



AMANDA DO CARMO ALVES

**PROSPECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE CEPAS DE
Bacillus thuringiensis EFICIENTES NO CONTROLE DE
Spodoptera eridania, *Spodoptera cosmioides* E *Spodoptera
frugiperda***

LAVRAS – MG

2021

AMANDA DO CARMO ALVES

**PROSPECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*
EFICIENTES NO CONTROLE DE *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*
E *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente

Orientador

Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana

Co-orientador

LAVRAS-MG

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da
Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Alves, Amanda do Carmo.
Prospecção e análise genômica de cepas de *Bacillus thuringiensis*
eficientes no controle de *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*
e *Spodoptera frugiperda* / Amanda do Carmo Alves. - 2021.
65 p. : il.

Orientador(a): Fernando Hercos Valicente.
Coorientador(a): Ubiraci Gomes de Paula Lana.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.
Bibliografia.

1. Controle Biológico. 2. Sequenciamento. 3. Genes inseticidas. I.
Valicente, Fernando Hercos. II. de Paula Lana, Ubiraci Gomes. III.
Título.

AMANDA DO CARMO ALVES

**PROSPECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*
EFICIENTES NO CONTROLE DE *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* E
*Spodoptera frugiperda***

**PROSPECTION AND GENOMIC ANALYSIS OF *Bacillus thuringiensis*
STRAINS EFFICIENT IN CONTROLLING *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*
AND *Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de setembro de 2021.
Dr. Fernando Hercos Valicente - UFLA
Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana - EMBRAPA
Dra. Sylvia Morais de Sousa Tinoco - EMBRAPA
Dr. Frederick Mendes Aguiar - EMBRAPA

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

**LAVRAS-MG
2021**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe que sempre me apoiou, incentivou e me mostrou que a família é a base de tudo. Foram suas orações que me mantiveram firme em meu propósito. Te amo mais que tudo nesta vida!

À minha irmã Angélica, que sempre esteve na torcida me dando total apoio e suporte em cada decisão com muita paciência, incentivo e amor. Principalmente na reta final. Você é um exemplo pra mim.

Ao meu orientador Dr. Fernando Hercos Valicente pela oportunidade concedida e confiança no desenvolvimento dos trabalhos aqui realizados. E ao Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana, pela ajuda e incentivo.

À Embrapa Milho e Sorgo, por cederem a estrutura e materiais para a condução dos ensaios. Aos funcionários Ismael e Celso, pela amizade e todo apoio prestado e a todos os estagiários que contribuíram para a realização desse trabalho.

Um obrigado em especial a Lillian e Bárbara, a quem considero como irmãs por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e torcendo por mim, independente da distância entre nós.

Aos amigos, Karine e Thiago que acompanharam de perto todas as dificuldades, conquistas, tristezas e alegrias desde o começo. meus sinceros agradecimentos, por todos os momentos que dividimos no laboratório e na vida. Sem dúvidas, sem a ajuda de vocês eu nem estaria aqui escrevendo estes agradecimentos.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de auxílio aos estudos.

Aos membros da banca pelo interesse e disponibilidade.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho. Meu muito obrigado!

E finalmente a Deus, por sempre me iluminar, me guiar e por colocar estas pessoas aqui citadas e outras que não mencionei no meu caminho. Muito obrigada!

RESUMO

Apesar do Brasil ser um dos principais produtores de grãos do mundo, ocorrem perdas significativas na produção por causa de pragas do gênero *Spodoptera*, com destaque para as espécies *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides*. Estas pragas causam desfolha e danos diretos às folhas e/ou vagens em diferentes culturas. O controle biológico com microrganismos entomopatogênicos vem sendo empregado com eficácia há anos para o manejo de pragas. Especialmente, a bactéria *Bacillus thuringiensis* vem sendo utilizada em diferentes formulações de bioinseticidas ou como fonte de genes inseticidas para o desenvolvimento de plantas transgênicas. O objetivo deste trabalho foi identificar cepas de *B. thuringiensis* eficientes contra as lagartas *Spodoptera eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda* e os genes inseticidas presentes na cepa com mortalidade superior a 90% para as três pragas. Para isso, foram utilizadas 30 cepas de *B. thuringiensis* provenientes da Coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas/MG para a realização dos bioensaios seletivos com lagartas neonatas das diferentes pragas. Os bioensaios foram realizados usando 150 μ L da solução de esporos e cristais de cada cepa com a concentração de 3×10^8 esporos/mL, sendo a mortalidade avaliada durante sete dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com grupos experimentais de quatro repetições com 16 insetos cada. Seis das trinta cepas de *B. thuringiensis* causaram mortalidade simultânea acima de 80% em três espécies de *Spodoptera*, e nenhuma delas produziu β -exotoxina. A cepa de *B. thuringiensis* 1408 causou mortalidade acima de 90% para as três espécies de *Spodoptera*, portanto, teve seu genoma sequenciado utilizando a plataforma BGISEQ-500. Foram obtidos 39 *scaffolds* resultando num cromossomo de 5.196.838 pb, conteúdo G+C igual 34,8%, 5.887 regiões codificantes e um total de cinco genes codificadores das proteínas inseticidas Cry1Ib, Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac e Vip3Ag. Ficou também evidenciado que as proteínas inseticidas Cry1Da e Vip3Ag, por possuírem similaridade menor que 95% com as já depositadas em bancos, são pertencentes a novas subclasses. Portanto, a cepa 1408 de *B. thuringiensis* mostrou-se ativa contra três importantes espécies do gênero *Spodoptera* e contém genes inseticidas, podendo ser utilizada para produção de novos bioinseticidas e/ou como fonte de genes para desenvolvimento de novos eventos de plantas transgênicas resistente a insetos-praga.

Palavras-chave: Sequenciamento, controle biológico, Bt, genes inseticidas.

ABSTRACT

Despite Brazil being one of the main grain producers in the world, there are significant losses in production due to pests of the *Spodoptera* genus, especially the species *S. frugiperda*, *S. eridania* and *S. cosmioides*. These pests cause defoliation and direct damage to leaves and/or pods in different crops. Biological control with entomopathogenic microorganisms has been used effectively for years to manage pests. In particular, the bacterium *Bacillus thuringiensis* has been used in different formulations of bioinsecticides or as a source of insecticide genes for the development of transgenic plants. The aim of this work was to identify efficient *B. thuringiensis* strains against *Spodoptera eridania*, *S. cosmioides* and *S. frugiperda* caterpillars and the insecticide genes present in the strain with mortality above 90% for the three pests. Thirty strains of *B. thuringiensis* from the Collection of Microorganisms of Embrapa Milho and Sorgo in Sete Lagoas/MG, Brazil were used to carry out selective bioassays with newborn caterpillars of different pests. Bioassays were carried out using 150 μ L of the solution containing spores and crystals of each strain at a concentration of 3×10^8 spores/mL, with mortality assessed for seven days. A completely randomized experimental design was used with 4 replications with 16 insects each. Six of the 30 strains of *B. thuringiensis* caused simultaneous mortality above 80% in three species of *Spodoptera*, and none of them produced β -exotoxin. The *B. thuringiensis* 1408 strain caused mortality above 90% for the three *Spodoptera* species, therefore, its genome was sequenced using the BGISEQ-500 platform. 39 scaffolds were obtained resulting in a chromosome of 5,196,838 bp, G+C content equal to 34.8%, 5,887 coding regions and a total of five genes encoding the insecticidal proteins Cry1Ib, Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac and Vip3Ag. It was also evidenced that the insecticidal proteins Cry1Da and Vip3Ag, for having similarity less than 95% with those already deposited in banks, belong to new subclasses. Therefore, the *B. thuringiensis* 1408 was shown to be active against three important species of the *Spodoptera* genus and contains insecticide genes, which can be used for the production of new bioinsecticides and/or as a source of genes for the development of new events in transgenic plants resistant to pest insects.

Keywords: Sequencing, biological control, Bt, insecticidal genes.

SUMÁRIO

1)INTRODUÇÃO	8
2)REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1) Pragas agrícolas.....	9
2.1.1) Cultivo de Soja e milho.....	9
2.1.2) <i>Spodoptera cosmioides</i> (Walker, 1858)	10
2.1.3) <i>Spodoptera eridania</i> (Stoll, 1782).....	11
2.1.4) <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797).....	12
2.1.5) Controle de pragas.....	13
2.2) <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
2.2.1) Histórico	14
2.2.2) Nomenclatura e classificação	16
2.2.3) Proteínas inseticidas	17
2.2.4) β -exotoxinas	18
2.3) Biotecnologia	19
2.4) Análises genômicas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20
3)OBJETIVOS	22
3.1) Objetivo Geral	22
3.2) Objetivos Específicos	22
4)MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1) Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	22
4.2) Criação dos insetos.....	23
4.3) Preparo das suspensões de <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
4.4) Bioensaios Seletivos.....	24
4.5) Detecção da produção de β -exotoxinas.....	24
4.6) Análises genômicas	25

4.6.1) Extração de DNA	25
4.6.2) PCR para detecção do gene <i>thuE</i>	26
4.6.3) Sequenciamento genômico.....	26
4.6.4) Montagem do <i>Draft</i> genoma da cepa 1408	26
4.6.5) Montagem do cromossomo	27
4.6.6) Montagem dos plasmídeos	27
4.6.7) Anotação do genoma.....	27
4.6.8) Identificação de genes que codificam proteínas inseticidas.....	28
5)RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1) Bioensaios seletivos	28
5.2) Avaliação da produção de β -exotoxinas	32
5.3) Análise da qualidade do genoma.....	34
5.4) Montagem do cromossomo	35
5.5) Montagem dos plasmídeos	38
5.6) Anotação do genoma.....	39
5.7) Determinação dos genes que codificam proteínas inseticidas	41
6)CONCLUSÃO	47

1) INTRODUÇÃO

A produção brasileira de grãos é uma das maiores do mundo, sendo que as estimativas de produção para a safra 2020/2021 de algodão, arroz, milho, soja, feijão e trigo é de 260,8 milhões de toneladas (CONAB, 2021). Diversos estudos têm indicado que na próxima década o Brasil terá uma produção de grãos em torno de 300 milhões de toneladas (MAPA, 2019), com crescimento anual em torno de 2,4% até 2028/2029 (CONAB, 2019).

Apesar da crescente produção as culturas de soja, milho e algodão sofrem constantes ataques de pragas. Dentre as principais pragas que causam os maiores danos podemos citar o gênero *Spodoptera*. Neste trabalho, as espécies *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* foram escolhidas por causarem além de desfolha, danos diretos às vagens em diferentes culturas de interesse econômico. Ambas as pragas são polífagas, ou seja, permanecem em pequena densidade em diversos hospedeiros até migrarem para outras espécies de plantas para completarem seu desenvolvimento (AFONSO; AROLDO; MAROCHI, 2002; CASMUZ et al., 2017; ZACHÉ et al., 2012).

O estabelecimento de estratégias de manejo é fundamental para o controle dos danos as culturas. O manejo de *Spodoptera* é principalmente realizado pelo controle químico (DAN et al., 2010; DE OLIVEIRA, et al., 2006; WAQUIL et al., 1982). Contudo, este tipo de controle gera danos à saúde e ao meio ambiente e por não ser seletivo, os organismos não-alvo também são afetados (AKUTSE et al., 2020; CRUZ; RESENDE, 2004; DE OLIVEIRA, et al., 2006; WAQUIL et al., 1982). Visando a redução dos danos causados pelo uso excessivo de produtos químicos sintéticos, o controle biológico tem sido implementado para ser utilizado em conjunto com o controle químico e outras práticas de controle (CRUZ; RESENDE, 2004; VALICENTE, 2018). O controle biológico visa o controle de pragas a partir do uso de inimigos naturais como predadores e microrganismos, como fungos, bactérias e vírus (BORROR et al., 1989; GALZER; FILHO, 2016; PARRA, 2000; VALICENTE, 2018).

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada em formulações no controle biológico devido a sua ação inseticida, concebida principalmente pela produção de proteínas durante o processo de esporulação (Cry e Cyt) ou durante a fase de crescimento vegetativo (Vip e Sip) (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001 BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; KNOWLES et al., 1993; PALMA et al., 2014). A ação destas proteínas é de grande interesse, pois minimizam os riscos à saúde de humanos e ao meio ambiente (DE SOUZA et al., 1999; SANAHUJA et al., 2011). O *B. thuringiensis* também exerce papel muito importante na produção de plantas transgênicas, uma vez que seus genes inseticidas podem ser expressos

gerando proteção contra insetos-praga e, conseqüentemente, a redução no uso de inseticidas químicos sintéticos (GALZER; FILHO, 2016; PEREIRA, 2015; VAECK et al., 1987).

O sequenciamento de genomas completos de microrganismos teve um salto nos últimos anos devido aos sequenciamentos de nova geração (LAND et al., 2015; LOMAN et al., 2012a). Devido a isso diversos genomas de *B. thuringiensis* tem sido depositado em bancos públicos, o que favorece a descoberta de novas proteínas inseticidas, análise estrutural e funcional do genoma e de plasmídeos (LIU et al., 2017; MA et al., 2020; PAREEK; SMOCZYNSKI; TRETYN, 2011).

Desta maneira, este trabalho tem como objetivo a identificação de cepas de *B. thuringiensis* eficientes no controle de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* e os genes codificadores de proteínas inseticidas presentes em seus genomas.

2) REFERENCIAL TEÓRICO

2.1) Pragas agrícolas

2.1.1) Cultivo de Soja e milho

O cultivo de grãos no Brasil e no mundo possui importância social e econômica, impactando diretamente na geração de empregos e no fornecimento de produtos para alimentação humana e animal (NETO et al., 2004; SANTOS et al., 2018). Dentre os grãos de maior importância no País, destacam-se o milho e a soja.

O milho (*Zea mays*) pertencente à família Poaceae é um dos cereais mais cultivados no mundo. Além da sua importância na alimentação humana e animal, a utilização como matéria prima na produção de biocombustíveis coloca este grão como um dos mais importantes para o agronegócio (MAXIMIANO 2017; SOLOGUREN, 2015). A produção brasileira de milho na safra 2020/2021 está estimada em aproximadamente 96,4 milhões de toneladas (CONAB, 2021). Em comparação com a safra anterior é visto um aumento da área total plantada de 7,1% com 19.840,7 mil ha (CONAB 2021).

A soja (*Glycine max*) pertence à família das Fabaceae e possui ampla adaptabilidade, o que desperta grande interesse econômico (LEAL-COSTA; ARAGÃO; TAVARES, 2008; PEREIRA, 2015). Devido aos altos teores de proteína, a soja tem sido altamente utilizada na alimentação humana e produção de ração animal, dispondo de um amplo mercado (GAZOLA; ZUCARELI; CAMARGO, 2014). Segundo dados da CONAB (2021) a área plantada de soja apresentou crescimento de 4,2% em relação à safra anterior com 38,5 milhões de hectares. Este

crescimento proporcionou uma produção de 135,9 milhões de toneladas de soja e um aumento de 8,8% em comparação à safra passada (CONAB, 2021). Entretanto, o crescimento anual que é esperado pode ser influenciado por diversos fatores, sendo que o ataque de diversas pragas é um dos mais preocupantes, pois leva a perdas na produtividade (AVILA; GRIGOLLI, 2017). A expansão das áreas agrícolas tem deixado as plantações mais susceptíveis ao ataque de insetos, ácaros e outros organismos (COSTA et al., 2018).

As pragas que atacam diferentes culturas podem ser encontradas tanto no solo, quanto em vagens, grãos e folhas, dependendo da fase de desenvolvimento ou preferência alimentar do inseto (QUINTELA, 2001; RODRIGUES et al., 2018). Várias espécies de pragas já são amplamente conhecidas, valendo destacar que nas últimas décadas vem surgindo nas lavouras de soja e milho as lagartas desfolhadoras pertencentes ao gênero *Spodoptera* (POSTALI PARRA; COELHO, 2019; SILVAIN; LALANNE-CASSOU, 1997; THOMAZINI, 2001).

2.1.2) *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858)

A espécie *S. cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera, Noctuidae) é conhecida como lagarta das vagens ou lagarta marrom, sendo encontrada por toda América do Sul (BAVARESCO et al., 2002). É uma espécie polífaga, ou seja, se alimenta de diversos tipos de plantas e possui alta taxa de sobrevivência em culturas que são irrigadas (BAVARESCO et al., 2004; KERGOAT et al., 2012). *Spodoptera cosmioides* foi descrita por Walker em 1958 no Brasil, considerada sinônima de *S. latifascia*, descrita pelo mesmo autor em 1956 na Jamaica (SILVAIN et al., 1997; ZACHÉ et al., 2012). Entretanto, tais espécies foram diferenciadas por estratégias moleculares, morfológicas, fisiológicas e comportamentais (SILVAIN et al., 1997).

No Brasil, *S. cosmioides* tem causado danos principalmente em flores, grãos e vagens de algodão, milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar e algodão (BAVARESCO et al., 2002; GORDY et al., 2015). Entretanto, também tem sido relatada como hospedeira em culturas como pimentão, tomateiro, begônia, cebola, mudas de eucalipto, mamoneiro, mangueira, pimentão doce, poejo, berinjela e hortaliças (HABIB; PALEARI; AMARAL, 1985; ZENKER; SPECHT; CORSEUIL, 2007).

Severos danos relacionados a ação de *S. cosmioides* foram relatados em cultivos de milho transgênico resistentes a insetos na Bahia e Sergipe em 2013 (TEODORO et al., 2013). Esses danos foram provocados por lagartas do 5º e 6º ínstar (TEODORO et al., 2013). Para o desenvolvimento destas lagartas, elas se alimentam de outros hospedeiros, até que estes entrem em senescência e, ao procurar por alimento, migram para os cultivos de milho, provocando

assim, grandes perdas nas culturas (BOIÇA JUNIOR et al., 2013; MUCHALAK et al., 2020; TEODORO et al., 2013).

