



KARINE SILVA DE CARVALHO

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS
DE *Bacillus thuringiensis* EFICIENTES CONTRA LAGARTA
FALSA-MEDIDEIRA (*Chrysodeixis includens*)**

LAVRAS-MG

2017

KARINE SILVA DE CARVALHO

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* EFICIENTES CONTRA LAGARTA FALSA-MEDIDEIRA (*Chrysodeixis includens*)

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

**LAVRAS-MG
2017**

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

Carvalho, Karine Silva de.

Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) / Karine Silva de Carvalho. - 2017.

77 p. : il.

Orientador(a): Fernando Hercos Valicente.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Controle Biológico. 2. Caracterização Molecular. 3. *Bacillus thuringiensis*. I. Valicente, Fernando Hercos. . II. Título.

KARINE SILVA CARVALHO

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* EFICIENTES CONTRA LAGARTA FALSA-MEDIDEIRA (*Chrysodeixis includens*)

SELECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* EFFICIENTS AGAINST Soybean looper (*Chrysodeixis includens*)

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 06 de abril de 2017.
Dr. Fernando Hercos Valicente - UFLA
Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana - EMBRAPA
Dra. Andrea Almeida Carneiro - EMBRAPA

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

À minha mãe Vandete pelo amor incondicional e por me mostrar a ser
feliz independente dos obstáculos que possam surgir.
Ao meu pai Ademar por ser meu maior exemplo de vida, ao me ensinar
todos os dias em como superar desafios.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela presença e proteção em minha vida, permitindo a realização desse sonho.

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

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

À Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao meu orientador Dr. Fernando Valicente pela oportunidade, confiança em meu trabalho, otimismo e pelos grandes ensinamentos.

Ao Dr. Ubiraci Lana por todas as instruções, sugestões e pela paciência em esclarecer todas as dúvidas.

À Dra. Cássia Pinheiro pela amizade, disponibilidade e paciência em me ajudar nas análises estatísticas, no texto e sanar todas as dúvidas que tive.

Aos meus queridos pais Ademar e Vandete por todo amor, carinho, apoio e incentivo para a realização desse sonho.

Ao meu irmão Cássio pela amizade, carinho, incentivo e por sempre alegrar os meus dias.

Ao meu querido Lucas por todo amor, ajuda, companheirismo e bons momentos.

Aos amigos do programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, em especial à Tatiane pela amizade, cumplicidade nos estudos, convívio e ajuda desde o início desta etapa, e ao Victor e à Daniele pela boa convivência, momentos de descontração, e por toda disposição em me ajudar sempre que precisei.

A todo pessoal do Laboratório do Controle Biológico, em especial ao Nate, Celsinho, Ismael, Juliana, Bruna, Débora, Isabela, Jéssica, Cleidiane, André, Caio, Igor, Carlos e Fabrini, pelo bom trabalho em equipe e ótimos momentos no dia-a-dia.

MUITO OBRIGADA!

“... É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar
E, então, fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar

Não é sobre chegar no topo do mundo
E saber que venceu
É sobre escalar e sentir
Que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo
E também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo
Em todas as situações

A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe
Pra perto de mim...”

Ana Vilela

RESUMO

Lagartas de falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) são importantes insetos desfolhadores responsáveis por perdas significativas de produtividade principalmente em cultivos de soja no Brasil. Dentre os métodos de controle sustentáveis mais utilizados para a supressão de insetos-praga na agricultura se destacam os bioinseticidas e as plantas transgênicas à base de proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. A fim de fornecer novos componentes para o controle da falsa-medideira, este estudo teve como objetivo selecionar cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para essa espécie e caracterizá-las molecularmente. Foram utilizadas 50 cepas pertencentes ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo para a realização de bioensaios seletivos, detecção da presença de genes de classes *cry1*, *cry2* e *cry9*, ensaios de detecção de β -exotoxinas, além de análises dos perfis plasmidiais e de padrões de proteínas totais e ativas das cepas eficientes. A partir dos testes realizados, foram selecionadas quatro cepas (3820, 531, 547 e 566) e estas foram consideradas promissoras para o controle de *C. includens*. Todas apresentaram 100% de mortalidade para essa espécie, e através das avaliações moleculares foi observada a presença de genes *cry*, de megaplasmídeos e de duas bandas proteicas principais produzidas pelas cepas. Além disso, duas das cepas selecionadas para falsa-medideira (3820 e 566) também apresentaram para outras três espécies lepidópteras de importância agrícola do gênero *Spodoptera*. Estes resultados evidenciam o alto potencial dessas cepas para uso na formulação de produtos à base de Bt para a agricultura.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico. Caracterização molecular. *Chrysodeixis includens*. Falsa-medideira.

ABSTRACT

Soybean looper (*Chrysodeixis includens*) are important defoliating insects responsible for significant losses in productivity mainly in soybean crops in Brazil. Among the most used sustainable control methods for the suppression of pests in agriculture are the bio-insecticides and transgenic plants containing proteins produced by *Bacillus thuringiensis*. In order to provide new components for the control of the soybean looper, this study aimed to select strains of *B. thuringiensis* toxic to these species and to characterize them molecularly. Fifty strains belonging to the Bank of Microorganisms of Embrapa Milho e Sorgo were used to perform selective bioassays, detection of the presence of genes *cry1*, *cry2* and *cry9*, β -exotoxin detection assays, in addition to analysis of the plasmid profiles and to patterns of protein total and active of the efficient strains. From the tests, four strains were selected (3820, 531, 547 and 566) and these have been considered promising for the control of *C. includens*. All of them showed 100% mortality for these species, and through molecular evaluations was observed the presence of *cry* genes, megaplasmids and two main protein bands produced by the strains. In addition, two of the strains selected for soybean looper (3820 and 566) also presented toxicity to other three lepidopteran species of agricultural importance of the genus *Spodoptera*. These results demonstrate the high potential of these strains for use in the formulation of products containing Bt for agriculture.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Biological control. *Chrysodeixis includens*. Molecular characterization. Soybean looper.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	Falsa-Medideira - <i>Chrysodeixis includens</i> (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae)	14
2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	16
2.3	Proteínas Cry (δ -endotoxinas)	18
2.4	β -exotoxinas	21
2.5	Perfil Plasmidial	22
2.6	Caracterização Molecular	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	26
3.2	Bioensaios	28
3.2.1	Criação e manutenção da população de insetos (Falsa-medideira).....	28
3.2.2	Preparo das suspensões de Bt	29
3.2.3	Ensaios de toxicidade com <i>Chrysodeixis includens</i>	30
3.3	Caracterização Molecular	32
3.4	Extração de DNA genômico	32
3.4.1	Identificação de β -exotoxinas nos isolados.....	33
3.4.2	<i>Primers cry</i> -específicos	34
3.4.3	Sequenciamento.....	37
3.4.4	Extração e análise de perfil plasmidial	37
3.4.5	Extração, ativação e análise de proteínas	40
3.5	Bioensaios com lagartas do gênero <i>Spodoptera</i>	41
3.6	Análises estatísticas dos dados	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	42
4.2	Ensaios de toxicidade com <i>Chrysodeixis includens</i>	43
4.3	Identificação de β -exotoxinas nos isolados.....	45

4.4	Detecção de genes <i>cry</i>	49
4.5	Perfis plasmidiais	54
4.6	Perfis Proteicos.....	58
4.7	Ensaio de toxicidade com lagartas do gênero <i>Spodoptera</i>.....	61
5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF), nas últimas décadas o país vem sofrendo a cada safra com perdas relacionadas a novas pragas em lavouras, como por exemplo, as espécies *Helicoverpa armigera*, o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) e a broca do café (*Hypothenemus hampei*), o qual as perdas causadas são de valores bilionários que podem prejudicar o produtor e o fornecimento de alimentos (ANDEF, 2017).

Nesse contexto se inserem as espécies de lagartas desfolhadoras, que ocorrem nas lavouras brasileiras provocando diversos prejuízos. Atualmente, uma das grandes preocupações está na elevada incidência da espécie falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), principalmente em cultivos de soja (CONTE et al., 2014) uma espécie vegetal cultivada em diversas regiões do Brasil, que está em segundo lugar de maior produção mundial do grão, com 49% de área plantada e grande destaque na balança comercial por seus produtos possuírem alto padrão de qualidade (CONAB, 2017).

Na safra 2014/2015 essa espécie ocorreu de forma generalizada nos cultivares de soja oferecendo reais riscos de perdas em próximas colheitas, de forma que o aumento populacional dessa espécie pode estar diretamente ligado a aplicações desordenadas de inseticidas químicos, prejudicando a ação dos inimigos naturais da praga (EMBRAPA, 2015). Além disso, existe uma grande preocupação relacionada à tolerância dessa espécie a diversos inseticidas, o que pode dificultar ainda mais o seu controle (MASCARENHAS & BOETHEL, 2000).

A utilização do controle biológico como estratégia de manejo surge de forma a minimizar danos causados por infestações de insetos-pragas nas lavouras e tem obtido bons resultados como a diminuição dos prejuízos econômicos (MENDES et al., 2012).

Diante deste cenário, o uso dos microrganismos entomopatogênicos como o *Bacillus thuringiensis* (Bt) passou a ser muito estudado no controle de pragas, devido às características bioinseticidas de tais microrganismos para diferentes ordens de insetos. Desde então aumentaram-se os estudos na busca por isolados com atividades tóxicas para uso na formulação de produtos para a agricultura à base dessa bactéria (FORRESTER, 1994; FEITELSON, PAYNE & KIM, 1992; CAPALBO, 2005).

As características tóxicas para insetos-pragas proporcionadas pelo Bt são devidas à produção de proteínas cristalinas que são codificadas por genes denominados *cry*. O uso de estratégias moleculares para a caracterização de isolados de Bt eficientes tem sido amplamente empregado para investigar e distinguir suas propriedades principalmente em relação ao conteúdo gênico, proporcionando, assim, novas perspectivas para uso dessas bactérias (CAROZZI et al., 1991; CERON et al., 1995; CERON et al., 1995; BRAVO, 1997; BOBROWSKI et al., 2003).

As formas mais utilizadas do Bt na agricultura incluem os biopesticidas e, mais recentemente, o uso de plantas transgênicas resistente a insetos, que se caracterizam pela introdução de genes de toxinas do Bt nas plantas, conferindo-lhes resistência a algumas espécies de lagartas. Os cultivares Bt contribuem na agricultura como componente do MIP (Manejo Integrado de Pragas), permitindo reduzir aplicações de inseticidas, especialmente para lagartas consideradas pragas agrícolas com alta interferência na produção de cultivares (CONTE et al., 2014).

Com a adoção de plantas transgênicas foi possível obter resultados econômicos positivos. O Brasil só perde para os Estados Unidos no plantio de transgênicos, ocupando a segunda posição no ranking mundial, com 44,2 milhões de hectares de área de plantada e com 60 eventos de culturas aprovados no país. O plantio de eventos transgênicos no Brasil é mais intensificado nos cultivares de soja, milho e algodão, e estima-se que mais de 80% das lavouras plantadas no país constituam de variedades transgênicas (ISAAA, 2015).

Dessa forma, torna-se importante investir em estudos de seleção de isolados de Bt ativos com novas propriedades para serem incluídos em estratégias de fabricação de produtos como os biopesticidas e o desenvolvimento de plantas transgênicas. A partir disso, este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar molecularmente cepas de *Bacillus thuringiensis* com atividades inseticidas visando o controle biológico da lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Falsa-Medideira - *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta falsa-medideira (Figura 1) caracteriza-se por possuir dois pares de pseudopatas, face interna das mandíbulas com dois dentes, coloração verde clara com linhas brancas longitudinais e causar desfolha, não se alimentando das nervuras das plantas e deixando os folíolos com aspecto rendilhado característico, podendo consumir até 200 cm² de área foliar ocasionando a perda de qualidade do produto no mercado (Figura 2) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; PICANÇO et al., 2010). Seu desenvolvimento ocorre através de fase larval, fase de pupa envolta a uma teia geralmente na face ventral da folha e adultos que podem colocar em média 600 ovos.

Sua ocorrência é frequente em todas as regiões produtoras de soja, assim como nas áreas atuais de expansão da cultura (Norte e Nordeste). Era considerada uma praga secundária, com baixo nível populacional nas lavouras, sendo controlada por diversos inimigos naturais. O aumento populacional de tal lagarta nos últimos anos pode estar relacionado a aplicações exageradas e inadequadas de inseticidas químicos não seletivos combinados ao uso de fungicidas para o controle de ferrugem, o que contribuiu para o declínio populacional dos inimigos naturais e favoreceu a explosão populacional da praga, assim, transformando-se em um sério problema desde a safra 2002/2003 (EMBRAPA, 2012).

Figura 1- Lagarta Falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*).



Fonte: (CRAVEIRO et al., 2008)

Figura 2 - Folha de aspecto rendilhado causado por Falsa-medideira.



Fonte: AFBueno - Arquivo Embrapa Soja.

Um estudo na safra 2014/2015 apontou o aumento da densidade dessa espécie gradativamente ao longo do desenvolvimento das plantas de soja e a mesma foi predominante até no final do ciclo da cultura, destacando-se como a mais frequente (53,1%) das espécies, ultrapassando até mesmo o percentual da *Anticarsia gemmatilis* (41,5%), outra espécie de

lagarta que é considerada a principal praga da soja. Demonstrando assim, um fator preocupante principalmente no estado do Paraná devido ser a principal espécie presente durante todo ciclo da soja (CONTE et al., 2014).

A falsa-medideira também se tornou praga de outras culturas além da soja, por exemplo, o algodão. A lagarta causa sérios danos às regiões produtoras desta cultura devido à sua dispersão principalmente após a entrada da soja na fase de senescência, onde a planta fica menos atrativa (IMA, 2014). Além disso, a lagarta também tem sido reportada em outras espécies vegetais como maracujazeiros (BENASSI et al., 2012), couve, repolho (CARDOSO et al., 2010) e feijão (DINIZ, 2015).

Um fator preocupante para essa espécie decorre do fato de que esta lagarta é considerada uma praga de difícil controle pelos agricultores, devido a maior tolerância e alto potencial de desenvolvimento de resistência, quando comparada a outras espécies como a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), aos inseticidas químicos e biológicos existentes no mercado (BUENO et al., 2012). As lagartas são encontradas alimentando-se na região do terço médio e inferior das plantas de soja, e esse comportamento contribui para as dificuldades em seu controle através de pulverizações, motivando assim a intensificação dos estudos biotecnológicos para desenvolverem estratégias eficientes para o controle dessa praga.

2.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, não-capsulada e móvel com flagelos em sua periferia, foi formalmente descrita por Berliner em 1915, e também é conhecida popularmente pela sigla Bt.

Existem diversas subespécies dessa bactéria e sua ecologia tornou-se bastante conhecida, a qual é tipicamente encontrada no solo onde permanece dormente na maioria das condições naturais, em grãos armazenados, água, superfícies de plantas e insetos mortos (BURGES & HURST, 1977; HASTOWO, LAY, & OHBA; KAELIN, MOREL & GADANI, 1994; GLARE & O'CALLAGHAN, 2000). Devido sua utilização comercial no controle de insetos, o Bt alcançou um lugar importante na agricultura e na saúde pública, de forma que sua ação inseticida é eficiente, segura aos seres humanos e compatível ao meio ambiente, se

tornando um biopesticida amplamente utilizado em todo o mundo (ROH et al., 2007; IBRAHIM et al., 2010; BISHOP & ROBINSON, 2014).

O Bt foi descrito inicialmente como um patógeno oportunista, de forma que a síntese do cristal durante a fase de esporulação pode ser devido ao interesse em matar o hospedeiro e obter nutrientes suficientes para a bactéria para permitir no futuro a germinação dos esporos dormentes (BURGES & HURST, 1977; DE MAAGD et al., 2001). Porém, estudos mostram que esse microrganismo não pode ser considerado um patógeno obrigatório de insetos devido a sua presença e replicação em ambientes improváveis de encontrar insetos hospedeiros susceptíveis (RAYMOND et al., 2010) e ao grande número de isolados que produzem proteínas Cry não inseticidas.

Entretanto, algumas destas proteínas não inseticidas já são conhecidas recentemente com uma nova capacidade de atuação contra células cancerígenas, ganhando assim uma nova categoria de proteínas, as Parasporinas (PS) (MIZUKI et al., 1999; KATAYAMA et al., 2005; OHBA et al., 2009).

A atividade entomopatogênica do Bt é dada através da formação de cristais por meio da acumulação de proteínas durante a fase de esporulação, estas proteínas, quando digeridas por insetos-específicos, são ativadas e interagem com as células epiteliais do intestino médio, provocando a formação de poros na membrana da célula que ocasionam diversos distúrbios no organismo do inseto até provocar sua morte (HÖFTE & WHITELEY, 1989).

No controle biológico de pragas, o *Bacillus thuringiensis*, juntamente com seus subprodutos, é a espécie microbiana mais promissora e bem sucedida por ser amplamente comercializada para o controle de lagartas em várias culturas (AGUIAR-MENEZES, 2003) há mais de 60 anos. Isto se deve ao fato de que, além do seu vasto uso como formulações bioinseticidas, que oferecem uma alternativa poderosa na redução do uso de produtos químicos (EMMERT & HANDELSMAN, 1999), esse entomopatógeno também se mostra promissor como fonte de genes que expressam proteínas inseticidas para serem utilizados na produção de plantas transgênicas resistentes à praga-alvo.

A sua utilização deve ser parte de um conjunto de medidas de forma a promover a manutenção e a redução da população de pragas em lavouras a níveis não prejudiciais economicamente, podendo ser empregados em programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP), pois possuem compatibilidade com a maioria dos métodos de controle (GALLO et al.,

2002). Já são existentes mais de 180 produtos biopesticidas à base de Bt, que são utilizados em culturas e plantas ornamentais com diversas formas de uso como sprays, pós, grânulos ou pellets (NPIC, 2015).

