteínas Cyt de *Bacillus* *thuringiensis* subsp. *israelensis* por Gradiente de Sacarose

*Maria Lucília Machado da Costa*¹

*Luciano Vilela Paiva*²

Fernando Hercos Valicente^{3*}

Introdução

O milho é cereal mais cultivado no Brasil, com cerca de 51.382,9 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 12.896,8 milhões de hectares, tornando o país o terceiro maior produtor do grão no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos e China, respectivamente (CONAB, 2010). A maior parte desses grãos, cerca de 70%, é destinada à cadeia produtiva de suínos e aves, sendo o restante destinado ao consumo humano e à produção de energia através do etanol.

Entretanto, um dos fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção é a incidência de pragas, gerando prejuízos à lavoura, com importante impacto econômico. A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil, reduzindo a produção de grãos em até 37% (FATORETTO et al.,

¹Estudante de Mestrado em Biotecnologia Vegetal (Bolsista Capes), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000, costa.nlm@gmail.com

²Professor do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Caixa Postal 3037, CEP 37.200-000, luciano@ufla.br

³Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG – Caixa Postal 151, CEP 35.701-970 *Autor correspondente: valicent@cnpmc.embrapa.br

2007). Ela ocorre durante todos os estádios de desenvolvimento da cultura atacando o cartucho e as folhas, podendo destruí-los completamente (WERNECK et al., 2000). O controle desta praga é realizado, em sua maioria, por inseticidas químicos, cuja utilização abusiva desencadeia vários problemas, que vão desde a falta de especificidade dos produtos à poluição ao meio ambiente, podendo ocasionar também, a seleção de populações de insetos resistentes.

Hoje são conhecidos muitos microrganismos com potencial a serem empregados no controle biológico de insetos-praga. Dentre eles, o *Bacillus thuringiensis* destaca-se por apresentar atividade tóxica contra espécies das ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Hymenoptera, dentre outras, onde se incluem importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (LERECLUS et al., 1993). As toxinas produzidas pelo *B. thuringiensis* são altamente específicas aos insetos, sendo inócuas aos humanos, vertebrados e plantas e são biodegradáveis (BRAVO et al., 2007). Desta maneira, este microrganismo torna-se uma alternativa viável e econômica para o controle de pragas, evitando a contaminação do meio ambiente, além de preservar os inimigos naturais.

A característica patogênica do *B. thuringiensis* deve-se à produção de uma inclusão protéica de formato cristalino. Esse cristal é sintetizado durante a fase de esporulação, sendo constituído por polipeptídeos denominados δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), que vão sendo acumuladas nas células bacterianas (HERRNSTADT et al., 1986; IBARRA et al., 2003). Ambas fazem parte de uma classe de toxinas conhecida como PFT (Do inglês *pore-forming toxins*), contudo não apresentam relação filogenética e homologia estrutural, mas possuem propriedades bioquímicas em comum (BRAVO et al., 2007). Estas proteínas são produzidas por diferentes genes que são específicos a grupos insetos, apresentando um caráter monogênico, facilitando sua manipulação em processos biotecnológicos. Estes cristais, depois de ingeridos pelos insetos, sofrem ativação proteolítica, se solubilizando em decorrência da ação de proteases

presentes no intestino. Estas enzimas atuam em pH alcalino, condição esta encontrada no intestino dos insetos (pH ~10), convertendo as protoxinas em toxinas ativas. Estas, por sua vez, unem-se às células do epitélio do intestino formando poros, causando um desequilíbrio osmótico e iônico, levando à morte do inseto por inanição ou septicemia (BRAVO et al., 2007).

O crescente uso da proteína cristal e sua não toxicidade aos mamíferos têm impulsionado a busca por novas cepas com diferentes espectros de ação. Além disso, existe uma grande preocupação com o manejo preventivo de resistência de insetos-alvo às δ -endotoxinas (Cry e Cyt) presentes nos atuais transgênicos comerciais e biopesticidas (CAROZZI et al., 1991).

Estudos envolvendo bioensaios são úteis para a avaliação da toxicidade das cepas de Bt a grupos de inseto. Entretanto, existe ainda, a dificuldade de se obter as proteínas purificadas, havendo grandes esforços neste sentido por parte dos grupos de pesquisa da área.