2.1.3) *Spodoptera eridania* (Stoll, 1782)

A *Spodoptera eridania* (Stoll, 1782), mais conhecida como lagarta das folhas, pertence à família Noctuidae (EFROM et al., 2013). No passado, foi classificada no gênero *Xylomyges* por TODD; POOLE (1980). Existem diversos sinônimos na literatura para designação da espécie como, *Laphygma eridania* (Cramer), *Prodenia eridania* (Cramer) e *Xylomyges eridania* (Cramer), entre outros (CORTEZ; WAQUIL, 1997). É frequentemente encontrada no sudoeste dos Estados Unidos, México, Caribe, América central, Argentina, Chile e Uruguai atacando diversas culturas por ser um inseto polífono (DE SOUZA et al., 2012; GOULART et al., 2011). Dentre as várias espécies do grupo de lagartas desfolhadoras que atacam a cultura da soja, a *S. eridania* tem se destacado por causar prejuízos econômicos principalmente aos sojicultores da região dos cerrados (SARDINHA DE SOUZA et al., 2012).

São relatadas cerca de 202 espécies de plantas como hospedeiras dessa praga (MONTEZANO et al., 2014). Dentre as principais hospedeiras, destacam-se o milho, algodão, feijão, arroz, pimentão batata doce, beterraba, berinjela, corda-de-viola, soja, couve, dentre outras (MENEGUIM; NEVES, 2005; JESUS et al., 2013; MONTEZANO et al., 2014).

Há pouco tempo, a espécie *Spodoptera eridania* era considerada como praga secundária na cultura de algodão (DOS SANTOS et al., 2005). No entanto, devido ao sistema de rotação entre algodão e soja e à presença de plantas invasoras como corda-de-viola, as lagartas no final de seu ciclo, migram das plantas de soja para as plantas invasoras e posteriormente para a cultura de algodão (DOS SANTOS et al., 2005). No algodão, as lagartas podem permanecer atacando, desde o estágio vegetativo até a fase final, danificando folhas e hastes (JESUS et al., 2013). Com isso, a ocorrência de *S. eridania* a cada safra, devido à disponibilidade de hospedeiros alternativos, vem aumentando gradativamente (MONTEZANO et al., 2014). Um método bem-sucedido de controle dentro do manejo integrado de pragas (MIP) consiste na eliminação de plantas invasoras e o distanciamento entre os cultivares de soja e algodão (GRAVENA, 1992; HOELHERT et al., 2018).

A semelhança no padrão de coloração e a grande variabilidade intraespecífica, geralmente aliada ao dimorfismo sexual, a taxonomia do gênero *Spodoptera* tem tornado confusa, havendo, em geral, vários sinônimos para cada espécie (POGUE, 2002; SILVA et al., 2012).

2.1.4) *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

A lagarta *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), vem ocasionando nos últimos anos grandes perdas econômicas, principalmente na cultura de milho e algodão (CRUZ; TURPIN, 1983; POGUE, 2002). No Brasil, os danos econômicos chegam a 34% da produção de grãos, o que pode levar à perda anual em torno de US\$ 400 milhões (GANIGER et al., 2018).

Conhecida como lagarta-do-cartucho por atacar o “cartucho” ou região central da planta, causa danos nas folhas antes destas abrirem, ou seja, em toda parte aérea (BUNTIN, 1986). No milho, o ataque pode ocorrer no período vegetativo, provocando a morte da planta e no período reprodutivo, onde as lagartas são vistas no pendão e nas espigas (BUNTIN, 1986; WAQUIL et al., 1981).

Sua distribuição ocorre em todo mundo por ser uma espécie cosmopolita (POGUE, 2002). Apesar de possuir preferência por regiões de zonas tropicais e subtropicais das Américas, pode ser encontrada em regiões temperadas do continente norte americano em certas épocas do ano (SANTOS et al., 2004). A velocidade de sua dispersão pelo mundo vem sendo cada vez mais relatada. Ocorrências na África Ocidental e Central foram vistas em 2016 e em 2018 na Índia, ambas em plantações de milho (GOERGEN et al., 2016).

Devido ao fato de ser altamente polífaga, esta praga possui alta capacidade de dispersão em diversas plantas hospedeiras. Os hospedeiros, bem como os danos causados são dependentes da quantidade e qualidade das plantas hospedeiras disponíveis, o que impacta diretamente nas condições do seu desenvolvimento (ARAGÃO, 1993). No Brasil, a ocorrência já foi relatada por todo território, devido às condições favoráveis do ambiente (CRUZ, et al., 1995). Atualmente são conhecidas, cerca de 186 espécies de plantas hospedeiras, entre elas, a cana-de-açúcar, milho, sorgo, algodão e soja (CRUZ; TURPIN, 1983).

As lagartas *S. frugiperda* são responsáveis pelos danos principalmente no milho, normalmente com a presença de uma lagarta por cartucho devido ao canibalismo desta espécie (SANTOS, et al., 2004). Quando o período larval termina, as lagartas penetram o solo e se transformam em pupas onde o período pupal pode durar de 6 a 55 dias (FIGUEIREDO; MARTINS-DIAS; CRUZ, 2006).

2.1.5) Controle de pragas

Dentre as pragas que atacam as lavouras de milho e soja, o gênero *Spodoptera* é considerado como pragas em expansão pela frequência crescente e intensidade de danos em diversas regiões produtoras onde não eram consideradas pragas-chave (CORTEZ; WAQUIL, 1997; CRUZ, et al., 1995; LEVY; HABECK, 2015). Os danos provenientes do ataque de pragas variam de acordo com a severidade das infestações, região, genótipo, bem como período de semeadura (FIGUEIREDO et al., 2005; OLIVEIRA, 1987).

Historicamente, o método mais difundido para o controle de pragas é a utilização de inseticidas químicos (OLIVEIRA, 1987; WAQUIL et al., 1982). Na cultura de milho no Brasil, cerca de 14 aplicações de inseticidas químicos são feitas a cada ciclo (VALICENTE; TUELHER, 2009). No entanto, vários casos de seleção de insetos resistentes, contaminação ambiental e elevação de custos de produção limitaram a eficácia deste tipo de controle (COSTA et al., 2018). O uso mal planejado também contribuiu com a evolução da resistência moléculas amplamente utilizadas, como organofosforados, carbamatos, piretroides, benzoilureias e diamidas (RIFFEL et al., 2012).

Para contornar estes problemas, o MIP consiste numa estratégia que vem sendo empregada com eficácia tanto em sistemas agroecológicos quanto na agricultura convencional para a elaboração de protocolos de monitoramento de pragas (DE OLIVEIRA et al., 2006; RIFFEL et al., 2012). O MIP emprega o uso de táticas de controle, isoladamente ou associadas, numa estratégia baseada em análises de custo e benefício, que levam em conta o impacto sobre os produtores, sociedade e o ambiente (PANIZZI; PARRA, 2009). Uma das técnicas utilizadas no MIP é o controle biológico, que envolve a utilização de inimigos naturais para o controle das pragas (GRAVENA, 2011; PANIZZI; PARRA, 2009). O uso de vírus, fungos, bactérias e nematóides no controle biológico de pragas se tornou uma das estratégias mais bem-sucedidas nos últimos anos (DE OLIVEIRA et al., 2006; PARRA, 2019).

Juntamente com a utilização de microrganismos, a produção de híbridos comerciais transgênicos expressando proteínas inseticidas estão disponíveis no mercado desde 2008 como uma opção essencial (MICHELOTTO et al., 2017). Esses híbridos têm sido desenvolvidos para expressão isolada ou combinada de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*.

2.2) *Bacillus thuringiensis*

2.2.1) Histórico

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva da família Bacillaceae. Descoberta no Japão por Ishiwata em 1902, foi chamada de "Sottokin-Bacillus" que significa "morte súbita-Bacillus" por estar relacionada a mortalidade do bicho-da-seda (*Bombix mori* L.) (HEIMPEL; ANGUS, 1960).

Em 1915, Aoki e Chigasaki descreveram a doença que esta bactéria causava nas lagartas do bicho-da-seda. A partir destes estudos iniciais, foi possível especular que a bactéria seria tóxica para os insetos podendo assim ser utilizada no controle dos mesmos. Contudo, os primeiros estudos realizados não foram suficientes para determinar o mecanismo de toxicidade apresentado pelo *B. thuringiensis* (HABIB; ANDRADE 1998; RAMIREZ-LEPE; RAMIREZ-SUERO, 2012).

Posteriormente em 1915, *B. thuringiensis* foi isolado de lagartas de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) por Ernst Berliner na Alemanha, sendo nomeada *Bacillus thuringiensis Berliner*, em homenagem a província de onde foi isolada (HEIMPEL; ANGUS, 1960). Continuando suas pesquisas, Berliner descreveu a existência de um cristal no interior do *B. thuringiensis*, mas somente na Europa no ano de 1920, os primeiros ensaios começaram a ser desenvolvidos para seu uso no controle biológico (HABIB et al, 1998; POLANCZYK; ALVES, 2003).

Em 1927, Mattes conseguiu isolar uma cepa de *B. thuringiensis* de *Ephestia* sp. (Lepidoptera: Pyralidae) e, com este isolado, diversas pesquisas foram realizadas, levando a produção na França, em 1938, do primeiro bioinseticida comercial: *Sporeine* (DUBOIS; LEWIS, 1981; GALZER; FILHO, 2016; HUSZ, 1930). Contudo, mesmo com a produção do bioinseticida, ainda era desconhecido o que causava a patogenicidade que levava a morte dos insetos (GOBBO, 2016). Na Segunda Guerra Mundial, ocorreram grandes avanços científicos, tanto que o ano de 1939 foi marcado pela descoberta do DDT (diclorodifenitricloroetano) devido as suas propriedades inseticidas, e seu baixo custo (BEAGLE; YAMAMOTO, 1992; GOBBO, 2016). Nessa perspectiva, o interesse de empresas e pesquisadores no desenvolvimento de biopesticidas diminuiu drasticamente (GOBBO, 2016).

No ano de 1953 o pesquisador Hannay foi o primeiro a associar a patogenicidade encontrada no *B. thuringiensis* aos corpos parasporais, que mais tarde foram chamados de cristais. A estrutura e o papel dos cristais foram descobertos em 1956 por Angus, demonstrando que a presença dos cristais causava morte decorrente de paralisia nos insetos (ANGUS, 1984;

HEIMPEL; ANGUS, 1960). A produção dos cristais ocorre durante o período de esporulação, sendo uma característica do gênero *Bacillus* (HABIB; ANDRADE, 1998).

O uso dos cristais de *B. thuringiensis* começou a ganhar espaço com inúmeras pesquisas desenvolvidas, o que levou ao conhecimento de quais ordens são susceptíveis a patogenicidade do *B. thuringiensis*, com destaque para Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera e Simuliidae (DROBNIOWSKI; ELLAR, 1988; ESTRUCH et al., 1996; KAMAR et al., 2013).

Entre 1950-1960 países da União das Repúblicas Socialistas Soviéticas, além da Alemanha e França, desenvolveram produtos em larga escala baseados na tecnologia do *B. thuringiensis* (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992; SANCHIS, 2011). Nesse período, a empresa *Pacific Yeast Products*, lançou em 1956 na Califórnia o “Thuricide”, entretanto, o produto somente ficou disponível para testes 1958 nos Estados Unidos (HABIB et al., 1991; SANSINENA, 2012). Em 1959, a *Biochem Products S.A* produziu o primeiro produto industrial à base de *B. thuringiensis* que teve sua produção bem documentada e obteve a patente do “Bactospéine” (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992; SANCHIS, 2011).

Mesmo com inúmeros avanços, o uso de biopesticidas não era a primeira escolha dos agricultores para o manejo de pragas, já que o DDT era mais eficaz (ENTWISTLE et al., 1993; FONTANA; MORAES, 1988; RAMOS, 2008). A dificuldade foi ainda maior por causa da baixa eficácia dos biopesticidas devido à perda de estabilidade, espectro limitado de ação e degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (NAVON, 2000). Entretanto, devido ao acúmulo do DDT e a difícil degradação deste no meio ambiente, muitos países proibiram seu uso (GOBBO, 2016).

Com a proibição do uso do DDT, as pesquisas para encontrar outras formas de manejo de pragas foram novamente impulsionadas. Em 1970, uma cepa de *B. thuringiensis* foi isolada por Dulmage na lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) (DE BARJAC; LEMILLE, 1970). Esta descoberta proporcionou grandes transformações no cenário, devido a sua toxicidade ser 200 vezes maior do que as cepas até então isoladas (SANCHIS, 2011). De Barjac e Lemille sorotiparam a cepa e atribuíram ela a linhagem HD-1, variedade kurstaki (DE BARJAC; LEMILLE, 1970).

Após o isolamento da cepa HD-1, as pesquisas para o desenvolvimento de biopesticidas contendo *B. thuringiensis* cresceram, principalmente devido à resistência dos insetos aos inseticidas sintéticos (MOAR et al., 1995; SANCHIS, 2011). Investimentos cresceram para o desenvolvimento de pesquisas para isolar cepas com alta taxa de mortalidade para diversas espécies de insetos (SANCHIS, 2011).

As pesquisas propiciaram a elucidação dos genes responsáveis pela toxicidade do *B. thuringiensis*, e grandes avanços foram dados para o desenvolvimento de várias tecnologias (BOBROWSKI et al., 2003). A clonagem dos genes inseticidas de *B. thuringiensis* permitiu a inserção dos genes e expressão de proteínas em plantas configurando uma nova etapa para a biotecnologia (BOBROWSKI et al., 2003; SCHNEPF; WHITELEY, 1981).

Avanços nesse campo visaram aumentar a eficiência a longo prazo, para assim, ser possível um melhor entendimento dos processos que envolvem o mecanismo de resistência dos insetos (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013). Novas proteínas podem gerar avanços biotecnológicos a diferentes ordens, que podem auxiliar no manejo integrado de pragas (SUBBANNA et al., 2018).

2.2.2) Nomenclatura e classificação

B. thuringiensis é compreendida ao grupo de bactérias *B. cereus sensu lato*, que inclui cinco outras espécies, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* e *B. weihenstephanensi* (KNOWLES et al., 1993; HÖFTE et al., 1989; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007). *B. thuringiensis* apresenta estrutura em forma de bastonetes organizados em pares ou cadeias podendo medir 0,5 a 2,5 µm de largura e 1,2 a 10 µm de comprimento (BOBROWSKI et al., 2003; KNOWLES et al., 1993). É encontrada principalmente em solo, insetos, folhas de coníferas e produtos armazenados (FIGUEIREDO et al., 2013; SCHNEPF et al., 1998). Quando em condições nutricionais ou ambientais desfavoráveis, ocorre o processo de esporulação (FIUZA, 2010; SCHNEPF et al., 1998). Durante a fase estacionária de seu ciclo de vida, esporos permanecem latentes, e isso pode durar anos, até que o ambiente esteja favorável para seu crescimento (BOBROWSKI et al., 2001; SCHNEPF et al., 1998).

A esporulação e a formação de cristais são mecanismos altamente estudados em *B. thuringiensis*, pois confere a atividade inseticida (SCHNEPF et al., 1998). Os cristais ou δ-endotoxinas são inclusões de natureza proteica que durante a esporulação produzem proteínas Cry e Cyt; e durante a fase vegetativa produzem proteínas VIP (FIGUEIREDO, et al., 2013; SCHNEPF et al., 1998).

Com o advento da tecnologia de sequenciamento de DNA em larga escala, foi viabilizado progressos na área da genômica. Atualmente estão depositadas no NCBI 670 sequências completas e *drafts* de genomas de *B. thuringiensis*, sendo que seu genoma varia de 5,2 a 6,8 Mb e o número de genes estudados está entre 5343 a 7170 (NCBI, 2021). Entretanto, devido à grande diversidade genética que as cepas de *B. thuringiensis* possuem mutações e

novos genes que levam a proteínas diversas tem sido relatado (JOUZANI; VALIJANIAN; SHARAFI, 2017; VIANA et al., 2020).

2.2.3) Proteínas inseticidas

Durante a fase estacionária de crescimento, o *B. thuringiensis* produz as δ -endotoxinas (GATEHOUSE, 2008). Estas proteínas foram classificadas em dois grupos, com base na especificidade de seu alvo: as proteínas Cry e Cyt (BUTKO et al., 2003; LI et al., 1991). As proteínas Cyt apresentam atividade tóxica *in vivo* para a ordem Diptera, incluindo mosquitos e moscas negras e as Cry tem ação em lepidópteros, coleópteros, dípteros (BRAVO et al. 2012; BRAVO; GILL; MAAGD et al., 2001; ROH et al., 2007; SOBERÓN, 2007; THOMAS; ELLAR, 1983).

A nomenclatura proposta por Höfte e Whiteley sofreu algumas alterações, propostas por Neil Crickmore e colaboradores. Não são mais utilizados números romanos e sim arábicos, assim sendo, CryIIIa se torna Cry3 (CRICKMORE et al., 2018). As classes também foram alteradas, sendo que a classificação é dada pela sequência de aminoácidos que compõem cada proteína, devido a esta mudança, atualmente já são descritos 78 grupos de proteínas Cry (CRICKMORE et al., 2021).

Alguns fatores são muito importantes para o mecanismo de ação das proteínas Cry no intestino das lagartas. A solubilização das proteínas é um exemplo, pois este passo depende do pH presente no intestino das lagartas (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; KNOWLES, 1994; SCHNEPF et al., 1998). A maior eficácia do uso de *B. thuringiensis* em lepidópteros e dípteros se deve ao pH do intestino médio destes insetos ser alcalino (entre 9,0 e 9,5), por outro lado, em Coleopteros, o pH é neutro ou pouco ácido, o que exige a necessidade de uma prévia ativação *in vitro* (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; KNOWLES, 1994; SCHNEPF et al., 1998).

Algumas cepas de *B. thuringiensis* secretam durante sua fase vegetativa as proteínas inseticidas vegetativas (VIP) (ESTRUCH et al., 1996). Nestas proteínas não é observada homologia entre as sequências das proteínas Cry e Vip, porém apresentam alta toxicidade para lepidópteros, coleópteros e alguns hemípteros (ESTRUCH et al., 1996; PALMA et al., 2013). Atualmente, um total de 15 proteínas Vip1, 20 proteínas Vip2, 110 proteínas Vip3 e uma Vip4 estão atualmente descritos no banco de dados de nomenclatura de toxinas de *B. thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

As proteínas Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 e possuem o modo de ação e insetos alvo diferentes das proteínas Cry (PALMA et al., 2013). As Vip1 e Vip2 são binárias e codificam proteínas com 885 e 426 aminoácidos respectivamente (BEARD et al., 2008; PALMA et al., 2013; YU et al., 1997).