As toxinas de Bt são as principais constituintes de plantas transgênicas para controle de insetos (SAXENA & STOTZKY, 2000; STOTZKY, 2005) e sua atividade inseticida varia de acordo com os genes *cry* presentes nas cepas. Estes genes codificam as proteínas Cry (também conhecidas como δ -endotoxinas), que são as principais e mais estudadas. O *Bacillus thuringiensis* também produz outros tipos de toxinas importantes como as Cyt (outro tipo de δ -endotoxinas); as exotoxinas (α e β) que possuem atividade de amplo espectro de ação para insetos e vertebrados; as hemolisinas; as exoenzimas (dentre elas quitinases e proteases) e as Proteínas Inseticidas Vegetativas conhecidas como *VIP's*, descobertas mais recentemente e estão sendo bastante estudadas por sua elevada toxicidade a lepidópteros (DROBNIIEWSKI & ELLAR, 1988; ESTRUCH et al., 1996; PINTO et al., 2010; DE SOUZA LIMA, 2013).

Os genes de Bt são agrupados de acordo com sua especificidade tóxica para as classes de Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros e Nematóides (DE MAAGD, BRAVO & CRICKMORE, 2001). Sua descoberta foi o marco para a produção e aprovação de diversos eventos de plantas Bt no mundo, como milho, soja, algodão, canola, arroz, beringela, álamo, batata e tomate transformados com os genes das classes *cry1*, *cry2*, *cry3* e *cry9* (ISAAA, 2017).

2.3 Proteínas Cry (δ -endotoxinas)

A especificidade e patogenicidade de uma cepa de *Bacillus thuringiensis* são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que estão presentes no cromossomo e principalmente nos plasmídeos da bactéria (algumas linhagens apresentam os genes exclusivamente nos plasmídeos), podendo conter uma ou várias cópias do mesmo gene *cry*, ou diferentes genes que formarão o mesmo cristal (DEBABOV et al., 1976; LERECLUS et al., 1982).

Estes cristais são formados por polipeptídeos, dentro do citoplasma das células esporuladas (DE MAAGD et al., 2001) podendo ter diversas formas, como bipiramidais,

esféricos, retangulares, cubóides ou irregulares, estabelecidos através de condições de natureza e da concentração molar de toxinas produzidas.

A partir das estratégias moleculares e ferramentas de bioinformática, o comitê de nomenclatura de delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* já classificou 74 grupos diferentes de proteínas Cry. Baseados na identidade entre sequências de aminoácidos, permitindo a classificação em conjunto de toxinas intimamente ligadas e a sua especificidade biológica é utilizada como componente da nomenclatura original. Esta nomenclatura sofreu alterações pela troca de algarismos romanos na posição primária por algarismos arábicos, como exemplo, antes a proteína era CryIII, agora tornou-se Cry3A, devido ao aumento no número de genes já sequenciados (CRICKMORE et al., 2016).

O pesquisador Neil Crickmore e colaboradores (2017) mantém um banco de dados online com informações importantes e atuais sobre as proteínas de Bt existentes, disponível em < <http://www.btnomenclature.info/>>, com interesses particulares em descobrir os mecanismos de cristalização *in vitro*, mecanismos de ação das toxinas e as formas de aquisição de resistência às toxinas pelos insetos.

Desde 1998 publicações utilizando Bt em bioensaios contra diferentes espécies de insetos são incorporadas em um banco de dados específico (van Frankenhuyzen, K., Nystrom, C., <http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>) e a partir disso sabe-se a especificidade das famílias de toxinas Cry. Esses bioensaios mostram que as principais famílias para a ordem de lepidópteros são Cry1, Cry2 e Cry9, e estudos específicos com a espécie *Chrysodeixis includens* mostram atividade principalmente das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Bb e Cry2Aa (VAN FRANKENHUYZEN, 2009).

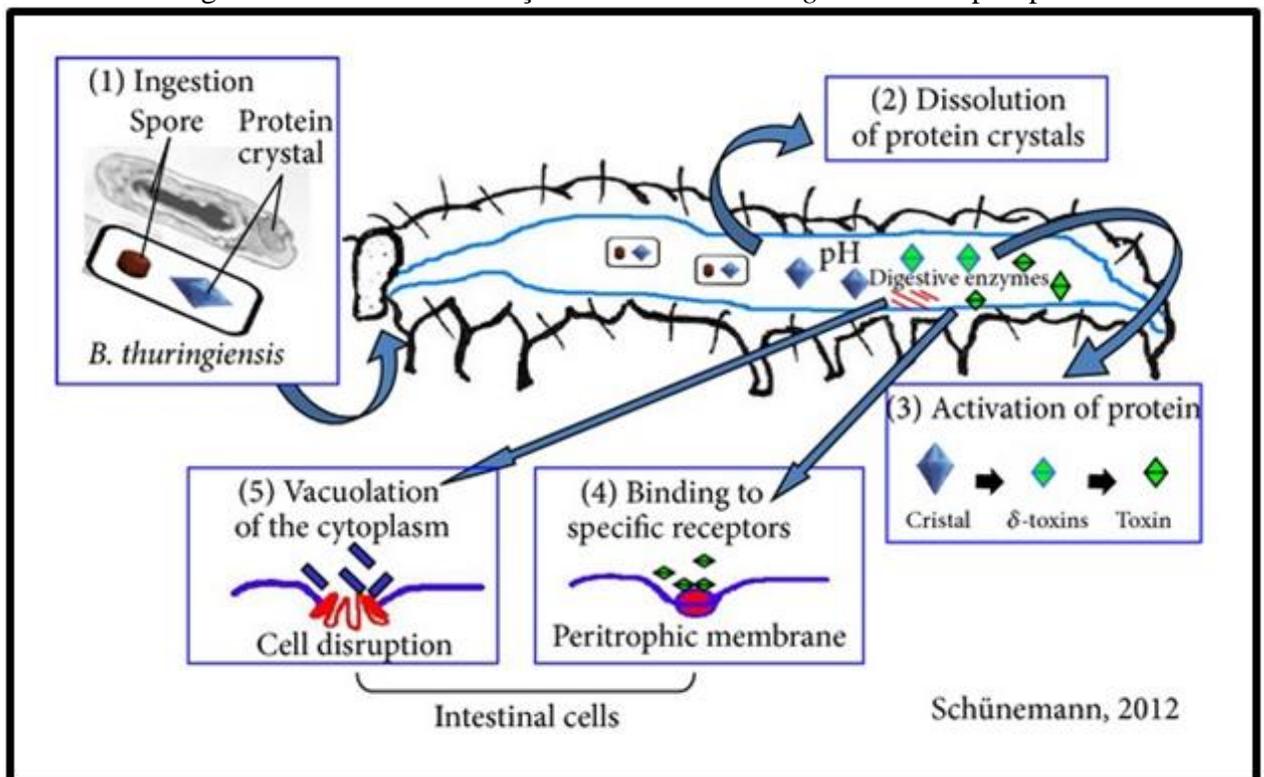
O mecanismo de ação (Figura 3) das proteínas Cry, baseia-se na produção das mesmas pelo Bt em forma de pró-toxinas (contendo um C-terminal prolongado, determinante da formação da estrutura do cristal); nesta forma, elas não possuem ação inseticida e podem ser encontradas com diferentes tamanhos moleculares, variando de 50-140 kDa e essa variação ocorre devido a variedade de sub-espécies existentes (BRAVO,1997).

Após a ingestão e a dissolução, as pró-toxinas precisam ser ativadas através de clivagem por enzimas digestivas (proteases específicas) no ambiente alcalino do intestino médio do inseto para que ocorra a formação de fragmentos tóxicos. Estes fragmentos são derivados da metade N- terminal, possuem aproximadamente 60 a 70 kDa e a sua estrutura é composta por

três domínios semelhantes, conservados e ligados por ligantes simples, sugerindo assim um modo de ação similar à essa família de proteínas, determinantes importantes de especificidade, (HÖFTE & WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994; BRAVO et al., 2007; PARDO-LOPEZ, 2013) esse mesmo processo de ativação das proteínas pode ser realizado *in vitro* utilizando diversos tipos de proteases.

Posteriormente, ocorre a ligação aos receptores específicos localizados em microvilosidades apicais presentes no tecido epitelial do intestino do inseto, com consequente formação de poros líticos na membrana plasmática que resultarão na lise celular e ruptura do epitélio, resultando em morte por fome ou septicemia (HOFTE & WHITELEY, 1989; RUKIMINI et al., 2000; ADANG, CRICKMORE & JURAT-FUENTES, 2014).

Figura 3 - Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis* em lepidópteros.



(1) Ingestão de bactérias; (2) Solubilização dos cristais; (3) Ativação de proteínas; (4) Ligação de proteínas aos receptores; (5) Formação de poros da membrana e lise de células.

Fonte: (SCHÜNEMANN et al., 2014).

O estudo do conjunto de processos que ocorrem com as proteínas Bt torna-se importante para o entendimento do modo de ação e como forma a lidar também com eventuais problemas de resistência. Além disso, é de grande importância o rastreamento de novas proteínas Cry com

diferentes especificidades a receptores de insetos para o desenvolvimento de novos produtos (BRAVO, GILL & SOBERÓN, 2007).

2.4 β -exotoxinas

Alguns isolados de Bt podem produzir metabólitos não proteicos durante o crescimento vegetativo conhecidos como β -exotoxina ou thuringiensina (Thu). Essas substâncias são oligossacarídeos termoestáveis, solúveis em água, persistentes no ambiente, claramente diferentes dos corpos de inclusão, e são compostas por adenosina, glicose, ácido fosfórico e diácido glucônico, de peso molecular de 0.7 kDa e possuem amplo espectro tóxico (MCCONNELL & RICHARDS, 1959; FARKAS et al., 1969).

A sua alta toxicidade inespecífica torna-se um problema devido à ação sobre quase todas as formas de vida, incluindo várias espécies de insetos e também a de mamíferos. Essas toxinas inibem a atividade da RNA polimerase dependente de DNA, agindo de forma competitiva com ATP por sítios de ligação, provocando assim o bloqueio da síntese proteica e afetando os diferentes estágios de desenvolvimento dos insetos. A ação das β -exotoxinas interfere conseqüentemente na reprodução, alimentação e crescimento, com efeitos disruptivos na formação de cutículas. Essas características despertaram precaução no uso comercial de formulações à base de Bt (SCHARMA et al., 1976; VARGAS MESINA, 1993).

A Organização Mundial de Saúde determina a proibição de isolados de Bt que produzem esse metabólito para formulação de bioinseticidas, tornando-se importante detectá-los (WHO, 1999). Para isso existem diversos métodos, como HPLC (Cromatografia líquida de alta resolução), bioensaios com sobrenadantes autoclavados e análises moleculares (LEVINSON et al., 1990; HERNÁNDEZ et al., 2001; MAC INNES & BOUWER, 2009; SAUKA et al., 2014).

A capacidade de produção elevada de β -exotoxinas está distribuída entre os sorotipos de Bt e diretamente correlacionada à presença de plasmídeos com genes *cry*, por exemplo, foi observada que a presença dos genes *cry1B* e *vip2* está fortemente associada a essa biossíntese (ESPINASSE et al., 2002).

São conhecidos dois tipos de β -exotoxinas (I e II) que diferem nos valores de pH, coeficiente de absorção, hidrofobicidade e toxicidade, e é interessante ressaltar que foi

determinado que o tipo II apresenta maior toxicidade que o tipo I para várias espécies de lepidópteros (LEVINSON et al., 1990).

Em seu trabalho Liu et al. (2010) propuseram uma elucidação da via de biossíntese da β -exotoxina do tipo I, relatando que esse fator inseticida é codificado em plasmídeo com fragmentos relacionados a elementos móveis e estão acoplados a evolução do *Bacillus thuringiensis*, sustentando a opinião de que esses plasmídeos foram adquiridos por transferência horizontal. O estudo desses autores permitiu que o gene *ThuE* fosse identificado e provado ser o responsável pela codificação de uma enzima que promove a fosforilação da β -exotoxina tipo I em sua última etapa de biossíntese. Porém, este mesmo método não pode ser usado para identificar β -exotoxina do tipo II, pelo fato de que os isolados que as produzem não possuem esse mesmo gene, assim utilizando outros para sua biossíntese.

A descoberta desses genes envolvidos na biossíntese de β -exotoxina é um passo crucial para gerar estratégias que possam impedir a produção desses metabólitos (SAUKA et al., 2014).

2.5 Perfil Plasmidial

Os genes *cry*, responsáveis pela expressão das proteínas tóxicas de Bt, estão presentes principalmente nos plasmídeos bacterianos (embora também estejam presentes no cromossomo) que são DNA's extra cromossomais e podem apresentar de 10 a 20% do DNA total do Bt variando de um isolado para outro quanto à quantidade (entre 1 a 17) e tamanho (entre 1 a 150 MDa), dessa forma esses elementos abrigam componentes genéticos extremamente importantes para conferir características fenotípicas especiais ao hospedeiro (GONZÁLEZ & CARLTON, 1980; GONZÁLEZ et al., 1981; LIU et al., 2010).

Um padrão plasmidial está associado a cada isolado fornecendo ferramentas valiosas para reivindicações de propriedade intelectual. Para a classificação dividem-se, principalmente, em dois grupos diferentes de plasmídeos: os pequenos plasmídeos que possuem tamanho ≤ 30 MDa e os megaplasmídeos ≥ 30 MDa. Os pequenos plasmídeos geralmente se apresentam nos isolados em número elevado, mas ainda não se conhece a função específica dos mesmos, diferente dos megaplasmídeos que se apresentam em baixo

número de cópias, mas que possuem maior importância, pois são os principais responsáveis por abrigar os genes *cry* (REYES-RAMÍRES & IBARRA, 2008; FAGUNDES et al., 2011).

A diversidade de padrões plasmidiais se dá devido à capacidade de perda de plasmídeos por isolados de *Bacillus thuringiensis* e de transferência entre isolados de *B. thuringiensis* e entre *B. thuringiensis* com outras espécies bacterianas como *B. cereus* e *B. anthracis* que apesar de serem de mesmo grupo bacteriano possuem fenótipos e efeitos patológicos amplamente distintos, estes processos resultam no surgimento de novas subespécies com diferentes conteúdos plasmidiais (REDDY et al., 1987).

A perda de plasmídeos pode levar a perda de produção de δ -endotoxinas, e os fatores que podem contribuir para isso são altas temperaturas e os nutrientes de cultivo (GONZÁLEZ & CARLTON, 1984). Em seus estudos, Reyaz et al. (2013) observaram que a variação de perfis plasmidiais em isolados de Bt também pode estar associada às diferentes condições ambientais, por exemplo, regiões com temperaturas entre 13° a 30°C são mais propícias de se encontrar isolados com megaplasmídeos contendo genes *cry*.

A análise dos pequenos plasmídeos pode ser feita através de procedimentos de extração, e já pode-se observar métodos bem sucedidos. Porém, devido aos megaplasmídeos terem baixo número de cópias e serem fáceis de degradar, ainda existem dificuldades para o seu isolamento comparado aos pequenos plasmídeos. Desta forma, estes plasmídeos foram ignorados em comparações de perfis plasmidiais em diversos estudos (REYES-RAMÍREZ & IBARRA, 2008).

Os protocolos tradicionais de extração baseiam-se em reagentes que promovem a lise alcalina e a separação por gradiente de densidade utilizando cloreto de cézio e brometo de etídeo (CURRIER & NESTER, 1976), entretanto, podem ser trabalhosos, por isso novos protocolos surgem, incluindo os que utilizam kits comerciais de forma a trazerem vantagens para as análises (HERINGA et al., 2007) que são permitidas pela visualização por eletroforese em gel de agarose, através da observação das bandas pela migração diferencial dessas moléculas (REYES-RAMIREZ & IBARRA, 2008; FAGUNDES et al., 2011).

2.6 Caracterização Molecular

A caracterização genética de isolados de *Bacillus thuringiensis* tem sido realizada por diversos pesquisadores no mundo todo, como exemplo, os trabalhos publicados de Alejandra Bravo e colaboradores no México (BRAVO et al., 1998), Hongxia Liang e colaboradores na China (LIANG et al., 2011), Ali Seifinejad e colaboradores no Iran (SEIFINEJAD et al., 2008), Talaat El-kersh e colaboradores na Arábia Saudita (EL-KERSH et al., 2016), Anon e Tipvadee na Tailândia (THAMMASITTIRON & ATTATHOM, 2008) e de Valicente e colaboradores no Brasil (VALICENTE et al., 2010). Estes estudos contribuem para troca de informações quanto a frequências gênicas, podendo refletir na prevalência e na distribuição de genes *cry* entre diferentes coleções e ecossistemas.

A caracterização molecular é possível devido aos avanços nas técnicas de Biologia Molecular que utilizam métodos baseados principalmente no DNA, de forma a diferenciar cepas Bt e determinar a presença/ausência de determinados genes *cry* (POLANCZYK, 2004). A caracterização desses genes é importante também para diferenciar a especificidade das toxinas contra determinadas ordens de insetos (SCHÜNEMANN, KNAAK & FIUZZA, 2014).

Para esse rastreio, são muito utilizadas as reações de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) descrita por Kary Banks Mullis em 1983, para amplificação e clonagem dos genes a serem identificados no DNA das cepas, podendo-se utilizar *primers cry*-específicos (JUAREZ-PEREZ et al., 1997; BEN-DOV et al., 1997; BRAVO et al., 1998; VALICENTE et al., 2010; MARTINS et al., 2004; ZORZETTI et al., 2016) ou *primers* universais para descoberta de novos genes. Apesar da grande diversidade de genes descritos até o momento, o número de proteínas ativas para o controle de uma espécie-alvo ainda é limitado, motivando a busca por novas toxinas (HERRERO et al., 2002).

A Embrapa Milho e Sorgo possui um banco de microrganismos contendo atualmente mais de 4.000 cepas de *Bacillus thuringiensis* catalogadas, que foram isoladas de diferentes regiões geográficas do Brasil (VALICENTE & BARRETO, 2003). Desta forma, muitos estudos são realizados para verificação do potencial tóxico e a caracterização dos isolados provenientes dessa coleção utilizando diferentes ferramentas moleculares, como no estudo de

Silva (2009) ao avaliar 49 cepas quanto ao perfil plasmidial e a diversidade genética entre elas utilizando sequências repetitivas ERIC e REP.