Este trabalho teve por objetivo apresentar uma metodologia para o isolamento da proteína Cyt a partir de uma cepa de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti).

Proteínas Cyt

As proteínas Cyt (codificadas pelos genes *cyt*) são citotoxinas isoladas do *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*. São sintetizadas durante a fase de esporulação. São encontradas também em menor quantidade em outras subespécies, tais como *kyushuensis*, *jegathesan*, *medeliin*, *morrisoni*, *neoleoensis*, dentre outras (DELÉCLUSE et al., 1995; JUÁREZ-PÉREZ et al., 2002). Em contraste com as toxinas Cry, as Cyt não se ligam a receptores específicos, interagindo diretamente com a membrana lipídica dos insetos, formando poros ou destruindo-na através de ação detergente (BUTKO, 2003).

A proteína Cyt1Aa é a mais estudada e compõe a maior parte do cristal do *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (45-50%). Ela apresenta peso molecular de 28 kD, podendo ser ativada através da utilização de proteases como a proteinase K, gerando um fragmento tóxico de 25 kDa (CHOW et al., 1989). No intestino do inseto esta ativação é mediada pela presença da tripsina onde é formada uma toxina ativa com cerca de 249 aminoácidos (KONI; ELLAR, 1994). Estas proteínas não apresentam homologia na sequência de aminoácidos com as proteínas Cry (BUTKO, 2003). As proteínas Cyt possuem um domínio único, cuja estrutura apresenta uma arquitetura α/β , onde as α -hélices formam uma camada exterior e as folhas- β permanecem encobertas dentro do interior da proteína (LI et al., 1996). A proteína Cyt1Aa tem sua atividade citolítica atribuída à hidrofobicidade e habilidade de se ligar a fosfolípidios. Esta proteína é inserida na membrana através da criação de canais cátion-seletivos com cerca de 1–2 nm de diâmetro, levando à lise osmótica (THOMAS; ELLAR, 1983).

Até o presente foram descritas dez toxinas Cyt, pertencentes a três classes agrupadas em ranques de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos, Cyt1, Cyt2 e Cyt3 (Cyt1Aa, 1Ab, 1Ba, 1Ca, 2Aa, 2Ba, 2Bb, 2Bc, 2Ca e 3Aa) (CRICKMORE, 2011).

Estudos apontam que as proteínas Cyt agem de forma sinérgica com as proteínas Cry, atuando como receptores adicionais destas, potencializando sua ação (OESTERGAARD et al., 2007). O mecanismo proposto é que as proteínas Cyt se ligam à membrana do inseto deixando expostas regiões que são reconhecidas pelas proteínas Cry, facilitando a oligomerização destas, e conseqüentemente a formação de poros (PÉREZ et al., 2005). No Bti esta ligação ocorre no loop α -8 do domínio II da proteína Cry11Aa que também está relacionado com a interação desta com o receptor da fosfatase alcalina (FERNÁNDEZ et al., 2005). Mutações nesta região afetam esta interação específica, reduzindo o sinergismo entre estas proteínas (PÉREZ et al., 2005).

A sinergia Cyt/Cry é maior que as interações entre proteínas Cry

(CRICKMORE et al., 1995). Wu et al. (1994) expressando várias combinações de genes Cyt/Cry, observou um incremento de quatro vezes na atividade tóxica das proteínas, em relação às proteínas Cry utilizadas isoladamente. Outros trabalhos demonstram também que as proteínas Cyt não apresentam ação tóxica quando utilizadas isoladamente e não são determinantes para a toxicidade da cepa. Delécluse et al. (1991) silenciaram o gene *cyt1Aa* do Bti na tentativa de eliminar sua atividade inseticida contra dípteros, fato este que não ocorreu. A maioria dos estudos envolvendo genes *cyt* mostra que estes são eficientes contra dípteros (PÉREZ et al., 2005), apontando seu importante papel no controle destes grupos. Entretanto genes *cyt* foram identificados em cepas de *B. thuringiensis* tóxicas a lepidópteros e coleópteros (GUERCHICOFF et al., 1997, 2001). Por exemplo, o gene *cyt2Ba* foi encontrado no *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, sendo este, efetivo contra coleópteros. Esses resultados mostram a necessidade de mais testes envolvendo outros grupos, como por exemplo, os lepidópteros.