As proteínas Vip se ligam a uma maior quantidade de alvos, logo elas não competem pelos mesmos sítios de ligação (DE CÁSSIA ALVES et al., 2011; YU et al., 1997). Estas diferenças as tornam viáveis a serem utilizadas em conjunto com as Cry, pois tende a aumentar o espectro de toxicidade, diminuindo assim a chance de ocorrência de resistência cruzada (DE CÁSSIA ALVES et al., 2011; FIGUEIREDO, 2017).

2.2.4) β -exotoxinas

Durante a fase de crescimento vegetativo, algumas cepas de *B. thuringiensis* produz as β -exotoxinas, também conhecidas como *thuringiensina* ou *lexotoxina* (FARKAŠ et al., 1969; LEVINSON et al., 1990). Ela é classificada como um análogo da adenina, pois se difere apenas na porção nove e contém a ribose, glicose e ácido fosfolárico (FARKAŠ et al., 1969). β -exotoxinas são metabólitos termoestáveis, hidrossolúveis e de baixo peso molecular (0,8 kDa), secretadas no meio de cultura (GOHAR; PERCHAT, 2001a; SÁNCHEZ-SOTO et al., 2015).

Estes metabólitos são produzidos com algumas diferenças em sua estrutura, por isso são classificadas em dois tipos (FARKAŠ et al., 1969). O tipo I é um metabolito análogo do ATP e o tipo II análogo do UTP (FARKAŠ et al., 1969). Devido as semelhanças estruturais que o tipo I têm com a molécula de ATP, presume-se que ocorra uma competição com o ATP, o que leva a inibição da RNA polimerase (LEVINSON et al., 1990). Seu efeito tóxico tem amplo espectro de ação, englobando várias ordens de insetos, vertebrados e invertebrados, e pode prejudicar a formação do fuso mitótico, o que leva a efeitos clastogênicos e mutagênicos (SHARMA; SAHU, 1977).

Uma das funções das β -exotoxinas consiste no controle da transcrição de genes responsáveis pela esporulação do *B. thuringiensis* (LEVINSON et al., 1990). Estudos mostram que estes metabólitos podem ser desfosforilados enzimaticamente ou quimicamente, o que gera a perda da toxicidade tanto para insetos, quanto para camundongos (LEVINSON et al., 1990).

A elevada toxicidade torna as cepas produtoras β -exotoxinas inviáveis para o uso como bioinseticidas, uma vez que a Organização Mundial da Saúde (OMS), não recomenda seu uso para o controle de insetos (WHO, 1999). Por isso a detecção da produção desse metabólito por cepas é de extrema importância.

As reações de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) detectam a produção da β -exotoxina do tipo I (GOHAR, PERCHAT, 2001; HERNÁNDEZ et al., 2001). A detecção baseia-se na amplificação de um fragmento do gene *thuE*, responsável pela produção de uma enzima que fosforila a β -exotoxina do tipo I no final do seu processo de biossíntese (LIU et al., 2014; SAUKA et al., 2014). Com isso, é importante correlacionar os resultados obtidos pelo método de PCR e pela realização de bioensaios com insetos, já que a PCR permite apenas a detecção da β -exotoxina I, enquanto através de bioensaios é possível identificar a capacidade de produção da β -exotoxina I e II (PERANI et al., 1998; SAUKA et al., 2014).

2.3) Biotecnologia

A prospecção de novos genes inseticidas oriundos de *B. thuringiensis* para produção de híbridos e caracterização de novas cepas para o desenvolvimento de formulações são de suma importância para o controle de pragas (NAVON, 2000).

O evento de milho comercial MON 810 que expressa a proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis* foi o primeiro lançado em 2008. A partir daí, a utilização de genes de *B. thuringiensis* teve um aumento significativo, sendo as toxinas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry2Ab, Cry3Bb e Cry34/35Ab amplamente utilizadas em cultivares modificados de milho e algodão (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; ZHAO et al., 2019). Desde então, outras tecnologias vêm sendo implementadas para o controle de *S. frugiperda* e outras pragas.

Entretanto, falhas começaram a ocorrer, devido principalmente à resistência que determinados insetos adquiriram ao longo dos anos (BERNARDI et al., 2016). A proteína Cry1F é um exemplo de quebra de resistência, ela está presente em um evento para o controle de *S. frugiperda*, mas acabou perdendo eficácia (SHELTON; ZHAO; ROUSH, 2002; YANG et al., 2018). Até o final de 2019, a CTNBio liberou 28 eventos de milho geneticamente modificados para comercialização no Brasil que expressam proteínas de *B. thuringiensis* (CTNBio, 2021).

Vários mecanismos estão sendo empregados para retardar o aumento da resistência, dentre eles a piramidação de genes inseticidas e adequação das áreas de refúgio (NELSON; ALVES, 2014). A piramidação consiste na inserção de mais de um gene codificador de proteína inseticida que tenha receptores diferentes e sejam expressas em alta dose com concentração igual ou superior a 25 vezes a concentração letal, resultando em mais de 99% de eficiência no controle do inseto-alvo (BERNARDI et al., 2016; WALKER; FREDERICK, 2019).

Existem no mercado diversos cultivares de milho geneticamente modificado com genes piramidados, como YieldGard VT PRO (Monsanto) e Powercore (Monsanto e Dow Agrosiences), expressando as proteínas Cry1A.105/Cry2Ab2 e Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F, respectivamente, (CTNbio, 2021). Mais recentemente, a soja Conkestatm que expressa as proteínas Cry1AC e Cry1F foi lançada pela Corteva AgriScience, IN (AGROLINK, 2021).

O Brasil bateu o recorde de área plantada com soja geneticamente modificada em todo mundo na safra 2018/2019, com 34,86 milhões de hectares (CELERES, 2021). Além disso, a expectativa é aumento de 2,6% na área total plantada com culturas transgênicas na safra 2019/2020 de 53,1 milhões de hectares (CELERES, 2020).

Atualmente, a crescente preocupação com questões envolvendo a biodiversidade e proteção do meio ambiente fez com que o uso de ferramentas moleculares por meio da engenharia genética seja cada vez mais utilizado (MERIGUETE et al., 2020). Neste contexto, as formulações à base de *B. thuringiensis* possuem inúmeras vantagens em termos de segurança e especificidade sendo também biodegradáveis (SANAHUJA, et al, 2011). O número de registros de produtos biológicos teve um grande aumento em 2020 sendo expedido 95 registros, um aumento de 135% em relação ao ano anterior (SINDIVEG, 2021). Dentre os produtos formulados à base de *B. thuringiensis* atualmente disponíveis no mercado nacional, podemos citar: Able[®], Bactospeina[®], Condor[®], Costar[®], CryMax[®], Cutlass[®], Futura[®], Lepinox[®], Thuricide[®], Steward[®], Florbac[®], Agree[®], Xentari[®], Foil[®], apresentando eficiência no controle de diversas espécies de insetos-praga (SANAHUJA, et al, 2011). Mais recentemente o Acera[®] foi lançado contendo as cepas 1641 e 1644 de *B. thuringiensis* (BALLAGRO, 2021).

Nesse sentido, pesquisas para a prospecção de novas cepas *B. thuringiensis* e novos genes codificadores de proteínas inseticidas são fundamentais tanto para o desenvolvimento de novas formulações de bioprodutos quanto com fonte de genes para desenvolvimento de novos eventos transgênicos resistentes a insetos.

2.4) Análises genômicas de *Bacillus thuringiensis*

O sequenciamento de procariotos de importância econômica proporcionou a elucidação de mecanismos de comparação funcional e filogenética, aumentando assim a qualidade dos produtos (PAREEK; SMOZYNSKI; TRETYN, 2011; THERMES, 2014). Dada a importância que o *B. thuringiensis* tem para a agricultura, a necessidade da busca por novas cepas e genes codificadores de proteínas inseticidas com maior espectro e especificidade são necessárias (BOBROWSKI et al., 2003; HÖFTE; WHITELEY, 1989; SANAHUJA et al., 2011).

Nos últimos anos, as técnicas para obter as sequências dos genes que codificam proteínas de *B. thuringiensis* tiveram grandes melhorias (FONTANA; MORAES, 1988; SANAHUJA et al., 2011). Tecnologias ficaram cada vez mais acessíveis, e com isso, vários genomas foram disponibilizados, auxiliando na identificação de muitos genes.

Os genes *cry*, *cyt* e *vip* que codificam as proteínas estão localizados em grandes plasmídeos e são essenciais para a atividade inseticida apresentada pelas cepas de *B. thuringiensis* (GONÇALVES et al., 2009; KRONSTAD; WHITELEY, 1984; LERECLUS et al., 1984; VARANI et al., 2013). Os plasmídeos que abrigam estes genes são geralmente conjugativos, ou seja, podem ser transmitidos horizontalmente, o que geram a grande diversidade gênica (GONÇALVES et al., 2009; VILAS-BÔAS; PERUCA; ARANTES, 2007).

O sequenciamento das cepas de *B. thuringiensis* e sua divulgação em bancos de dados permite o acesso fácil as informações do conteúdo gênico, bem como a elucidação da disposição das bases no cromossomo e no plasmídeo de diferentes cepas (JOUZANI; VALIJANIAN; SHARAFI, 2017; ZUO et al., 2020). Estão depositados até o momento no NCBI cerca de 670 genomas de subespécies de *B. thuringiensis*. Os depósitos são realizados com o genoma completo, contendo o cromossomo e plasmídeos ou em *scaffolds* ou contigs, intitulados *drafts* genomas. Os depósitos são divulgados contendo informações além da sequência, como o tamanho do genoma, tRNAs, rRNAs, conteúdo G+C, além da plataforma utilizada para montagem das sequências (LIU, et al., 2017; MA et al., 2020; REYAZ et al., 2019; ZUO et al., 2020).

Os estudos genômicas realizados com *B. thuringiensis* são altamente necessários, uma vez que podem, por exemplo, explicar cepas produtoras de proteínas inseticidas não apresentam toxicidade. Este tipo de estudo vem sendo realizado para contexto genômico, onde é elucidado a sequência destas proteínas e se as mesmas estão inativas ou se os alvos ainda não foram identificados (EHLING-SCHULZ et al., 2019). Além disso, a disposição das sequências de novas proteínas para novas ordens de insetos alvo é fundamental para o desenvolvimento de produtos para o controle de pragas, especialmente com foco para controle simultâneo das espécies *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. cosmioides*, atualmente sem produtos registrados no mercado.

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo Geral

- Identificação de cepas de *B. thuringiensis* eficientes no controle de *Spodoptera frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides*.

3.2) Objetivos Específicos

- Mortalidade de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* causadas por cepas de *B. thuringiensis*;
- Cepas de *B. thuringiensis* que causam mortalidade simultânea acima de 80% nos insetos-alvo, que não sejam produtoras de β -exotoxina;
- Cepas de *B. thuringiensis* que causam mortalidade simultânea acima de 90% nas três espécies de *Spodoptera*;
- Identificação de genes inseticidas presentes no genoma de cepas eficientes no controle de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides*.

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Cepas de *Bacillus thuringiensis*

Foram selecionadas trinta cepas de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas/MG previamente isoladas de solos de diferentes regiões do Brasil (VALICENTE; BARRETO, 2003) (Tabela 1). O primeiro critério de seleção foi o local de coleta, sendo selecionadas cepas provenientes dos estados de Minas Gerais e Goiás. O segundo critério foi a análise dos valores de toxicidade (>65%) para larvas de *S. frugiperda* em bioensaios prévios realizados no Laboratório de Controle Biológico (LCB) da Embrapa Milho e Sorgo (dados não publicados).

Tabela 1. Cepas de *Bacillus thuringiensis* selecionadas para realização de bioensaios contra os insetos *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania* e *Spodoptera cosmioides*.

N° amostra	Cepa	Origem da amostra	N° amostra	Cepa	Origem da amostra
1396	1090H	Boa Esperança/MG	4097	1643	Sete Lagoas/MG
1408	1092C	Coqueiral/MG	4162	1697C	Lagoa Santa/MG
1433	1074D	Coqueiral/MG	4242	1708C	Inhaúma/MG
1442	1089	Boa Esperança/MG	4254	1704E	Sete Lagoas/MG
1443	1089A	Boa Esperança/MG	4315	1720	Itumbiara/GO
1446	1089D	Boa Esperança/MG	4316	1720A	Itumbiara/GO
1451	1090	Boa Esperança/MG	4319	1721	Itumbiara/GO
1497	1104B	Boa Esperança/MG	4320	1721A	Itumbiara/GO
1688	1130B	Jataí/GO	4328	1724A	Itumbiara/GO
1707	1133C	Jataí/GO	4340	1727D	Rio Verde/GO
1742	1110F	Rio Verde/GO	4347	1730C	Rio Verde/GO
1871	1139G	Rio Verde/GO	4441	1755B	Portelândia/GO
2260	1232G	Jataí/GO	4445	1755S	Portelândia/GO
2277	1243L	Sta Helena, GO	4447	1756B	Montividiu/GO
2286	1219M	Rio Verde/GO	4459	1757U	Santa Helena/GO

Fonte: Da Autora (2021)

4.2) Criação dos insetos

As criações de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* foram realizadas no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas / MG. Os insetos foram mantidos em sala climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 10\%$ com fotoperíodo de 12:12 h.

As lagartas foram alimentadas com dieta artificial à base de feijão carioca, gérmen de trigo e levedo de cerveja (GREENE et al., 1976) e acondicionadas em copos plásticos de 50 mL com tampas de acrílico em suportes de isopor até a fase adulta. Os adultos foram transferidos para gaiolas de PVC com 30 a 40 cm de diâmetros, sendo as laterais e a parte superior das gaiolas revestidas com papel toalha para oviposição. Na parte inferior das gaiolas foram adicionados copos plásticos com aproximadamente 50 mL de uma dieta líquida para alimentação (VILELA et al., 2014). As gaiolas foram desmontadas a cada três dias e as posturas colocadas em sacos plásticos e mantidas em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12:12 h até a eclosão. Após a eclosão, as lagartas neonatas foram transferidas para copos plásticos contendo a dieta artificial, iniciando novamente o ciclo.

4.3) Preparo das suspensões de *Bacillus thuringiensis*

As cepas de *B. thuringiensis* foram cultivadas em placas de petri contendo o meio Luria-Bertani (LB) + sais (VALICENTE, MOURÃO, 2008) a 30°C por 72 h ou até confirmação da esporulação das células por microscopia de contraste de fase (100x). A massa celular das placas contendo esporos e cristais foi coletada e dissolvida em 10 mL de Tween-20 0,05% (v/v). Para a contagem de esporos, uma alíquota de 10 uL das suspensões foi retirada para o preparo de diluições seriadas fator 1:10 e avaliação em câmara de Neubauer utilizando microscópio de contraste de fase (40x) (BARRETO et al., 1999). As amostras foram ajustadas para a concentração de 3×10^8 esporos/mL.

4.4) Bioensaios Seletivos

Bioensaios foram realizadas para seleção das cepas com alta toxicidade simultânea para cada um dos três insetos-alvo. Para isso, adicionou-se 1 cm³ de dieta artificial em bandejas com 16 poços (VALICENTE, BARRETO, 2003). Em seguida, 150 µL da suspensão bacteriana contendo esporos e cristais na concentração de 3×10^8 esporos/mL foram adicionados na superfície da dieta, com a presença de uma lagarta neonata em cada poço. Tanto no controle negativo, quanto nas outras soluções, foi utilizado o Tween-20 0,05% (v/v) sobre a dieta artificial como espalhante. Os experimentos foram mantidos em sala climatizada com temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h. A mortalidade dos insetos foi avaliada durante sete dias e as cepas que causaram mortalidade acima de 80% foram selecionadas para os ensaios de detecção de β -exotoxina.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições contendo 16 insetos cada. Os resultados de mortalidade das lagartas foram coletados, transformados em $(x+1)^{0,5}$ e submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011).

4.5) Detecção da produção de β -exotoxinas

As cepas que apresentaram valores de mortalidade acima de 80% simultaneamente para as três espécies-alvo foram selecionadas para detecção de β -exotoxinas. As análises realizadas

são divididas em duas partes, os bioensaios e a análise molecular. Os bioensaios para presença de β -exotoxinas foram realizados com larvas neonatas de *S. frugiperda*, considerada uma espécie padrão dessa análise (HORNBY; GARDNER, 1987).

Para os bioensaios foi preparado um pré-inóculo contendo 10 μ L das cepas de *B. thuringiensis* e 10 mL de meio LB + sais (VALICENTE, MOURÃO, 2008). O pré-inóculo foi incubado a 28°C por 16 h sob agitação de 200 rpm. A contagem de células foi realizada em microscópio de contraste de fases com aumento de 40x. Cada inóculo foi preparado em um volume de 50 mL contendo de 1×10^6 células/mL. As amostras foram incubadas a 28 °C por seis dias sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante coletado, aquecido a 121°C por 20 min e posteriormente filtrado em filtro TPP- 0,22 μ M. Os bioensaios foram realizados seguindo as mesmas condições dos bioensaios seletivos, acrescido da cepa de *B. thuringiensis* HD-125 que é produtora de β -exotoxinas (controle positivo).

Após oito dias, o peso das larvas sobreviventes e a taxa de mortalidade foram avaliados. As cepas que obtiveram inibição do crescimento acima de 50% foram consideradas produtoras de β -exotoxinas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizados (DIC) e os resultados de mortalidade e peso das lagartas foram coletados. Os dados foram transformados com $(x+1)^{0,5}$, e submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância no software SISVAR v. 5.8 (FERREIRA, 2011).

4.6) Análises genômicas

4.6.1) Extração de DNA

O DNA total das cepas de *B. thuringiensis* que causaram taxa de mortalidade superior a 90% para os insetos-alvo foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para isso, as culturas foram crescidas a 30°C por 16 h sob agitação de 200 rpm. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e a concentração final e a pureza do DNA foram mensuradas por espectrometria UV/Vis usando NanoDrop® ND-1000 (Thermofisher, EUA).

4.6.2) PCR para detecção do gene *thuE*

Para uma maior confiabilidade dos bioensaios de β -exotoxinas, uma análise adicional com o DNA das cepas de *B. thuringiensis* selecionadas foi realizada por PCR com *primers* específicos que detectam o gene *thuE*, associado à via de produção de β -exotoxinas. Para isso foram utilizados os oligonucleotídeos BEF (5'-GCGGCAGCCGTTTATTCAA-3') e BER (5'-CCCCTTCCCATGGAGAAACA-3'), além de BEF1 (5'-CAGTAAAAGGCCCATTTGGAA-3') e BER1 (5'-TTCCATGAATTTGCCGATTT-3') (SAUKA et al., 2014). As reações de amplificação foram realizadas em microtubos com volume final de 25 μ L contendo tampão 1X, 2 mM de $MgCl_2$, 0,125 mM de dNTP, 0,5 mM de cada oligonucleotídeos, 2 U de Taq DNA polimerase, 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto e por fim, extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e comparados com marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen, USA).