Costa (2011), também caracterizou molecularmente 500 cepas de Bt provenientes deste banco, através de PCR para confirmação de genes *cyt1* e *cyt2* e bioensaios com a espécie *Spodoptera frugiperda* para avaliação da toxicidade de proteínas Cry e Cyt purificadas. Pinheiro (2013) caracterizou 32 cepas de Bt já consideradas eficientes a *Spodoptera frugiperda* quanto à capacidade de sintetizarem β -exotoxinas, outra análise importante para detecção de metabólitos indesejáveis para produção de biopesticidas.

Valicente & Lana (2008) utilizaram diversas ferramentas moleculares para caracterizar duas cepas de *Bacillus thuringiensis* eficientes no controle de *Spodoptera frugiperda*. Realizaram bioensaios seletivos e avaliação do CL₅₀(Concentração Letal para matar 50% da população), PCR para detecção de genes *cry1*, ampliações por ERIC-PCR, análises de perfis plasmidiais e das proteínas produzidas por SDS-PAGE. Todos esses conjuntos de estratégias permitem avaliar e diferenciar cepas, além de serem ferramentas importantes para questões de propriedade intelectual.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados de *Bacillus thuringiensis*

Para realização desse trabalho foram utilizadas 50 cepas de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. As cepas foram isoladas anteriormente através de amostras de solo e de lagartas mortas de diversas regiões do Brasil (VALICENTE & BARRETO, 2003) (Tabela 1). Os isolados foram escolhidos de forma aleatória e, posteriormente, verificados quanto à presença do complexo esporo-cristal por microscopia de contraste de fase (MCF) em objetiva de 100x.

Tabela 1- Isolados de *Bacillus thuringiensis* selecionados do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

N ^o amostra	N ^o cepa	Origem Amostra
3	355	Pindobaçu, BA
4	356 C	Juazeiro, BA
24	359	Missão Velha, BA
28	373	Santa Maria da Boa Vista, PR
46	423	Maçaroca, BA
47	356	Juazeiro, BA
48	344	Foz do Iguaçu, PR
79	356 B	Juazeiro, BA
80	364 E	Jaguari, BA
137	328	Carrapichel, BA
205	461A	-
230	348 L	Foz do Iguaçu, PR
485	733 D	Maracaí, SP
490	735 A	Água Clara, MS
510	748 A	Maracaí, SP
529	702A	Campo Grande, MS

(Continua)

531	726	Pereira Barreto, SP
534	721G	Pereira Barreto, SP
540	680B	Forcal, SP
547	773	Anhanduí, MS
563	775 B	Gurolândia, SP
565	775 D	Gurolândia, SP
566	775 E	Gurolândia, SP
567	775 F	Gurolândia, SP
569	775 H	Gurolândia, SP
573	775 M	Gurolândia, SP
574	776 A	Campo Grande, MS
577	780 B	Nova Alvorada, MS
865	842C	Nova Alvorada, MS
2391	1243 H	Sta Helena, GO
2398	1257 M	Rio Verde, GO
2411	1275	Jataí, GO
2511	1277 A	Jataí, GO
2530	1288A	Rio Verde, GO
2545	1290B	Rio Verde, GO
2546	1290C	Rio Verde, GO
2548	1290E	Rio Verde, GO
2553	1290L	Rio Verde, GO
2558	1293C	Rio Verde, GO
2560	1293E	Rio Verde, GO
2562	1294C	Rio Verde, GO
2582	1297F	Sta Helena, GO
2626	1297 A	Sta Helena, GO
2651	1301J	Jataí, GO
2655	1302D	Rio Verde, GO
2668	1303E	Sta Helena, GO
2683	1307B	Prudente de Moraes, MG

(Continua)

2693	1279 A1	Jataí, GO
2726	1303 D	Sta Helena, GO
3820	1608A	Sete Lagoas, MG

(Conclusão)

Fonte: Laboratório de controle Biológico (Embrapa Milho e Sorgo) - Dados não publicados

3.2 Bioensaios

3.2.1 Criação e manutenção da população de insetos (Falsa-medideira)

Lagartas coletadas em campo foram transportadas ao Laboratório de Controle Biológico (LCB) da Embrapa Milho e Sorgo, onde foi realizada a multiplicação do material, livre de pressão seletiva a Bt ou inseticidas. Lagartas neonatas foram mantidas em dieta artificial de Greene et al. (1976) com modificações (Tabela 2), em copos plásticos com capacidade de 50 mL e vedados com tampas de acrílico até a formação de pupas. As pupas foram mantidas em potes plásticos forrados com papel toalha até emergirem os adultos, estes em seguida foram transferidos para gaiolas cilíndricas feitas com PVC revestidas internamente com guardanapos de papel macio, fechados na parte superior com tecido tipo “voil”. A solução para alimentação dos adultos foi constituída de açúcar, ácido ascórbico, glicose de milho e água.

As gaiolas foram mantidas em sala climatizada com temperatura de aproximadamente 25°C. A cada três dias as posturas foram coletadas e transferidas para sacos plásticos que foram incubados em BOD com 25°C e fotofase de 12 horas até a eclosão. Uma parte das lagartas recém-eclodidas foi usada para os bioensaios e o restante foi utilizado para manutenção da criação.

Tabela 2- Dieta artificial usada para alimentação na criação e bioensaios de lagartas falsamedideira.

INGREDIENTES	QUANTIDADE
Feijão (branco)	206,0 g
Ágar Puro	35,0 g
Germe de Trigo	164,0 g
Levedura de Cerveja	25,7 g
Farelo de Soja	103,0 g
Ácido Ascórbico	9,8 g
Ácido Sórbico	5,0 g
NIPAGIN (Metil-parahidroxibenzoato)	11,0 g
Formol (Formaldeído 36,0%)	10 mL
Solução Vitamínica	16 mL
Sol. Inibidora (Ác. Propiônico 41,8%; Ác. Fosfórico 4,2%; Água 54,0%)	5 mL
Água*	2.800,0 mL

* Total de água suficiente para cozinhar o feijão, ferver o ágar e triturar os demais ingredientes da dieta.

Fonte: Laboratório de controle Biológico (Embrapa Milho e Sorgo) - Dados não publicados

3.2.2 Preparo das suspensões de Bt

As suspensões celulares para ensaios de toxicidade e contagem de esporos foram preparadas da seguinte forma: Estriaram-se 10 µl de cada isolado em placas de Petri contendo meio LB em formato xadrez e encubação em estufa por 72 horas a 29°C. Após este período, as células foram raspadas e transferidas para tubos falcon de 15 mL, contendo 10 mL de água deionizada autoclavada sendo submetidas à agitação em vortex.

Em seguida, foi realizado a contagem de esporos presentes nas suspensões utilizando a Câmara de Neubauer por meio de um microscópio óptico de objetiva de 100x, de forma a estimar a concentração de esporos dos isolados no volume concentrado que foi usado para a análise de toxicidade (ALVES & MORAIS, 1998).

3.2.3 Ensaios de toxicidade com *Chrysodeixis includens*

Foram utilizadas lagartas de falsa-medideira neonatas para avaliação da eficiência dos isolados de Bt para seu controle.

Para os bioensaios, os insetos foram criados com dieta artificial modificada de Grene et al. (1976) e mantidos individualmente em placas de 128 células, cada um contendo 1 mL de dieta artificial e aplicado superficialmente 50 µl de suspensão Bt, contendo esporos e cristais (Figura 4). Três repetições com 32 larvas/repetição foram utilizadas e a mortalidade avaliada após três dias de alimentação contínua. Como controle dos ensaios, utilizou-se água deionizada autoclavada e as placas foram acondicionadas a 26 ± 2 °C. Foram consideradas como tóxicos os isolados que atingiram acima de 70% de mortalidade.

Figura 4- Ensaio de toxicidade em placas de 128 células contendo dieta artificial para lagarta falsa-medideira e banhadas superficialmente com cepas de *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Carvalho, 2017.

3.3 Caracterização Molecular

3.4 Extração de DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico foram realizadas com base no método proposto por Shuhaimi et al. (2001) contendo algumas modificações, e os mesmos foram utilizados para todas as reações de PCR deste trabalho.

As cepas foram plaqueadas em meio LB sólido e mantidas à temperatura de 30° C por aproximadamente 16 horas. Com o auxílio de uma alça de platina, toda a massa celular foi raspada e transferida para um microtubo sendo ressuspensa em 1000 µl de solução tampão (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl e 10 mM EDTA, pH 8) e lisozima na concentração de 20 mg/mL. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37° C por 30 minutos e adicionadas 25 µl de SDS 10% e 5 µl de proteinase K (20 mg/ mL), seguido de incubação à 60° C por 1 hora.

Após esse período, 500 µl de clorofórmio/octanol (24:1) foram adicionados, seguido por centrifugação por 2 minutos a 12000 rpm, repetido por duas vezes. Foi realizada a transferência de 300 µl da fase aquosa (superior) para um novo tubo, acrescentou-se o mesmo volume de acetato de potássio 3M e o dobro do volume de isopropanol, verteu-se suavemente e centrifugou-se a 12000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o pellet lavado com 300 µl de etanol 70% e novamente centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. Novamente, houve descarte do sobrenadante e secagem do pellet de forma com que não ficasse resíduo de etanol e, posteriormente, foi ressuspensa em 150 µl de TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM, pH 8,0).

As amostras de DNA genômico de cada cepa foram visualizadas em gel de agarose 1% e quantificadas através do equipamento Nanodrop (ND-1000 V3.1.2 - Spectrophotometer).

3.4.1 Identificação de β -exotoxinas nos isolados

No estudo de identificação da produção de β -exotoxinas foram utilizadas as cepas consideradas eficientes para lagarta falsa-medideira com mortalidade superior a 70%.

Para o cultivo, inicialmente foi realizado um pré-inóculo com 10 μ l das cepas de Bt em meio LB + sais conforme Valicente & Mourão (2008) e cultivados a 28°C a 200 rpm por 16 horas. Em seguida, foi realizada a contagem de células com microscópio de contraste de fases e uso da câmara de Neubauer. Uma alíquota do pré-inóculo foi acrescentada em 50 mL de meio LB + sais de forma que a concentração inicial fosse de 1×10^6 células/mL e cultivada por 144 horas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi aquecido a 121°C durante 20 minutos. Em seguida, realizou-se a filtração utilizando filtros marca TTP de poros contendo 22 μ m, e armazenamento a -20°C até o uso.

Nos bioensaios foram aplicados 165 μ l do sobrenadante das culturas bacterianas em fragmentos de dieta artificial com aproximadamente 1cm³ colocados em copos plásticos. Foram realizadas três repetições e para cada uma utilizaram-se 24 lagartas de *Spodoptera frugiperda* (espécie padrão para esses ensaios) com até dois dias de idade e acondicionadas individualmente em sala aclimatizada a 26°C. Estes processos foram realizados igualmente para a testemunha substituindo apenas o sobrenadante por água autoclavada e para o controle positivo foi utilizado a cepa HD125 que é capaz de produzir β -exotoxina.

A avaliação da mortalidade e a pesagem das lagartas foram realizadas com 8 dias após a montagem, e foram considerados como tóxicos quando a mortalidade foi de 50% ou quando houve inibição de crescimento.

Após os bioensaios para avaliar a produção de β -exotoxinas, foi realizado a detecção por PCR utilizando os *primers* BEF/BER e BEF1/BER1 para detectar a presença de gene *thuE* que está fortemente associado à síntese de β -exotoxina tipo I descrito por Sauka et al. (2014) (Tabela 3).

Tabela 3- Características dos *primers* pra identificação de gene *thuE* (SAUKA et al, 2014).

<i>Primers</i> (5'- 3')	Tamanho do fragmento (pb)
BEF (forward): GCGGCAGCCGTTTATTCAAA BER (reverse):CCCCTTCCCATGGAGAAACA	406
BEF1(forward): AGTAAAAGGCCCATTTGGAA BER1 (reverse): TTCCATGAATTTGCCGATTT	385

Fonte: SAUKA et al. (2014).

As reações foram constituídas de solução tampão 1X, 2 mM de MgCl₂, 5 mM de DNTPs, 0,5 mM de cada *primer*, 2 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems), com volume final de 25 µl para cada. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler com as condições de programação de acordo com os autores. Ao final das reações, foi realizada a eletroforese com 10 µl do produto e análise em gel de agarose a 1,2 % e o padrão de bandas foi comparado através do marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen).

3.4.2 *Primers cry-específicos*

Nas reações de amplificação foram utilizados *primers* específicos para amplificar genes de classes *cry1*, *cry2* e *cry9*, que estão relacionadas à toxicidade para insetos Lepidópteros. Os isolados selecionados para isso foram todos os que atingiram valores de mortalidade acima de 70% para falsa-medideira, além de quatro isolados com mortalidade entre 27-33% e dois isolados de mortalidade entre 4-6%.

Cada reação constituiu de solução tampão 1X, 2mM de MgCl₂, 5mM de DNTPs, 0,5 mM de cada *primer* (forward e reverse), 2 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems), 10 ng de DNA, num volume final de 10 µl. As sequências dos *primers* utilizados são indicadas segundo a tabela abaixo (Tabela 4):

Tabela 4- Sequências e características dos *primers-cry* utilizados.

Sequência 5'-3'	Genes	Ta (°C) Primer	Fragmento (pb)	Referencial
CGCCACAGGACCTCTTAT TGCACAACCACCTGACCCA	<i>cry1Ab</i>	55	232	Valicente et al.,(2010)
AATTTGCCATCCGTCGTA TTGTGGTAGAAGCGTAGCGA	<i>cry1Ab</i>	55	418	Valicente et al.,(2010)
GTTAGATTA AATAGTAGTGG TG TAGCTGGTACTGTATTG	<i>cry1Ac</i>	53	180	Ceron et al.,(1994)
CTTCATCACGATTGGAGTAA CATAATTTGGTCGTTCTGTT	<i>cry1B</i>	55	367	Ceron et al.,(1994)
AAAGATCTGGAACACCTTT CAA ACTCTAAATCCTTTCAC	<i>cry1C</i>	58	130	Ceron et al.,(1994)
CTGCAGCAAGCTATCCAA ATTTGAATTGTCAAGGCCTG	<i>cry1D</i>	55	290	Ceron et al.,(1994)
GGAACCAAGACGAACTATTGC GGTTGAATGAACCCTACTCCC	<i>cry1Ea/cry1Eb</i>	56	147	Ceron et al.,(1995)
TAATAGGGCGGAATTTGGAG AAGCCCCAGTACATAATGAG	<i>cry1Fa1/cry1Fb</i>	55	283	Valicente et al.,(2010)
TGCGAATGAATTATGGGTC CACAAAGTGTAACCAATTTTAC	<i>cry1Fb1</i>	55	377	Valicente et al.,(2010)
ATATGGAGTGAATAGGGCG TGAACGGCGATTACATGC	<i>cry1G</i>	55	235	Ceron et al.,(1995)
GGGGCGACTAATCTCAATCA AGGTGTTCCCGAAGGACTTT	<i>cry2Aa</i>	53	318	Fagundes*
TGTTAAATGGATTTAGTGGTGCT CAAATGGCGTTAACAATGG	<i>cry2Ab</i>	53	201	Fagundes*
ACAGCAGTCGCTAGCCTTGT CAAATTGTGGATTGCCGTTA	<i>cry2Ac</i>	55	475	Fagundes*

(Continua)

ACGATATCGCCACCTTTGTC AGGTGTTCTCTGAAGGGCTTT	<i>cry2Ad</i>	53	282	Fagundes*
TTATCGGGTGAATCTCTAGAACG TGTTAAAGTCCCCGTTTTGC	<i>cry9</i>	53	343	Fagundes*
CATAATAGGCGATGCAGCAA CTAACGAGCCACCATTCTGTT	<i>cry9Aa</i>	53	395	Fagundes*
GTTGATACCCGAGGCACA CCGCTTCCAATAACATCTTTT	<i>cry9A</i>	60	571	Valicente*
TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC CCGCTTCCAATAACATCTTTT	<i>cry9B</i>	60	402	Valicente*
AATAGACCAAATGGCGCAAG AATCCATTGCCGTCAAAGTC	<i>cry9D</i>	60	382	Fagundes*

(Conclusão)

**Primers* do Laboratório de Controle Biológico (LCB) da Embrapa Milho e Sorgo, dados não publicados.

Fonte: Carvalho, 2017.

As ampliações foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler, com as seguintes condições: Desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento com temperatura dos *primers* de acordo com a tabela acima por um minuto, extensão a 72°C por um minuto, e após 35 ciclos as amostras foram submetidas a uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

As mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, e foi utilizado o marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen) no gel para realizar a comparação de bandas. Após a corrida os géis foram fotodocumentados no LPix Loccus Biotecnologia Molecular Imaging.

3.4.3 Sequenciamento

Após as reações de PCR utilizando os *primers* específicos para amplificar genes da família *cry2* e *cry9*, pertencentes do LCB da Embrapa Milho e Sorgo, o produto das ampliações foram sequenciados para confirmação dos genes. Os produtos foram purificados adicionando enzima EXO/SAP (ExoProStar) e incubados a 37°C por 30 minutos, em seguida foi realizado a inativação por aquecimento a 80°C por 15 minutos.

Após a etapa de purificação, foram realizadas as reações de sequenciamento utilizando-se dNTP's BigDye® num volume total de reação de 10 µl e submetidas às seguintes condições no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler: 96° por um minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 96°C por 20 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, e extensão a 60°C por quatro minutos.

O produto obtido a partir da reação de sequenciamento foi submetido à etapa de precipitação. Este procedimento baseou-se na purificação por meio da adição de etanol/EDTA. Ao final de tal procedimento, foram adicionados formamida (HiDi) nas amostras e encaminhadas ao termociclador para desnaturação a 95°C por dois minutos. Após esta etapa, as amostras foram encaminhadas para o sequenciador automático 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem). As sequências foram tratadas utilizando o programa CodonCode Aligner (versão trial) e analisadas pelo programa BLAST disponível no endereço eletrônico do NCBI < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>.

3.4.4 Extração e análise de perfil plasmidial

As cepas de mortalidade acima de 70% para a lagarta falsa-medideira foram submetidas a dois métodos de extração plasmidial.