Material e métodos

Isolado bacteriano

As proteínas Cyt foram isoladas a partir de uma cepa de Bti, proveniente da Unesp – Jaboticabal/SP. Esta cepa contém as classes de genes *cyt1* e *cyt2*, confirmados via PCR (Figura 1) e sequenciamento.

Obtenção do DNA bacteriano e PCR para confirmação dos genes *cyt*

O DNA genômico da cepa de Bti foi isolado de acordo com Bravo et al. (1998), com algumas modificações. A cepa foi plaqueada em meio LB (Lurian Bertani) sólido por aproximadamente 16 horas à temperatura de 28°C. Com uma alça de platina foi coletada uma pequena amostra e transferida para um microtubo contendo 100 µl de água ultra pura estéril.

Em seguida, os microtubos foram estocados em freezer -80°C por 15 minutos. Após este período, os tubos foram levados ao banho-maria por 10 minutos na temperatura de 100°C e as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 segundos e o sobrenadante coletado e utilizado nas reações de PCR.

Foto: Maria Lucília Machado da Costa

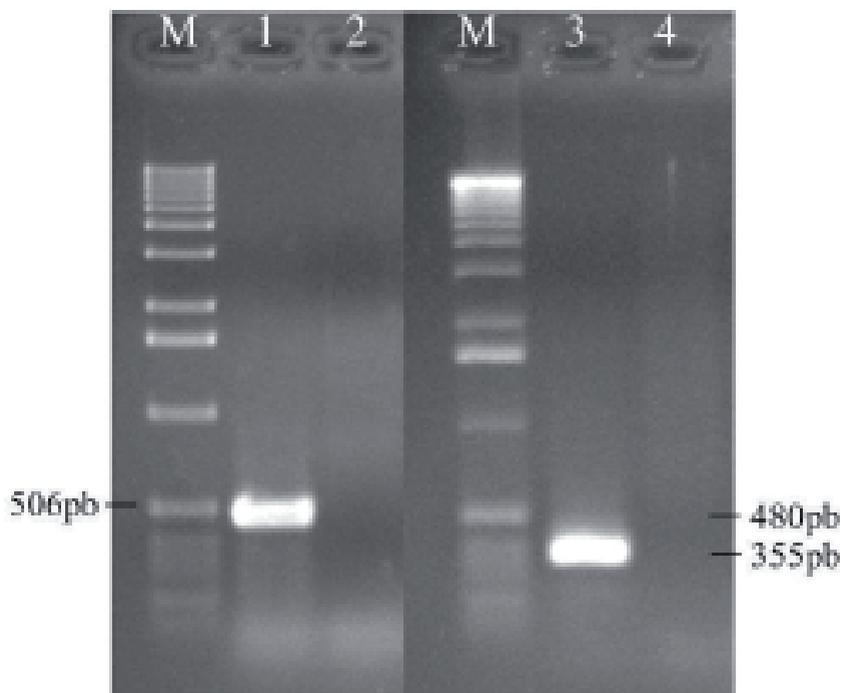


Figura 1. Produtos de PCR obtidos com os iniciadores específicos para as classes de genes *cyt*. Canaletas 1 e 3 – Bti, com os genes *cyt1* e *cyt2*, respectivamente, e canaletas 2 e 4 – Controle negativo (Cepa HD1). M – Padrão de peso molecular (DNA Ladder 1Kb, Invitrogen®).

Nas reações de amplificação foram utilizados *primers* específicos para as classes de genes *cyt1* e *cyt2*, descritos por IBARRA et al. (2003). As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 20 μL , consistindo de 5 μL de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl_2 ; 1 U Taq DNA polimerase (Waterville, USA), 0,125 mM de dNTPs e

0,4 μM de cada primer. As amplificações foram efetuadas em termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hanburg, Germany) e os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 56°C (*cyt2*) ou 58°C (*cyt1*) por 1 min e 72°C por 1 min, seguido por uma alongação final de 72°C por 10 minutos, mantendo a reação à 4°C.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5 % (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0). Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 15 minutos, descorado em água por 10 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Gel Logic 200 (Kodak, New York, USA).