4.6.3) Sequenciamento genômico

A cepa 1408 de *B. thuringiensis* foi única que apresentou mortalidade acima de 90% para todos os insetos-alvo e foi selecionada para sequenciamento genômico. Para isso, uma alíquota de 50 μ g do seu DNA genômico foi liofilizado e enviado para a empresa BGI (Beijing Genomics Institute, Hong Kong) para as etapas de preparação das bibliotecas de DNA e sequenciamento. O sequenciamento genômico foi realizado com a plataforma BGISEQ-500 empregando a estratégia de sequenciamento a partir de ambas as extremidades (*paired-end*) com fragmentos de 2 x 150 pb.

4.6.4) Montagem do *Draft* genoma da cepa 1408

Após a obtenção dos dados do sequenciamento, as sequências foram analisadas quanto a qualidade a partir do software FastQC v 0.11.9 visando monitorar graficamente o valor da qualidade em cada base (BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017). Para obter resultados mais

precisos e confiáveis, os dados brutos foram tratados removendo as leituras com bases de baixa qualidade (≤ 20).

Para a montagem do genoma foi utilizado o software SOAP de nova versão 2.04 (ALKAN; SAJJADIAN; EICHLER, 2010; LI et al., 2008). Além disso, foi utilizado para analisar a qualidade da montagem, calcular o número e tamanho total dos *scaffolds*, além do tamanho médio de *scaffolds*, N50 o software QUASt versão 4.0 L50 (GUREVICH et al., 2013).

4.6.5) Montagem do cromossomo

Para a montagem do cromossomo foi utilizado um genoma de referência que foi selecionado com a ferramenta *Similar Genome Finder*, integrada na plataforma PATRIC v 3.6.9 (WATTAM et al., 2014).

O programa QUASt foi utilizado para gerar estatísticas sobre a qualidade montagem dos genomas enquanto o ordenamento de *contigs* com o genoma de referência foi realizado com o software Progressive MAUVE (DARLING; MAU; PERNA, 2010; GUREVICH et al., 2013).

4.6.6) Montagem dos plasmídeos

Para a montagem dos plasmídeos, as sequências de plasmídeos de *B. thuringiensis* depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1428>) foram utilizadas para a confecção de um banco de dados local. O programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) foi utilizado para comparação das sequências nucleotídicas, e os parâmetros avaliados foram: a porcentagem de identidade, o tamanho do alinhamento, a quantidade de *mismatch* e *gaps*, *e-value* e *bit score*. Os melhores alinhamentos foram visualizados no software CONTIGuator (GALARDINI et al., 2011).

4.6.7) Anotação do genoma

O genoma *B. thuringiensis* foi anotado automaticamente por meio do RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (RASTtk) v. 2.0 (AZIZ et al., 2008; BRETTIN et al., 2015; OVERBEEK et al., 2014).

4.6.8) Identificação de genes que codificam proteínas inseticidas

A identificação dos genes inseticidas presentes no genoma da cepa 1408 de *B. thuringiensis* foi realizada pelo programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997) por meio de alinhamento local a partir de um banco de dados de sequências de genes que codificam proteínas inseticidas (<http://www.btnomenclature.info>). Os parâmetros avaliados foram: a porcentagem de identidade, o tamanho do alinhamento, a quantidade de *mismatch* e *gaps*, *e-value* e *bit score*.

As ORFs (*open reading frame*), ou seja, fase aberta de leitura dos genes inseticidas encontrados, quantidade de nucleotídeos e aminoácidos e suas sequências foram obtidas pelo ORFfinder (ROMBEL et al., 2002). Posteriormente, foi realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos obtidas utilizando o programa Clustal Ômega na plataforma do UNIPROT para avaliar as diferenças entre os aminoácidos e anotar os SNPs (Single nucleotide polymorphism) (PUNDIR; MARTIN; O'DONOVAN, 2017; SIEVERS; HIGGINS, 2021). Para avaliar características físico-químicas, como a massa da proteína (kDa), foi utilizado o programa ProtParam na plataforma EXPASY (GASTEIGER et al., 2005).

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1) Bioensaios seletivos

Bioensaios com cepas de *B. thuringiensis* contra largas de *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania* foram realizados separadamente para seleção de cepas eficientes no controle simultâneo destes insetos-praga.

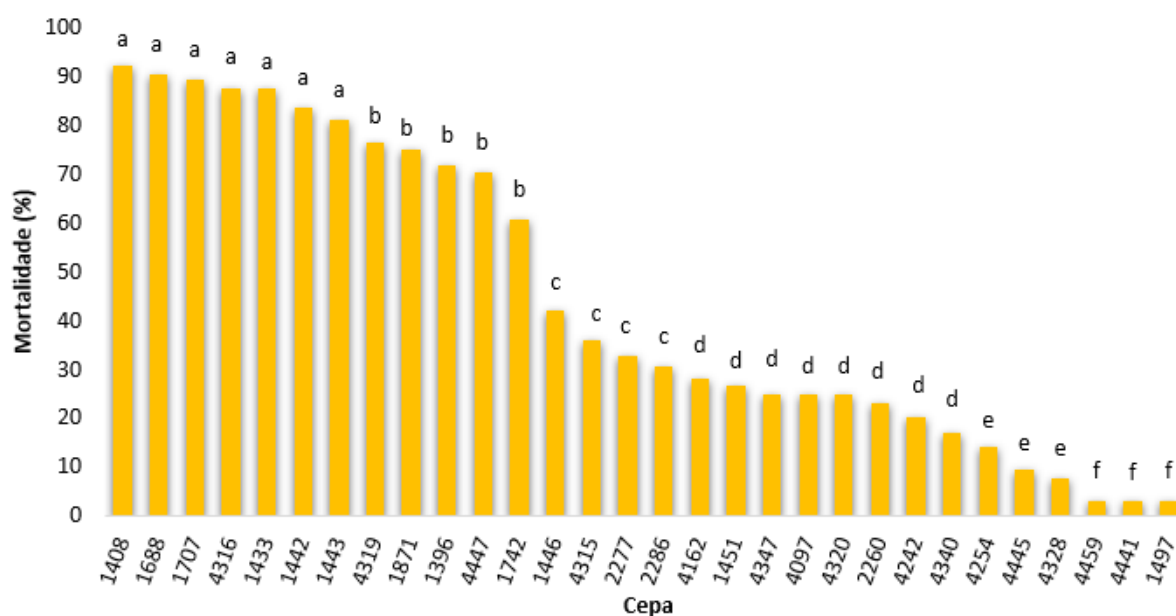
Nos bioensaios seletivos contra *S. frugiperda* indicaram valores de mortalidade entre 3 e 92% (Figura 1). Das 30 cepas estudadas, os valores mais baixos foram vistos nas cepas 4459, 4441, 1497 com 3% de mortalidade. As cepas que obtiveram os valores mais altos de mortalidade foram a 1408, 1688, 1707, 4316, 1433, 1442 e 1443, com valores entre 81 e 92% e não diferiram estatisticamente entre si, sendo consideradas com alta eficiência no controle *S. frugiperda*.

Das 30 cepas testadas, 18 tiveram valores de mortalidade abaixo de 42%, este resultado divergiu dos resultados dos bioensaios realizados previamente no laboratório de controle biológico com as mesmas cepas contra *S. frugiperda* (dados não apresentados). Todas as cepas selecionadas tinham mortalidade prévia acima de 65% nas populações de *S. frugiperda*,

diferença que pode ser relacionada à população de *S. frugiperda* utilizada nos bioensaios, pois esse dado não foi mencionado na anotação dos experimentos anteriores.

Atualmente o laboratório de controle biológico conta com três populações deste inseto coletadas em diferentes regiões brasileiras, nos bioensaios realizados neste trabalho, a população utilizada foi proveniente do estado do Mato Grosso. Como já comprovado por outros trabalhos, diferenças de toxicidade em espécies de *Spodoptera* de regiões distintas são frequentemente observadas (BUSATO et al., 2005 CRUZ et al., 2000; PRATISSOLI et al., 2007).

Figura 1. Mortalidade média (%) de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* causada por cepas de *Bacillus thuringiensis*.

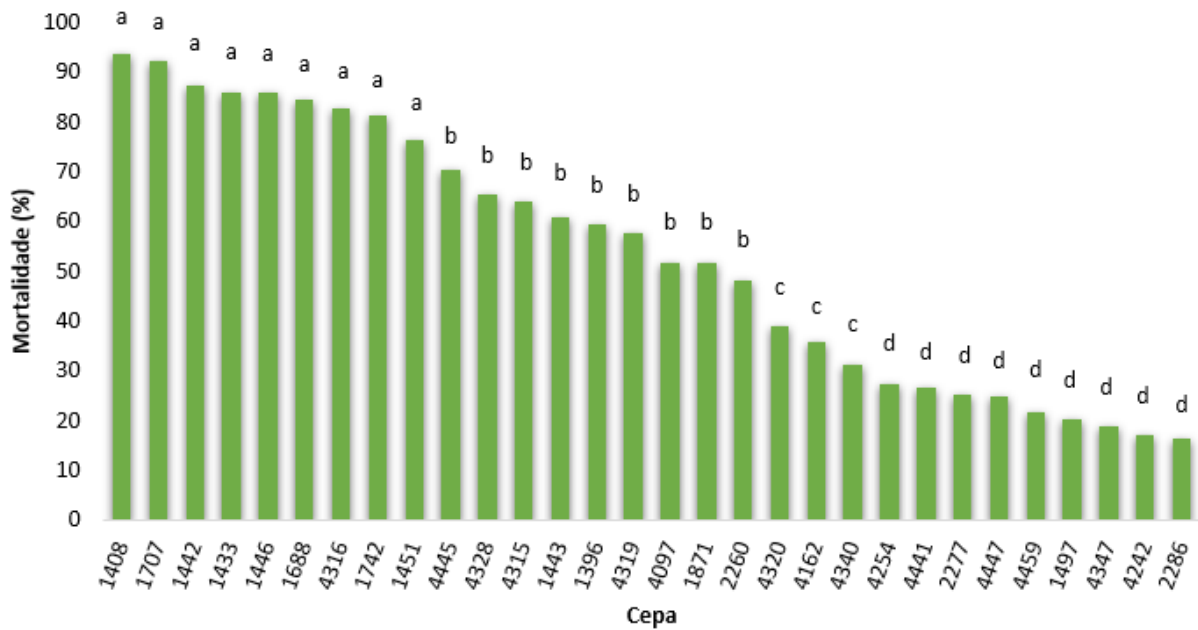


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5%.

Fonte: Da Autora (2021)

Nos bioensaios seletivos com *S. cosmioides*, as 30 cepas de *B. thuringiensis* causaram a mortalidade entre 16 e 94% dos insetos (Figura 2). Os valores mais baixos de mortalidade foram causados pelas cepas 4254, 4441, 2277, 4447, 4459, 1497, 4347, 4242 e 2286, variando de 16 a 27%. As melhores cepas foram 1408, 1707, 1442, 1433, 1446, 1688, 4316, 1742 e 1451 que apresentaram mortalidade entre 77 a 94% e não diferiram estatisticamente entre si, sendo consideradas com alta eficiência no controle de *S. cosmioides*.

Figura 2. Mortalidade média (%) de lagartas neonatas de *Spodoptera cosmioides* causada por cepas de *Bacillus thuringiensis*.

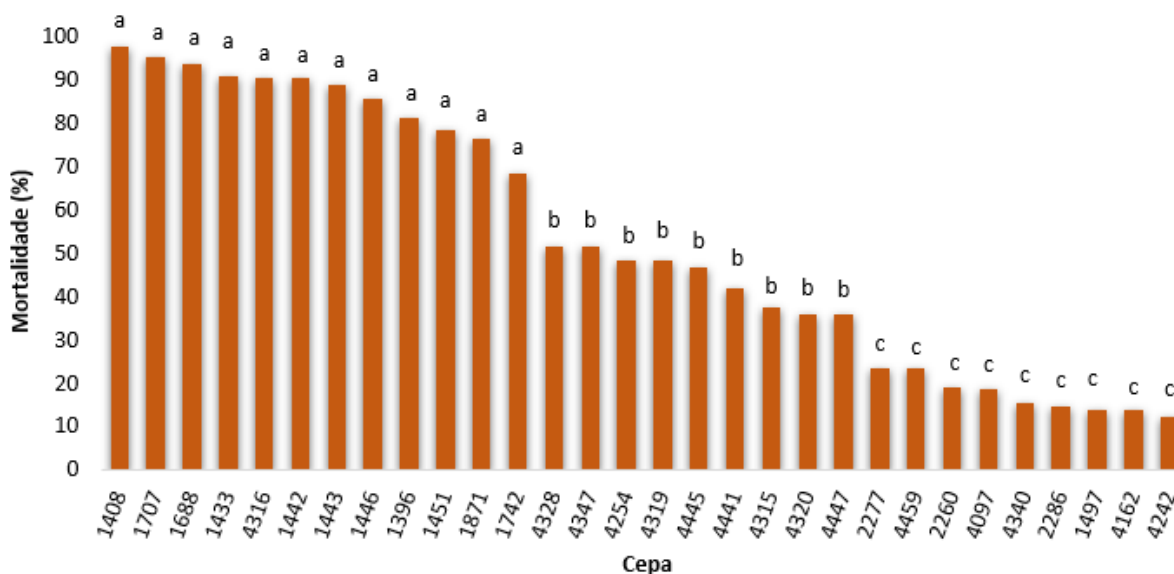


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5%.

Fonte: Da Autora (2021)

Já nos bioensaios seletivos contra *S. eridania*, as 30 cepas de *B. thuringiensis* causaram mortalidade entre 13 e 98% dos insetos (Figura 3). As cepas 2277, 4459, 2260, 4097, 4340, 2286, 1497 obtiveram os valores mais baixos de mortalidade, entre 15 e 24%. Os maiores valores de mortalidades foram causados pelas cepas 1408, 1707, 1688, 1433, 4316, 1442, 1443, 1446, 1396, 1451, 1871 e 1742, variando entre 69 e 98% e não diferiram estatisticamente entre si.

Figura 3. Mortalidade média (%) de lagartas neonatas de *Spodoptera eridania* causada por cepas de *Bacillus thuringiensis*.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott - Knott ao nível de 5%.

Fonte: Da Autora (2021)

As cepas de *B. thuringiensis* 1408, 1433, 1442, 1688, 1707 e 4316 causaram mortalidade superior a 80% para as três espécies de *Spodoptera*. Todas as cepas utilizadas no trabalho são provenientes dos estados de MG e GO, entretanto, não foi possível indicar uma região com maior incidência de cepas eficientes no controle das pragas, visto que 50% das cepas selecionadas são de Minas Gerais e 50% de Goiás.

Diversos trabalhos têm relatado a seleção de cepas de *B. thuringiensis* eficientes no controle das espécies do gênero *Spodoptera*, especialmente *S. frugiperda* (ARANGO; ROMERO; ORDUZ, 2002; CONSTANSKI et al., 2015; IRIARTE et al., 1998; VALICENTE; BARRETO, 2003). Entretanto, poucos estudos têm selecionado cepas de *B. thuringiensis* eficientes no controle de *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*. Dos Santos e colaboradores (2009) avaliaram 100 cepas de *B. thuringiensis* provenientes da Universidade Estadual de Londrina contra *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* simultaneamente, sendo que apenas sete cepas causaram mortalidade acima de 70%. Em outro estudo, das 34 cepas de *B. thuringiensis* testadas contra *S. frugiperda* e *S. eridania*, apenas três causaram mortalidade superior a 90% nas duas espécies (CONSTANSKI et al., 2015). Mais recentemente, nosso grupo identificou duas outras cepas de *B. thuringiensis*, 1608A e 775E, que causaram mortalidade acima de 80% para as três espécies de *Spodoptera* (CARVALHO et al., 2020).

A diferença de toxicidade que cada cepa apresenta pode ser influenciada pela proporção de cada proteína inseticida expressa na célula. Seja pela ação individual de cada uma ou pelo

sinergismo entre todas as proteínas expressas. O conjunto de genes que a cepa possui, bem como quais receptores os insetos alvo apresentam são combinações de fatores que levam a uma maior ou menor toxicidade.

A necessidade de bioprodutos que sejam efetivos no controle de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* é crescente devido à alta polifagia que estas espécies apresentam ao atacar as principais culturas de importância econômica no Brasil, incluindo milho, soja e algodão (DOS SANTOS et al., 2009; SILVA et al., 2017; TEODORO et al., 2013). Atualmente existem 34 bioprodutos a base de *B. thuringiensis* disponíveis no mercado nacional, contudo, não existe nenhum bioproduto registrado para o controle simultâneo de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* (MAPA, 2021). A falta de produtos disponíveis intensifica a necessidade da busca por cepas com alta mortalidade para estas espécies.

5.2) Avaliação da produção de β -exotoxinas

As cepas de *B. thuringiensis* 1408, 1433, 1442, 1688, 1707 e 4316 foram selecionadas para avaliação da produção de β -exotoxinas por apresentarem mortalidade acima de 80% para as três espécies de *Spodoptera*. Não foi observada a produção de β -exotoxina em nenhuma das seis cepas selecionadas neste estudo (Tabela 2). A cepa HD-125 foi utilizada como controle positivo nos bioensaios por ser produtora β -exotoxina.

Tabela 2. Média e desvio padrão da mortalidade e peso de larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas com dieta contendo sobrenadantes autoclavados de cepas de *Bacillus thuringiensis* para avaliação da produção de β -exotoxinas.