1) Método I:

O primeiro método de extração foi de acordo com Fagundes et al. (2011) com algumas modificações. Foram inoculados 10 µl das cepas em 50 mL de meio de cultura SB (Spizizen broth) contendo: 0,2% NH₄SO₄; 1,4% K₂HPO₄; 0,6% KH₂PO₄; 0,1% Citrato de Sódio; 0,02%

MgSO₄.7H₂O, suplementado com 0,5% glicose, 0,1% Ácido Casamino e 0,01% extrato de levedura.

As amostras foram colocadas sob agitação de 250 rpm em temperatura de 28 °C durante aproximadamente 16 horas. Após o crescimento, foi avaliada a densidade óptica (OD) de cada amostra a 600 nm. Posteriormente, foram centrifugadas a 4°C por 20 minutos a 10.000 rpm, e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi ressuscitado em 20 mL de tampão TES (30mM Tris base; 5mM EDTA; 50 mM NaCl; pH 8,0) seguindo de centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 2 mL de tampão de lise (tampão TES, 20% sacarose, 2 mg/mL liozima e 1 µl/mL de RNase na concentração de 10 mg/mL) e, incubado em banho-maria a 37 °C por 90 minutos. Após o banho-maria, foi adicionado em cada amostra 3 mL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e as amostras incubadas a 65°C por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de acetato de sódio 3M (pH 4,8) e estas foram incubadas à -20°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 25 minutos a 10.000 rpm.

Foram adicionados a esta suspensão 12 mL de etanol absoluto sendo incubado overnight à -20°C, seguido de centrifugação por 20 minutos nas mesmas condições. Os pellets formados foram ressuscitados em 200 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0) e armazenados à -20 °C.

Para determinação dos perfis plasmidiais, foi analisada a integridade e a concentração dos plasmídeos de cada isolado, através da aplicação de 10 µl em gel de agarose 0,5% em cuba horizontal. Foi utilizado o tampão TAE (0,001M EDTA pH 8,0; 0,04M TRIS pH 8,0; 0,02M ácido acético) para a confecção do gel e para a corrida, que durou aproximadamente 4 horas a 80V. Após a eletroforese, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador LPix Loccus Biotecnologia Molecular Imaging.

2) Método II:

O segundo método de extração de plasmídeos foi através do kit comercial “QIAGEN® Plasmid Purification Handbook”. A extração dos plasmídeos foi realizada com as recomendações de acordo com o fabricante contendo algumas modificações.

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo com a coleta de uma pequena porção das cepas crescidas em meio LB + sais sólido a 29°C por 16 horas, e posteriormente transferidas para 5 mL de meio LB + sais, o qual foi submetido a agitação por 250 rpm a 37°C durante 8 horas. Uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi acrescentada a 500 mL de meio LB + sais e cultivados a 37°C sob agitação de 250 rpm durante 16 horas.

Posteriormente coletaram-se as células bacterianas por centrifugação a 8500 rpm por 15 minutos a 4°C e, o pellet bacteriano foi ressuscitado com 10 mL de Tampão I. Em seguida, foram adicionados 10 mL de tampão II, verteu-se de 4-6 vezes e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Após esse tempo, 10 mL do tampão III foram adicionados e, verteu-se imediatamente durante 4-6 vezes, e posteriormente as amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 40 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e centrifugou-se novamente a 5000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para as colunas filtrantes com resinas e a coleta do material passada por fluxo de gravidade.

O material foi eluído em 15 mL de tampão QF e precipitado adicionando 10,5 mL de isopropanol seguindo de centrifugação a 10.000 rpm por 40 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 5 mL de etanol 70% seguido de centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos. O pellet foi secado por 15 minutos e o DNA ressuscitado em 200µl de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0).

Para determinação dos perfis plasmidiais foi analisada a integridade e a concentração dos plasmídeos de cada isolado, aplicados de 10 µl em gel de agarose 0,8% em cuba horizontal. Foi utilizado o tampão TAE (0,001M EDTA pH 8,0; 0,04M TRIS pH 8,0; 0,02M ácido acético) para a confecção do gel e para a corrida, que durou aproximadamente 3 horas a 80V. Após a eletroforese, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador LPix Looccus Biotecnologia Molecular Imaging.

3.4.5 Extração, ativação e análise de proteínas

Para análise de proteínas produzidas pelas cepas de Bt foi utilizado o método segundo Valicente & Lana (2008), com algumas modificações. As cepas selecionadas para esse estudo foram as que obtiveram mortalidade acima de 70% para lagartas de falsa-medideira.

As cepas foram crescidas em 50 ml de meio LB por 4 dias, sob agitação de 245 rpm a 30°C. A suspensão celular foi centrifugada por 13 minutos a 10.000 rpm e o precipitado ressuspenso em solução de Triton (0,01%), utilizando 10 ml por lavagem, repetindo esse processo por três vezes. Na última lavagem foram adicionados 5 mL de solução contendo Triton (0,01%), 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e NaCl 10 mM. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 7 minutos e, o pellet, ressuspenso em 5 mL de tampão de bicarbonato de sódio 50 mM, pH 10,5 contendo 10mM de β -mercaptoetanol e incubação por 3 horas a 37°C sob agitação constante de 180 rpm. Posteriormente, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 13 minutos. Uma amostra de 100 μ l do sobrenadante foi retirada e armazenada a -20°C.

Em seguida, a proteína solúvel foi quantificada através de Spectrofotômetro UV-mini-1240 (SHIMADZU) pelo método de Bradford e foi realizada a análise comparativa pela curva padrão (BRADFORD, 1976). Uma parte do sobrenadante (proteínas) foi tratada com enzima tripsina (200 μ g/mL) e incubada a 37°C por 2 horas em banho-maria. A reação foi inativada com PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) 1mM diluído em isopropanol.

A eletroforese em gel de corrida de SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) foi realizada para observar a integridade e a massa molecular tanto das proteínas totais solubilizadas (sem tratamento com proteases) quanto da toxina (proteínas ativadas com proteases). A coloração foi através de Coomassie Brilliant blue G250, e a massa das proteínas foi determinada por comparação com o marcador SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen).

3.5 Bioensaios com lagartas do gênero *Spodoptera*

A fim de observar a eficiência dos isolados de Bt que tiveram mortalidade acima de 70% para lagarta falsa-medideira em outras espécies de lagartas, foram realizados ensaios de toxicidade utilizando lagartas neonatas das espécies *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera frugiperda*. Os bioensaios foram conduzidos seguindo os mesmos procedimentos utilizados anteriormente para as lagartas de falsa-medideira.

3.6 Análises estatísticas dos dados

Os delineamentos experimentais foram inteiramente casualizados (DIC) e os resultados de mortalidade e peso das lagartas foram analisados utilizando o *software* estatístico *Assistat* 7.7 (SILVA & AZEVEDO, 2016). Visto que os dados podem não demonstrar distribuições conforme o modelo normal, foi necessário realizar a transformação dos mesmos utilizando o método de Box-Cox (BOX; COX, 1964) de forma a contornar eventuais pressupostos de normalidade na análise de variância (ANOVA). As médias dos tratamentos de detecção de β -exotoxinas foram classificadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, e os resultados dos ensaios de toxicidade com *Chrysodeixis includens* e com lagartas do gênero *Spodoptera*, tiveram as médias dos tratamentos classificadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolados de *Bacillus thuringiensis*

Através das observações por microscopia de contraste de fase, não foi detectada a presença de contaminações por outros microrganismos em todas as 50 cepas selecionadas, garantindo desta forma que apenas cepas de Bt estavam presentes nos experimentos. Além disso, foi possível verificar os tipos morfológicos dos corpos de inclusões paraesporais (CIP) como bipiramidais, esféricos, retangulares e irregulares produzidos pelas mesmas (Figura 5).

Figura 5- Microscopia de contraste de fase (objetiva 100x) da suspensão de *Bacillus thuringiensis* (cepa 566) contendo esporos e cristais proteicos.



CB= Cristais bipiramidais; EP= Esporos.Fonte: Carvalho, 2017.

4.2 Ensaio de toxicidade com *Chrysodeixis includens*

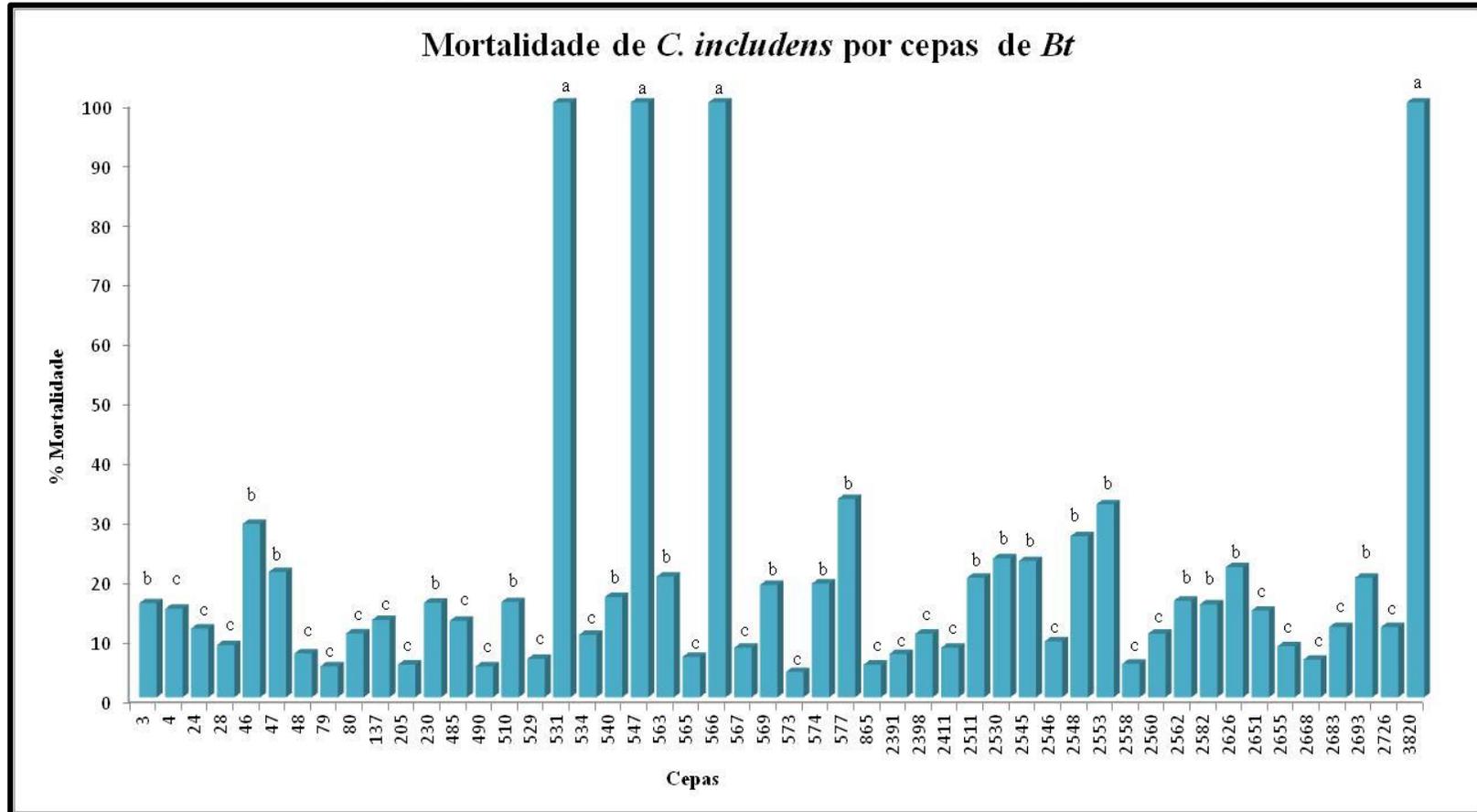
Os bioensaios seletivos realizados no presente trabalho utilizaram cepas de *Bacillus thuringiensis* nas concentrações de 10^9 / mL e, evidenciaram isolados potencialmente tóxicos contra lagarta falsa-medideira. Foram observados os sintomas nas lagartas como perda de mobilidade, perda do brilho e tonalidade cor marrom-escuro nos tegumentos e flacidez, devido à infecção generalizada provocada pelas toxinas do entomopatógeno (MONNERAT, BRAVO & MELO, 2000). Os valores de mortalidade das larvas variaram entre 4% e 100% permitindo observar diferenças significativas para as atividades tóxicas entre os isolados. As porcentagens de mortalidade obtidas por cada isolado testado são mostradas no gráfico a seguir (Gráfico 1).

Os isolados de número 531, 547, 566 e 3820 não diferiram entre si e demonstraram potenciais patogênicos para lagartas de primeiro ínstar dessa espécie ao atingirem os maiores valores de mortalidade (100%), sendo selecionados para as análises moleculares. O restante dos isolados testados tiveram valores de mortalidade considerados baixos, menores que 33 %.

Os isolados considerados eficientes representam apenas 8% do total de cepas analisadas, e essa frequência já foi relatada em outros estudos de cepas de Bt com outras espécies de insetos, como por exemplo, de Silva (2011) que ao selecionar cepas de Bt contra *Aedes aegypti* obteve 8,8 % de isolados eficientes e da Silva et al. (2002) que obteve 9 % de frequência de isolados tóxicos para a espécie *Spodoptera frugiperda*.

Não são disponíveis na literatura muitos trabalhos verificando a frequência de toxicidade de isolados Bt contra falsa-medideira, entretanto, Barreto (2012) ao testar 13 isolados, detectou que todos eles apresentaram ação entomocida apresentando assim 100 % de frequência em seu estudo e Isakova et al. (2007) ao analisar 13 cepas de Bt constatou que 3 delas apresentaram potencial tóxico para essa espécie, obtendo assim frequência de 23%.

Gráfico 1- Mortalidade de lagartas de falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) alimentadas de dieta artificial contendo suspensão de cepas de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.



Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Carvalho, 2017.

O Bt possui ampla ocorrência em praticamente todos os ambientes terrestres, tornando-se importante notar quais as localidades são propícias na identificação de isolados que possuem toxicidade a alguma espécie-praga. O solo é um importante ambiente de sobrevivência de esporos do Bt e, em conjunto com fatores ambientais favoráveis, são responsáveis pela sua distribuição e multiplicação (MARTIN & TRAVERS, 1989; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Nesse estudo a maioria das cepas selecionadas foi coletada de solos e alguns de lagartas mortas, provenientes das regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-oeste do Brasil. Foi observado que das quatro cepas que foram consideradas eficientes, três delas foram isoladas da região sudeste do Brasil (531, 566, 3820) e uma da região Centro-Oeste (547).

Já foi verificado anteriormente por Valicente & Barreto (2003) o potencial dessas e de outras regiões brasileiras como fontes de cepas eficientes, assim como Barreto (2012), que também demonstrou que o estado de São Paulo teve muitos isolados eficientes coletados em solo dessa região, sendo dois dos isolados considerados eficientes coletados em cidades de tal estado.

4.3 Identificação de β -exotoxinas nos isolados

Os isolados que obtiveram mortalidade acima de 70% para lagarta falsa-medideira (531, 547, 566 e 3820) foram submetidos à análise de produção de β -exotoxinas através de bioensaios com lagartas de *Spodoptera frugiperda*. A escolha de lagartas de 1º instar dessa espécie baseia-se em estudos de HORNBY & GARDNER (1987) que detectaram valores mais baixos de CL₅₀ dessa toxina para *S. frugiperda* quando comparados a outras espécies de lepidópteros, o que permite maior sensibilidade de detecção.

Não foi detectada nos sobrenadantes de nenhuma das cepas selecionadas a presença de β -exotoxinas. Apenas o controle positivo HD-125(*Bt tolworthi*) apresentou a esperada para *S. frugiperda* mesmo após a autoclavagem do sobrenadante. Os valores de mortalidade e peso médio das lagartas estão representados na tabela 5.

Tabela 5- Valores de médias e desvios-padrão de mortalidade e peso das lagartas de *S. frugiperda* submetidas a bioensaios com sobrenadantes de *B. thuringiensis*.

Tratamentos	Mortalidade %	Peso Médio (mg)
Água	8,33 ± 4,91b	17,35 ± 3,27b
HD-125	29,16 ± 9,30a	0,55 ± 0,24 c
3820	8,33 ± 4,16b	30,45 ± 2,52a
531	13,04 ± 6,31b	27,7 ± 3,04ab
547	8,33 ± 6,36b	32,13 ± 0,99a
566	8,33 ± 10,96b	26,39 ± 6,89ab

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Carvalho, 2017.

Não houve diferenças significativas quanto à mortalidade das lagartas de 1º ínstar quando submetidas aos sobrenadantes de Bt, porém, as maiores diferenças foram observadas através dos pesos das lagartas vivas e na observação de crescimento e desenvolvimento delas após 8 dias de exposição. Lagartas submetidas ao sobrenadante da cepa HD-125 apresentaram médias de pesos 31 vezes menor do que o peso de lagartas submetidas à água, que é o tratamento controle negativo utilizado nesse estudo (Figura 6).

Figura 6- Comparação dos sintomas de inibição de crescimento de lagartas de *S. frugiperda* expostas a β -exotoxinas de Bt após 8 dias.



A= Controle positivo cepa HD-125; B= Água; C= Cepa 547.
Fonte: Carvalho, 2017.

Além de mortalidade, a inibição do desenvolvimento larval é o sintoma mais observado promovido pelas β -exotoxinas, pelo fato destas toxinas não causarem o interrompimento alimentar em muitas espécies de insetos (ZHANG & WANG, 1999), esses aspectos foram confirmados nesse trabalho com a cepa controle HD-125, que diferiu dos demais tratamentos.

A exposição de insetos às altas concentrações de β -exotoxinas produzidas por Bt também está associada à incidência de pupas deformadas (TOLEDO et al., 1999), à redução de fecundidade e de alimentação de insetos adultos devido a deformidades morfológicas (ROYALTY et al., 1990). Estudos bioquímicos e patológicos realizados para avaliar seus efeitos em mamíferos, mostram que essa toxina provoca toxicidade pulmonar em ratos. Estes animais apresentam histologia pulmonar anormal, inflamações nos bronquíolos e alvéolos, além de necrose celular brônquica (TSAI et al., 2003), reforçando assim, os aspectos perigosos relacionados à sua exposição.

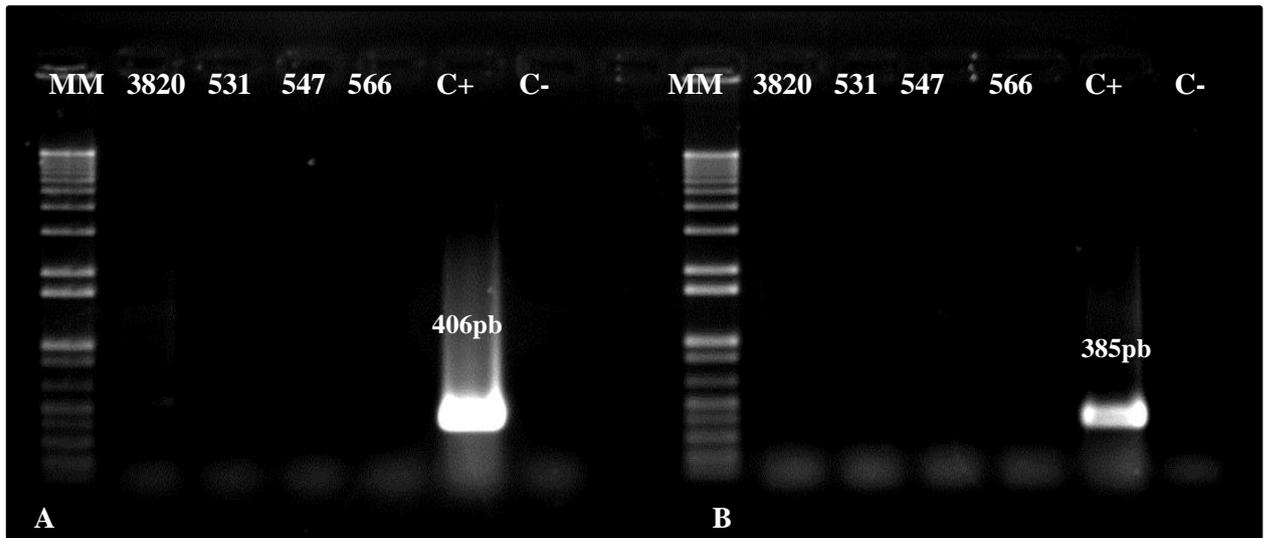
As β -exotoxinas são excretadas pelas células do *Bacillus thuringiensis* e já foi constatado a sua ação para larvas de diversas ordens de insetos como Lepidópteros, Dípteros, Coleópteros, Hymenópteros e Nematóides, porém, esta toxicidade é inespecífica podendo afetar também aos vertebrados, o que tornou a sua presença em produtos comercializados

proibida (LAM & LEBSTER, 1972; VANDENBERG & SHIMANUKI, 1986; TOLEDO et al., 1999; TAMEZ-GUERRA et al., 2004). Dessa forma, ao se descobrir cepas tóxicas para alguma espécie-praga torna-se essencial a detecção dessas toxinas, como forma de completar as suas caracterizações e garantir o seu potencial para o uso na agricultura.

Os bioensaios são métodos importantes e de procedimentos simples na detecção qualitativa de β -exotoxinas, devido a demonstrar níveis de toxicidade para determinar produção de β -exotoxinas do tipo I e também para o tipo II, além disso, podem ser utilizados outros métodos complementares existentes para estudos mais aprofundados, como o HPLC e espectrofotometria (HERNÁNDEZ et al., 2001). Os resultados destas técnicas indicam que esses protocolos fornecem informações úteis e necessárias para a avaliação da / patogenicidade de substâncias produzidas por microrganismos.

Como forma de complementar e confirmar os resultados de bioensaios, os DNA's das cepas foram submetidos à PCR utilizando *primers*-específicos para identificação do gene *thuE* que está fortemente associado à síntese de β -exotoxina do tipo I. Os *primers* BEF/BER e BEF1/BER1 aqui utilizados não produziram ampliações em nenhuma das cepas selecionadas, confirmando que elas não são produtoras dessas toxinas. Já o controle positivo HD-125 confirmou a amplificação das bandas esperadas (Figura 7).

Figura 7- Fragmentos de DNA amplificados pelos *primers* BEF/BER e BEF1/BER1 para detecção de β -exotoxinas do tipo I em cepas de Bt eficientes para lagartas de falsa-medideira.



Cepas = 3820, 531,547,566; C+ = HD-125; MM= 1kb plus (Invitrogen). A= BEF/BER, B= BEF1/BER1.

Fonte: Carvalho, 2017.

4.4 Detecção de genes *cry*

Nas análises de PCR usando *primers cry*-específicos para as classes de genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, foram utilizados os DNA's de 10 cepas escolhidas quanto à mortalidade para lagartas de falsa-medideira a fim de comparar a presença de genes *cry*: As cepas 3820, 547, 531, 566 com mortalidade de 100%, as cepas 2553, 46, 577 e 2548 com mortalidade de 27 a 33% e as cepas 2558 e 573 com mortalidade entre 4 e 5 %.

O sequenciamento dos produtos produzidos pelos *primers*-específicos para os genes de classes *cry2* e *cry9* pertencentes ao Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo foram confirmados. Algumas fotodocumentações de eletroforeses com *primers cry*-específicos podem ser conferidas a seguir (Figura 7), e os resultados de presença/ ausência de ampliações estão disponíveis na tabela 6.

Foi possível obter os produtos de PCR com os fragmentos de tamanhos esperados em quase todas as reações, com exceção para os *primers*-específicos aos genes *cry1Ea/cry1Eb* que não produziram ampliações, demonstrando não ser o responsável pela toxicidade das cepas contra a espécie *C. includens*. Van Frankenhuyzen (2009) já havia relatado que estas

proteínas puras não causaram uma mortalidade eficiente para essa espécie através de bioensaios.

Tabela 6- Caracterização do perfil genético de isolados de *Bacillus thuringiensis* pertencentes ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.

Primers	Cepas									
	3820	547	531	566	2553	46	577	2548	2558	573
<i>cry1Ab</i> (1)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>cry1Ab</i>	x				x	x	x	x	x	
<i>cry1Ac</i>				x						
<i>cry1B</i>				x						
<i>cry1C</i>		x	x		x	x	x	x		x
<i>cry1D</i>				x						
<i>cry1Ea/cry1Eb</i>										
<i>cry1Fa1/cry1Fb</i>	x									
<i>cry1Fb</i>	x									
<i>cry1G</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>cry2Aa</i>	x		x		x					
<i>cry2Ab</i>	x	x	x	x			x	x		
<i>cry2Ac</i>	x	x	x	x			x			x
<i>cry2Ad</i>	x	x	x	x	x		x		x	x
<i>cry9</i>	x			x						
<i>cry9Aa</i>	x									
<i>cry9A</i>	x									
<i>cry9B</i>	x									

(x) Determina a presença dos genes.

Fonte: Carvalho, 2017.

Todas as cepas estudadas apresentaram genes *cry* em seu genoma, e os amplicons mais frequentes foram os genes *cry1G* presente em todas as cepas com 100% de frequência, *cry1Ab* presente em 9 das 10 cepas correspondendo a 90% de frequência e o *cry2Ad* com 80% de frequência.

Os genes *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1Fa1/cry1Fb*, *cry1Fb*, *cry9Aa*, *cry9A* e *cry9B* foram os menos frequentes, correspondendo a apenas 10% cada. Estes resultados diferem de outros estudos, como de Valicente et al. (2010), ao determinar que os genes *cry1D*, *cry1B* e *cry1E* tiveram maior presença em seu estudo. Bravo et al.(1998), também obteve abundância

do gene *cry1D* e De Macedo et al. (2013) encontraram menor frequência do gene *cry1G* nas cepas estudadas. A variação de frequência dos genes apresentados pode ocorrer devido a fatores ambientais, como os diferentes locais e substratos de coleta das cepas, contribuindo como fatores de variação da distribuição de genes *cry*.

Contudo, a abundante frequência do gene *cry1G* aqui apresentado nas cepas também foi já foi observada por Thammasittirong & Attathom (2008) assim como do gene *cry1Ab*, que também já foi confirmada em outros estudos como de Faretto et al. (2007) com presença em 69% dos 115 isolados estudados, e outros estudos que detectaram inclusive a presença em 100% dos isolados estudados, como relatado por Alper et al. (2014) e Dos Santos et al. (2009). Além disso, esse gene já possui relação de toxicidade confirmada para *C. includens* (VAN FRANKENHUYZEN, 2009).

As proteínas pertencentes às famílias Cry1, Cry2 e Cry9 são conhecidas pela toxicidade em insetos lepidópteros, obteve-se nesse trabalho maior frequência de genes *cry2* (57,5%) e *cry1* (37%) nas cepas estudadas, mesmo estas apresentando alta e baixa mortalidade para falsa-medideira. Thammasittirong & Attathom (2008) estudando 134 cepas coletadas na Tailândia também encontraram maior frequência dessas famílias de genes nas mesmas, de forma com que a família de genes *cry1* esteve frequente em 81,3% e *cry2* em 80,6%, utilizando PCR com *primers* específicos para esse conjunto de genes.

Já em relação aos genes *cry9* obteve-se uma baixa ocorrência (12%) nas cepas, o que se assemelha ao trabalho de Bravo et al. (1998) que também obtiveram baixa ocorrência de apenas 2,6% de frequência para esse grupo de genes em seus 496 isolados estudados. A baixa ocorrência de genes de classe *cry9* em *B. thuringiensis* coletados de diversas regiões já foi confirmada em outros estudos, como de Medeiros et al. (2005) em que nenhuma de suas cepas estudadas tiveram amplificações para esses genes e Thammasittirong & Attathom (2008) que verificaram que esses genes foram o de menor frequência nas 134 cepas estudadas com 37,3% de frequência.

Apesar da maioria dos trabalhos apresentarem a baixa frequência dos genes *cry9*, contraditoriamente no estudo de Pinto & Fiuza (2003) essa classe de gene apresentou a maior frequência em 42,82% dos isolados do Rio Grande do Sul, superando os *cry1* e *cry2*. Segundo estes autores as diferenças de frequência existentes entre os estudos podem estar associadas a

fatores abióticos como características físico-químicas do solo que foram coletadas as cepas de Bt.

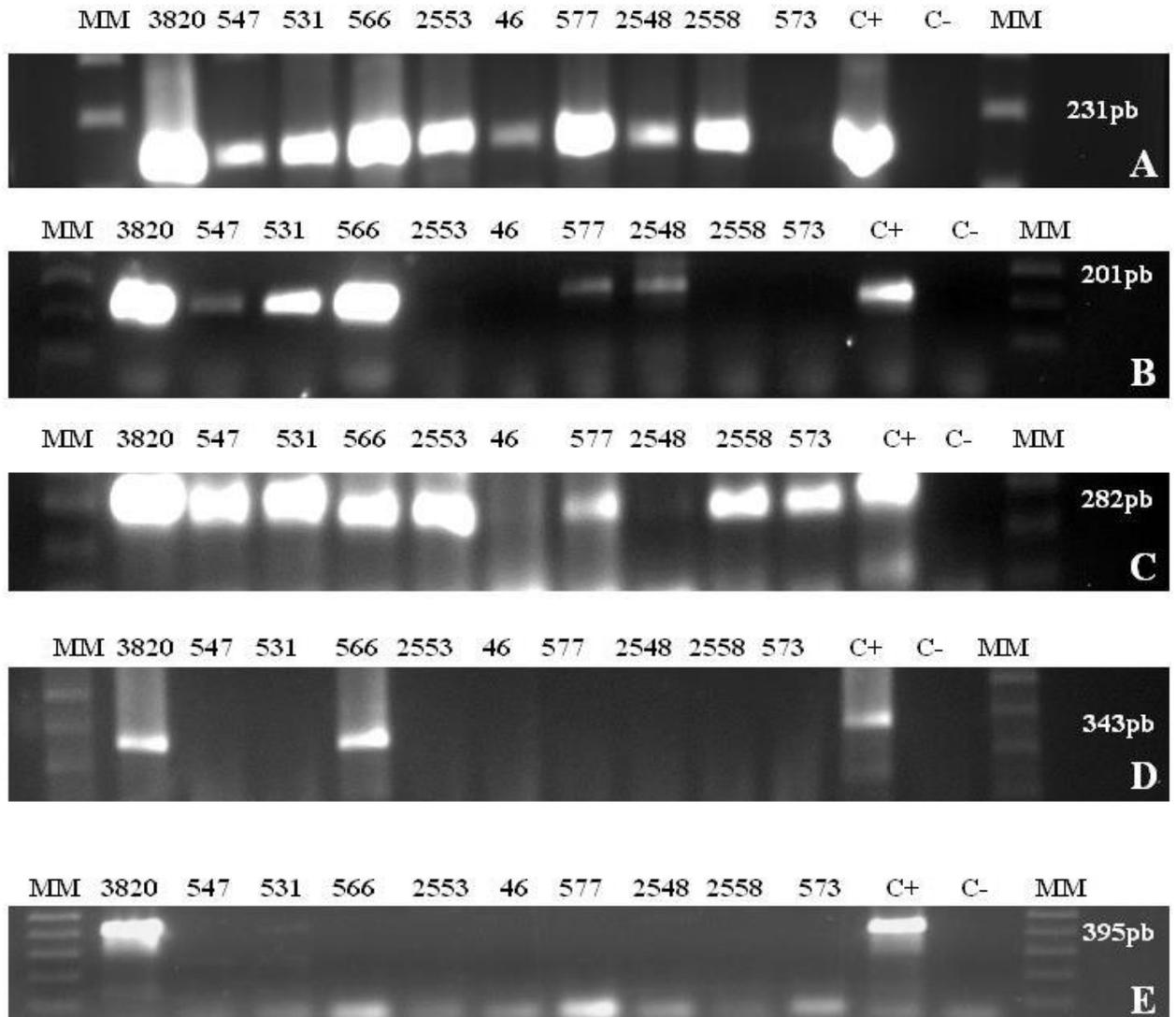
A alta toxicidade de cepas de *B. thuringiensis* parece derivar dos atributos combinados de diferentes proteínas Cry que formam os corpos de inclusão característicos (THAMMASITTIRONG & ATTATHOM, 2008). É importante observar que os isolados que obtiveram mortalidade de 100% para falsa-medideira tiveram a presença de muitos tipos de genes *cry* (acima de seis), e em comum, apresentaram os genes *cry1Ab*, *cry1G*, *cry2Ab*, *cry2Ac* e *cry2Ad*, porém não foi possível correlacionar a presença/ausência de genes *cry* específicos com a mortalidade das cepas à espécie *C. includens*, devido a presença dos genes ocorrerem de forma variável entre as cepas selecionadas.

Apesar da maioria das cepas de Bt apresentar diversos genes *cry* com diferentes combinações em seu conteúdo gênico; a presença de um gene específico não pode ser apurada diretamente para sua atividade tóxica, devido à presença dos genes não significar que estão sendo expressos pela bactéria, podendo estar inativos ou em baixas taxas para expressar completamente a atividade tóxica. Porém, a identificação do tipo de gene *cry* presente nas cepas é uma técnica importante para correlacionar a sua ação bioinseticida (CERON, 1994; WANG et al., 2003).

Torna-se importante destacar a cepa 3820 com a presença de 13 genes dos 18 analisados, além de ser a única a apresentar todos os genes de classes *cry9* em seu genoma. Genes *cry9* são ferramentas promissoras para o controle de insetos lepidópteros, como avaliado por Jansens et al. (1997) ao mostrar resultados positivos de milho transgênico expressando a proteína Cry9C no controle eficiente da espécie *Ostrinia nubilalis* e por Pang et al. (2002) ao detectar alta atividade tóxica pela proteína Cry9Ca contra a espécie *Choristoneura fumiferana*. Portanto, a cepa 3820 é bastante promissora para estudos futuros no controle de pragas.

Os resultados aqui obtidos fornecem dados sobre o conteúdo de genes e as suas distribuições em algumas cepas do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo que foram eficientes e outras que também não apresentaram eficiência de mortalidade às lagartas de Falsa-medideira.

Figura 7- Amplificações por PCR utilizando *primers cry*-específicos



A= *cry1Ab* (1); B= *cry2Ab*; C= *cry2Ad*; D= *cry9*; E= *cry9Aa*.

Cepas= 3820, 547, 531, 566, 2553, 46, 577, 2548, 2558, 573; MM= 1 kb plus (Invitrogen)

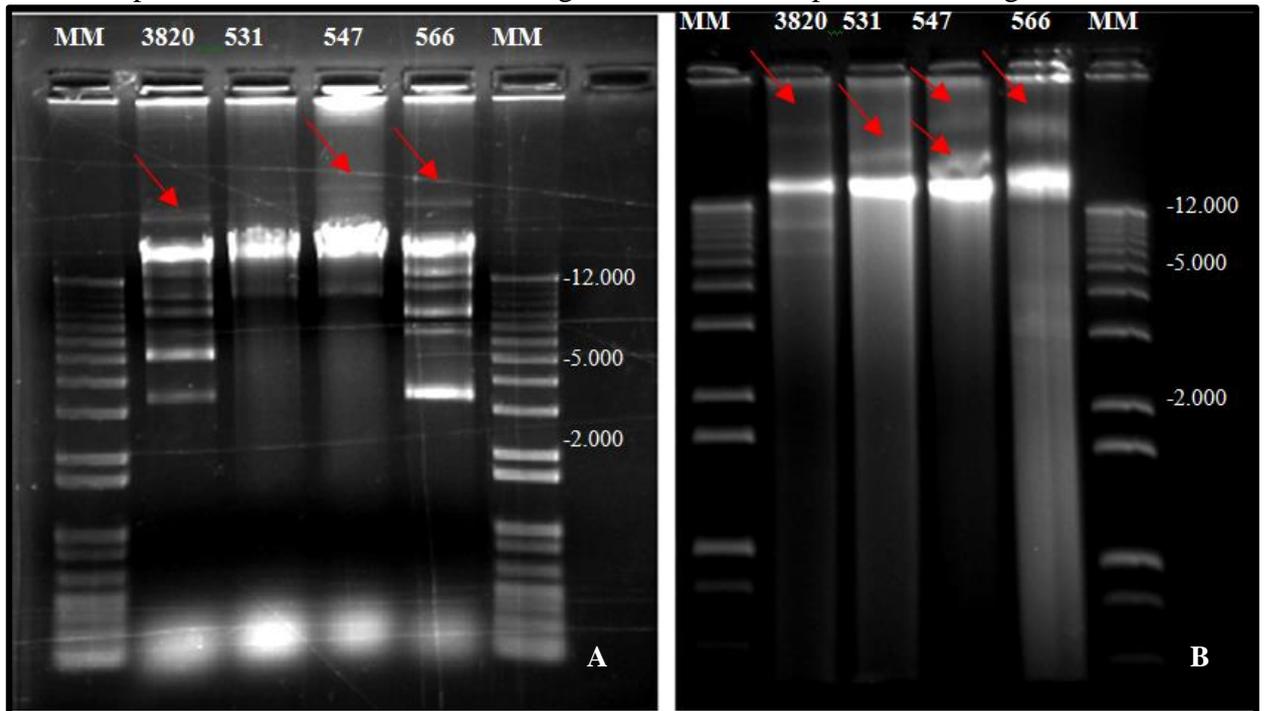
Fonte: Carvalho, 2017.

4.5 Perfis plasmidiais

Devido à importância dos plasmídeos nas células de um hospedeiro e ao seu crescente uso como ferramentas moleculares, principalmente como vetores de clonagem ao comportarem genes de interesse, são realizadas constantemente a otimização de técnicas para extração e purificação de plasmídeos de Bt (GITAHY et al., 2005). Sabe-se que os megaplasmídeos são as moléculas responsáveis por abrigar os genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*, dessa forma Berry et al. (2002) ao analisarem a sequência completa de um megaplasmídeo pBtoxis de *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis detectaram a presença de genes *cry* e *cyt* além de uma sequência *cyt* com um domínio ainda não visto anteriormente, afirmando que os genes abrigados por estes plasmídeos podem estar envolvidos em diversas funções na produção de toxinas, como na promoção da formação dos cristais e no aumento de viabilidade celular.

Os dois métodos de extração de plasmídeos de *B. thuringiensis* utilizados nesse estudo permitiram observar a separação de bandas dos DNAs extracromossomais através da visualização de gel de agarose. A figura 8 mostra que ambos os métodos se diferiram consideravelmente, e apenas em comum entre eles foi a presença de uma banda de DNA cromossômico em todas as amostras próximas a uma banda de marcador de 12.000 pb. Através da extração pelo método I foi possível obter megaplasmídeos únicos em três das quatro amostras analisadas (75%) que se difere em seus tamanhos, com exceção da cepa 531.

Figura 8- Perfis plasmidiais de cepas de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra *C. includens* pertencentes ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo.



Cepas= 3820, 531, 547,566; A= Extração com reagentes segundo Fagundes, (2011); B= Extração com kit comercial; MM= 1kb plus (Invitrogen).

Fonte: Carvalho, 2017.

Diferentemente, a extração pelo método II permitiu analisar megaplasmídeos em todas as cepas estudadas (100%), inclusive na cepa 547 onde foi possível obter dois megaplasmídeos com tamanhos diferentes, o que não ocorreu na extração pelo método I.

Esses resultados mostram que os genes responsáveis pela eficiência de mortalidade dessas cepas à lagarta falsa-medideira podem estar localizados nos megaplasmídeos devido à presença dessas moléculas, porém torna-se importante verificar a localização dos mesmos para essa confirmação. E ainda, confirmam a presença dos megaplasmídeos de forma única na maioria de cepas de *B. thuringiensis* que são estudadas, como no estudo de Fagundes et al. (2011) que detectaram megaplasmídeos únicos em 13% das cepas avaliadas e Unalmis et al. (2015) que detectaram em 3,63% de suas cepas.

Poucos trabalhos conseguem obter cepas de Bt com conteúdo de megaplasmídeos múltiplos, porém Reyaz et al. (2013) também conseguiram isolar cepas de Bt com mais de um megaplasmídeo, estas foram coletadas em áreas planas e montanhosas na Índia, e obtiveram um percentual de 11,76% e 29,41% respectivamente. Esses autores mostraram que as cepas

que apresentam mais de um megaplasmídeo em seu genoma podem apresentar maior conteúdo de novos genes *cry* e necessitam ser estudados detalhadamente.

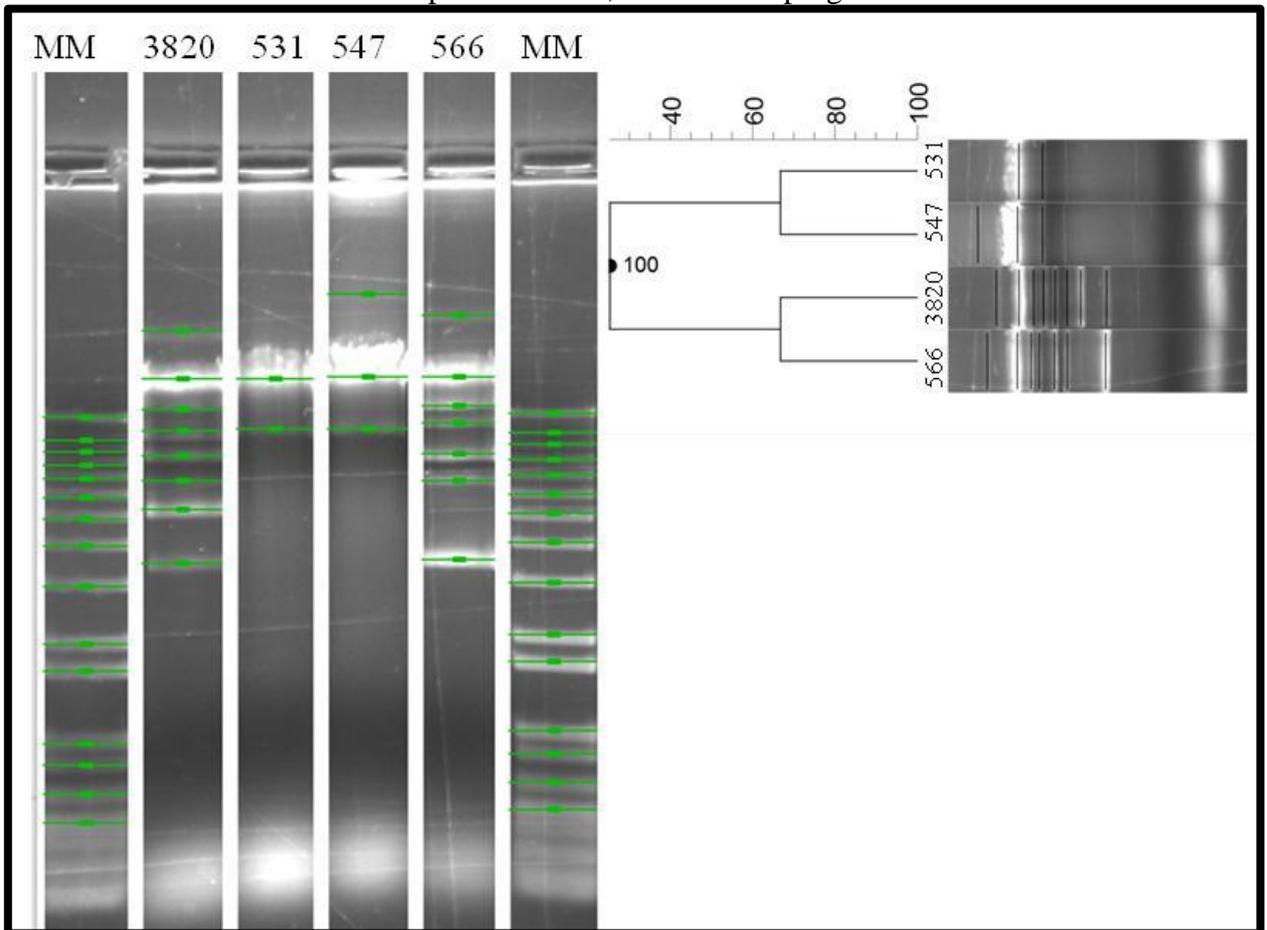
Também foi possível obter padrões de pequenos plasmídeos diversos encontrados abaixo do DNA cromossômico. Diante da dificuldade de isolar megaplasmídeos devido à facilidade de se degradarem durante o armazenamento, ocasionando assim à perda de informações de cada padrão plasmidial, a maioria dos estudos está focada na comparação dos padrões plasmidiais através de análises apenas dos pequenos plasmídeos presentes nas cepas, devido a estes se apresentarem geralmente em número de cópias elevados (REYES-RAMIREZ & IBARRA, 2008).

Através da extração pelo método I, foi possível observar a presença de maior número de pequenos plasmídeos nas cepas, o que não foi possível observar através da extração por kit comercial, o qual apenas a amostra 3820 revelou a presença de alguns de seus pequenos plasmídeos. Isso pode ter ocorrido devido ao protocolo utilizado para o kit comercial ser concebido para preparação principalmente de plasmídeos de baixas cópias como é o caso dos megaplasmídeos. Dessa forma a comparação dos perfis plasmidiais desse trabalho foram através dos plasmídeos extraídos pelo método I.

Lereclus et al. (1982) ao investigarem o conteúdo plasmidial em diferentes cepas de *B. thuringiensis* observaram como os pequenos plasmídeos podem ocorrer em maiores quantidades. Estes autores conseguiram detectar a presença de 17 plasmídeos em uma única cepa, que se diferiram em relação ao tamanho variando de 3,9 a 180 MDa.

As cepas analisadas no presente trabalho apresentam de 1 a 6 plasmídeos, e duas cepas, 531 e 547, tiveram padrões de pequenos plasmídeos semelhantes ou mesmo idênticos entre si, ao apresentarem apenas um em cada, ambos com tamanhos de aproximadamente 10.000 pb. Na figura 9, é possível observar a comparação dos perfis plasmidiais extraídos pelo método I através do programa BioNumerics 7.1. O dendograma obtido mostrou dois agrupamentos, de forma que as cepas 3820 e 566 foram mais próximas em uma escala de 65% e as cepas 547 e 531 com o mesmo valor de 65% de proximidade entre elas.

Figura 9- Análise dos perfis plasmidiais de cepas de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra *C. includens* extraídos pelo método I, utilizando o programa BioNumerics 7.1.



Cepas= 3820, 531, 547,566; MM= 1kb plus (Invitrogen).

Fonte: Carvalho, 2017.

Alguns autores também encontraram padrões plasmidiais idênticos em cepas de Bt diferentes, como Fagundes et al. (2011) que encontraram padrões semelhantes em cepas com sorotipos diferentes, determinando que embora os plasmídeos possuam tamanhos semelhantes as sequências de DNA podem se diferir, o que deve ser considerado para trabalhos futuros. No presente estudo as cepas utilizadas não possuem identificação de subespécies, o que não permite fazer a correlação dos perfis plasmidiais com o sorotipo de cada uma.

Embora alguns perfis plasmidiais sejam compartilhados entre as cepas, foram detectados padrões plasmidiais únicos em duas. A cepa 3820 apresentou o maior número de plasmídeos com seis no total, de tamanhos variando entre 3.000 pb a 12.000 pb aproximadamente. Enquanto a cepa 566 apresentou cinco plasmídeos com as variações similares, porém a

principal diferença entre elas está na ausência de um plasmídeo com tamanho de 5.000 pb na cepa 566.

Apesar dos estudos focarem na importância dos megaplasmídeos como locais de abrigo de genes que codificam as delta-endotoxinas bioinseticidas, algumas informações importantes também são encontradas nos pequenos plasmídeos de forma contribuinte para a biologia do seu hospedeiro (LI et al., 2014). Foi detectado a presença de gene formador de cristal *cry1A* em fragmentos de apenas 50 kb (Rolle, Ejiofor & Johnson, 2005).

A partir disso, também se tornam importantes os estudos dos pequenos plasmídeos de *B. thuringiensis* e já existem trabalhos focados em caracterizar, sequenciar e clonar essas moléculas, como os realizados por McDowel & Mann (1991), López-Meza et al. (2003), e Andrup et al. (2003).

4.6 Perfis Proteicos

A análise do perfil proteico por SDS-PAGE das proteínas totais e digeridas com tripsina das cepas que tiveram eficiência para lagarta falsa-medideira demonstrou semelhanças entre as mesmas. Todas as cepas avaliadas apresentaram em suas proteínas totais duas bandas principais de ~130 e ~ 65 kDa, porém as mesmas mostraram diferenças em relação à intensidades das bandas proteicas produzidas, demonstrando perfis diferentes (Figura 10). Conforme Bravo (1997) as proteínas Cry de Bt possuem uma gama de pesos moleculares com massas entre 50 a 140 kDa, condizendo com os resultados aqui apresentados, e a presença dessas proteínas pode ser o fator determinante para a alta toxicidade dessas cepas contra *C. includens*.

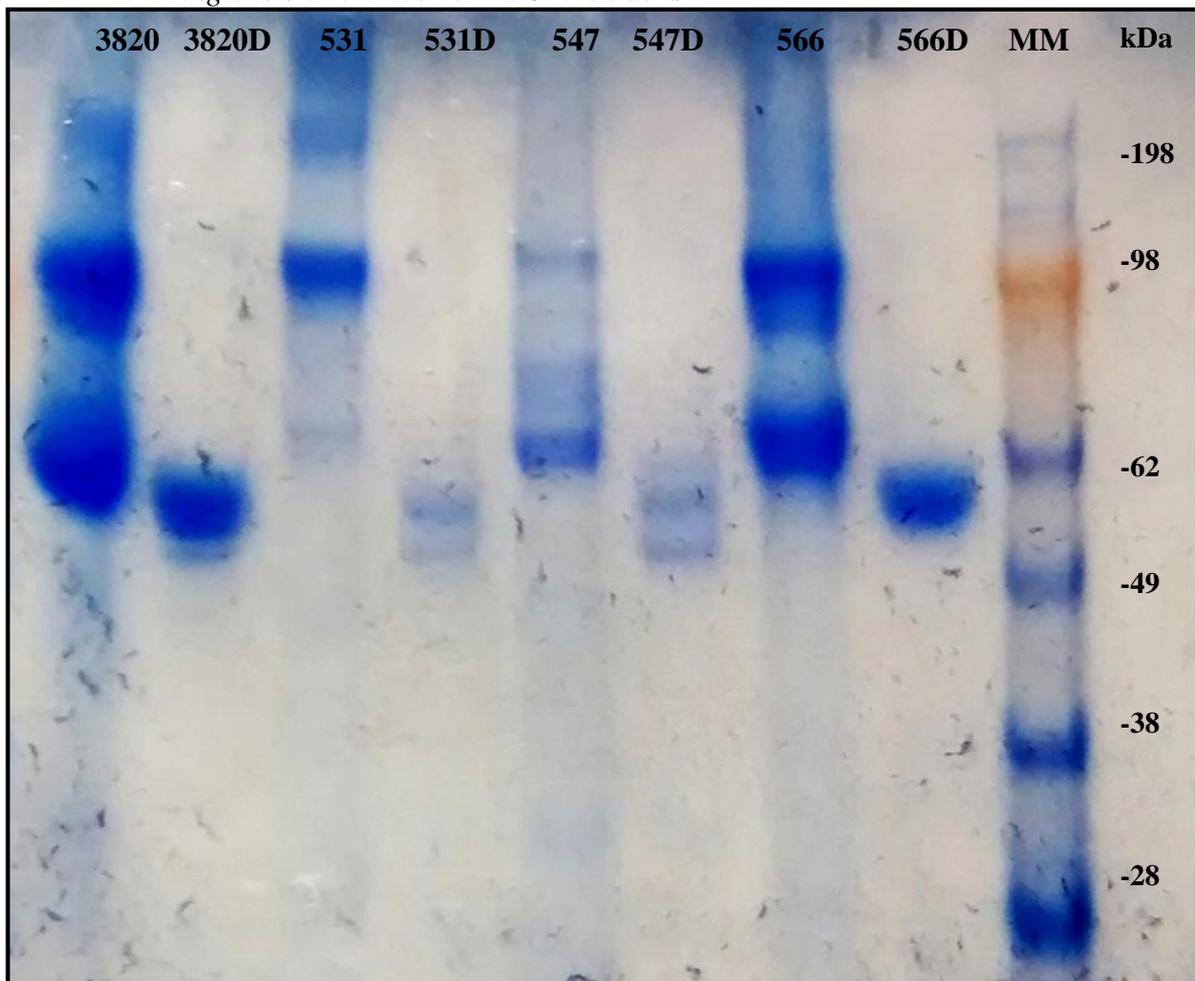
Os padrões de proteínas aqui encontrados se assemelham a cepas que possuem cristais proteicos tipo Cry1 e Cry2, assim como a cepa de referência HD1 que está relacionada à toxicidade principalmente a espécies de lepidópteros (LERECLUS et al., 1993; MONNERAT et al., 2007).

Bandas proteicas de ~130kDa são tipicamente de proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* e são as proteínas mais frequentemente encontradas, sendo sintetizadas por pelo menos sete subclasses de genes de *cry1A* ao *cry1G*, e estão associados à conformidades bipiramidais dos cristais de Bt (LERECLUS et al., 1993; DIAS et al., 1999). Porém, as proteínas de classes

Cry9 também apresentam valores moleculares semelhantes, entre 130-132 kDa e já são conhecidas suas importantes atividades tóxicas a espécies de lepidópteros, além de confirmadas como uma boa alternativa para o manejo da resistência de insetos (SHU et al., 2013; CRICKMORE et al., 2016). Dessa forma, torna-se importante considerar a possibilidade deste tipo proteico ser produzido por algumas dessas cepas estudadas neste presente trabalho.

As proteínas codificadas por genes *cry2* possuem tamanhos entre 65 a 70kDa (HOFTE & WHITELEY, 1989) proporcionais à segunda banda encontrada em todas cepas aqui estudadas, as mesmas estão associadas a presença de cristais com conformidades cuboides em muitas cepas de Bt, além de também serem associadas com toxicidade a lepidópteros.

Figura 10- Padrão de proteínas totais e digeridas com tripsina produzidas pelas cepas *Bacillus thuringiensis* eficientes contra *C. includens*.



(D) Proteínas que foram digeridas por tripsina; MM= Marcador SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard. Fonte: Carvalho, 2017.

Após os insetos-alvo ingerirem as inclusões cristalinas produzidas por Bt, as pró-toxinas são solubilizadas em seu intestino médio a partir da clivagem da região C-terminal e em alguns casos ocorre também a remoção de uma parte de aminoácidos da região N-terminal, através de proteases intestinais resultando assim em fragmentos tóxicos com peso molecular de aproximadamente 60kDa (HOFTE & WHITELEY, 1989; DE MAAGD et al., 2003).

A digestão das pró-toxinas Cry torna-se importante na determinação da susceptibilidade, pelo aumento da atividade que se sucede (ADANG et al., 2014). O ambiente intestinal de insetos possui um complexo de diferentes proteases, e as serino-proteases são as principais classes dessas enzimas e amplamente distribuídas na natureza, e seus representantes mais estudados são as tripsinas e quimiotripsinas (LAZAREVIĆ & JANKOVIĆ-TOMANIĆ, 2015). Nesse trabalho, as pró-toxinas produzidas pelas cepas Bt que foram eficientes para *C. includens*, foram digeridas utilizando a protease tripsina de forma a simular *in vitro* como ocorre esse procedimento no intestino dos insetos para ativação de proteínas.

Foi obtido esse mesmo valor de peso molecular (60 kDa) para todas as cepas, além de também mostrarem uma formação de dois fragmentos separados após a digestão bem próximos, em três das quatro cepas estudadas (3820, 531 e 547), e nesta segunda banda apresentaram tamanhos de cerca de 50 kDa. Esse fato já foi observado por Yamagiwa et al. (1999) e Yamaguchi et al. (2010) estes autores demonstraram que a formação de dois fragmentos após digestão com proteases pode estar associados a formação de um complexo ativo das proteínas.

Dessa forma, o estudo da ativação é um passo crucial, devido ao processo tornar as proteínas Cry funcionais, visto que esses fragmentos são responsáveis por se ligarem aos receptores específicos e essa ligação induz a formação de pequenos poros ou canais não específicos (0,5-1,0 nm) que permitem a entrada de íons e água na célula o que promove a lise celular da membrana do inseto-alvo (KNOWLES & ELLAR, 1987; SCHNEPF et al., 1998).

4.7 Ensaios de toxicidade com lagartas do gênero *Spodoptera*

O gênero *Spodoptera*, pertence ao grupo mais destrutivo da família de insetos Noctuidae e possui características preocupantes para a agricultura em relação a perdas monetárias. Estes insetos são migratórios e ocasionam danos a importantes culturas como milho, algodão, sorgo, soja, arroz e tomate (POGUE, 2002). Entre as espécies desse complexo que se encontram no Brasil, *S. eridania* (Cramer, 1782), *S. cosmioides* (Walker, 1858) e *S. frugiperda* (J.E.Smith, 1797) são destaques de ocorrência em diversas lavouras, ocasionando danos de desfolha, destruição das estruturas reprodutivas e alimentação dos grãos (SANTOS et al., 2003; BARROS et al., 2010; SANTOS et al., 2010)

Os problemas com essas espécies nas diferentes safras, principalmente *S. frugiperda*, agravaram-se devido uma evolução da resistência aos inseticidas químicos com mesmo modo de ação, além de modificações nos sistemas de cultivo, como a frequente sucessão de cultivos hospedeiros da praga permitindo a sobrevivência populacional entre os cultivares (DIEZ-RODRIGUEZ & OMOTO, 2001; IRAC, 201).

Assim, como *C. includens* essas espécies de *Spodoptera* também são comumente encontradas em diversos campos de produção de soja, destacando-se em maior ocorrência *S. cosmioides* e *S. eridania*. As lagartas desse grupo abrigam próximas às vagens o que lhes garante proteção aos inseticidas, provocando o efeito “guarda-chuva”, que se baseia na formação de barreira protetora através das folhas (MOSCARDI et al., 2012).

De Freitas Bueno et al. (2011) verificaram a capacidade de alimentação da área foliar das principais pragas da cultura da soja e observaram que em algumas situações as três espécies de *Spodoptera* apresentaram o mesmo ou até maior capacidade de desfolha que *C. includens*, demonstrando que lagartas lepidópteras de espécies distintas podem apresentar níveis de desfolha diferentes, o que é preocupante, devido a essa cultura não conseguir suportar alto nível de infestação por essas espécies em conjunto.

A partir disso, ao avaliar as cepas de *Bacillus thuringiensis*, eficientes com 100% de mortalidade para *C. includens*, contra as três espécies do gênero *Spodoptera* (*S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*), foi possível determinar diferentes níveis de toxicidade para as três espécies de insetos.

Das quatro cepas analisadas, duas (3820 e 566) apresentaram mortalidade com valores de 80-100% para as três espécies de *Spodoptera*, revelando a possibilidade de esses isolados

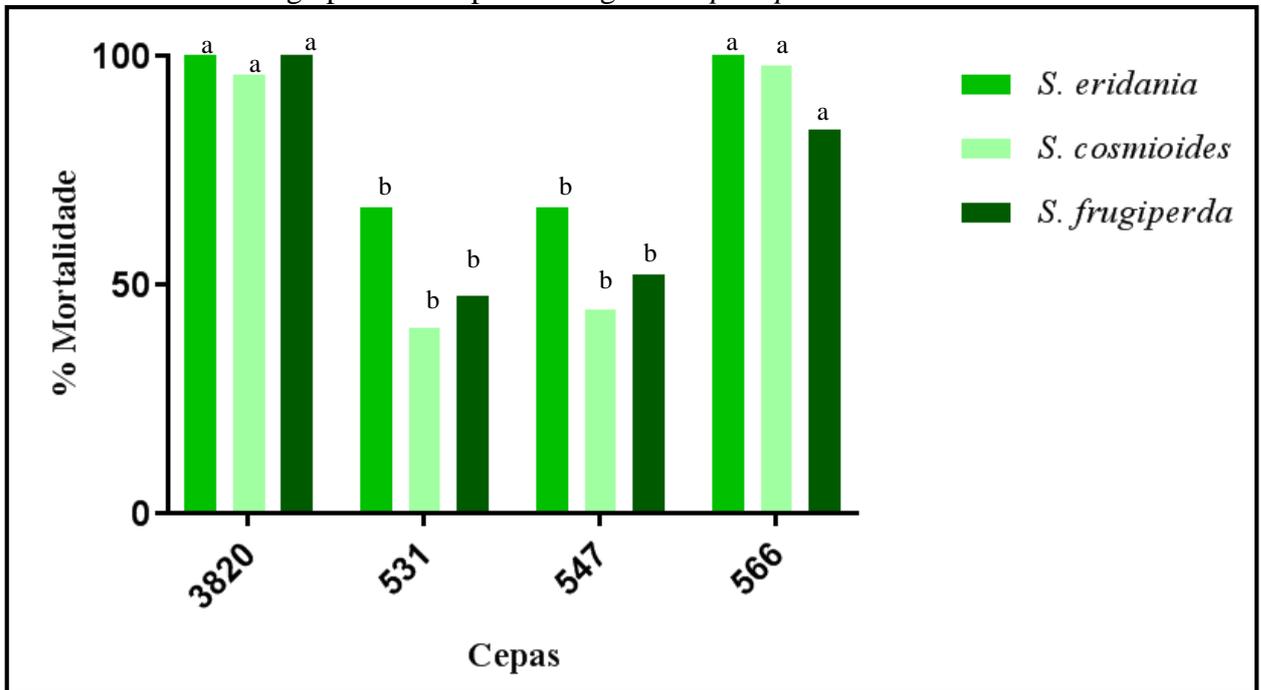
apresentarem grande potencial de controle de outras lagartas além de *C. includens*. Os maiores valores de mortalidade foram causados pela cepa 3820, que apresentou 100% de mortalidade para *S. eridania* e *S. frugiperda* e, da cepa 566 que causou 100% de mortalidade para *S. eridania* (Gráfico 2).

Outros estudos também conseguiram detectar cepas com proteínas tóxicas para mais de uma espécie-praga, todavia em números reduzidos como relatado por Monnerat et al. (2007). Esses autores avaliaram 1400 isolados e 27 deles apresentaram toxicidade considerável para *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Plutella xylostella*.

Dos Santos et al. (2009) também avaliaram cepas de Bt presentes em um banco de microrganismos contra as três espécies do gênero de *Spodoptera* estudadas nesse trabalho. Das 100 cepas testadas apenas sete apresentaram eficiência com mortalidades acima de 70% para as mesmas, reafirmando a importância de constantes pesquisas na obtenção de cepas de *B. thuringiensis* com melhores características tóxicas sobre as espécies-praga.

Já são conhecidos os efeitos tóxicos de *B. thuringiensis* no controle dessas espécies de *Spodoptera* (POLANCZYK, 1999; MONNERAT et al., 2007; HERRERO et al., 2016), mas, apesar disso, ainda é um obstáculo a obtenção de novos isolados de Bt eficientes para as mesmas. Fiuza et al. (2004) avaliaram 139 isolados de Bt sendo que apenas sete apresentaram atividade contra *S. frugiperda*, com mortalidade máxima de apenas 45%, considerado um baixo valor de mortalidade.

Gráfico 2- Avaliação da toxicidade de cepas de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra *Chrysodeixis includens* pertencentes ao Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e sorgo para três espécies do gênero *Spodoptera*.



Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Carvalho, 2017.

As cepas 531 e 547 também apresentaram mortalidade de 100% para *C. includens* neste estudo, porém ao avaliá-las com as diferentes espécies de *Spodoptera* apresentaram diferentes atividades tóxicas com valores de mortalidade inferiores, entre 40 a 66%. Estas diferenças de toxicidade entre espécies de insetos-praga diferentes são confirmadas por Van Frankenhuyzen (2009) ao observar como as diversas espécies de lepidópteros respondiam diferentemente às proteínas testadas, dividindo-as em grupos de mais permissivas ou menos permissivas à ativação de toxinas de Bt.

Praça et al. (2004) também observaram singularidades de toxicidade de cepas Bt, ao detectar uma cepa com maior eficiência de mortalidade para *S. frugiperda* e ao mesmo tempo ineficiente para *A. gemmatilis*, cujos valores de toxicidade se diferiram e foram inferiores. Porém, outros trabalhos também já observaram cepas de Bt potencialmente tóxicas para mais de uma espécie de lepidóptero. Praça et al. (2003) ao estudar 300 cepas observou que duas delas apresentaram toxicidade contra as espécies *S. frugiperda* e *A. gemmatilis* e ainda, detectou cepas tóxicas para cinco espécies de insetos, entre eles lepidópteros, coleópteros e

dípteros, porém com valores variados de superioridade e inferioridade de mortalidade em relação à cepa padrão HD-1.

Um aspecto importante na especificidade das toxinas está nas diferenças de atividades proteolíticas existentes entre os insetos alvos, o que promove a grande importância de selecionar cepas de Bt com altas atividades tóxicas e de modos de ação diferentes para as formulações utilizadas na agricultura (BOBROWSKI et al., 2001; BOBROWSKI et al., 2003).

A ação das toxinas ativas depende da interação de alta afinidade das mesmas com os receptores de ligação presentes nas microvilosidades apicais das células intestinais dos insetos, cada etapa desse mecanismo pode modular a atividade a uma espécie de inseto em particular ou uma especificidade global, porém ainda estamos distantes de compreender totalmente os fatores determinantes para a especificidade das proteínas de Bt a um inseto específico (DE MAAGD, BRAVO & CRICKMORE, 2001) isso demonstra a importância de estudos para avaliar os padrões de ligação das proteínas em diferentes insetos, mesmo sendo da mesma ordem Lepidoptera.

5 CONCLUSÃO

- Foi possível selecionar quatro cepas de *Bacillus thuringiensis* potencialmente eficientes no controle da lagarta falsa-medideira (*C. includens*), além de determinar a presença/ausência de genes *cry* das classes 1, 2 e 9 em seus genomas;
- Nenhuma cepa selecionada apresentou capacidade de produção de β -exotoxinas, demonstrando a segurança em utilizá-las para formulações de biopesticidas;
- As cepas apresentaram, em geral, perfis plasmidiais distintos, sendo possível a detecção de megaplasmídeos em todas;
- O padrão proteico mostrou semelhanças entre as cepas com características de duas bandas proteicas principais relacionadas a proteínas Cry presentes;
- Duas cepas que foram eficientes para *C. includens* (3820 e 566) também foram tóxicas para lepidópteros do gênero *Spodoptera* (*S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*).

REFERÊNCIAS

- ADANG, M. J. et al. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism**. Insect Midgut Insect Proteins, v. 47, p. 39, 2014.
- AGUIAR-MENEZES, E. de L. **Controle biológico de pragas: princípios e estratégias de aplicação em ecossistemas agrícolas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003.
- ALPER, M. et al. **Distribution, occurrence of cry genes, and lepidopteran toxicity of native *Bacillus thuringiensis* isolated from fig tree environments in Aydın Province**. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, v. 38, n. 6, p. 898-907, 2014.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. **Quantificação de inóculo de patógenos de insetos**. Controle microbiano de insetos, v. 2, p. 765-778, 1998.
- ANDEF. **Ameaças fitossanitárias**. Documento online, 2017. Disponível em : <http://www.undef.com.br/sustentabilidade/ameacas-fitossanitarias>. Acesso em: 25 de jan. 2017
- ANDRUP, L. et al. **The patchwork nature of rolling-circle plasmids: comparison of six plasmids from two distinct *Bacillus thuringiensis* serotypes**. Plasmid, v. 49, n. 3, p. 205-232, 2003.
- BARRETO, M. R. **Prospecção e Caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com Potencial Para o Controle de Insetos-praga da Cultura da Soja**. 2012. 93p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BARROS, E. M. et al. **Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica**. Neotropical Entomology, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.
- BENASSI, V. L. R. M. et al. **Lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857), nova praga do maracujazeiro no Espírito Santo**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 34, p. 941-943, 2012.
- BEN-DOV, E. et al. **Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis***. Applied and Environmental Microbiology, v. 63, n. 12, p. 4883-4890, 1997.
- BERRY, C. et al. **Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis**. Applied and environmental microbiology, v. 68, n. 10, p. 5082-5095, 2002.
- BISHOP, A. H.; ROBINSON, C. V. ***Bacillus thuringiensis* HD-1 Cry–: development of a safe, non-insecticidal simulant for *Bacillus anthracis***. Journal of applied microbiology, v. 117, n. 3, p. 654-662, 2014.
- BOBROWSKI, V. L. et al. **Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from South of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 32, n. 2, p. 105-109, 2001.
- BOBROWSKI, V. L. et al. **Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas**. Ciência Rural, v. 34, n. 1, p. 843-850, 2003.

- BOX, G. E.; COX, D. R. **An analysis of transformations**. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), p. 211-252, 1964.
- BRAVO, A. et al. **Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection**. Applied and Environmental Microbiology, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.
- BRAVO, A. et al. **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control**. Toxicon, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
- BRAVO, A. **Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains**. Journal of bacteriology, v. 179, n. 9, p. 2793, 1997.
- BUENO, A. F. et al. INIMIGOS NATURAIS DAS PRAGAS DA SOJA. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Londrina: Editores Técnicos, 2012. Cap. 8. p. 494-629.
- BURGES, H. D.; HURST, J. A. **Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths**. Journal of Invertebrate Pathology, v. 30, n. 2, p. 131-139, 1977.
- CAPALBO, D. M. F. et al. ***Bacillus thuringiensis***. Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v. 34, p. 69-85, 2005.
- CARDOSO, M. O.; PAMPLONA, A. M. S. R.; MICHEREFF FILHO, M.. **Recomendações técnicas para o controle de lepidópteros pragas em couve e repolho no Amazonas**. Manaus: Gleise Maria Teles de Oliveira, 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/63832/1/Circ-Tec-35.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2016.
- CAROZZI, N. B. et al. **Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles**. Applied and Environmental Microbiology, v. 57, n. 11, p. 3057-3061, 1991.
- CERON, J et al. **Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection**. Applied and Environmental Microbiology, v. 61, n. 11, p. 3826-3831, 1995.
- CERON, J. et al. **PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis***. Applied and Environmental Microbiology, v. 60, n. 1, p. 353-356, 1994.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Quarto levantamento, Brasília, v. 4, p. 1-160 janeiro 2017.
- CONTE, O. et al. **Resultados do manejo integrado de pragas da soja na safra 2014/15 no Paraná**. Londrina: Marisa Yuri Horikawa, 2014. 56 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/109670/1/Resultados-do-manejo-integrado-de-pragas-da-soja-na-safra-2013-14-no-Parana.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2016.
- COSTA, M. L. M. **Caracterização molecular de genes cyt de cepas de *Bacillus thuringiensis* e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas contra *Spodoptera frugiperda* (JE**

Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

CRAVEIRO, S. R. et al. **Caracterização de isolados virais patogênicos à lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*):** Caracterização de isolados virais patogênicos à lagarta falsa-medideira (*Pseudoplusia includens*). Brasília: Maria da Graça Simões Pires Negrão, 2008. 15 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2025003/bpd230.pdf/69e04798-52dc-47db-88bb-215b242ca472>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

CRICKMORE, N. et al. ***Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature.** 2016. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 10 jul. 2016.

CURRIER, T. C.; NESTER, E. W. **Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria.** Analytical biochemistry, v. 76, n. 2, p. 431-441, 1976.

DA SILVA, S. F et al. **Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil.** Brasília: Alysson Messias da Silva, 2002. 4 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2019329/cot070.pdf/cb1a2d98-f929-4572-9b23-02d755452f06>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

DE FREITAS BUENO, R. C. O. et al. **Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions.** Pest management science, v. 67, n. 2, p. 170-174, 2011.

DE MAAGD, R. A. et al. **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** TRENDS in Genetics, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

DE MAAGD, R. A. et al. **Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria.** Annual review of genetics, v. 37, n. 1, p. 409-433, 2003.

DE MACEDO, C. L. et al. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 47, n. 12, p. 1759-1765, 2013.

DE SOUZA LIMA, G. M. **PROTEÍNAS BIOINSETICIDAS PRODUZIDAS POR *Bacillus thuringiensis*.** Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, v. 7, p. 119-137, 2013.

DEBABOV, V. G. et al. **Isolation and preliminary characteristics of the extrachromosomal elements of *Bacillus thuringiensis* DNA.** Genetika, v. 13, n. 3, p. 496-501, 1976.