Extração de proteínas e gradiente de sacarose

Com uma alça de platina foi coletada uma pequena amostra dos *pellets* da cepa de Bti, sendo transferida para 200 mL de meio LB e mantida em *shaker* a 150 rpm a 28°C por 72 horas. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspenso em 15 mL 0.01% Triton. Esta etapa foi repetida três vezes. Após essa lavagem, o *pellet* foi solubilizado utilizando 10 mL do tampão (0.01% Triton, 10 mM NaCl e 50 mM Tris-HCl, pH 8.0). Após esta etapa, as inclusões foram purificadas em gradiente descontínuo de sacarose (3 mL de cada: 67%, 72% e 79% em 50mM Tris-HCl; 10mM KCl pH 7.5). As amostras foram centrifugadas a 24000 rpm por 72 horas em ultracentrífuga Himac CP 80 β (Figura 2) (Hitashi Koki®, Japão). Em seguida, foi coletada a banda entre os gradientes 72% e 79% (Figura 3), e feita a observação dos cristais em microscópio. Ao material coletado, foram adicionados 5 mL do tampão (50mM bicarbonato de sódio e 10 mM β -mercapetanol, pH 10.5) e mantido em *shaker* a 37°C por três horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em 3 mL de 0.1 M Tris pH

8.0. Ao final da extração, a proteína foi ativada utilizando tripsina ($0,5\mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$) e mantida em *shaker* a 150 rpm a 37°C por duas horas e inativada utilizando 0,15 mM PMSF (Fenil metil sulfonil fluído).

Foto: Maria Lucília Machado da Costa



Figura 2. Centrifuga modelo Himac CP 80β (Hitashi Koki®, Japão) utilizada no gradiente de sacarose.

Foto: Maria Lucília Machado da Costa

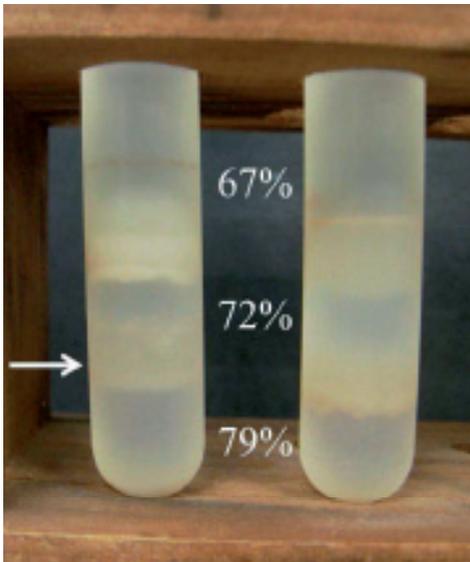


Figura 3. Gradiente descontínuo de sacarose (67%, 72% e 79%) de amostras de *Bacillus thuringiensis* sv *israelensis*. Seta indica a fase coletada contendo proteínas Cyt.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita segundo descrito por Valicente et al. (2010). Alíquotas das proteínas foram misturadas a igual volume de tampão (0,0625 M Tris, 2,3% SDS (m/v), 10% (v/v) glicerol, 5% (v/v) β-mercaptoetanol e 0,1% (m/v) azul de bromofenol, pH 6,8). Essa mistura foi mantida em água fervente por cinco minutos e transferida para o gelo até o momento da aplicação no gel. Os géis e sobre géis contiveram 12,5% e 6% de acrilamida:bis 37:1, respectivamente. Ao final os mesmos foram corados com 1% (m/v) de azul de comassie diluído em 10% (v/v) ácido acético e 50% (v/v) etanol. Como padrão de peso molecular das proteínas foi utilizado o BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

Análise da purificação da proteína Cyt

O protocolo de extração utilizado no presente estudo possibilitou o isolamento das proteínas Cyt. A figura 4 mostra o perfil protéico da cepa de Bti sem a metodologia de extração e após o uso do gradiente de sacarose. Na coluna referente à proteína purificada observa-se uma banda com peso molecular próximo ao das proteínas Cyt (~27 kDa). A análise realizada com microscópio óptico de contraste de fase revelou a presença de cristais.

Foto: Maria Lucília Machado da Costa

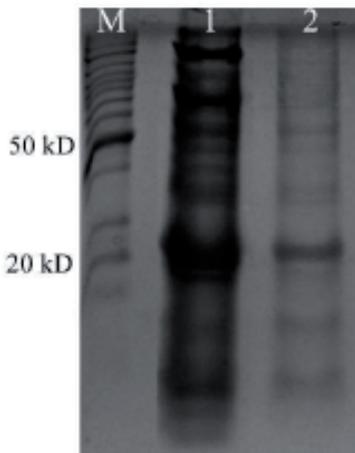


Figura 4. SDS-PAGE da cepa de *Bacillus thuringiensis* sv *israelensis*. Canaleta 1 – Cepa sem o protocolo de extração, 2 – Cepa após a extração e gradiente de sacarose. M – Padrão de peso molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen®).