Tratamento	Mortalidade (%) [*]	Peso médio (mg) [*]
HD-125 (+)	14,58 \pm 2,40 a	0,56 \pm 0,08 c
1442	5,21 \pm 3,99 b	22,91 \pm 2,23 b
Água	0,25 \pm 0,50 b	26,18 \pm 1,79 ab
1433	3,58 \pm 1,34 b	26,40 \pm 2,78 ab
4316	5,21 \pm 3,99 b	27,28 \pm 1,94 ab
1688	5,21 \pm 3,99 b	27,28 \pm 1,94 ab
1707	3,13 \pm 2,08 b	28,83 \pm 2,28 a
1408	0,00 \pm 0,00 b	29,71 \pm 0,41 a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Fonte: Da Autora (2021)

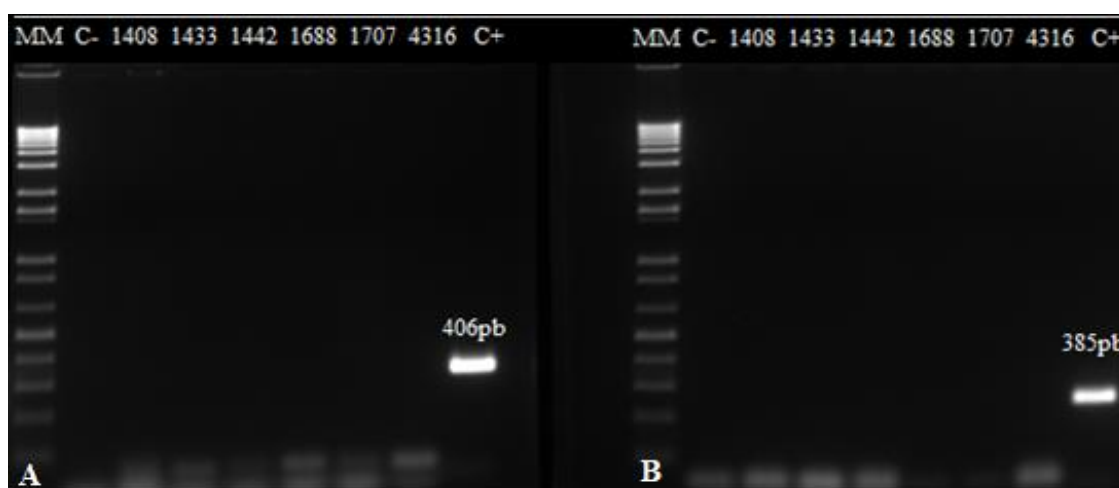
As β -exotoxinas são metabólitos termoestáveis produzidos por algumas cepas de *B. thuringiensis* e secretada durante a fase de crescimento vegetativo (HORNBY; GARDNER,

1987). Por ser persistente no ambiente e ter ação em mamíferos e insetos, a presença desta proteína em formulações de *B. thuringiensis* é proibida de acordo com recomendações da Organização Mundial de Saúde (FARKAŠ et al., 1969; LEVINSON et al., 1990).

Vários trabalhos utilizaram técnicas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para a detecção de β -exotoxina, sendo uma técnica rápida e sensível para detectar β -exotoxina tipo I no sobrenadantes de culturas de *B. thuringiensis* (GOHAR; PERCHAT, 2001b; HERNÁNDEZ et al., 2003; LEVINSON et al., 1990). No entanto, outros tipos de β -exotoxinas como o tipo II podem não ser detectados por HPLC e, portanto, os bioensaios são altamente recomendáveis (HERNÁNDEZ et al., 2003). Os bioensaios consistem em um método tradicional para detecção de β -exotoxina do tipo I e II, permitindo avaliar a toxicidade direta desses metabólitos, sem equipamentos de alto custo (HERNÁNDEZ et al., 2001; MAC INNES; BOUWER, 2009).

De modo complementar, ensaios moleculares baseados na detecção do gene *thuE* associado à via de produção de β -exotoxinas também foram realizados. Foi verificado a ausência de amplificação nas amostras avaliadas, confirmando que as cepas 1408, 1433, 1442, 1688, 1707 e 4316 não possuem o gene (Figura 4). A cepa HD-125 utilizada como controle positivo apresentou amplificação do gene *thuE*, com a presença das bandas de 385 e 406 pb.

Figura 4. Produtos de amplificação do gene *thuE* com primers BEF/BER (A) e BEF1/BER1 (B) utilizadas para detecção de β -exotoxinas em cepas de *Bacillus thuringiensis*.



MM: Padrão de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen. EUA); C-: Branco; Cepas 1408, 1433, 1442, 1688, 1707, 4316; C+: Controle positivo (cepa HD-125).

Fonte: Da Autora (2021)

O gene *thuE* é um dos genes necessários para a produção da β -exotoxina tipo I, responsável pela produção de uma enzima responsável por fosforilar este metabólito no final

do seu processo de biossíntese (LIU et al., 2014; SAUKA et al., 2014). As reações de PCR somente detectam a presença do gene *thuE* e como ele não está presente em cepas que produzem a β -exotoxina tipo II, o uso do bioensaios em conjunto com as análises moleculares são essenciais para esta detecção (SAUKA et al., 2014).

A ausência da produção de β -exotoxina evidencia o papel dessas cepas de *B. thuringiensis* como potenciais para serem utilizadas no controle biológico de *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*. Entretanto, para o sequenciamento genômico, somente a cepa 1408 foi escolhida por promover mortalidade acima de 90% nos testes de toxicidade para as três espécies de *Spodoptera* avaliadas.

5.3) Análise da qualidade do genoma

Um total de 14.022.36 *reads* foram obtidos a partir do sequenciamento do genoma da cepa de *B. thuringiensis* 1408. A maioria das *reads* apresentou um valor de phred acima de 20 e muitas acima do valor de phred 30, o que significa uma boa qualidade dos dados obtidos. O valor de phred 20 indica a probabilidade de 1 em 100 de a base incorporada não estar correta, e phred 30 indica 1 em 1000 (BRANDINE; SMITH, 2019; BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017). Esta etapa é fundamental para a montagem do genoma para eliminação das sequências com baixa qualidade para que não interfiram na montagem, sem perder informações importantes (CARNEIRO et al., 2012; BROWN; PIRRUNG; MCCUE, 2017). A montagem do genoma permitiu a obtenção de 39 *scaffolds*, conteúdo G+C igual 34,8% e cobertura de 363x (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise gerada por QUASt para a montagem do genoma da cepa de *Bacillus thuringiensis* 1408.

Parâmetros	Valores
Tamanho da sequência	5.776,506 pb
Número de contigs	41
Número de <i>scaffolds</i>	39
Conteúdo G+C	34,8 %
N50	693.346 pb
N90	201.819 pb
Reads paired end	14.022.36 pb
Comprimento mínimo	541 pb
Comprimento máximo	1.090,781 pb
Número de gaps	434
Cobertura em bases	363 x

*pb=pares de bases.

N50 e N90 o comprimento do menor contig no conjunto que contém o menor (maior) *contig* cujo comprimento combinado representa pelo menos 50% e 90% da montagem.

Fonte: Da Autora (2021)

Algumas semelhanças são compartilhadas com outros genomas de *B. thuringiensis*, como o conteúdo G+C que normalmente varia de 32-36% e porcentagem de sequências codificadoras (CDSs) entre 5 e 6 mil sequências (DAY et al., 2014; LI, QIAO et al., 2015; PENG; YU; SONG, 2019). Entretanto, devido a presença de plasmídeos, transposons e outros elementos, diferenças no tamanho e na composição gênica das cepas são frequentemente observadas (FROST et al., 2005; FANG et al., 2011; HE et al., 2011, ZUO et al., 2020).

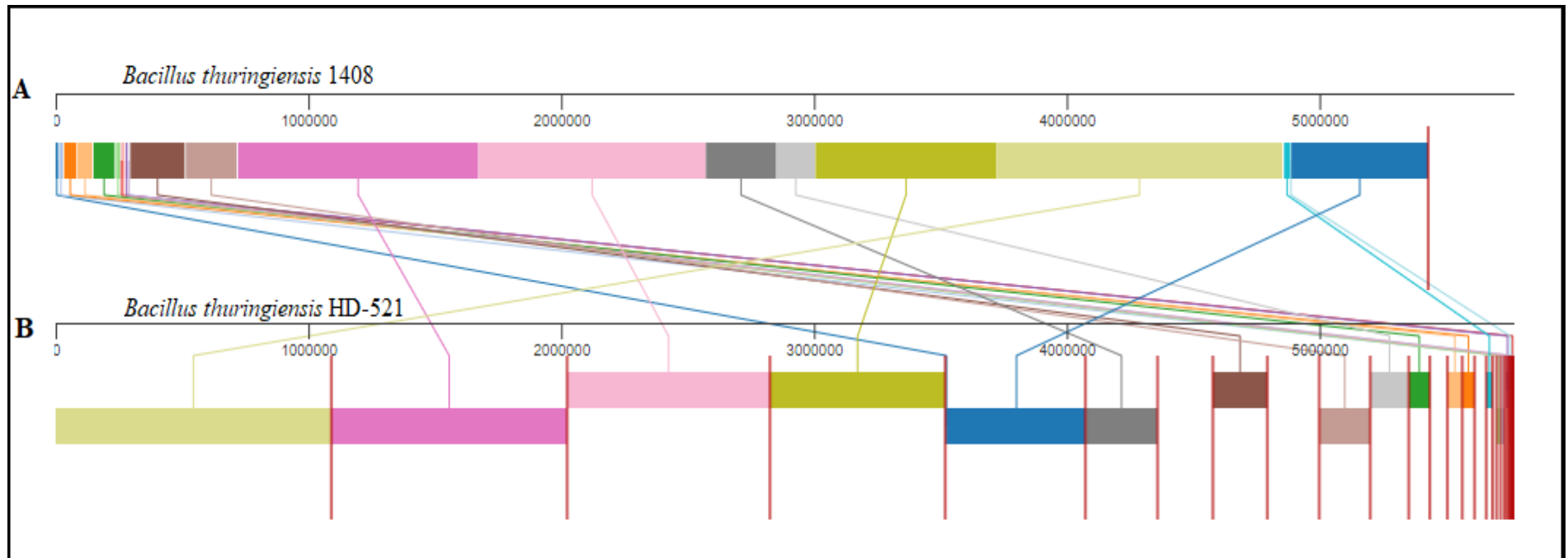
5.4) Montagem do cromossomo

A busca por um genoma de referência resultou na seleção do genoma da cepa *B. thuringiensis serovar indiana* HD521 (NCBI CP010106.1) (QIAO et al., 2015), utilizado para a orientação dos *scaffolds*. O alinhamento entre o genoma da cepa 1408 e o de referência (HD521) com o software MAUVE resultou numa identidade de 94,56%, com um alinhamento de 5.138.842 pb. Foram observados 466 *indels* e 17.565 *mismatches* entres os genomas da cepa 1408 em relação ao genoma de referência (HD521).

Dos 39 *scaffolds* resultantes da montagem do genoma da cepa 1408, vinte foram mapeados com o genoma de referência (Figura 5). A sequência do genoma da cepa 1408 foi alinhada de maneira que o arranjo dos *scaffolds* gerou o mínimo possível de blocos, o que equivale à sua provável ordem e orientação. Este tipo de análise permite filtrar e classificar as maiores regiões genômicas presumivelmente homólogas chamadas de blocos localmente colineares (LCBs) que são conectados por linhas com precisão na ordenação dos contigs, variando entre 90,4 e 99,4% (RISSMAN et al., 2009).

Atualmente estão disponíveis no NCBI 670 genomas completos e *drafts* de *B. thuringiensis*. Esta disponibilidade de genomas em bancos públicos tem permitido seu uso como genoma de referência para a montagem de outros genomas e fechamento de gaps em diversos estudos (FANG et al., 2011; BOLOTIN et al, 2016; RANG et al., 2015). Após o cromossomo da cepa 1408 ser mapeado com o genoma de referência HD521, os *scaffolds* restantes foram retirados e utilizados para a montagem e identificação dos plasmídeos.

Figura 5. Alinhamento entre as sequências do genoma a cepa *Bacillus thuringiensis* 1408 (A) com o cromossomo da cepa *Bacillus thuringiensis* HD-521 (B) utilizada como referência.



Os LCBs localizados acima da linha horizontal no genoma da cepa HD-521 significam que a região alinhada possui a mesma orientação na sequência correspondente. LCBs abaixo da linha horizontal, indicam que aquela região está alinhada na orientação inversa.

Fonte: Software MAUVE (2021)

5.5) Montagem dos plasmídeos

As sequências restantes da montagem do cromossomo foram alinhadas contra um banco de dados local com 331 sequências de plasmídeos de *B. thuringiensis* depositadas no NCBI. Após avaliação dos parâmetros do BLAST e visualização do alinhamento, foram identificados três *scaffolds* do genoma da cepa 1408 como regiões de plasmídeos. As cepas de *B. thuringiensis* tem diferentes números e tamanhos de plasmídeos, sendo que algumas podem abrigar até 15 plasmídeos (LI et al., 2017; REYAZ et al., 2019b; REYAZ et al., 2021).

O *scaffold* 13 foi mapeado com o plasmídeo pBTHD521-3 (NZ_CP010109.1) com tamanho de 69.550 pb e o *scaffold* 7 foi mapeado com o plasmídeo pBTHD521-6 (NZ_CP010112.1) com 218.786 pb, ambos provenientes da cepa *Bacillus thuringiensis* serovar *indiana* (HD-521), a mesma cepa usada como referência na montagem do cromossomo. O *scaffold* 9 foi mapeado com o plasmídeo pYC1 da cepa de *B. thuringiensis* YC-10 (NZ_CP011350.1) com 205.546 pb (CHENG et al., 2015).

A cepa HD 521 (NCBI CP010106.1) apresenta três genes *cry7* presente no plasmídeo pBTHD521-5 que exibem toxicidade contra *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) (LI et al., 2015; SUN et al., 2021). Entretanto, nenhuma das sequências das proteínas inseticidas encontradas no genoma da cepa 1408 não foram mapeados com este plasmídeo.

A cepa YC-10 10 (NZ_CP011350.1) possui os genes *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa*, *cry2Ab* e *cryB1* no plasmídeo pYC1 e apresenta atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita* (Nematoda) por causa da presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ia* (CHENG et al., 2015). O genoma da cepa 1408 foi mapeada com este plasmídeo, contudo, foi visto somente a presença da classe CryII com alterações nas subclasses devido aos SNPs que ambas possuem.

Os genes inseticidas *cry* normalmente estão localizados em plasmídeos, sendo frequente a produção de proteínas Cry em diversas cepas de *B. thuringiensis* (LERECLUS et al., 1993). Várias cepas de *B. thuringiensis* têm apresentado megaplasmídeos (>30 MDa), também responsáveis por abrigar genes codificadores de proteínas inseticidas, que também podem ser encontrados em pequenos plasmídeos (<30MDa) (LI et al., 2014). As diferenças de toxicidade e a diversidade de plasmídeos encontrados em *B. thuringiensis* podem ser explicadas pela transferência através de conjugação (GONÇALVES et al., 2009).

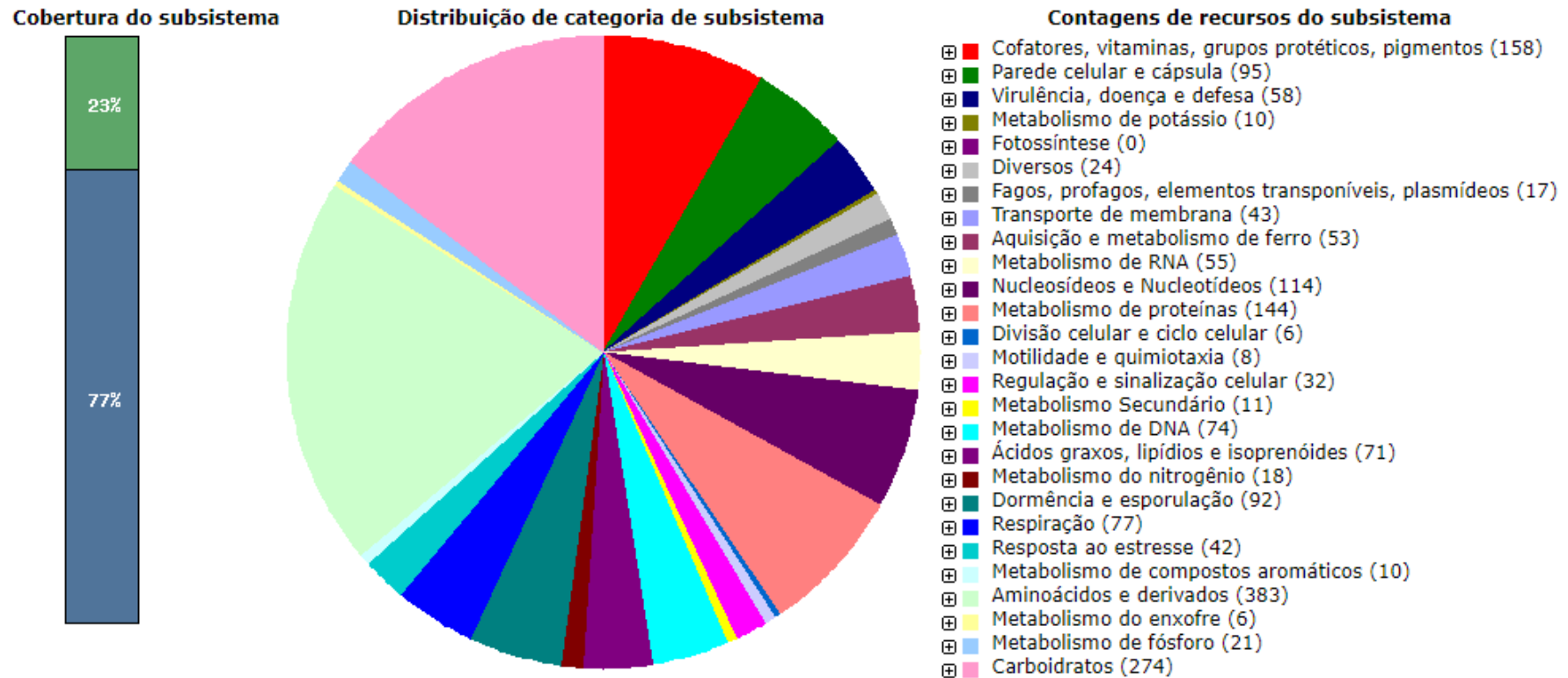
5.6) Anotação do genoma

A anotação do genoma da cepa 1408 permitiu a identificação de genes que codificam proteínas. A anotação gerou um total de 5.892 sequências codificadoras de proteínas (CDS) e 76 genes codificadores de tRNA e 14 de rRNA (Figura 6).

A anotação do genoma da cepa 1408 mostrou que ele possui 5.892 CDS, sendo que 23% das CDS foram distribuídas nos subsistemas, totalizando 1.347 genes anotados e 4.545 não foram anotados com exatidão. Geralmente não é possível classificar todos os genes presentes nas cepas nos subsistemas do RAST. Entretanto, a classificação realizada dá suporte para o conhecimento do conteúdo gênico presente na cepa (AZIZ et al., 2008; BRETTIN et al., 2015).

A quantidade de CDS presente nos genomas de *B. thuringiensis* tende a ser semelhante entre as cepas. Uma cepa de *B. thuringiensis* isolada de solo de mangue contaminado com óleo foi sequenciada e foram encontrados 5.135 CDS (MARCON et al., 2014). O sequenciamento de uma cepa de *B. thuringiensis* isolada da Polônia revelou 5.617 CDS (MURAWSKA et al., 2013). Estes resultados foram similares com os resultados encontrados na cepa 1408, entretanto, os autores não mencionam a presença de genes inseticidas presentes nas mesmas.

Figura 6. Distribuição dos subsistemas da cepa *Bacillus thuringiensis* 1408 gerada a partir do servidor de anotação RAST. A cor verde representa os recursos encontrados no subsistema RAST enquanto a cor azul representa recursos não atribuídos a um subsistema



Fonte: Software RAST (2021)

5.7) Determinação dos genes que codificam proteínas inseticidas

O genoma da cepa de *B. thuringiensis* 1408 foi utilizado para busca por genes codificadores de proteínas inseticidas. Para isso, seu genoma foi comparado com um banco local obtidos através de sequências públicas contendo genes que codificam proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis*. Após avaliação da porcentagem de identidade, o tamanho do alinhamento, a quantidade de *mismatch*, *gaps*, *e-value* e *bit score* foram identificadas cinco sequências gênicas que correspondem às proteínas inseticidas Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac e Vip3Ag (Tabela 4).

Tabela 4. Genes codificadores de proteínas inseticidas identificados no genoma da cepa *Bacillus thuringiensis* 1408 através do programa Blastn contra o banco local de genes inseticidas.

Gene	Tamanho do gene (pb)	Tamanho do alinhamento (pb)	Identidade (%)	<i>mismatches</i>	<i>gaps</i>	<i>e-value</i>	<i>bit score</i>
<i>cry1Da</i>	3498	3500	92,31	265	4	0.0	4970
<i>cry1Ib</i>	2160	2162	96,72	67	3	0.0	3596
<i>vip1Ca</i>	2328	2328	99,83	4	0	0.0	4277
<i>vip2Ac</i>	1389	1387	98,20	25	0	0.0	2423
<i>vip3Ag</i>	2361	2364	93,74	142	6	0.0	3541

Fonte: Da Autora (2021)

Os resultados dos alinhamentos entre os genes indicaram vários polimorfismos. Todas as proteínas inseticidas codificadas pelos genes encontrados no genoma da cepa 1408 possuem no mínimo 2 e no máximo 77 SNPs em relação às sequências das proteínas inseticidas depositadas no GenBank (Tabela 5).

Tabela 5. Análise das proteínas inseticidas identificadas no genoma da cepa *Bacillus thuringiensis* 1408.

Proteína	Aminoácidos ^a	SNPs ^b	Massa (kDa) ^c	Identidade (%) ^d
Cry1Da	1.165	77	131,97	93,30
Cry1Ib	719	35	81,33	95,13
Vip1Ca	775	2	87,16	99,74
Vip2Ac	459	18	52,08	96,08
Vip3Ag	786	59	88,06	92,38

^a Programa ORFfinder; ^b Quantidade de troca de aminoácidos visualizadas com o programa Clustal Ômega; ^c Programa ProtParam; ^d Similaridade entre as sequências depositadas no NCBI utilizando Blastp.

Fonte: Da Autora (2021)

Quando comparados os resultados das análises do programa Protparam mostram diferenças entre o peso das proteínas encontradas em relação as depositadas nos bancos. Alguns aminoácidos como o Triptofano, Tirosina e Arginina tem peso (kDa) maior do que outros como Alanina e Glicina. Logo, dependendo da troca que ocorre o peso da proteína pode aumentar ou diminuir (NELSON; COX, 2002).

O *scaffold* 9, foi alinhado elevada similaridade com o plasmídeo pYC1 da cepa de *B. thuringiensis* YC-10 (NZ_CP011350.1) e foi observado a presença de todos os genes inseticidas da cepa 1408, exceto o gene *cry1Ib*. Os genes *vip1Ca* e *vip2Ac* presentes no *scaffold* 9 estão separados por apenas 5 nucleotídeos, enquanto os outros genes mesmo presentes no mesmo *scaffold*, estão em regiões distantes. A maioria dos genes que codificam as proteínas inseticidas normalmente estão presentes nos plasmídeos de cepas de *B. thuringiensis*, contudo, o gene *cry1Ib* está presente no *scaffold* 21 e integrado ao cromossomo bacteriano (GONÇALVES et al., 2009; GONZÁLES et al., 1982). A cepa T414 isolada na Índia abriga em um único plasmídeo os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1IAa*, *cry2Aa*, *cry2Ab* e *cyt1* e *vip3Aa* (REYAZ et al., 2019b). Vários estudos mostraram que algumas cepas de *B. thuringiensis* possuem mais de um gene que codifica para as proteínas inseticidas nos plasmídeos (DAY et al., 2014; LI et al., 2017; REYAZ et al., 2021, 2019).

As proteínas Cry1 foram caracterizadas inicialmente como tóxicas para insetos das ordens lepidóptera e coleóptera (TAILOR et al., 1992). Entretanto, estudos realizados com as subclasses das proteínas CryII e CryID demonstraram que estas proteínas apresentaram somente toxicidade para lepidópteros (CHOI et al., 2000; GLEAVE; WILLIAMS; HEDGES,

1993; KOSTICHKA et al., 1996; YUDINA et al., 2007). Os genes *cryII* codificam proteínas de 70 a 81 kDa que não estão presentes no cristal do *B. thuringiensis*, pois são expressos na fase vegetativa e secretados no meio ou estão silenciados (CHOI et al., 2000; GLEAVE; WILLIAMS; HEDGES, 1993; KOSTICHKA et al., 1996b; SONG et al., 2003). Devido a sua ausência nos cristais produzidos pelo *B. thuringiensis*, estas proteínas não são ingredientes ativos nos bioinseticidas (RUIZ DE ESCUDERO et al., 2006). Contudo, o uso dos genes codificadores das proteínas CryII já foi relatado em plantas transformadas eficientes no controle de *Helicoverpa armígera* (Lepidoptera: Noctuidae), *Phthorimaea operculella* e *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) (LAGNAOUI et al., 1999; LIU et al., 2004; SELVAPANDIYAN et al., 1998).

O gene *cryIIb* da proteína presente no genoma da cepa 1408 possui 719 aminoácidos com identidade igual a 95,13%, estando no limiar estabelecido pelo banco Bt nomenclature para ser uma nova proteína (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). O gene *cryIIb2* foi clonado e demonstrou toxicidade contra *Papilio cresphontes* (Lepidoptera) (XIAYU et al., 2010).

O gene *cryIDA* presente no genoma da cepa 1408 codifica 1165 aminoácidos, possui massa molecular estimada em 131,97 kDa e apresentou identidade igual a 93,30%. Diversas pesquisas relatam a toxicidade da proteína CryIDA para o gênero *Spodoptera*, incluindo resultados histopatológicos que demonstraram danos causados por esta proteína em células epiteliais do intestino de *S. littoralis* (BENFARHAT-TOUZRI et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ; FERRÉ; ESCRICHE, 2008; PORCAR; MARTÍNEZ; CABALLERO, 2000; BENFARHAT-TOUZRI et al., 2013).

Estudos que realizam a caracterização genética de cepas de *B. thuringiensis* para o controle de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* simultaneamente são escassos. Contudo, cepas de *B. thuringiensis* que causaram a mortalidade entre 70 e 100% destes insetos, apresentaram produtos de amplificação com primers específicos para genes que codificam proteínas da classe Cry1 (CARVALHO et al., 2020; SANTOS et al., 2009). As classes de proteínas Cry1 foram encontradas nos dois estudos, evidenciando assim, que estas proteínas estão relacionadas com a patogenicidade que o *B. thuringiensis* exibe (CARVALHO et al., 2020; KAAK et al., 2010; SANTOS et al., 2009).

Alguns estudos relatam a sinergia entre proteínas Cry e Vip aumentando a toxicidade contra insetos suscetíveis (ESTRUCH et al. 1996; MACINTOSH et al. 1990; WIRTH et al., 2001; XUE et al., 2005). Frequentemente, novos estudos são realizados para encontrar genes

cry e *vip* para serem introduzidos em conjunto no genoma de plantas para inibir a resistência em insetos-pragas (ALYOKHIN, 2011; JADHAV et al., 2020; MUSHTAQ et al., 2017; SALEHIAN et al., 2021; SONG et al., 2003).

Foram encontrados também no genoma da cepa 1408 os genes que codificam as proteínas Vip1, Vip2 e Vip3. As proteínas Vip possuem toxicidade da mesma magnitude das proteínas Cry contra insetos susceptíveis (DONOVAN et al. 2001). O gene que codifica a proteína Vip1Ca encontrada no genoma da cepa 1408 possui 99,74% de identidade com a sequência conhecida. Já o gene que codifica a proteína Vip2Ac apresentou 96,08% de identidade com a sequência depositada, e possui 18 SNPs encontrados por todo gene. Em sua composição estão 459 aminoácidos gerando uma massa molecular estimada de 52,08 kDa.

As proteínas Vip1 e Vip2 agem como toxinas binárias, que têm atividade inseticida contra várias espécies de Coleoptera e Hemiptera (LEUBER et al., 2006; SATTAR, 2011; SCHNEPF, 2001; WARREN, 1997). Alguns trabalhos foram realizados para elucidar o perfil de toxicidade que as proteínas Vip1Ca e Vip2Ac apresentam. Bioensaios utilizando lepidópteros, dípteros e coleópteros realizados em 2007 por Shi e colaboradores não encontraram toxicidade para as espécies alvo. Contudo, os estudos de Shingote e colaboradores em 2013 mostraram toxicidade de 60% contra *Sitophilus zeamais* (Coleoptera). Com isso, mais investigações são necessárias para avaliar se as mudanças de aminoácidos encontradas na Vip2Ac do genoma da cepa 1408 promovem a formação de uma proteína inseticida funcional.

A maior família, Vip3, possuem em média 791 aminoácidos e massa molecular de 88,5 kDa (ESTRUCH et al., 1996). Vários estudos demonstraram sua ação em lepidópteros, incluindo *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda*, *S. exigua*, *Heliiothis virescens*, *Helicoverpa zea*, dentre outros (ESTRUCH et al, 1996; DOSS et al. 2002; LIU et al, 2007). A proteína Vip3Ag presente no genoma da cepa 1408 apresentou baixa porcentagem de identidade, 92,38% com as sequências depositadas no GenBank. Assim, a presença de substituições de aminoácidos nas proteínas Vip3Ag e Cry1Da da cepa 1408 faz com que elas se diferenciem das proteínas depositadas nos bancos de dados, evidenciando desta forma a presença de duas novas proteínas. A subclasse de proteínas Vip3Ag compreende até o momento 15 genes depositados, classificados de *vip3Ag1* a *vip3Ag15* e a subclasse da proteína Cry1Da apresenta cinco genes depositados, classificados de *cry1Da1* a *cry1Da5* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/).

As toxinas VIP são uma geração promissora de inseticidas para serem usados em formulações e em plantas transgênicas, devido ao seu amplo espectro de alvos de insetos (MELO et al., 2016). Diversos estudos têm focado na determinação da estrutura e função das

proteínas Vip, procurando por novas proteínas nos genomas de cepas *B. thuringiensis* (FIGUEIREDO et al., 2013; SYED et al., 2020).

Alguns estudos relatam que as proteínas Vip3A reconhecem receptores distintos de Cry1 em *Manduca sexta*, *Agrotis segetum* e *S. littoralis*, não sendo visto relatos de resistência cruzada das proteínas Cry1 e Vip3 (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011; BEN HAMADOU-CHARFI et al., 2013; LEE et al., 2003). Por não apresentar resistência cruzada com as proteínas Cry, as Vip se tornaram atrativas como estratégia para diminuir a resistência a insetos em eventos transgênicos (BRAVO et al., 2011 , MEHLO et al., 2005 , SENA et al., 2009). De fato, alguns trabalhos têm relatado a sinergia entre proteínas Cry e Vip aumentando a toxicidade contra insetos susceptíveis (ESTRUCH et al. 1996; MACINTOSH et al. 1990; WIRTH et al., 2001; XUE et al., 2005). Assim, uma das abordagens principais consiste na busca por novos genes *cry e vip* para serem introduzidos em conjunto no genoma de plantas para inibir a resistência em insetos-pragas (ALYOKHIN, 2011; JADHAV et al., 2020; MUSHTAQ et al., 2017; SALEHIAN et al., 2021; SONG et al., 2003).

Nas últimas décadas, os pesquisadores têm tentado encontrar novos isolados de *B. thuringiensis* de diferentes regiões geográficas e ambientes diversos, para caracterizar novas toxinas com alto potencial inseticida e para enfrentar a resistência genética dos insetos-praga (ARANGO; ROMERO; ORDUZ, 2002; BARRETO et al., 1999; CARVALHO et al., 2020; CONSTANSKI et al., 2015; LEE et al., 1996; LOGUERCIO et al., 2002; SILVA-WERNECK et al., 2008). A descoberta e caracterização de cepas pode permitir o desenvolvimento de novos bioprodutos de um amplo espectro inseticida (HAMADOU et al., 2013; SYED et al., 2020)

Várias estratégias vêm sendo empregadas com sucesso para aumentar a toxicidade e o espectro das proteínas inseticidas. Dentre elas, a troca de genes, fazendo com que uma proteína expresse a sequência ou domínio de outra proteína, formando assim toxinas Vip quiméricas (SYED et al., 2020). Este método foi também utilizado para criar proteínas Cry1 quiméricas (Cry1Ba / Cry1Ia), aumentando assim a toxicidade contra o besouro-da-batata (*Leptinotarsa decemlineata*) (NAIMOV et al., 2001; SYED et al., 2020).

O conhecimento aprofundado do mecanismo de ação das proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* e dos mecanismos de resistência a insetos é crucial para os benefícios prolongados dessas toxinas no controle de pragas. Assim, para um manejo eficaz da resistência, é necessário desenvolver novas toxinas e combinar mais de uma estratégia no controle de pragas (BOBROWSKI et al., 2003; BOIÇA JUNIOR et al., 2013; WAQUIL et al., 2013).

O sequenciamento de última geração (NGS) e desenvolvimento de novas ferramentas de bioinformática foram capazes de acelerar a descoberta de novas proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* por meio do sequenciamento completo e análise de genomas de novas cepas (CARVALHO; SILVA, 2010; LI et al., 2015; MA et al., 2020; MCCUTCHEN et al., 2002).

É importante ressaltar que a toxicidade de algumas cepas acontece em função de interações sinérgicas entre proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* (CRIALESI-LEGORI et al., 2014). Assim, estudos adicionais incluindo a expressão heteróloga das proteínas inseticidas identificadas, bem como a realização de bioensaios com tais proteínas purificadas são fundamentais para a identificação de qual toxina e/ou interação estaria sendo responsável pela mortalidade das lagartas *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides*.

6) CONCLUSÃO

Seis cepas de *Bacillus thuringiensis* que não produzem β -exotoxinas mostraram-se eficientes no controle de *Spodoptera frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides*, com potencial uso em formulações de bioinseticidas.

A cepa 1408 de *B. thuringiensis* promoveu mortalidade acima de 90% nos insetos-praga e possui cinco genes codificadores de proteínas inseticidas, sendo os genes *cry1Da*, *vip1Ca*, *vip2Ac* e *vip3Ag* estão distribuídos num único plasmídeo, enquanto *cry1Ib* está no DNA cromossomal.

Duas proteínas inseticidas, *Cry1Da* e *Vip3Ag*, mostraram similaridade menor que 95% com outras proteínas conhecidas, indicando pertencerem a uma nova subclasse de toxinas.

Estudos adicionais deverão ser realizados a fim de determinar a toxicidade, especificidade e eficiência de cada proteína inseticida no controle dos insetos-praga das espécies *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides*.

REFERÊNCIAS

- ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of invertebrate pathology**, 106(2), 250-254, 2011.
- AISWARIYA, K. S; GEETHU, E. T. Recent advances in next generation sequencing (NGS) and its Impact in plant research. **Meridian**. 5, no. 1, p. 1–5, 2016.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, vol. 25, no. 17, p. 3389, 1997.
- ALVES, M. D. C., ROSSI, J. R.; RODRIGUES, M. G. F.; ALVES, E. C. D. C.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A. Identificação e caracterização de genes vip e cry coleóptero-específicos em isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1053-1060, 2011.
- ANGUS, T. A. Inspiration, Sweat, and Serendipity: The Proof of *Bacillus thuringiensis* in Biological Control. **Pathogens of Invertebrates**. Boston, MA: Springer US, p. 35–46 1984
- ARAGÃO, M. B. Ecologia Nutricional de Insetos e suas Implicações no Manejo de Pragas. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 9, no. 1, p. 100–100, Mar. 1993.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia e exigências térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, vol. 31, no. 1, p. 49–54, 2002.
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRÜTZMACHER, A. D.; RINGENBERG, R.; FORESTI, J. Adequação de uma dieta artificial para a criação de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. **Neotropical Entomology**, vol. 33, no. 2, p. 155–161, 2004.
- BEARD, C. E.; COURT, L.; BOETS, A.; MOURANT, R.; VAN RIE, J.; AKHURST, R. J. Unusually High Frequency of Genes Encoding Vegetative Insecticidal Proteins in an Australian *Bacillus thuringiensis* Collection. **Current Microbiology**, vol. 57, no. 3, p. 195–199, 2008.
- BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; & OMOTO, C. Manejo da Resistência de Insetos a Plantas Bt. **Edição. PROMIP–Manejo Integrado de Pragas, Engenheiro Coelho, SP, Brasil**, 2016.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; BODANESE-ZANETTINI, M. H.; AGRÔNOMO, E. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, set-out. vol. 34, no. 1, p. 843–850, 2003.
- BOIÇA JUNIOR, A. L.; FERRAREZI, R.; RODRIGUES, N. E. L.; SOUZA, B. H. S. de; BOTTEGA, D. B.; SILVA, A. G. da. Resistência de cultivares de amendoim de hábitos de crescimento ereto e rasteiro a *Spodoptera cosmioides* em laboratório. **Reta Agro@ mbiente**, v. 7, n. 1, p. 80-88, 2013.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, vol. 49, no. 4, p. 423–435, 2007.

BUNTIN, G. D. A Review of Plant Response to Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), Injury in Selected Field and Forage Crops. **The Florida Entomologist**, vol. 69, no. 3, p. 549, 1986.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; ZOTTI, M. J.; STEFANELLO JÚNIOR, G. J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 743-750, 2005.

BUTKO, P.; DELÉCLUSE, A.; TAMAYO, M. C.; ORDUZ, S. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and environmental microbiology**, vol. 69, no. 5, p. 2415–22, 2003.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, 2012.

CARLIER, M.-F. Actin polymerization and ATP hydrolysis. **Advances in Biophysics**, vol. 26, p. 51–73, 1990.

CARVALHO, K. S. D.; BARBOSA, T. A. N.; LANA, U. G. D. P.; VALICENTE, F. H. Selection and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* strains efficient against soybean looper (*Chrysodeixis includens*) and *Spodoptera* species. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 64, 2020.

CARVALHO, M. C.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, vol. 40, no. 3, p. 735–744, 2010.

CASMUZ, A. et al. Review of the host plants of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 69, n. 3-4, 2017.

CASTELLANA, S.; ROMANI, M.; VALENTE, E. M.; MAZZA, T. A solid quality-control analysis of AB SOLiD short-read sequencing data. **Briefings in Bioinformatics**, vol. 14, no. 6, p. 684–695, 2013.

CATTLEY, S.; ARTHUR, J. W. BioManager: the use of a bioinformatics web application as a teaching tool in undergraduate bioinformatics training. **Briefings in Bioinformatics**, vol. 8, no. 6, p. 457–465, 2007.

CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; SENESI, S.; GHELARDI, E. *Bacillus thuringiensis* membrane-podamaging toxins acting on mammalian cells. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 361, no. 2, p. 95–103, 2014.

CHENG, F.; WANG, J.; SONG, Z.; CHENG, J.; ZHANG, D.; LIU, Y. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* YC-10, a novel active strain against plant-parasitic nematodes. **Journal of biotechnology**, v. 210, p. 17-18, 2015.

CHOI, S. K., SHIN, B. S., KONG, E. M., RHO, H. M., & PARK, S. H. Cloning of a New *Bacillus thuringiensis* cryII-Type Crystal Protein Gene. **Current microbiology**, 41(1), 65-69, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB - Mapeamento das Culturas Agrícolas. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. 2021

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB - Mapeamento das Culturas Agrícolas. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. 2019

CONSTANSKI, K. C.; ZORZETTI, J.; BOAS, G. T. V.; RICIETO, A. P. S.; FAZION, F. A. P.; BOAS, L. V.; NEVES, P. M. O. J. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 730-733, 2015.

CORTEZ, M. G. R.; WAQUIL, J. M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, vol. 26, no. 2, p. 407-410, 1997.

COSTA, N. V.; RODRIGUES-COSTA, A. C. P.; COELHO, É. M. P.; FERREIRA, S. D.; BARBOSA, J. de A. Métodos de controle de plantas daninhas em sistemas orgânicos: breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, vol. 17, no. 1, p. 25-44, 2018.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B., DAVOLOS, C. C., LEMES, A. R. N., MARUCCI, S. C., LEMOS, M. V. F., FERNANDES, O. A., & DESIDÉRIO, J. A Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 79-87, 2014.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.; VIANA, P.; PAULA, L. Suscetibilidade de diferentes populações de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas químicos. In: **Embrapa Milho e Sorgo- Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia, MG. A inovação tecnológica e a competitividade no contexto dos mercados globalizados: resumos expandidos. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2000.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Yield Impact of Larval Infestations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Midwhorl Growth Stage of Corn1. **Journal of Economic Entomology**, vol. 76, no. 5, p. 1052-1054, 1983.

CRUZ, I; RESENDE, M. A. M. Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho. **Embrapa**, vol. 114, p. 1-4, 2004.

DAN, L. G. D. M.; DAN, H. D. A.; BARROSO, A. L. D. L.; BRACCINI, A. D. L. Qualidade fisiológica de sementes de soja tratadas com inseticidas sob efeito do armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 131-139, 2010.

DAUM, C.; TIGHE, D.; PHILIP, L.; MIHALKANIN, D.; SPURRELL, C.; MILLER, D.; COPELAND, A.; LUCAS, S. M. The Joining of Competitors: The Dual Operation of the ABI 3730xl and GE MegaBACE4500 DNA Sequence Analyzers at the DOE Joint Genome Institute. **Lawrence Berkeley National Laboratory**, 6 Feb. 2006.

- DE BARJAC, H.; LEMILLE, F. Presence of flagellar antigenic subfactors in serotype 3 of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 15, no. 1, p. 139–140, 1970.
- DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, vol. 17, no. 4, p. 193–199, 1 2001.
- DE OLIVEIRA, A. M.; MARACAÇA, P. B.; DINIZ FILHO, E. T.; LINHARES, P. C. F. CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS EM CULTIVOS COMERCIAIS COMO ALTERNATIVA AO USO DE AGROTÓXICOS. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, vol. 1, no. 2, p. 01, 2006.
- DE SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JÚNIOR, A. L.; DA SILVA, A. G.; LOBATO RODRIGUES, N. E. Não preferência para alimentação e aspectos biológicos de *Spodoptera eridania* em cultivares de feijão-caupi. **Revista Caatinga**, vol. 25, no. 3, p. 31–37, 2012.
- DIDELLOT, X.; BARKER, M.; FALUSH, D.; PRIEST, F. G. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. **Systematic and Applied Microbiology**, vol. 32, no. 2, p. 81–90, 2009.
- DOS SANTOS, K. B.; MENEGUIM, A. M.; NEVES, P. M. O. J. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**, vol. 34, no. 6, p. 903–910, 2005.
- DOS SANTOS, Karen Bianchi et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 157-163, 2009.
- DRESSMAN, D.; YAN, H.; TRAVERSO, G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 100, no. 15, p. 8817–8822, 2003.
- DRMANAC, R.; SPARKS, A. B.; CALLOW, M. J.; HALPERN, A. L.; BURNS, N. L.; KERMANI, B. G.; REID, C. A. Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. **Science**, v. 327, n. 5961, p. 78-81, 2010.
- DUBOIS, N.; LEWIS, F. What is *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Arboriculture**, vol. 7, no. 9, p. 233–243, 1981.
- EDWARDS A, V. H.; RICE P, C. A.; STEGEMANN J, S. C.; ZIMMERMANN J, E. H.; CASKEY CT, A. W. Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. **Genomics**, vol. 6, no. 4, p. 593–608, 1990.
- EHLING-SCHULZ, M.; KOEHLER, T. M.; LEECLUS, D. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with Pathogenic Potential. **Microbiology spectrum**, vol. 7, no. 3, 31, 2019.
- EISENSTEIN, M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. **Nature Biotechnology**, vol. 30, no. 4, p. 295–296, 2012.

ESPINASSE, S.; CHAUFAX, J.; BUISSON, C.; PERCHAT, S.; GOHAR, M.; BOURGUET, D.; SANCHIS, V. Occurrence and Linkage Between Secreted Insecticidal Toxins in Natural Isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology** 2003 47:6, vol. 47, no. 6, p. 501–507, 2003.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, no. 11, p. 5389–5394, 1996.

FANG, C.; ZHONG, H.; LIN, Y.; CHEN, B.; HAN, M.; REN, H.; LU, H.; LUBER, J. M.; XIA, M.; LI, W.; STEIN, S.; XU, X.; ZHANG, W.; DRMANAC, R.; WANG, J.; YANG, H.; HAMMARSTRÖM, L.; KOSTIC, A. D.; KRISTIENSEN, K.; LI, J. Assessment of the cPAS-based BGISEQ-500 platform for metagenomic sequencing. **GigaScience**, vol. 7, no. 3, p. 1–8, 2018.

FARKAŠ, J.; ŠEBESTA, K.; HORSKÁ, K.; SAMEK, Z.; DOLEJŠ, L.; ŠORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. Preliminary communication. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, vol. 34, no. 3, p. 1118–1120, 1969.

FIGUEIREDO, C. S. Interação das proteínas CRY1, CRY2 E VIP3 de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda*. 2017.

FIGUEIREDO, C. S.; MARUCCI, S. C.; TEZZA, R. I. D.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Caracterização do gene *vip3A* e toxicidade da proteína Vip3Aa50 á lagarta-do-cartucho e á lagarta-da-soja. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, vol. 48, no. 9, p. 1220–1227, 2013.

FIGUEIREDO, M. D. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relação entre a lagarta-do-cartucho e seus agentes de controle biológico natural na produção de milho. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, vol. 41, no. 12, p. 1693–1698, 2006.

FIUZA, Dra. L. M. BIOTECNOLOGIA Ciência & Desenvolvimento KL3. **Bio Tecnologia**, p. 1–74, 2010.

FONTANA, D. M.; MORAES, I. Aspectos da produção de *Bacillus thuringiensis*. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 11., 1988, Campinas. Anais. Campinas: Fundação Cargill, 1988.

GALZER, E. C. W.; FILHO, W. S. A. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, vol. 1, no. 1, p. 13–16, 2016.

GANIGER, P. C.; YESHWANTH, H. M.; MURALIMOHAN, K.; VINAY, N.; KUMAR, A. R. V.; CHANDRASHEKARA, K. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. **Current Science**, v. 115, no. 4, p. 621–623, 2018.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; WILKINS, M.R.; APPEL, R.D.; AIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. **The proteomics protocols handbook**, p. 571-607, 2005.

GATEHOUSE, J. A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. **Plant physiology**, vol. 146, no. 3, p. 881–7, 2008.

GAZOLA, D.; ZUCARELI, C.; CAMARGO, M. C. Comportamento germinativo de sementes de cultivares de milho sob condições de hipoxia. **Científica**, v. 42, no. 3, p. 224–232, 2014.

GLEAVE, A. P.; WILLIAMS, R.; HEDGES, R. J. Triagem por reação em cadeia da polimerase de sorotipos de *Bacillus thuringiensis* para a presença de genes de proteínas inseticidas semelhantes a cryV e caracterização de um gene cryV clonado de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Microbiologia Aplicada e Ambiental**, v. 59, n. 5, pág. 1683-1687, 1993.

GOBBO, S. R. Uso do DDT: um perigo eminente para a saúde humana. **Projeto Qualidade da Água**, v.16, 2016.

GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMÒ, M. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 2016.

GOHAR, M.; PERCHAT, S. Sample Preparation for β -Exotoxin Determination in *Bacillus thuringiensis* Cultures by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, vol. 298, no. 1, p. 112–117, 2001.

GONÇALVES, P.; LEONA, G.; VARIAL, H.; PATRÍCIA DE MEDEIROS, M.; MÁRCIA, G.; VIDAL, S.; LUIZ, J.; ARAÚJO, S.; IVO, J.; PLASMÍDIOS, B.; BACILLUS, E. Plasmídeos em *Bacillus thuringiensis*: tamanho, mecanismo de replicação e papel na atividade entomopatogênica. **Embrapa Agrobiologia Seropédica**, 2009.

GONZÁLEZ, J. M.; BROWN, B. J.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 79, no. 22, p. 6951, 1982.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics** 2016 17:6, vol. 17, no. 6, p. 333–351, 2016.

GORDY, J. W.; LEONARD, B. R.; BLOUIN, D.; DAVIS, J. A.; STOUT, M. J. Comparative Effectiveness of Potential Elicitors of Plant Resistance against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in Four Crop Plants. **PLOS ONE**, vol. 10, no. 9, p. e0136689, 2015.

GOULART, M. M. P.; BUENO, A. de F.; BUENO, R. C. O. de F.; VIEIRA, S. S. Interaction between *Telenomus remus* and *Trichogramma pretiosum* in the management of *Spodoptera* spp. **Revista Brasileira de Entomologia**, vol. 55, no. 1, p. 121–124, 2011.

GRAVENA, S. Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas. **Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1992.

GREENE, GL; LEPPLA, NC; DICKERSON, WA Lagarta de veludo: um procedimento de criação e meio artificial. **Journal of economic entomology**, v. 69, n. 4, pág. 487-488, 1976.

GUAN XIAYU, ZHANG YONGRONG, HUANG TIANPEI, GUAN XIONG. Clonagem e bioinformática do gene cry1Ib2 de *Bacillus thuringiensis* [J]. **Chinese Journal of Tropical Crops**, 31 (8): 1266-1271, 2010.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênica. **Controle microbiano de insetos**, v. 2, p. 383-446, 1998. PEREIRA, Jaqueline Magalhães et al. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera eridania* (Cramer) pela utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). 2009.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. **Controle microbiano de insetos**, v. 2, p. 383-446, 1998.

HABIB, M. E. M.; PALEARI, L. M.; AMARAL, M. E. C. Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walker, 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 3, p. 177-182, 1982.

HAMADOU-CHARFI, D. B.; BOUKEDI, H.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. Agrotis segetum midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **Journal of invertebrate pathology**, v. 114, n. 2, pág. 139-143, 2013.

HANNAY, C. L. Crystalline Inclusions in Aerobic Sporeforming Bacteria. **Nature**, vol. 172, no. 4387, p. 1004–1004, 1953.

HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. A. Bacterial insecticides. **Bacteriological reviews**, vol. 24, no. 3, p. 266–88, 1960.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN, B. M.; JOHANSEN, J. E. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. **Antonie van Leeuwenhoek**, vol. 89, no. 2, p. 239–249, 2006.

HERNÁNDEZ, C. S.; FERRÉ, J.; LARGET-THIÉRY, I. Update on the detection of β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 4, p. 643-647, 2001.

HERNÁNDEZ, C. S.; MARTÍNEZ, C.; PORCAR, M.; CABALLERO, P.; FERRÉ, J. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. **Journal of invertebrate pathology**, v. 82, n. 1, p. 57-62, 2003.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 97, n. 3, p. 245-250, 2008.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 107, no. 1, p. 219–225, 2009.

HOELHERT, J. da S.; SILVA, A. G. da; ALMEIDA, A. M.; SILVA, W. T.; GOTTARDE, G. C.; EL-HUSNY, J. C. Infestation of *Euschistus heros*, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivar the Paragominas pole of grains. **Nucleus**, vol. 15, no. 2, p. 357–369, 2018.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological reviews**, vol. 53, no. 2, p. 242–55, 1989.

HORNBY J.A., GARDNER, W. A., Dosage/mortality response of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and other Noctuid larvae to beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of economic entomology**, v. 80, n. 4, p. 925-929, 1987

HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER, R. L.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P.; ANDOW, D. A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G. D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **PLoS ONE**, vol. 9, no. 11, p. e112958, 17 Nov 2014.

HUANG, J.; LIANG, X.; XUAN, Y.; GENG, C.; LI, Y.; LU, H.; GAO, S. A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer. **Gigascience**, v. 6, n. 5, p. gix024, 2017.

JESUS, F. G. de; SOUSA, P. V. de; MACHADO, B. R.; PEREIRA, A. I. de A.; ALVES, G. C. S. Desenvolvimento de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, vol. 80, no. 4, p. 430–435, 2013.

JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. **Applied Microbiology and Biotechnology 2017 101:7**, vol. 101, no. 7, p. 2691–2711, 2017.

KAMAR, R.; GOHAR, M.; JÉHANNO, I.; RÉJASSE, A.; KALLASSY, M.; LERECLUS, D.; SANCHIS, V.; RAMARAO, N. Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. **Journal of clinical microbiology**, vol. 51, no. 1, p. 320–3, 2013.

KERGOAT, G. J.; PROWELL, D. P.; LE RU, B. P.; MITCHELL, A.; DUMAS, P.; CLAMENS, A.-L.; CONDAMINE, F. L.; SILVAIN, J.-F. Disentangling dispersal, vicariance and adaptive radiation patterns: A case study using armyworms in the pest genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol. 65, no. 3, p. 855–870, 2012.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G. W.; MULLINS, M.; MULLINS, A. D.; PALEKAR, N. V.; CRAIG, J. A.; ESTRUCH, J. J. Cloning of a cryV-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the cryV-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, pág. 2141-2144, 1996.

KRONSTAD, J. W.; WHITELEY, H. R. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal of Bacteriology**, vol. 160, no. 1, p. 95, 1984.

- LAGNAOUI, A.; CAÑEDO, V.; DOUCHES, D. S. Evaluation of Bt-cryIIa1 (cryV) transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. **CIP Program Rep**, v. 2000, p. 117-121, 1999.
- LAND, M., HAUSER, L., JUN, S. R., NOOKAEW, I., LEUZE, M. R., AHN, T. H., KARPINETS, T.; LUND, O.; USSERY, D. W. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & integrative genomics**, 15(2), 141-161, 2015.
- LEAL-COSTA, M. V.; ARAGÃO, F. J. L.; TAVARES, E. S. Anatomia foliar de plantas transgênicas e não transgênicas de *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae). **Revista Biociências**, vol. 14, no. 1, 2008.
- LECADET, M.M.; CHAUFaux, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.840-849, 1992.
- LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and environmental microbiology**, 69(8), 4648-4657., 2003.
- LERECLUS, D.; RIBIER, J.; KLIER, A.; MENOUE, G.; LECADET, M. M. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **The EMBO Journal**, vol. 3, no. 11, p. 2561, 1984.
- LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, T. C.; GONZÁLEZ, J. M.; JR. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of bacteriology**, vol. 172, no. 6, p. 3172–9, 1990.
- LEVY, R.; HABECK, D. H. Descriptions of the Larvae of *Spodoptera sunia* and *S. latifascia* with a Key to the Mature *Spodoptera* Larvae of the Eastern United States (Lepidoptera: Noctuidae)1. **Annals of the Entomological Society of America**, vol. 69, no. 4, p. 585–588, 2015.
- LI, J.; CARROLL, j.; ELLAR, D. J., Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.
- LI, Q.; XU, L.Z.; ZOU, T.; AI, P.; HUANG, G.H.; LI, P.; ZHENG, A.P.; Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain HD521. **Stand Genomic Sci**. 2015.
- LI, X. Q.; TAN, A.; VOEGTLIN, M.; BEKELE, S.; CHEN, C. S.; AROIAN, R. V. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. **Biological Control**, v. 47, n. 1, pág. 97-102, 2008.
- LI, Y., WU, C., XING, Z., GAO, B., & ZHANG, L. Engineering the bacterial endophyte *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 for the control of lepidoptera larvae by introducing the cry218 genes of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment** , v. 31, n. 6, pág. 1167-1172, 2017.

- LI, Y.; WU, K.; ZHANG, Y.; YUAN, G. Degradation of Cry1Ac protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* rice tissues under field and laboratory conditions. **Environmental entomology**, v. 36, n. 5, pág. 1275-1282, 2014.
- LIU, J.; LI, L.; PETERS, B.; LI, B.; CHEN, D.; XU, Z.; SHIRTLIFF, M. E. Complete genome sequence and bioinformatics analyses of *Bacillus thuringiensis* strain BM-BT15426. **Microbial Pathogenesis**, vol. 108, p. 55–60, 2017.
- LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, vol. 2, 2012.
- LIU, Y. J.; SONG, F. P.; HE, K. L.; YUAN, Y.; ZHANG, X. X.; GAO, P.; WANG, G. Y. Expression of a Modified CryIIe Gene in *E. coli* and in Transgenic Tobacco Confers Resistance to Corn Borer. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 36, n. 4, pág. 309-313, 2004.
- LIU, Y.; YE, W.; ZHENG, J.; FANG, L.; PENG, D.; RUAN, L.; SUN, M. High-quality draft genome sequence of nematocidal *Bacillus thuringiensis* Sbt003. **Standards in Genomic Sciences**, vol. 9, no. 3, p. 624, 2014.
- MA, W.; CHEN, H.; JIANG, X.; WANG, J.; GELBIČ, I.; GUAN, X.; ZHANG, L. Whole genome sequence analysis of the mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* LLP29. **Archives of Microbiology** 2020 202:7, vol. 202, no. 7, p. 1693–1700, 2020.
- MARDIS, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**, vol. 24, no. 3, p. 133–141, 1 Mar. 2008.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376-380, 2005.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 74, no. 2, p. 560, 1977.
- MERIGUETE, I. L. D. A. V., DE ARAÚJO JÚNIOR, D. P., DE SOUZA SEVALHO, E., MOURA, J. M. P., ASTOLFI FILHO, S., & DA SILVA, C. G. N. Monitoramento na Adoção de Tecnologia Agropecuária em Municípios-Hub no Estado do Amazonas. **REVISTA GEINTEC-GESTAO INOVACAO E TECNOLOGIAS**, v. 10, n. 3, p. 5600-5613, 2020.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. e A. S. de P. A. Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29. Brasília: [s. n.], 2019.
- MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT, V. F.; DE BARROS, N. M. Immature stages of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae): Developmental parameters and host plants. **Journal of Insect Science**, vol. 14, no. 1, 2014.

- MUCHALAK, F.; DA COSTA JUNIOR, W. V.; DE SOUZA LOUREIRO, E.; PESSOA, L. G. A.; DA SILVA, A. A. P. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) em *Eucalyptus* spp. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e0591210801-e0591210801, 2020.
- MUINCK, E. J. de; TROSVIK, P.; GILFILLAN, G. D.; HOV, J. R.; SUNDARAM, A. Y. M. A novel ultra high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing library preparation method for the Illumina HiSeq platform. **Microbiome**, vol. 5, no. 1, p. 68. 2017.
- NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection — reality and prospects. **Crop Protection**, vol. 19, no. 8–10, p. 669–676, 2000.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.
- NELSON, M. E.; ALVES, A. P. Plant Incorporated Protectants and Insect Resistance. **Insect Resistance Management**, p. 99–147, 2014.
- NETO, D. D.; SPAROVEK, G.; DE FIGUEREDO JÚNIOR, L. G. M.; LUIZ, A. F.; MANFRON, P. A.; MEDEIROS, S. L. P. Modelo para estimação da produtividade de grãos de milho deplecionada com base no balanço hídrico no solo. **sbagro.org**, vol. 12, no. 2, p. 359–367, 2004.
- PALMA, L.; DE ESCUDERO, I. R.; MAEZTU, M.; CABALLERO, P.; MUÑOZ, D. Screening of vip genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two Vip3 proteins highly toxic to five lepidopteran crop pests. **Biological Control**, vol. 66, no. 3, p. 141–149, 2013.
- PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, vol. 6, no. 12, p. 3296–325, 2014.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. **Embrapa Soja-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2009.
- PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 37, no. 1, p. 3–22, 2013.
- PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, vol. 52, no. 4, p. 413, 2011.
- PARRA, J. R. P. Controle biológico na agricultura brasileira. **Entomological Communications**, v. 1, p. 2675-1305, 2019.
- PEREIRA, R. S., A evolução do complexo soja e a questão da transgenia. **Revista de Política Agrícola**, vol. 13, no. 2, p. 26–32, 2015.
- POGUE, M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **American Entomological Society**, no. 43, p. 202, 2002.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia - Sitio en Reparación**, vol. 7, no. 2, p. 1–9, 2003.

POSTALI PARRA, J. R.; COELHO, A. Applied Biological Control in Brazil: From Laboratory Assays to Field Application. **Journal of insect science (Online)**, vol. 19, no. 2, 2019.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. D. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 39, no. 1, p. 11–16, 2004.

PRATISSOLI, D.; POLANCZYK, R. A.; GRECCO, E. D.; FERREIRA, R. A.; HOLTZ, A. M. Efeito entomotóxico de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* em duas populações de *Spodoptera frugiperda* oriundas de minas gerais e do espírito santo. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, v. 6, n. 02, 2007.

QUINTELA, E. D. Manejo Integrado de Pragas do Feijoeiro. **Embrapa - Circular Técnica** 46, p. 28, 2001.

RAMIREZ-LEPE, M.; RAMIREZ-SUERO, M. Biological Control of Mosquito Larvae by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. **Insecticides - Pest Engineering**. 2012.

RAVI, R. K.; WALTON, K.; KHOSROHEIDARI, Mahdih. MiSeq: A Next Generation Sequencing platform for Genomic Analysis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, vol. 1706, p. 223–232, 2018.

REYAZ, A. L.; BALAKRISHNAN, N.; UDAYASURIYAN, V. A novel *Bacillus thuringiensis* isolate toxic to cotton pink bollworm (*Pectinophora gossypiella* Saunders). **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104671, 2021.

REYAZ, A. L.; BALAKRISHNAN, N.; UDAYASURIYAN, V. Genome sequencing of *Bacillus thuringiensis* isolate T414 toxic to pink bollworm (*Pectinophora gossypiella* Saunders) and its insecticidal genes. **Microbial Pathogenesis**, vol. 134, p. 103553, 2019.

RODRIGUES, P. de F. M.; ARAÚJO, D. A. de O.; ALMEIDA, S. M.; RODRIGUES, P. G. M.; BRITO, E. S. G.; RODRIGUES, T. T. M. S. Pragas e danos em milho adubado com remineralizador de solo. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, vol. 13, no. 5, p. 630, 2018.

ROTHBERG, J. M.; HINZ, W.; REARICK, T. M.; SCHULTZ, J.; MILESKI, W.; DAVEY, M.; BUSTILLO, J. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348-352, 2011

ROTHBERG, J. M.; LEAMON, J. H. The development and impact of 454 sequencing. **Nature Biotechnology** 2008 26:10, vol. 26, no. 10, p. 1117–1124, 2008.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, vol. 9, no. 3, p. 283–300, 2011.

SÁNCHEZ-SOTO, A. I.; SAAVEDRA-GONZÁLEZ, G. I.; IBARRA, J. E.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BARBOZA-CORONA, J. E.; DEL RINCÓN-CASTRO, M. C. Detection of β -exotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* using an easy bioassay with the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Letters in Applied Microbiology**, vol. 61, no. 6, p. 562–567, 2015.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, vol. 31, no. 1, p. 217–231, 2011.

SANDHU, K. S.; NACIRI, M.; AL-RUBEAI, M. Prediction of recombinant protein production in an insect cell–baculovirus system using a flow cytometric technique. **Journal of Immunological Methods**, vol. 325, no. 1–2, p. 104–113, 2007.

SANGER, F. The Croonian Lecture, 1975. Nucleotide sequences in DNA. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, vol. 191, no. 1104, p. 317–333, 1975.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 74, no. 12, p. 5463, 1977.

SANSINENEA, E. ***Bacillus thuringiensis* biotechnology**. New York. Springer, 2012.

SANTOS, J. R. dos; MAIA, A. G. de F.; COSTA, A. F. da; GODOY, M. S. de; SILVA, R. I. R. Eficiência de métodos de controles na supressão da *Spodoptera frugiperda* (Smith) na cultura do milho. **Revista Inova Ciência & Tecnologia / Innovative Science & Technology Journal**, vol. 4, no. 1, p. 7–13, 2018.

SANTOS, L. M. dos; REDAELLI, L. R.; DIEFENBACH, L. M. G.; EFROM, C. F. S. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho. **Ciência Rural**, vol. 34, no. 2, p. 345–350, 2004.

SARDINHA DE SOUZA, B. H.; GONÇALVES DA SILVA, A.; ELISA, N.; RODRIGUES, L. **Feeding of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean genotypes**. [S. l.: s. n.], 2012.

SATTAR, S.; MAITI, M. K. Caracterização molecular de uma nova proteína inseticida vegetativa de *Bacillus thuringiensis* eficaz contra insetos sugadores de seiva. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 21, n. 9, pág. 937-946, 2011.

SAUKA, D. H.; PÉREZ, M. P.; LÓPEZ, N. N.; ONCO, M. I.; BERRETTA, M. F.; BENINTENDE, G. B. PCR-based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of invertebrate pathology**, v. 122, p. 28-31, 2014.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, vol. 62, no. 3, p. 775–806, 1998.

SCHNEPF, H. E.; WHITELEY, H. R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 78, no. 5, p. 2893–7, 1981.

SCHNEPF, H. Ernest et al. **Toxinas e genes de pesticidas de cepas de *Bacillus laterosporus***. Patente dos EUA n. 6.605.701, 2001.

SCHOMBURG, I.; CHANG, A.; EBELING, C.; GREMSE, M.; HELDT, C.; HUHN, G.; SCHOMBURG, D. BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. **Nucleic acids research**, v. 32, n. suppl_1, p. D431-D433, 2004.

SELVAPANDIYAN, A.; ARORA, N.; RAJAGOPAL, R.; JALALI, S. K., VENKATESAN, T., SINGH, S. P., & BHATNAGAR, R. K. Toxicity analysis of N-and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 67(12), 5855-5858, 2001.

SELVAPANDIYAN, A.; REDDY, V. S.; KUMAR, P. A.; TEWARI, K. K.; BHATNAGAR, R. K. Transformation of *Nicotiana tabacum* with a native cryIIa5 gene confers complete protection against *Heliothis armigera*. **Molecular Breeding**, v. 4, n. 6, p. 473-478, 1998.

SHAMPO, M. A.; KYLE, R. A. Frederick Sanger--winner of 2 Nobel prizes. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, vol. 77, no. 3, p. 212, 2002.

SHARMA, C. B. S. R.; SAHU, R. K. Cytogenetic hazards from agricultural chemicals. I. A preliminary study on the responses of root meristems to exotoxin from *Bacillus thuringiensis* a constituent of a microbial insecticide, thuricide. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, vol. 46, no. 1, p. 19-26, 1977.

SHELTON, A. M.; ZHAO, J.-Z.; ROUSH, R. T. Economic, Ecological, Food Safety, and Social Consequences of the Deployment of Bt Transgenic Plants. **Annual Review of Entomology**, vol. 47, no. 1, p. 845-881, 2002.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology** 2008 **26:10**, vol. 26, no. 10, p. 1135-1145, 2008.

SHIN, B. S.; PARK, S. H.; CHOI, S. K.; KOO, B. T.; LEE, S. T.; KIM, J. I. Distribution of cryV-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of cryV-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(6), 2402-2407, 1995.

SILVA, E.; SILVA, E. J. E.; SPECHT, A.; LINK, D. Noctuídeos (Lepidoptera, Noctuidae) do Museu Entomológico Ceslau Biezanko, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, RS. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 10, n. 4, 2004.

SILVAIN, J. F.; LALANNE-CASSOU, B. Distinction entre *Spodoptera latifascia* (Walker) et *Spodoptera Cosmioides* (Walker), bona species [Lepidoptera, Noctuidae]. **Revue Française d'Entomologie**, vol. 19, no. 3-4, p. 95-97, 1997.

SOLOGUREN, L. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão agrícola**, v. 13, n. 1, p. 8-13, 2015.

SONG, F.; ZHANG, J.; GU, A.; WU, Y.; HAN, L.; HE, K.; HUANG, D. Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**, 69(9), 5207-5211, 2003.

- SUBBANNA, A. R. N. S.; CHANDRASHEKARA, C.; STANLEY, J.; MISHRA, K. K.; MISHRA, P. K.; PATTANAYAK, A. Bio-efficacy of chitinolytic *Bacillus thuringiensis* isolates native to northwestern Indian Himalayas and their synergistic toxicity with selected insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 158, p. 166–174, 2019.
- TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular microbiology**, 6(9), 1211-1217, 1992.
- TEODORO, A. V.; PROCÓPIO, S. de O.; BUENO, A. de F.; JUNIOR, A. S. N.; CARVALHO, H. W. L.; NEGRISOLI, C. R. de C. B.; BRITO, L. F.; GUZZO, E. C. *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae): **Novas Pragas de Cultivos da Região Nordeste**. 2013.
- THERMES, C. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, vol. 30, no. 9, p. 418–426, 2014.
- THOMAZINI, M. J. Insetos associados à cultura da soja no estado do Acre, Brasil. **Acta Amazonica**, vol. 31, no. 4, p. 673–673, 2001.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. van; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, vol. 328, no. 6125, p. 33–37, 1987.
- VALICENTE, F. H. Controle biológico de pragas com entomopatógenos. 2018. **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2009
- VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. H.C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. **Neotropical Entomology**, v. 37, p. 702-708, 2008.
- VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. D. E. S. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus. **Circular Técnica Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento ISSN**, vol. 114, p. 1–4, 2009.
- VARANI, A. M.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, C. C.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, E. C. C.; DESIDÉRIO, J. A. Draft Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Strain T01-328, a Brazilian Isolate That Produces a Soluble Pesticide Protein, CryIIa. **Genome Announcements**, vol. 1, no. 5, 2013.
- VIANA, P. A.; MAROCHI, A. I.; Controle químico da larva de *Diabrotica* spp. na cultura do milho em sistema de plantio direto. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, v. 1, n. 02, 2002.
- VILAS-BÔAS, G. T.; PERUCA, A. P.; ARANTES, A. V. M. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian journal of microbiology**, vol. 53, no. 6, p. 673–687, 2007.
- WALKER, K.; FREDERICK, R. Entomological Risks of Genetically Engineered Crops. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**, 2019.

WAQUIL, O. M.; VIANA, P. A.; LORDELLO, A. I.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, A. C. de. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 17, no. 2, p. 163–166, 1982.

WARREN, GREGORY W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. **Advances in insect control: The role of transgenic plants**, p. 109-121, 1997.

WHEELER, D. A.; SRINIVASAN, M.; EGHOLM, M.; SHEN, Y.; CHEN, L.; MCGUIRE, A.; ROTHBERG, J. M. The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. **Nature**, v. 452, n. 7189, p. 872-876, 2008.

WHO. **Microbial Pest Control**. World Health Organization, 1999.

XU, Y.; LIN, Z.; TANG, C.; TANG, Y.; CAI, Y.; ZHONG, H.; GAO, Q. A new massively parallel nanoball sequencing platform for whole exome research. **BMC bioinformatics**, v. 20, n. 1, p. 1-9, 2019.

YANG, J.; QUAN, Y.; SIVAPRASATH, P.; SHABBIR, M. Z.; WANG, Z.; FERRÉ, J.; HE, K. Insecticidal Activity and Synergistic Combinations of Ten Different Bt Toxins against *Mythimna separata* (Walker). **Toxins**, vol. 10, no. 11, 2018.

YAO, Y.; ZIA, A.; WYROŻEMSKI, Ł.; LINDEMAN, I.; SANDVE, G. K.; QIAO, S.-W. Exploiting antigen receptor information to quantify index switching in single-cell transcriptome sequencing experiments. **PLOS ONE**, vol. 13, no. 12, p. e0208484, 2018.

YIN, C.; LIU, Y.; GUO, X.; LI, D.; FANG, W.; YANG, J.; ZHOU, F.; NIU, W.; JIA, Y.; YANG, H.; XING, J. An Effective Strategy to Eliminate Inherent Cross-Contamination in mtDNA Next-Generation Sequencing of Multiple Samples. **The Journal of Molecular Diagnostics**, vol. 21, no. 4, p. 593–601, 2019.

ZACHÉ, B.; WILCKEN, C. F.; ZACHÉ, R. R. C.; SOUZA, N. M. de. Novo registro de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), como parasitóide de *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Biota Neotropica**, vol. 12, no. 1, p. 319–322, 2012.

ZANUNCIO, J. C.; MATOS NETO, F. C.; TAVARES, W. de S.; CRUZ, I.; DEMOLIN LEITE, G. L.; SERRÃO, J. E. Respostas funcional e numérica e reprodução de *Campoletis flavicineta* parasitando lagartas de *Spodoptera frugiperda*. **Acta Scientiarum - Agronomy**, vol. 35, no. 4, p. 419–426, 2013.

ZENKER, M. M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Estágios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, vol. 24, no. 1, p. 99–107, 2007.

ZHU, F. Y.; CHEN, M. X.; YE, N. H.; QIAO, W. M.; GAO, B.; LAW, W. K.; LIU, Y. G. Comparative performance of the BGISEQ-500 and Illumina HiSeq4000 sequencing platforms for transcriptome analysis in plants. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2018.

ZUO, W.; LI, J.; ZHENG, J.; ZHANG, L.; YANG, Q.; YU, Y.; ZHANG, Z.; DING, Q. Whole genome sequencing of a multidrug-resistant *Bacillus thuringiensis* HM-311 obtained

from the Radiation and Heavy metal-polluted soil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, vol. 21, p. 275–277, 2020.