DIAS, S. C. et al. **Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from Argentinean soils.** BioControl, v. 44, n. 1, p. 59-71, 1999.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. **Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina.** Neotropical Entomology, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

DINIZ, J. F. S. **Não preferência para alimentação e antibiose em genótipos de feijão-caupi a *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857)(Lepidoptera: Noctuidae).** 2015. 38 p. Dissertação (mestrado) – Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2015.

DOS SANTOS, K. B. 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.

DROBNIEWSKI, F. A.; ELLAR, D. J. **Investigation of the membrane lesion induced in vitro by two mosquitocidal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*.** *Current Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 195-199, 1988.

EL-KERSH, T. A. et al. **Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (sl).** *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 647, 2016.

E SILVA, F. D. A. S.; DE AZEVEDO, C. A. V. **The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data.** *African Journal of Agricultural Research*, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

EMBRAPA. **Ameaças fitossanitárias para a cultura da soja na safra 2015/2016.** Londrina: Embrapa Soja, 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355202/1529289/NOTATECNICAPRAGASEXOTICAS.pdf/352afb19-ce9e-4f06-8a31-f9bbd39361da>>. Acesso em: 04 jun. 2016.

EMBRAPA. **Lagarta falsa-medideira traz preocupação para soja.** 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/busca-de-noticias/-/noticia/1462162/lagarta-falsa-medideira-traz-preocupacao-para-soja>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. **Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective.** *FEMS Microbiology letters*, v. 171, n. 1, p. 1-9, 1999.

ESPINASSE, S. et al. **Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cry1B in *Bacillus thuringiensis*.** *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 9, p. 4182-4186, 2002.

ESTRUCH, J. J. et al. **Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FAGUNDES, R. B. S. et al. **Plasmid patterns of efficient and inefficient strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae).** *Neotropical entomology*, v. 40, n. 5, p. 600-606, 2011.

FARKAS, J. et al. **The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*.** Preliminary communication. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, v. 34, n. 3, p. 1118-1120, 1969.

FATORETTO, J. C. et al. **Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae).** *Neotrop. entomol*, v. 36, n. 5, p. 737-745, 2007.

FEITELSON, J.S.; PAYNE, J.; KIM, L. ***Bacillus thuringiensis*: insects and beyond.** *Nature Biotechnology*, v. 10, n. 3, p. 271-275, 1992.

FIUZA, L.; POLANCZYK, R.; SILVA, R. **ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* Berliner A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLOS E SUA PATOGENICIDADE PARA *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. Current Agricultural Science and Technology, v. 10, n. 2, 2004.

FORRESTER, Neil W. **Use of *Bacillus thuringiensis* in integrated control, especially on cotton pests**. Agriculture, ecosystems & environment, v. 49, n. 1, p. 77-83, 1994.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 930 p. 13 v.

GITAHY, P. D. M. et al. **Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio**. Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2005.

GITAHY, P. M. et al. **Purificação de DNA plasmidial de *Bacillus thuringiensis* por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio**. Seropédica: Marta Maria Gonçalves Bahia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2005.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology e safety**. Chichester: Wiley e Sons, p. 350, 2000.

GONZÁLEZ, J. M., JR; CARLTON, B. C. **Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis***. Plasmid, v. 3, n. 1, p. 92-98, 1980.

GONZÁLEZ, J.; DULMAGE, H. T.; CARLTON, B. C. **Correlation between specific plasmids and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis***. Plasmid, v. 5, n. 3, p. 351-365, 1981.

GONZÁLEZ, J; CARLTON, B. C. **A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety israelensis**. Plasmid, v. 11, n. 1, p. 28-38, 1984.

GREENE, G.L. **Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium**. Journal of Economic Entomology, v. 69, n.4, p. 487-488, 1976.

HASTOWO, S.; LAY, B. W.; OHBA, M. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. **Journal of applied bacteriology**, v. 73, n. 2, p. 108-113, 1992.

HERINGA, S. D.; MONROE, J. D.; HERRICK, J. B. **A simple, rapid method for extracting large plasmid DNA from bacteria**. Nature Precedings, 2007.

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.

HERRERO, S. et al. **Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the geranium bronze, *Cacyreus marshalli* Butler (Lepidoptera: Lycaenidae)**. Applied and Environmental Microbiology, v.68, p.4090-4094, 2002.

HERRERO, S. et al. **Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp**. Current Opinion in Insect Science, v. 15, p. 89-96, 2016.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*, v.53, n.2, p.242-255, 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.

IBRAHIM, M. A. et al. ***Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective**. *Bioengineered bugs*, v. 1, n. 1, p. 31-50, 2010.

IMA. **Ataques de mosca-branca e lagarta-falsa-medideira preocupam agricultores**. 2014. Disponível em: <<http://imamt.com.br/home/noticia/1053>>, acesso em: 01 de jun. 2016.

IRAC. **Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas Bt**. ESALQ/USP, Piracicaba, 2013. Disponível em: < <http://www.irc-online.org/documents/resistencia-de-spodoptera-frugiperda/?ext=pdf> >, acesso em: 10 de jan. 2017.

ISAAA. **Biotech country Facts & Trends**. 2015. Disponível em: <http://isaaa.org/resources/publications/biotech_country_facts_and_trends/download/Facts%20and%20Trends%20-%20Brazil.pdf>, acesso em: 13 de jun. 2016.

ISAAA. **Genes list**. 2017. Disponível em: < <http://www.isaaa.org/gmaprovaldatabase/geneslist/default.asp>>, acesso em: 03 de jan. 2017.

ISAKOVA, I. A. et al. **Specificity of Ukrainian *Bacillus thuringiensis* Berliner strains for agricultural pests of the Southeastern United States**. *Journal of Entomological Science*, v. 42, n. 2, p. 272-285, 2007.

JANSENS, S. et al. **Transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage**. *Crop Science*, v. 37, n. 5, p. 1616-1624, 1997.

JUAREZ-PEREZ, V. et al. **PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 8, p. 2997-3002, 1997.

KAELIN, P.; MOREL, P.; GADANI, F. **Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.)**. *Applied and environmental microbiology*, v. 60, n. 1, p. 19-25, 1994.

KATAYAMA, H. et al. **Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis***. *Journal of biochemistry*, v. 137, n. 1, p. 17-25, 2005.

KNOWLES, B. H. **Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins**. *Advances in insect physiology*, v. 24, p. 275-308, 1994.

- KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. **Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 924, n. 3, p. 509-518, 1987.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAM, A. B. Q.; WEBSTER, J. M. **Effect of the DD-136 nematode and of a β -exotoxin preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on leatherjackets, *Tipula paludosa* larvae.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 20, n. 2, p. 141-149, 1972.
- LAZAREVIĆ, J; JANKOVIĆ-TOMANIĆ, M. **Dietary and phylogenetic correlates of digestive trypsin activity in insect pests.** *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 157, n. 2, p. 123-151, 2015.
- LERECLUS, D. et al. **Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: Conserved sequences through 11 crystalliferous strains.** *Molecular and General Genetics MGG*, v. 186, n. 3, p. 391-398, 1982.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. **Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes.** *Bacillus thuringiensis*, p. 37-69, 1993.
- LEVINSON, B. L. et al. **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*, v. 172, n. 6, p. 3172-3179, 1990.
- LI, H. et al. **Characterization of one novel cry8 gene from *Bacillus thuringiensis* strain Q52-7.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 12, p. 3075-3080, 2014.
- LIANG, H. et al. **Characterization of cry2-type genes of *Bacillus thuringiensis* strains from soil-isolated of Sichuan basin, China.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 140-146, 2011.
- LIU, X. Y. et al. **Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 50, p. 39191-39200, 2010.
- LÓPEZ-MEZA, J. E. et al. **Sequencing and characterization of plasmid pUIBI-1 from *Bacillus thuringiensis* serovar *entomocidus* LBIT-113.** *Current microbiology*, v. 47, n. 5, p. 395-399, 2003.
- MAC INNES, T. C.; BOUWER, G. **An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin.** *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 101, n. 2, Jun 2009.
- MARTIN, P. A. W; TRAVERS, R. S. **Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 10, p. 2437-2442, 1989.
- MARTINS, E. S. et al. **Desenvolvimento de metodologia de bioensaio de dose contra o Bicudo do Algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) Utilizando estirpes de *Bacillus thuringiensis*.** Brasília, 2004.

- MASCARENHAS, R. N.; BOETHEL, D. J. **Development of diagnostic concentrations for insecticide resistance monitoring in soybean looper (Lepidoptera:Noctuidae) larvae using an artificial diet overlay bioassay.** Journal of Economic Entomology, v. 93, p. 897-904, 2000.
- MCCONNELL, E.; RICHARDS, A. G. **The production by *Bacillus thuringiensis* Berliner of a heat-stable substance toxic for insects.** Canadian journal of microbiology, v. 5, n. 2, p. 161-168, 1959.
- MCDOWELL, D. G.; MANN, N. H. **Characterization and sequence analysis of a small plasmid from *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki strain HD1-DIPEL.** Plasmid, v. 25, n. 2, p. 113-120, 1991.
- MEDEIROS, P. T. et al. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 11, p. 1145-1148, 2005.
- MENDES, S. M. et al. Controle de pragas. In: MAY, A. et al. **Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol: Sistema BRS1G-Tecnologia Qualidade Embrapa.** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2012. p. 57-67.
- MIZUKI, E. et al. **Unique activity associated with non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells.** Journal of applied microbiology, v. 86, n. 3, p. 477-486, 1999.
- MONNERAT, R. G. et al. **Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*.** Biological Control, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.
- MONNERAT, R. G.; BRAVO, A.; MELO, I. S. **Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência.** Controle biológico, v. 3, p. 163-200, 2000.
- MOSCARDI, F. et al. **Artrópodes que atacam as folhas da soja.** Soja. Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília: Embrapa, p. 214-334, 2012.
- NPIC. ***Bacillus thuringiensis* general fact sheet**, 2015. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/BTgen.pdf>>, acesso em: 15 de jun. 2016.
- OHBA, M. et al. **Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*.** Anticancer Research, v. 29, n. 1, p. 427-433, 2009.
- PANG, A. S.; GRINGORTEN, J. L.; VAN FRANKENHUYZEN, K. **Interaction between Cry9Ca and two Cry1A δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* in larval toxicity and binding to brush border membrane vesicles of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens.** FEMS microbiology letters, v. 215, n. 1, p. 109-114, 2002.
- PARDO-LOPEZ, L. et al. ***Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection.** FEMS microbiology reviews, v. 37, n. 1, p. 3-22, 2013.
- PICANÇO, M. C. et al. **Manejo integrado de pragas.** Viçosa: UFV, 144 p., 2010.

- PINHEIRO, D. H. **Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana (BBMV)s do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina em isolados de *Bacillus thuringiensis***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
- PINTO, L. M. N. et al. **Toxinas de *Bacillus thuringiensis***. Conselho Científico, v. 71503, p. 24, 2010.
- PINTO, L. M. N.; FIUZA, L. M. **Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil**. Ciência Rural, v. 33, n. 4, p. 699-702, 2003.
- POGUE G. M. **A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae)**. Memoirs of the American Entomological Society, Philadelphia, v. 43, n.28, p.117-124, 2002.
- POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)**. 2004. 145p. Tese (Doutorado) – Entomologia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- POLANCZYK, R.A. **Isolamento e seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner para controle de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**., 1999. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- PRAÇA, L. B. et al. **Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.
- PRAÇA, L. B. et al. **Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.
- RAYMOND, B. et al. ***Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen?**. Trends in microbiology, v. 18, n. 5, p. 189-194, 2010.
- REDDY, A.; BATTISTI, L.; THORNE, C. B. **Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies**. Journal of bacteriology, v. 169, n. 11, p. 5263-5270, 1987.
- REYAZ, A. L. et al. **Plasmid profiling of indigenous *Bacillus thuringiensis* isolated from Tamil Nadu and Kashmir**. Journal of Pharmacy Research, v. 6, n. 3, p. 325-330, 2013.
- REYES-RAMÍREZ, A.; IBARRA, J. E. **Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains**. Applied and environmental microbiology, v. 74, n. 1, p. 125-129, 2008.
- ROH, J. Y. et al. ***Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control**. Journal of microbiology and biotechnology, v. 17, n. 4, p. 547, 2007.
- ROLLE, R. L.; EJIORFOR, A. O.; JOHNSON, T. L. **Determination of the plasmid size and location of d-endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* by pulse field gel electrophoresis**. African Journal of Biotechnology, v. 4, n. 7, p. 580-585, 2005.
- ROYALTY, R. N.; HALL, F. R.; TAYLOR, R. A. J. **Effects of thuringiensin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) mortality, fecundity, and feeding**. Journal of economic entomology, v. 83, n. 3, p. 792-798, 1990.

- RUKMINI, V. et al. ***Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin.** Biochimie, v. 82, n. 2, p. 109-116, 2000.
- SANTOS, K. B. D. et al. **Caracterização dos Danos de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker)(Lepidoptera: Noctuidae) em Estruturas de Algodoeiro.** Neotropical entomology, v. 39, n. 4, 2010.
- SANTOS, W. J.; SANTOS, K. B.; SANTOS, R. B. **Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera spp.* em algodoeiro no Brasil.** In: Congresso Brasileiro de Algodão. 2003. p. 5.
- SAUKA, D. H. et al. **PCR-based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains.** Journal of invertebrate pathology, v. 122, p. 28-31, 2014.
- SAXENA, D.; STOTZKY, G. **Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ.** FEMS Microbiology Ecology, v. 33, n. 1, p. 35-39, 2000.
- SCHNEPF, E. et al. ***Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.** Microbiology and molecular biology reviews, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.
- SCHÜNEMANN, R., KNAAK, N., & FIUZA, L. M. **Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture.** ISRN microbiology, v. 2014.
- SEIFINEJAD, A. et al. **Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection.** Biological Control, v. 44, n. 2, p. 216-226, 2008.
- SHARMA, C. B. S. R. et al. **The exotoxin of *Bacillus thuringiensis*: A new C-mitotic agent.** Experientia, v. 32, n. 11, p. 1465-1466, 1976.
- SHU, C. et al. **Characterization of *cry9Da4*, *cry9Eb2*, and *cry9Ee1* genes from *Bacillus thuringiensis* strain T03B001.** Applied microbiology and biotechnology, v. 97, n. 22, p. 9705-9713, 2013.
- SHUHAIMI, M. et al. **Utilization of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence based PCR to fingerprint the genomes of Bifidobacterium isolates and other probiotic bacteria.** Biotechnology Letters, Surrey, v. 23, n. 9, p. 731-736, 2001.
- SILVA, J. S. **Isolamento, caracterização molecular e atividade larvívica de isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1911 do Amazonas em *Aedes aegypti* Linnaeus 1762 (Diptera: Culicidae).** Dissertação (Mestrado em Entomologia) – INPA, Manaus, 2011.
- SILVA, R. B. **Caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* utilizando REP-PCR e perfil plasmidial.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras, 2009.
- STOTZKY, G. **Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants.** Plant and soil, v. 266, n. 1, p. 77-89, 2005.
- TAMEZ-GUERRA, P. et al. **Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae.** Journal of invertebrate pathology, v. 86, n. 1, p. 7-18, 2004.

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. **PCR-based method for the detection of cry genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand.** Journal of invertebrate pathology, v. 98, n. 2, p. 121-126, 2008.

TOLEDO, J. et al. **Toxicity of *Bacillus thuringiensis* β -exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae).** Journal of economic entomology, v. 92, n. 5, p. 1052-1056, 1999.

TSAI, S. F. et al. **Pulmonary toxicity of thuringiensin administered intratracheally in Sprague–Dawley rats.** Toxicology, v. 186, n. 3, p. 205-216, 2003.

UNALMIS, S. et al. **Molecular Screening and Bioactivity of Native *Bacillus thuringiensis* Isolates.** Journal of Agricultural Science and Technology, v. 17, n. 5, p. 1197-1207, 2015.

VALICENTE, F. H. et al. **Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*.** Biological Control, v. 53, n. 3, p. 360-366, 2010.

VALICENTE, F. H., & MOURÃO, A. H. . **Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide.** Neotropical entomology, v. 37, n. 6, p. 702-708, 2008.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. ***Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae).** Neotropical Entomology, v. 32, n. 4, p. 639-644, 2003.

VALICENTE, F. H.; LANA, U. D. P. **Molecular characterization of the *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains 344 and 1644, efficient against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith).** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 7, n. 3, p. 195-209, 2008.

VAN FRANKENHUYZEN, K. **Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins.** Journal of invertebrate pathology, v. 101, n. 1, p. 1-16, 2009.

VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. **Two Commercial Preparations of the β Exotoxin of *Bacillus thuringiensis* Influence the Mortality of Caged Adult Honey Bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).** Environmental entomology, v. 15, n. 1, p. 166-169, 1986.

VARGAS MESINA, R. R. **Thuringiensin toxicity to *Tetranychus urticae* Koch and *Panonychus ulmi* (Koch)(Tetranychidae) and effects on cuticle development of immature stages of *T. urticae*.** 1993. 109p. Tese (Doutorado) – Filosofia, Universidade de Lincoln, Nova Zelândia, 1993.

WANG, Jinhong et al. **Characterization of cry1, cry2, and cry9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China.** Journal of Invertebrate Pathology, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.

WHO. ***Bacillus thuringiensis*.** Geneva, World Health Organization (Environmental Health Criteria 217), 1999.

YAMAGIWA, M. et al. **Activation process of dipteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis.** Applied and environmental microbiology, v. 65, n. 8, p. 3464-3469, 1999.

YAMAGUCHI, T. et al. **Intramolecular proteolytic nicking and binding of *Bacillus thuringiensis* Cry8Da toxin in BBMV of Japanese beetle.** Journal of invertebrate pathology, v. 105, n. 3, p. 243-247, 2010.

ZHANG, J.; WANG, C. **Comparison of toxicity and deterrence among crystal, spore and thuringiensin A of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (Hubner).** Kun chong xue bao. Acta entomologica Sinica, v. 43, n. 增刊 1, p. 85-91, 1999.

ZORZETTI, J. et al. **Selection and Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Berliner)(Eubacteriales: Bacillaceae) Strains for *Ecdytolopha aurantiana* (Lima)(Lepidoptera: Tortricidae) Control.** Neotropical entomology, p. 1-7, 2016.