A obtenção de proteínas purificadas possibilita estudos com bioensaio envolvendo diferentes grupos de insetos, como a *S. frugiperda*. Vários trabalhos vêm sendo realizados objetivando o isolamento de diferentes proteínas de Bt com diferentes metodologias, específicas para cada uma delas. Desta maneira, o presente estudo se torna uma ferramenta útil para futuros trabalhos utilizando a proteína Cyt.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro ao presente estudo.

Referências

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 4965-4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Cuernavaca, v. 49, p.423-435, 2007.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.

CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W.; EVOLA, S.; KOZIEL, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain reaction product profiles. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology**

Letters, Delft, v. 131, p. 249–254, 1995.

CRICKMORE, N. **Bt toxin nomenclature**. Falmer, 2011. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso: 10 mar. 2011.

CHOW, E.; SINGH, G. J. P.; GILL, S. S. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino modifiers. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2779-2788, 1989.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sexto levantamento**. Conab, Brasília, 2010.

DELÉCLUSE, A.; CHARLES, J. F.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Deletion by in vivo recombination shows that the 28-kilodalton cytolytic polypeptide from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is not essential for mosquitocidal activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 11, p. 3374-3381, 1991.

DELÉCLUSE, A.; ROSSO, M-L.; RAGNI, A. Cloning and expression of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.12, p.4230-4235, 1995.

FATORETTO, J. C.; SENA, J. A. D.; BARRETO, M. R.; LEMOS, M. V. F.; BOIÇA JUNIOR, A. L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 36, p. 737-745, 2007.

FERNÁNDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SEGOVIA, L.; RODRÍGUEZ, M. H.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* binds its receptor in *Aedes aegypti* mosquito larvae trough loop a-8 of domain II. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 79, p. 3508-3514, 2005.

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed *cyt* gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2716-2721, 1997.

GUERCHICOFF, A.; DELECLUSE, A.; RUBINSTEIN, C. P. The *Bacillus thuringiensis* *cyt* genes for hemolytic endotoxins constitute a gene family. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 1090-1096, 2001.

HERRNSTADT, C.; SOARES, G. G.; WILCOX, E. R.; EDWARDS, D. L. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran insects. **Nature Biotechnology**, New York, v. 4, p. 305-308, 1986.

IBARRA, J.; RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

JUÁREZ-PÉREZ, V.; GUERCHICOFF, A.; RUBINSTEIN, C.; DELÉCLUSE, A. Characterization of Cyt2Bc toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1228-1231, 2002.

KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic delta-endotoxins. **Microbiology**, Reading, v. 140, p. 1869-1880, 1994.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A. E.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p.37-69. In: ENWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M.; HIGGS, S. (Ed.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. West Sussex: John Willey e Sons, 1993. p. 37-69.

LI, J.; KONI, P. A.; ELLAR, D. J. Structure of insecticidal δ -endotoxin Cyt B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 257, p. 129-152, 1996.

OESTERGAARD, J.; EHLERS, R-U.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; REAL, M. D. Binding of Cyt1Aa and Cry11Aa Toxins of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* to brush border membrane vesicles of *Tipula paludosa* (Diptera: Nematocera) and subsequent pore formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 3623-3629, 2007.

PÉREZ, C; FERNÁNDEZ, L. E; SUN, J.; FOLCH, J. L.; GILL, S. S; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa functions as membrane bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, p. 18303-18318, 2005.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 154, p. 362-368, 1983.

VALICENTE, F. H.; PICOLI, E. A. T.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. T.; CARNEIRO, A. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* *cry1* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 53, p. 360-366, 2010.

WERNECK, J. O. S.; NETO, J. R. M. V.; TOSTES, A. N.; FARIA, L. O.; DIAS, J. M. C. S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 221-227, 2000.

WU, D.; JOHNSON, J. J.; FEDERICI, B. A. 1994. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Malden, v. 13, p. 965-972, 1994.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA