



THIAGO TREVISOLI AGOSTINI

**BIOPROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE
LEPIDÓPTEROS-PRAGA**

**LAVRAS - MG
2024**

THIAGO TREVISOLI AGOSTINI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus*
thuringiensis PARA O CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS-PRAGA**

Tese apresentada a Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Vegetal, área de concentração em
Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título
de Doutor

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

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

Agostini, Thiago Trevisoli.

Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* para o controle de lepidópteros-praga / Thiago Trevisoli Agostini. - 2012.

79 p. : il.

Orientador(a): Fernando Hercos Valicente.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2012.
Bibliografia.

1. Controle biológico. 2. Controle microbiano de pragas. 3. Microorganismos entomopatogênicos. I. Valicente, Fernando Hercos.
II. Título.

THIAGO TREVISOLI AGOSTINI

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS-PRAGA

SELECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* STRAINS FOR THE CONTROL OF LEPIDOPTERA PESTS

Tese apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 14 de dezembro de 2022.

Prof. Dr. Frederick Aguiar Mendes – EMBRAPA

Prof. Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana - EMBRAPA

Prof. Dra. Beatriz de Almeida Barros - EMBRAPA

Prof. Dra. Karine da Silva Carvalho - EMBRAPA

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

Aos meus amados pais Eliana de Fátima Trevisoli Agostini e José Guilherme Agostini, que dedicaram seu tempo e sua força ao sucesso de seus filhos, sendo meus grandes exemplos de vida.

Dedico

Aos meus queridos irmãos Matheus Trevisoli Agostini e Lucas Trevisoli Agostini, que sempre auxiliaram incondicionalmente meus passos, além de força e auxílio nas horas difíceis. A minha amada Sabrina Nayara Kotuzi Agostini, que com seu amor sempre trouxe alegrias, sendo minha base de dedicação e inspiração nesse caminho.

Aos meus avós, Anselmo Agostini (*in memoriam*), Maria Madalena Agostini, Pedro Trevisoli Sobrinho e Natalina Longhi Trevisoli (*in memoriam*), que são os responsáveis pela base sólida na educação.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras pela superior infraestrutura e oportunidade concedida.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelos conhecimentos passados e por serem os responsáveis por mais um degrau alcançado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

A EMBRAPA Milho e Sorgo, pela infraestrutura e pela oportunidade de trabalho.

Ao prof. Dr. Fernando H. Valicente pela amizade, orientação e ensinamentos.

Ao Dr. Haroldo Linhares Xavier Volpe por sua amizade e companheirismo.

Aos meus grandes amigos e companheiros de laboratório, Amanda do Carmo Alves, Celso Vieira, Ismael Moreira Maciel, Karine da Silva Carvalho, Frederick Aguiar Mendes e Jean Pinho, que não mediram esforços em meu auxílio, pela paciência e companheirismo, amizade e ajuda em todos os momentos.

A todos os meus amigos que deixaram esse caminho um pouco menos árduo.

E a todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

Longos dias e belas noites.

“Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”

J.R.R. TOLKIEN

RESUMO

Com o crescimento exponencial da população mundial, a demanda por produtos agrícolas de qualidade, principalmente por fontes alimentares para os seres humanos, tem aumentado consideravelmente. Porém, o ataque de insetos-praga nas lavouras contribui para a diminuição da produtividade e da qualidade dos produtos. O controle destes insetos é realizado principalmente pela utilização de produtos químicos, no entanto, este tipo de controle, apesar de eficiente, pode resultar em efeitos colaterais indesejados como a seleção de populações de insetos resistentes, a contaminação de ambientes e a morte de organismos não-alvo. Uma alternativa consiste na utilização do *Bacillus thuringiensis* (Bt), uma bactéria Gram-positiva, com ocorrência em diferentes tipos de substratos capaz de produzir cristais proteicos compostos de toxinas Cry, Cyt ou toxinas secretadas como as toxinas Vip. Estas toxinas apresentam alta atividade inseticida a diferentes ordens de insetos, sendo seguras para o homem e para o meio ambiente. O objetivo do trabalho foi identificar cepas de *B. thuringiensis* provenientes do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo que causem mortalidade superior a 90% para os lepidópteros-praga *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioidea*, *S. eridania*, e *Helicoverpa armigera*. Para isso, nos bioensaios seletivos com lagartas neonatas das diferentes pragas, foram utilizadas 80 cepas de *B. thuringiensis* provenientes do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas - MG. Os bioensaios foram realizados com a utilização de 150 µL da solução de esporos e cristais de cada cepa na concentração de 1×10^8 esporos/mL, sendo avaliada sua mortalidade por sete dias. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com grupos experimentais de quatro repetições com 16 insetos cada. Nove das oitenta cepas testadas apresentaram mortalidade acima de 90% para as espécies de *C. includens*, *Spodoptera* e *H. armigera* e nenhuma delas produziu β -exotoxina. As cepas de *B. thuringiensis* 1074F, 1090C, 1139E e 1166C apresentaram mortalidade acima de 90% simultaneamente para as cinco espécies de lepidópteros-praga testados e tiveram seu genoma sequenciado utilizando a plataforma NGS com tecnologia DNBSEQ™. Foram obtidos 135 *scaffolds* resultando num cromossomo de 5.812.623 pb (1074F), 125 *scaffolds* num cromossomo de 5.783.457 pb (1090G), 135 *scaffolds* num cromossomo 5.784.297 pb (1139E) e 132 *scaffolds* num cromossomo de 5.820.845 pb (1166C), com conteúdo G+C $\geq$ a 34% e um total de cinco genes codificadores das proteínas inseticidas Cry1Ib, Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac e Vip3Ag, para as cepas sequenciadas. Portanto, as cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C demonstraram atividade contra as cinco espécies de *C. includens*, *S. frugiperda*, *S. cosmioidea*, *S. eridania* e *H. armigera* e contém cinco genes inseticidas, demonstrando um potencial para serem utilizadas para a produção de novos bioinseticidas e/ou fonte de genes para o desenvolvimento de novos eventos de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga.

Palavras-chave: Controle biológico; Controle microbiano de pragas; Microrganismo entomopatogênicos.

ABSTRACT

With the exponential growth of the world population, the demand for quality agricultural products, especially food sources for humans, has increased considerably. However, the attack of insect pests on crops contributes to a decrease in productivity and product quality. Control of these insects is carried out mainly through the use of chemical products, however, this type of control, despite being efficient, can result in unwanted side effects such as the selection of resistant insect populations, contamination of environments and the death of non-organic organisms. -target. An alternative consists of using *Bacillus thuringiensis* (Bt), a Gram-positive bacterium, occurring on different types of substrates, capable of producing protein crystals composed of Cry, Cyt toxins or secreted toxins such as VIP toxins. These toxins have high insecticidal activity against different orders of insects, being safe for humans and the environment. The objective of the work was to identify strains of *B. thuringiensis* from the Embrapa Maize and Sorghum Microorganism Bank that cause mortality greater than 90% for the lepidopteran pests *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda*, *S. cosmioides*, *S. eridania*, and *Helicoverpa armigera*. For this, in selective bioassays with neonatal caterpillars of different pests, 80 strains of *B. thuringiensis* were used from the Embrapa Maize and Sorghum Microorganism Bank in Sete Lagoas - MG. The bioassays were carried out using 150 μ L of the spore and crystal solution of each strain at a concentration of 1×10^8 spores/mL, and their mortality was evaluated for seven days. The experimental design used was completely randomized with experimental groups of four replications with 16 insects each. Nine of the eighty strains tested showed mortality above 90% for the species of *C. includens*, *Spodoptera* and *H. armigera* and none of them produced β -exotoxin. The strains of *B. thuringiensis* 1074F, 1090C, 1139E and 1166C showed mortality above 90% simultaneously for the five lepidopteran pest species tested and had their genome sequenced using the NGS platform with DNBSEQ™ technology. We obtained 135 scaffolds resulting in a chromosome of 5,812,623 bp (1074F), 125 scaffolds in a chromosome of 5,783,457 bp (1090G), 135 scaffolds in a chromosome of 5,784,297 bp (1139E) and 132 scaffolds in a chromosome of 5,820,845 bp (1166C), with G+C content $\geq 34\%$ and a total of five genes coding for the insecticidal proteins Cry1Ib, Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac and Vip3Ag, for the sequenced strains. Therefore, strains 1074F, 1090G, 1139E and 1166C demonstrated activity against the five species of *C. includens*, *S. frugiperda*, *S. cosmioides*, *S. eridania* and *H. armigera* and contain five insecticidal genes, demonstrating a potential to be used to produce new bioinsecticides and/or source of genes for the development of new events of transgenic plants resistant to insect pests.

Keywords: Biological control; Microbial pest control; Entomopathogenic microorganisms.

INDICADORES DE IMPACTO

A busca por soluções sustentáveis na agricultura tem se intensificado diante dos desafios impostos pelas mudanças climáticas e da necessidade de garantir a segurança alimentar. Nesse contexto, o estudo intitulado “Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* para o controle de lepidópteros-praga” surge como uma alternativa promissora aos inseticidas químicos. A utilização da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* tem o potencial de produzir uma ampla variedade de proteínas inseticidas, ativas contra diferentes ordens de insetos. Dessa forma, os produtos à base de Bt são considerados seguros, pois não causam danos a mamíferos, organismos não-alvo e ao meio ambiente. Ao substituir os inseticidas químicos convencionais, essa abordagem contribui para a redução da contaminação do solo e dos recursos hídricos, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) relacionados à vida terrestre e aquática. Além disso, o desenvolvimento de bioinseticidas com *B. thuringiensis* fortalece diretamente a agricultura familiar e a produção de alimentos saudáveis, colaborando para a erradicação da fome e para uma agricultura sustentável, bem como para a promoção da saúde e bem-estar. A adoção dessas tecnologias inovadoras também incentiva a pesquisa e o desenvolvimento, impulsionando a indústria e a inovação. Do ponto de vista social, os impactos são focados na melhoria da segurança alimentar e na sustentabilidade do uso de bioinseticidas em práticas agrícolas locais, contribuindo para mitigar os efeitos na microbiota do solo e no produto final destinado diretamente às comunidades. Ao reduzir a dependência de produtos químicos sintéticos, essa abordagem também auxilia economicamente na mitigação das mudanças climáticas e na proteção da biodiversidade. Por fim, a produção tecnológica de alimentos mais seguros e de alta qualidade impacta positivamente a saúde humana e o desenvolvimento social, contribuindo para a construção de sociedades mais justas e equitativas.

IMPACT INDICATORS

The search for sustainable solutions in agriculture has intensified in response to the challenges posed by climate change and the need to ensure food security. In this context, the study entitled “Selection and Molecular Characterization of *Bacillus thuringiensis* Strains for the Control of Pest Lepidoptera” emerges as a promising alternative to chemical insecticides. The use of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* offers the potential to produce a wide variety of insecticidal proteins effective against various orders of insects. Thus, Bt-based products are considered safe, as they do not harm mammals, non-target organisms, or the environment. By replacing conventional chemical insecticides, this approach helps reduce soil and water contamination, aligning with the Sustainable Development Goals (SDGs) related to life on land and in water. Additionally, the development of *B. thuringiensis* bioinsecticides directly strengthens family farming and the production of healthy food, supporting the eradication of hunger, sustainable agriculture, and the promotion of health and well-being. The adoption of these innovative technologies also stimulates research and development, boosting industry and innovation. From a social perspective, the impacts focus on improving food security and the sustainability of bioinsecticide use in local agricultural practices, helping to mitigate the effects on soil microbiota and on the final product intended for communities. By reducing dependence on synthetic chemical products, this approach also contributes economically to mitigating climate change and protecting biodiversity. Finally, the technological production of safer, high-quality food positively impacts human health and social development, contributing to the building of fairer and more equitable societies.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 <i>Spodoptera frugiperda</i>	15
2.1.1 Importância econômica.....	15
2.1.2 Biologia e Morfologia	16
2.2 <i>Spodoptera eridania</i>	17
2.2.1 Importância econômica.....	17
2.2.2 Biologia e morfologia.....	18
2.3 <i>Spodoptera cosmioides</i>	19
2.3.1 Importância econômica.....	19
2.3.2 Biologia e morfologia.....	20
2.4 <i>Helicoverpa armigera</i>	21
2.4.1 Importância econômica.....	21
2.4.2 Biologia e Morfologia	21
2.5 <i>Chrysodeixis includens</i>	23
2.5.1 Importância econômica.....	23
2.5.2 Biologia e morfologia.....	24
2.6 <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
2.6.1 Aspectos gerais.....	24
2.6.2 δ -endotoxinas.....	26
2.6.3 Proteínas vegetativas inseticidas (VIP)	29
2.6.4 β -exotoxinas	31
2.6.5 Plantas geneticamente modificadas expressando <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
2.6.6 Resistência de <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
2.6.7 Sequenciamento genômico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. JUSTIFICATIVA	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 SELETIVIDADE DE CEPAS.....	36
5.1.1 Criação e manutenção da população dos insetos <i>Spodoptera frugiperda</i> , <i>S. eridania</i> , <i>S. cosmioides</i> , <i>Helicoverpa armigera</i> e <i>Chrysodeixis includens</i>	36
5.1.2 Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	37
5.1.3 Bioensaios de mortalidade.....	38
5.1.4 Bioensaios de β -exotoxinas	39

5.1.5 Extração de DNA genômico de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
5.1.6 Detecção do gene <i>thuE</i> através de PCR	40
5.1.7 Sequenciamento genômico	40
5.1.8 Identificação de genes que codificam proteínas	41
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
6.1 Seleção de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> por bioensaios de mortalidade	41
6.2 Bioensaios de produção de β -exotoxina e detecção do gene <i>thuE</i> através de PCR.....	45
6.3 Sequenciamento genômico	47
6.4 Determinação dos genes que codificam proteínas inseticidas nas cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C	48
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento exponencial da população mundial, a demanda por produtos agrícolas de qualidade tem aumentado, principalmente para alimentação humana (BALLARDO et al., 2017). O ataque de insetos-praga contribui para a diminuição da produtividade e da qualidade dos produtos, causando grandes perdas econômicas no campo. O controle desses insetos é realizado majoritariamente pela utilização de produtos químicos. No entanto, este tipo de controle, apesar de eficiente, pode resultar em efeitos colaterais indesejados como a seleção de populações resistentes, contaminação de ambientes e a morte de organismos não-alvo (KOGAN 1998; GALLO et al., 2002).

Dentre os insetos-praga, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmíodes*, *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens* possuem hábito alimentar polífago, podendo estar presentes em inúmeras culturas de importância econômica, como o algodão, amendoim, arroz, aveia, batata, batata-doce, cana-de-açúcar, cará, cebola, cravo, feijão, fumo, girassol, hortaliças, inhame, morango, tomate e soja (VALICENTE & CRUZ, 1991; POGUE, 2004; SRIVASTAVA et al., 2005; ALI & CHOUDHURY, 2009; CRUZ, 2009; BERNARDI, 2012; JESUS et al., 2013; PRATISSOLI & GONÇALVES, 2015; VALICENTE; 2015; SILVA et al., 2017). Para o controle dessas pragas são utilizados, em sua maioria, inseticidas como Clorfenapir, Piretroides, Carbamatos, Cipermetrina, bioinseticidas e inimigos naturais (GALLO et al., 2002; VALVERDE & VIRLA, 2007; TABASHNIK et al., 2013; SPARKS, 2013; LACEY et al., 2015; AGROLINK, 2019).

Dentre os microrganismos entomopatogênicos a bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Bt) é o entomopatógeno mais importante utilizado. Sua atividade inseticida se deve principalmente à produção de proteínas que causam efeitos inseticidas, a maioria das quais são sintetizadas durante a esporulação em um cristal parasporal, diferentemente de outros *Bacillus* spp. Misturas pulverizáveis de esporos Bt e cristais parasporais são consideradas mais seguras e específicas do que inseticidas sintéticos e respondem por 75–95% do mercado de biopesticidas microbianos (OLSON et al., 2015; JURAT-FUENTES et al., 2021). Além disso, estas toxinas apresentam alta atividade inseticida a diferentes ordens de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e nematoides, sendo seguras para o homem e o meio ambiente (KONECKA et al., 2007; BRAVO et al., 2011; PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2013; PALMA et al., 2014; KOCH et al., 2015).

Até hoje os genes inseticidas provenientes de Bt, são à contribuição mais importante da biotecnologia para o controle de pragas na agricultura. Essas culturas transgênicas Bt são plantadas em aproximadamente 246 milhões de hectares em todo o mundo (ISAAA, 2022).

Principais benefícios da adoção de culturas com tecnologia Bt incluem alta eficácia, maiores margens brutas de rendimento, redução do uso de inseticidas, maior biodiversidade e, no caso do milho Bt, maior segurança sanitária (National Academies of Sciences, 2017).

Inúmeras proteínas com atividade inseticida foram identificadas em Bt (ADANG et al., 2014), e são nomeadas e classificadas conforme a identidade da sequência de proteínas e semelhanças estruturais (PALMA et al., 2014). Existem, atualmente, 391 sequências de holótipos (CRICKMORE et al., 2020), das quais o maior grupo (271 proteínas) pertence à família Cry (de Crystal) de três domínios (3-D). A família Vip3 de proteínas inseticidas vegetativas contém 14. Atualmente somente as proteínas Cry (Cry1A.105, mCry3A e eCry3.1Ab) e Vip3 (Vip3Aa19 e Vip3Aa20) são comercializadas como culturas Bt. A evolução da resistência a essas culturas é dificultada pela produção de altas doses de toxina na planta e pelo plantio de refúgios de plantas não-Bt, ajudando a manter populações suscetíveis no campo. Essas populações suscetíveis irão cruzar com insetos resistentes, resultando na redução de populações resistentes, retardando assim, o desenvolvimento da resistência. Combinar a expressão de genes Bt no mesmo híbrido (piramidação de genes), expressando diferentes toxinas, não só contribui para o manejo da resistência, mas também aumenta seu espectro de ação, aumentando a eficiência no controle de diferentes espécies de insetos-praga. (JURAT-FUENTES et al., 2021).

O genoma é a base para a compreensão completa das características internas de uma bactéria e todo o sequenciamento do genoma é uma estratégia inicial para investigar seu comportamento. Recentemente os avanços nas estratégias de sequenciamento demonstraram que a utilização de técnicas como Illumina ou PacBio são eficientes para caracterização de cepas, permitindo sua diferenciação inter e intraespecífica, determinando a presença ou ausência de determinados genes (DOGGET et al., 2013; LIU et al., 2013; PALMA et al., 2014; GAO et al., 2015 CAO et al., 2018). Com isso, diversos genomas de Bt são depositados em bancos públicos como o NCBI (National Center for Biotechnology Information) (LAND et al., 2015; LIU et al., 2017).

O NCBI abriga uma coleção extensa de genes Bt, categorizados em diferentes famílias e subfamílias com base em sua estrutura e atividade inseticida. Fornecendo informações detalhadas sobre a localização e características de cada gene, incluindo sua sequência de nucleotídeos, aminoácidos codificados, estrutura proteica e motivos funcionais, além de diversas ferramentas e recursos para auxiliar na pesquisa e análise de genes Bt como, visualizadores de sequências, ferramentas de anotação de genes, bancos de dados de proteínas e recursos bibliográficos (NCBI 2022).

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo a identificação de cepas de Bt eficientes para o controle de *S. frugiperda*, *S. cosmioides*, *S. eridania*, *C. includens* e *H. armigera* e a identificação de genes codificadores de proteínas inseticidas presentes em seus genomas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Spodoptera frugiperda*

2.1.1 Importância econômica

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Crambidae) (Figura 1) é um dos principais insetos-praga da cultura de milho no Brasil, estando presente em até 284 países, podendo reduzir a produção nacional de 15 a 40% (CRUZ, 1995; FRIZZAS et al., 2014; PAINI et al., 2016; CABI, 2019). É a principal praga da cultura do milho, sendo considerada uma espécie extremamente polífaga, descrita em mais de 350 espécies de plantas, porém causa um maior dano econômico em cultivares como, milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar, tomate, batata, cebola, soja e milheto (LEIDERMAN & SAUER, 1953; POGUE, 2002; CASMUZ AUGUSTO et al., 2010; CABI, 2019). Conhecida como “lagarta-do-cartucho”, “lagarta-militar” ou “curuquerê-do-milho”, atualmente, é encontrada em todos os estados do Brasil, onde são favorecidas pelas condições climáticas e pela disponibilidade e diversificação de plantas hospedeiras por todo o ano (CRUZ, 1995; BOREGAS et al., 2013).

Lagartas pertencentes ao gênero *Spodoptera* alimentam-se tanto das folhas como das estruturas reprodutivas das plantas. As plantas de milho são prejudicadas pela destruição do cartucho, reduzindo a área fotossintética e comprometendo sua produção, podendo causar danos na base da espiga, destruindo os grãos e podendo facilitar a entrada de microrganismos fitopatogênicos (CRUZ, 1999).

Figura 1 - Lagarta de *Spodoptera frugiperda* com 16 a 20 dias de idade. Fonte: Do Autor (2022)



Fonte: Agostini (2018)

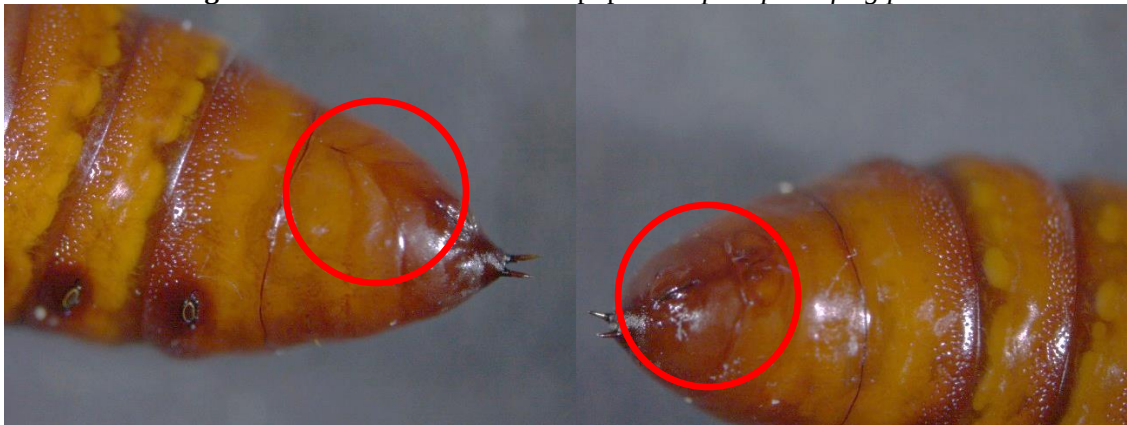
2.1.2 Biologia e Morfologia

Por ser um inseto de hábito polífago, *S. frugiperda* pode atacar diversas culturas, apresentando atividade crepuscular e, por isso, a maioria de sua atividade é realizada durante a noite, e se alimentando de folhas e da parte reprodutiva das plantas. É um inseto holometábolo, ou seja, de metamorfose completa, passando pelas fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulto.

Seus ovos têm duração de 2 a 3 dias até sua eclosão a 25 °C, possuindo coloração de verde-clara a alaranjada. Suas posturas são realizadas em massas, sendo que cada massa pode apresentar, em média, 100 ovos por vez em camadas sobrepostas (GALLO et al., 2002; SANTIAGO, 2005). A duração de seu período larval é de 12 a 30 dias e sua coloração pode variar do cinza-escuro ao marrom, apresentando faixas dorsais com pontos pretos na base de suas cerdas, sua cápsula cefálica apresenta sutura frontal não alcançando o vértice da cabeça. Além de serem canibais, nos primeiros instares se alimentam de folhas mais novas, passando a se alimentar de toda a planta em seus últimos instares. Seu período larval no solo, onde se transformam em pupa (GALLO et al., 2002, SANTIAGO, 2005).

A fase de pupa pode variar de 8 a 10 dias no verão ou até 25 dias no inverno. Neste estágio, com auxílio de uma lupa, pode ser realizada a sexagem dos indivíduos. Na porção final do abdômen, indivíduos machos apresentam duas protuberâncias circulares e as fêmeas apresentam um traço (Figura 2) (GALLO et al., 2002).

Figura 2 - Dimorfismo sexual de pupas de *Spodoptera frugiperda*.



Fonte: Agostini (2022)

Os adultos medem 35 mm de envergadura, sendo as asas anteriores pardo-escuras e as posteriores branco-acinzentadas, apresentam vida curta, e sua fecundidade e oviposição se torna ideal a 26°C. A longevidade pode variar entre 13 a 18 dias, cada fêmea adulta põe em média 1500 a 2000 ovos em camadas sobrepostas (BARFIELD et al., 1986; CRUZ, 1995; GALLO et al., 2002). Sua oviposição se inicia logo após o anoitecer, sobre a parte abaxial da folha (quando em alta população), e sobre a parte adaxial (quando em baixa população). As fêmeas começam sua oviposição depois de 3 a 5 dias após se tornarem adultos e continuam a ovipositar por 4 a 17 dias até sua morte, a maior quantidade de ovos são ovipositados nos primeiros quatro ou cinco dias após o período de pupa (LUGINBILL, 1928; CRUZ, 1995).

2.2 *Spodoptera eridania*

2.2.1 Importância econômica

A lagarta das folhas ou lagartas das vagens *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Figura 3) é um lepidóptero da família Noctuidae, nativa dos trópicos americanos, de ocorrência na América Central, América do Sul e Caribe, sendo encontrado também na região Sudeste dos Estados Unidos (CAPINERA, 2005; VALVERDE, 2007). Inicialmente era considerada uma praga secundária e sazonal na maioria dos cultivos, porém, quando instalada na cultura, se torna de difícil manejo devido ao seu elevado potencial biótico. Assim, com o passar do tempo *S. eridania* tem ganhado importância por apresentar danos constantes e sua ocorrência se apresentar de maneira regular (SOUZA et al. 2014; PRATISSOLI & GONÇALVES, 2015). Seu ciclo biológico gira em torno de 30 dias, sendo considerada uma espécie cosmopolita e generalista, atacando até 200 espécies de plantas, como algodão, arroz,

arroz sequeiro, cebola, cravo, girassol, morango e soja (CAPINEIRA, 2001; JESUS et al., 2013; PRATISSOLI & GONÇALVES, 2015). Esta lagarta vem apresentando uma maior frequência de infestação a cada safra nas culturas da soja e do algodão.

Nos primeiros estágios larvais, suas lagartas apresentam comportamento gregário e se alimentam da raspagem das folhas, enquanto a partir do terceiro instar, podem consumir o tecido foliar. As lagartas apresentam hábito solitário e consomem desde as folhas até frutos ainda verdes, o que pode acarretar prejuízos indiretos e diretos (PRATISSOLI, 2009; FORNAZIER et al., 2010; PRATISSOLI & GONÇALVES, 2015).

Na cultura do tomate, os danos causados por lagartas de *S. eridania*, podem ser observadas durante todo o desenvolvimento da cultura. Os danos iniciais ocorrem no parênquima das folhas, e à medida que se desenvolvem podem chegar a atacar os frutos das plantas (KING & SAUNDERS, 1984; CZEPAK et al., 2011). Em plantas do algodoeiro, as lagartas ocorrem a partir da emissão dos botões florais, ocasionando o desfolhamento e danificando as estruturas reprodutivas das plantas. Em plantas de repolho as lagartas podem causar a destruição da cultura sem o manejo apropriado. Nos primeiros instares as lagartas fazem a raspagem nas folhas, e após seu terceiro instar penetram na cabeça do repolho danificando-o profundamente (MICHEREFF FILHO et al., 2008).

Figura 3. Lagarta de *Spodoptera eridania* se alimentando de folhas com idade entre 15-18 dias.



Fonte: Agostini (2022)

2.2.2 Biologia e morfologia

Spodoptera eridania é um inseto holometábolo de hábito polífago que apresenta atividade crepuscular, sendo que nos primeiros instares suas lagartas realizam a raspagem da parte abaxial das folhas, deixando-a com aspecto rendilhado, por não se alimentarem das nervuras. Após o terceiro instar, suas lagartas se tornam solitárias, podendo se alimentar de

folhas e frutos verdes ou maduros (SCRIBER, 1981; NORA et al., 1989; CAPINERA, 2005; MICHEREFF FILHO et al., 2006). Suas pupas são encontradas na base da planta no solo, e seus adultos realizam posturas em massas de ovos.

Os ovos apresentam formato esférico, com cório fino e micrópila formada por quatro aberturas micropilares, roseta micropilar formada por 10 cerdas primárias e 20 a 21 cerdas secundárias. Coloração esverdeada logo após sua oviposição, adquirindo uma coloração marrom-escura ao decorrer do tempo (GALLO et al., 2002; CAPINERA, 2005; VALVERDE, 2007).

A duração do período larval é de 14 a 20 dias, a coloração pode variar entre o marrom, verde ou verde-escuro, apresentando uma linha longitudinal branca no dorso e uma linha lateral de coloração branca ou amarela, sendo interrompida no primeiro urômero. Ao término do período larval, as lagartas descem ao solo em uma profundidade de 5 a 10 cm, onde se transformam em pupa de coloração marrom e a duração do período pupal pode variar entre 8 a 10 dias (GALLO et al., 2002; CAPINERA, 2005).

Os adultos medem aproximadamente 40 mm de envergadura, sendo que as asas anteriores são acinzentadas ou marrons com um ponto preto no centro, as asas posteriores esbranquiçadas e, sua longevidade pode variar entre 7 a 10 dias (GALLO et al., 2002; CAPINERA, 2005; SANTOS et al., 2005). A oviposição é realizada em posturas cobertas por escamas provenientes do corpo das fêmeas, sendo ovipositados aproximadamente 200 a 270 ovos, sendo que cada fêmea tem a capacidade de colocar entre 900 a 1000 ovos em um período de até 5 dias, com uma viabilidade média dos ovos de 47,89% a 58, 57% (PARRA et al., 1977; GALLO et al., 2002; CAPINERA, 2005; VALVERDE, 2007).

2.3 *Spodoptera cosmioides*

2.3.1 Importância econômica

Spodoptera cosmioides (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) (Figura 4), ou lagarta das vagens, apresenta hábito polífago atacando diversas culturas e seu ciclo biológico varia em torno de 28 a 40 dias. No Brasil, as culturas do amendoim, batata-doce, girassol, milho, palma forrageira, soja, algodão, arroz, aveia, batata, cafeeiro, feijão, tomate e o trigo são consideradas hospedeiras desta praga (TEODORO et al., 2013).

Esta lagarta era considerada sinônimo de *Spodoptera latifascia* (Walk.), entretanto foi demonstrada, por Silvain & Lalanne (1997) e Lalanne-Cassou et al., (1999), a existência de diferenças moleculares, morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre elas, sendo assim, consideradas espécies distintas.

Estas lagartas causam a desfolha da cultura nos primeiros instares e depois causam perfurações dos botões florais e nos frutos, além da danificação das vagens e grãos, diminuindo assim a produtividade (AGROLINK, 2019).

Figura 4. Lagarta de *Spodoptera cosmioides* com 20-25 dias de idade.



Fonte: Agostini (2022).

2.3.2 Biologia e morfologia

No complexo *Spodoptera*, a *S. cosmioides* se destaca como a mais severa, com elevado potencial de desfolha e ataque nas fases reprodutivas das plantas, além de apresentar capacidade de sobrevivência em culturas como plantas daninhas ao redor da lavoura (MOSCARDI et al., 2012; DA SILVA et al., 2017). As lagartas apresentam coloração de cinza-escuro a preta, com duas linhas longitudinais alaranjadas e pontuações douradas dorsais distribuídas pelo corpo. Podem chegar a 50 mm de comprimento, apresentando movimentos vagarosos no seu deslocamento, ciclo total em média de 28 a 40 dias. O ciclo larval pode variar entre 20 a 28 dias em temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ (GALLO et al., 2002; BAVARESCO et al., 2004).

As pupas de *S. cosmioides* apresentam uma fase de pré-pupa que pode variar de 2 a 3 dias, e as pupas apresentam coloração marrom-avermelhada com duração de 10 a 13 dias (SILVA et al., 2017). Os adultos medem aproximadamente 40 mm de envergadura, apresentando coloração parda ou amarelada com manchas brancas nas asas anteriores e as posteriores de coloração esbranquiçadas ou escuras. A oviposição é realizada na parte abaxial das folhas e os ovos têm aspecto amarelado e, são colocados em massas de ovos recobertos por escamas da fêmea, agrupados de 50 a 300 ovos por postura, podendo colocar até 3000 a 7000 ovos em sua fase adulta (KING & SAUNDERS, 1984; SILVA et al., 2017).

2.4 *Helicoverpa armigera*

2.4.1 Importância econômica

Helicoverpa armigera (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (Figura 5) está presente em toda a Europa, África, Ásia, Oceania e na América do Sul, em áreas de clima tropical e temperado (GUO, 1997; GUOQING et al., 2001; LAMMERS) e ataca cerca de 180 espécies de plantas (POGUE, 2004; SRIVASTAVA et al., 2005; ALI; CHOUDHURY, 2009). É uma praga altamente polífaga, consumindo caules, folhas, frutos e sementes das plantas. Essa praga não havia sido detectada nas Américas até 2013, sendo que após sua identificação foi registrada sua ocorrência em várias regiões do Brasil (ARAÚJO, 1990; CZEPAK et al., 2013; SPETCH et al., 2013).

Figura 5. Lagarta de *Helicoverpa armigera* de 12-15 dias de idade.



Fonte: Agostini (2022)

2.4.2 Biologia e Morfologia

Helicoverpa armigera apresenta atividade crepuscular tendo sua maior atividade durante a noite, é um inseto de metamorfose completa, ou seja, holometábolo, em que o seu desenvolvimento biológico passa pelas fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulta (HARDWICK, 1965; ARAÚJO, 1990).

Seus ovos apresentam forma ovalada, sendo mais aguda na parte apical e achatado em sua base, a porção apical do ovo é lisa, apresentando nervuras longitudinais no restante de sua superfície (NASREEN & MUSTAFA, 2000; ÁVILA, VIVAN & TOMQUELSKI, 2013). Cada fêmea pode ovipositar entre 2.000 até 3.000 ovos, sendo que os primeiros ovos podem ser inférteis, sua postura (NASREEN & MUSTAFA, 2000; FIGUEIREDO et al., 2006). O

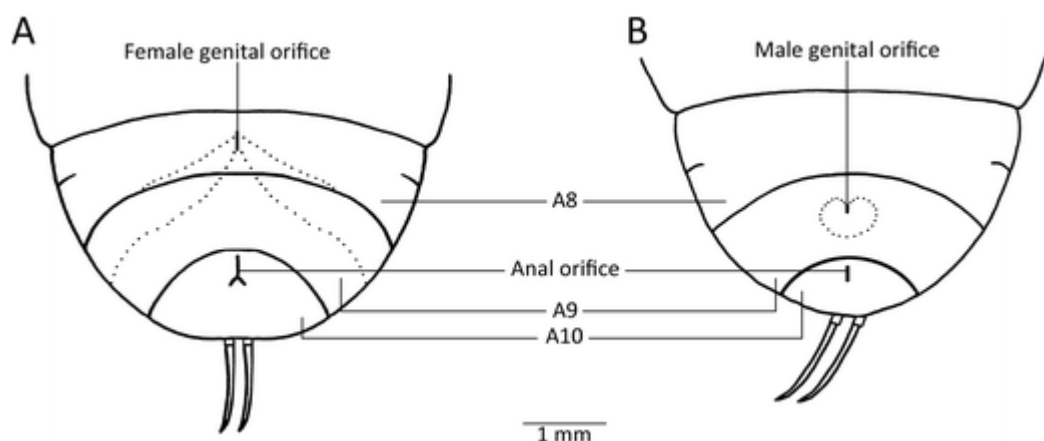
período de incubação dos ovos é, em média, de 3,3 dias, e a oviposição é realizada de forma isolada ou em pequenos agrupamentos na face adaxial das folhas (MENSAH, 1996).

A coloração das lagartas pode variar a partir do terceiro instar, oscilando do amarelo ao verde, com listras de coloração marrom laterais ao tórax, abdômen e na cabeça dependendo do tipo de alimento (ARAÚJO, 1990; ALI; CHOUDHURY, 2009). A partir do quarto instar, as lagartas apresentam tubérculos abdominais escuros e bem visíveis na região dorsal, sendo que esta característica é determinante para a identificação desta espécie (MATTHEWS, 1999). O período larval tem duração entre 15 e 17 dias (FERREIRA, 1989; FIGUEIREDO et al., 2006).

A pupa apresenta coloração castanha, nesta fase é possível distinguir o sexo através da observação da genitália externa, as fêmeas apresentam cicatrizes da abertura genital localizada médio ventral, já os machos apresentam uma abertura circundada por pequenas protuberâncias (Figura 6). A duração de seu período pupal gira em torno de 10 a 14 dias (ARAÚJO, 1990; ALI & CHOUDHURY, 2009; QUEIROZ-SANTOS et al., 2018).

Os adultos de *H. armigera* apresentam 40 mm de envergadura. As asas anteriores possuem uma mancha reniforme clara e na margem externa uma linha de sete a oito pontos escuros. As asas posteriores são brancas, com uma larga banda distal preta que contém uma mancha branca.

Figura 6. Região posterior da pupa de *Helicoverpa armigera*. **A** Região posterior fêmea, **B** região posterior macho.



Fonte: Queiroz-Santos (2018).

2.5 *Chrysodeixis includens*

2.5.1 Importância econômica

A falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) (Figura 7) por muito tempo foi conhecida como *Pseudoplusia includens*, até que Goater et al. (2003), após avaliarem o gênero *Pseudoplusia*, a reclassificaram para o gênero *Chrysodeixis*, sendo a classificação mais aceita atualmente

Este inseto se tornou um sério problema fitossanitário com o decorrer dos anos, apresentando vários surtos isolados ou que podem ser associados a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). Até o final da década de 1990, era considerada uma praga secundária da cultura da soja, representando uma incidência de não mais que 10% da lagarta-da-soja (MORAES et al., 1991; MOSCARDI, 1993). Entretanto, após as safras de 2000/2001 e 2001/2002, *C. includens* passou a ser considerada uma praga-chave da cultura da soja em várias regiões brasileiras (BUENO et al., 2007).

É uma praga restrita do Hemisfério Ocidental, ocorrendo desde o norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (ALFORD & HAMOND, 1982; KOGAN, 1981). No Brasil pode ser encontrada em todas as regiões produtoras, com surtos detectados com frequência no oeste da Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, associadas a campos de soja e algodão (MARSARO JUNIOR et al., 2010).

Figura 7. Lagarta de *Chrysodeixis includens* de 12 a 16 dias de idade.



Fonte: Agostini (2022)

2.5.2 Biologia e morfologia

Nos primeiros instares, as lagartas se alimentam de folhas novas com baixo teor de fibras através da raspagem, no decorrer de seu crescimento se tornam mais vorazes e destroem completamente as folhas, podendo danificar até hastes mais finas (KOGAN & COPE, 1974; STRAYER & GREENE, 1974).

Seus ovos são colocados individualmente na superfície das folhas, sendo que na maioria das vezes na parte inferior, apresentam formato globular e apresentam coloração creme-clara logo após a oviposição, passando para uma cor marrom-clara quando estes ovos estão perto da eclosão, o que ocorre após 2 a 3 dias (PETERSON, 1964).

As lagartas recém-eclodidas apresentam uma coloração verde-clara e ao decorrer de seus instares podem sofrer mudança em sua coloração, apresentando uma coloração verde-amarronzada-clara quando está se alimentando, ou uma coloração verde-limão translúcida quando a lagarta não está se alimentando, apresentando também listras longitudinais brancas e pontuações pretas (SMILOWITZ, 1973; SOSÁ-GOMEZ et al., 2010).

Após seu último instar, as lagartas se fixam na parte abaxial da folha, se transformando em pupa, que ocorre sob uma teia. A pupa apresenta uma coloração amarelo-pálida para verde-clara com pigmentação dorsal irregular 48h antes da emergência, entretanto seu padrão de coloração é altamente influenciado pelo seu tipo de alimentação, em geral, lagartas de *C. includens* alimentadas com folhas irão originar pupas com coloração verde-escuras (CANERDAY & ARANT, 1967; EICHLIN & CUNNINGHAM, 1978; SHOUR & SPARKS, 1981). Seu período pupal dura em torno de 7 a 9 dias até a emergência dos adultos (VAZQUEZ, 1988).

Os adultos de *C. includens* são de coloração escura, com duas manchas prateadas brilhantes na parte central do primeiro par de asas, sendo que as asas posteriores são de coloração marrom, medindo aproximadamente 35 mm de envergadura das asas, podendo realizar a oviposição de até 600 ovos (GALLO et al., 2002; SOSÁ-GOMEZ et al., 2010).

2.6 *Bacillus thuringiensis*

2.6.1 Aspectos gerais

Bacillus thuringiensis (Bt) (Berliner) (Bacillales: Bacillaceae) é uma bactéria gram-positiva, aeróbica, esporulante, pertencente à família Bacillaceae. Apresenta formato de bastonete e foi isolada pela primeira vez, em 1901, em *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), e posteriormente de *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), pelo pesquisador alemão Ernst Berliner (ISHIWATA, 1901; BERLINER, 1915).

Além disso, este microrganismo já foi isolado de uma grande diversidade de ecossistemas, como solo, água, matéria orgânica e insetos mortos (HÖFTE et al., 1989; KNOWLES et al., 1993; VALICENTE & BARRETO 2003, ROH et al., 2007; RAYMOND et al., 2010; PALMA et al., 2014).

Figura 8. Microscopia de contraste de fase de *Bacillus thuringiensis*, demonstrando o esporo (seta vermelha) e o cristal (seta azul).



Fonte: Agostini (2020).

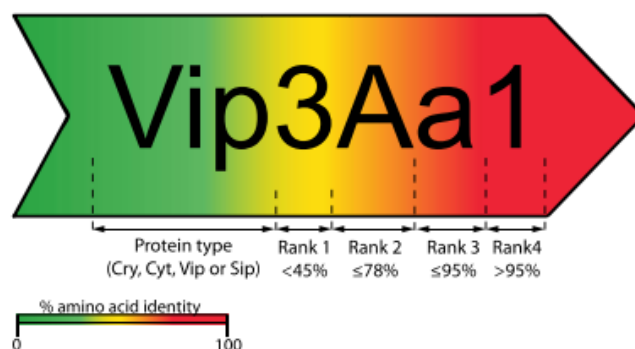
As cepas de Bt tem o potencial de produzir uma grande variedade de proteínas inseticidas que podem ser ativas contra diversas ordens de insetos (Figura 8). Isso fez com que os produtos à base de Bt a se tornassem o produto biológico mais vendido no mundo (RAYMOND et al., 1993; SCHNEPF et al., 1998; PALMA et al., 2014). Seus esporos e cristais são considerados seguros, pois não causam danos a mamíferos, organismos não-alvo e ao meio ambiente.

O ciclo de vida desse entomopatógeno pode ser dividido em duas principais fases, sendo uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria se multiplica por bipartição, e outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria pela formação de esporos. Quando o esporo se encontra em um ambiente favorável, com nutrientes e temperatura adequados, pode germinar e iniciar novamente o crescimento vegetativo (MONNERAT & PRAÇA, 2006).

As toxinas em forma de cristais proteicos são classificadas em toxinas Cry ou δ -endotoxinas, com Algarismos arábicos (1º a 4º grau), uma letra maiúscula (2º grau) e uma letra minúscula (3º grau) (PALMA, et al., 2014; CRICKMORE, et al., 2021). Esse sistema é

atribuído conforme a porcentagem de identidade de aminoácidos aos pares, em comparação com as toxinas anteriores. As proteínas *Bt* compartilham até 95% de similaridade na classificação primária, secundária e terciária (Figura 9) (CRICKMORE et al., 1998; CRICKMORE et al., 2021). Atualmente, mais de 100 classes diferentes de proteínas *Bt* foram confirmadas em todo o mundo, incluindo App, Cry, Cyt, Gpp, Mcf, Mpf, Mpp, Mtx, Pra, Prb, Spp, Tpp, Vip, Vpa, Vpb e Xpp (CRICKMORE et al., 2018; CRICKMORE et al., 2021).

Figura 9. Visão geral esquemática do sistema antigo de nomenclatura usado pelo Comitê de Nomenclatura de Toxina *Bt* para Cry e Cyt e secretáveis Vip3.



Fonte: Palma (2014).

Uma das características mais interessantes de toxinas Cry é sua especificidade determinada pela sua ligação específica às proteínas localizadas nas membranas das microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio dos insetos (BRAVO et al., 2011).

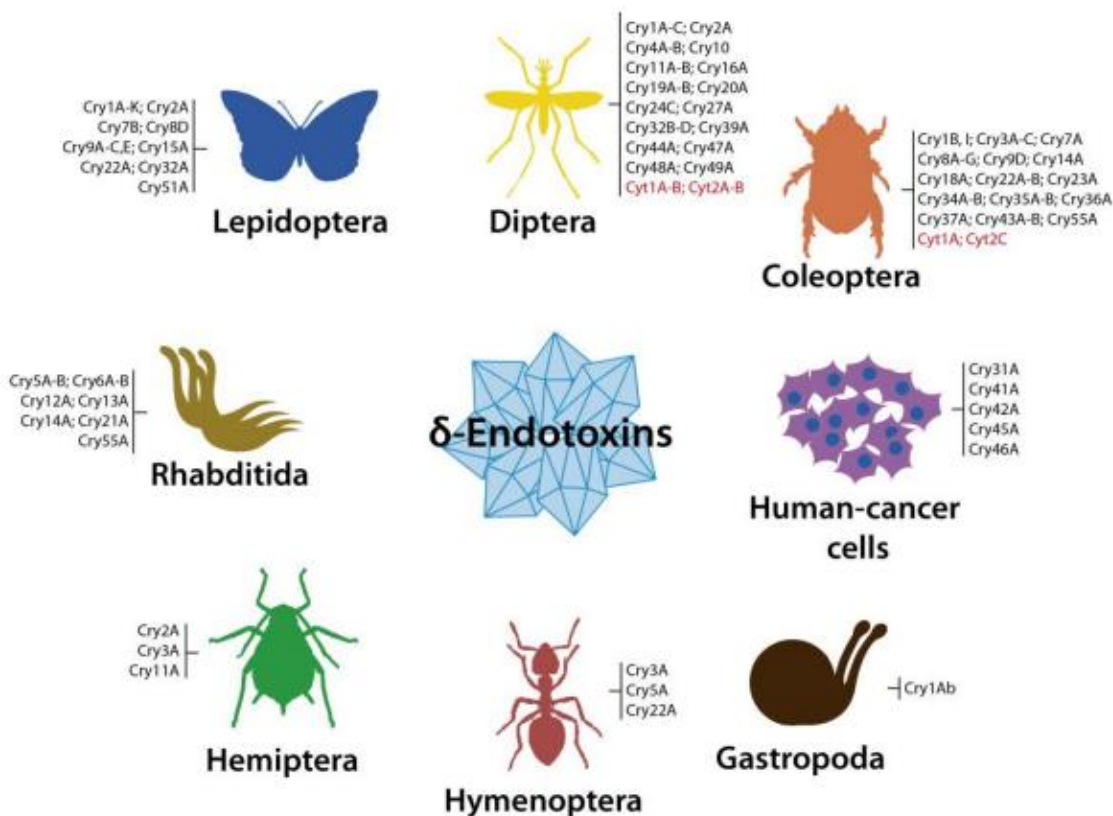
As toxinas *Bt* são altamente específicas para seus hospedeiros e ganharam importância mundial como alternativa aos inseticidas químicos. A utilização dessas proteínas inseticidas também motivou a busca por novos isolados de *Bt* nos mais diversos habitats a fim de identificar e caracterizar novas proteínas inseticidas com diferentes especificidades.

2.6.2 δ -endotoxinas

Em condições nutricionais adversas, o *Bacillus thuringiensis* interrompe sua divisão celular e inicia o processo de esporulação. Durante essa fase, são produzidas as δ -endotoxinas, também conhecidas como proteínas Cry. Essas toxinas se acumulam no compartimento da célula-mãe e, ao final da esporulação, o cristal contendo a δ -endotoxina é liberado junto com o esporo. O espectro de ação das δ -endotoxinas é geralmente restrito a algumas ordens específicas de insetos (Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera), além de nematoides

e ácaros (Figura 10) (HABIB & ANDRADE, 1998; SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al., 2007).

Figura 10. Espectro de ação de *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxinas.



Fonte: Palma (2014)

As toxinas Cry são classificadas de acordo com sua sequência primária de aminoácidos e mais de 700 diferentes sequências de genes *cry* foram classificadas em 79 grupos (*cry1* ao *cry79*) (CRICKMORE et al., 2021).

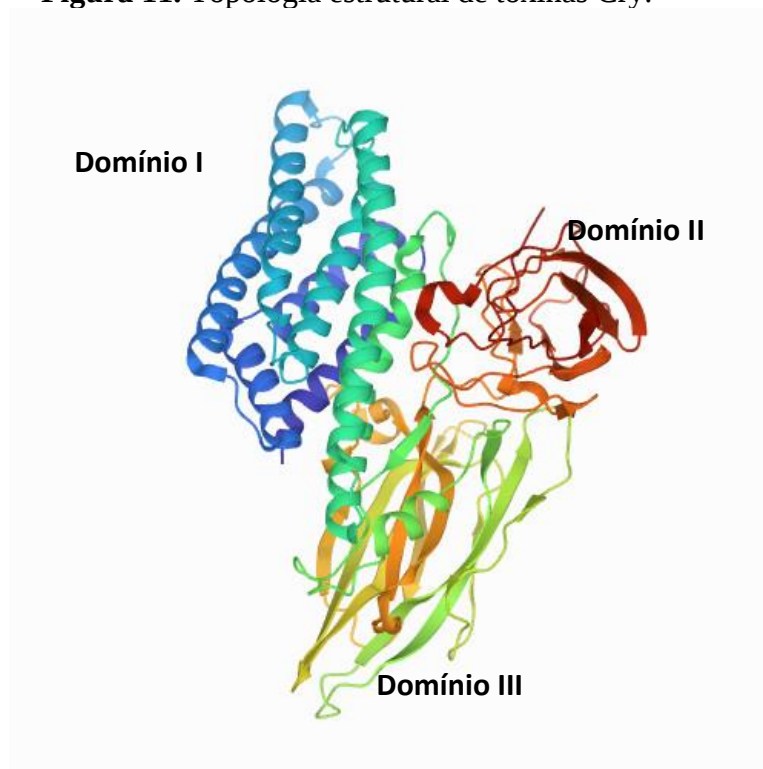
Bacillus thuringiensis pode produzir uma ou mais proteínas Cry com massa molecular variando de 40 a 140 kDa (SERAFINI et al., 2002). A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo variar de bipiramidal, cubóide, ovóide, esférica ou até mesmo não possuir forma definida (HABIB & ANDRADE, 1998; POLANCZYK & ALVES, 2003).

As toxinas Cry são compostas por uma estrutura 3-Dimensional (Figura 11), o domínio I consiste em um agrupamento de 7–8 α -hélices com α -hélice 5 localizada no centro, e os outros dois domínios são compostos por folhas β -antiparalelas dispostas em um “Greek-key” (domínio II) ou topologia “Jelly roll” (domínio III) (XU et al., 2014). Após a ingestão da

proteína Cry 3-D por um inseto, o cristal parasporal é solubilizado pelos fluidos intestinais do hospedeiro que apresentam pH alcalino, liberando uma pró-toxina de aproximadamente 120 kDa, sendo processada principalmente a partir do C-terminal por proteases digestivas intestinais a um núcleo ativo da proteína inseticida de 55–65 kDa (HECKEL, 2020). As pró-toxinas Cry 3-D mais curtas não possuem o C-terminal, sendo processadas principalmente no N-terminal. Proteínas inseticidas Cry produzidas por culturas Bt são a toxina ativada ou a forma completa de pró-toxinas mais curtas. Para atingir os enterócitos no intestino médio, as proteínas Cry ativadas precisam atravessar a matriz peritrófica, contendo carboidratos que podem se ligar e reter parte da proteína (HAYAKAWA, 2004).

Ao atingir o epitélio da membrana do intestino médio, as proteínas Cry 3-D se ligam a locais específicos considerados necessários, mas não suficientes para a toxicidade (WOLFERSBERGER, 1990). Diversas proteínas e glicoconjugados contêm sítios de ligação para toxinas Cry (PIGOTT, 2007), e evidências para a funcionalidade do receptor são relatadas para transportadores semelhantes a caderina, N-aminopeptidase, fosfatase alcalina (ADANG et al., 2014). Descobertas recentes sugerem que a ligação da proteína Cry aos transportadores ABC é crítica para alta citotoxicidade, enquanto a interação com outros receptores pode aumentar a toxicidade e, portanto, desempenhar um papel intensificador (TANAKA et al., 2013 & BRETSCHNEIDER et al., 2016). Os detalhes dos eventos pós-ligação que resultam em morte celular permanecem controversos (VACHON et al., 2012). A maioria das evidências apoia a inserção do oligômero da proteína Cry na membrana do enterócito para formar um poro seletivo de cátions que resulta em desequilíbrio osmótico e morte celular promovida pelo influxo compensatório de água através das aquaporinas (ENDO et al., 2017). A morte dos enterócitos destrói a barreira epitelial do intestino médio e permite a invasão da hemocèle pelo Bt e outras bactérias residentes no intestino, causando a morte do hospedeiro por septicemia (RAYMOND et al., 2010). Há evidências crescentes de que os domínios C-terminais das pró-toxinas Cry1A podem contribuir para a toxicidade por um mecanismo alternativo (QI et al., 2020). Embora tenham pouca ou nenhuma atividade inseticida por si só, os esporos podem contribuir para a toxicidade por meio de fatores de virulência adicionais (KALMYKOVA et al., 2009).

Figura 11. Topologia estrutural de toxinas Cry.



Fonte: Crickmore (2021).

2.6.3 Proteínas vegetativas inseticidas (VIP)

As proteínas VIPs (Vegetative Insecticidal Proteins) são produzidas por algumas cepas de Bt durante a fase vegetativa de crescimento e de esporulação, sendo consideradas a nova geração de toxinas Bt, devido as suas diferentes estruturas e propriedades moleculares (ESTRUCH et al., 1996). Por serem secretadas, não formam inclusões cristalinas e não apresentam homologia de sequência ou de estrutura com as proteínas Cry, por isso, as VIPs receberam uma nova classificação (SCHNEPF et al., 1998; BEL et al., 2017).

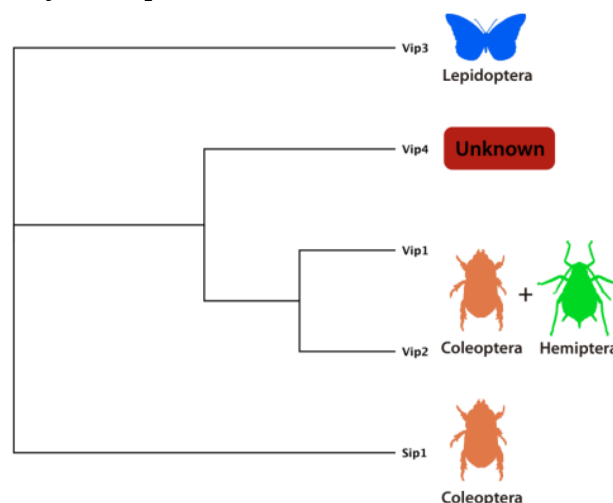
Nas proteínas Vip, temos as Vip1 e Vip2 que constituem uma toxina binária contra algumas espécies de coleópteros e hemípteros (Figura 12) (De MAAGD, et al., 2003; GENG, et al., 2019;). Os genes *vip1* e *vip2* são co-transcritos de um único operon de ~4kb e codificam proteínas de ~100 e ~50kDa (De MAAGD et al., 2003; GATEHOUSE 2008). Os primeiros genes *vip3* foram originalmente clonados a partir DNA de Bt (*vip3Aa1* e *vip3Ab1*), eles codificam proteínas e não apresentam homologia com qualquer outra proteína inseticida conhecida (ESTRUCH et al., 1996). As proteínas Vip3A exibem atividade inseticida contra uma ampla variedade de lepidópteros.

Essas proteínas são patogênicas a insetos pouco sensíveis à maioria das proteínas Cry como *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda*

(Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) (GOMIS-CEBOLLA et al., 2017). O modo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, sabe-se que a Vip3A é processada por proteases intestinais formando uma proteína de menor peso molecular que se liga a receptores específicos presentes na membrana epitelial do intestino médio, causando a lise celular. As manifestações tóxicas são semelhantes às que ocorrem com as proteínas Cry (YU et al., 1997; GOMIS-CEBOLLA et al., 2017).

Estudos sobre a ativação proteolítica de proteínas Vip3A demonstraram que as protoxinas Vip3A são clivadas para se tornarem vários fragmentos principais, geralmente incluindo fragmentos de 62-66 kDa, 45 kDa, 33 kDa e 19-22 kDa (YU et al., 1997; HAMADOU-CHARFI2013; BEL et al., 2017; BANYULS et al., 2018). O fragmento de 62 – 66 kDa do C-terminal das toxinas Vip3A foi determinado como sendo o principal produto do processamento proteolítico (BANYULS et al., 2018). Os fragmentos de 45 kDa e 33 kDa são produtos do processamento posterior do fragmento de 19 – 22 kDa e contém os primeiros 199 aminoácidos no N-terminal de Vip3A, sendo que se sugere que os fragmentos de 62 – 66 kDa no C-terminal pode ser o núcleo ativado da toxina (GAYEN et al., 2012; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; CHAKROUN et al., 2014; QUAN et al., 2019), porém estudos recentes indicam que ambos os fragmentos de 19 – 22 kDa e 62 – 66 kDa são necessários para a estabilidade e especificidade das toxinas Vip3A (BEL et al., 2020).

Figura 12. Espectro de ação das proteínas inseticidas VIP e SIP de *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: Palma (2014).

2.6.4 β -exotoxinas

As β -exotoxinas são toxinas não proteicas que podem ser produzidas por algumas estirpes de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa e secretadas no meio de cultura, também conhecidas como Thuringiensinas. São termolábeis, com baixa massa molecular. Existem dois tipos de β -exotoxinas, conhecidas como tipo I e tipo II (MALOVICHKO et al., 2019; HE et al., 2011; SÁNCHEZ-SOTO et al., 2015). A β -exotoxina tipo I é análoga de nucleotídeos de adenina, apresentando baixo peso molecular, e sua toxicidade se dá pela inibição da síntese de RNA por competição com o ATP (SEBESTA et al., 1970; DE RIJK et al., 2013; LIU et al., 2014). Diversos laboratórios utilizam da técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para detecção de β -exotoxina em amostras de formulações e fermentações, porém, essa técnica pode não detectar a presença da β -exotoxina tipo II. A β -exotoxina tipo II possui maior toxicidade que o tipo I, principalmente para coleópteros (JOHNSON & PETERSON, 1983; LEVINSON et al., 1990; PERCHAT et al., 2005; SAUKA et al., 2014; SAUKA et al. 2022).

A toxina tipo I é semelhante ao ATP, sendo composta por adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico (FARKAS et al., 1969). Sua atividade tóxica está relacionada à inibição da RNA polimerase, pois compete com o ATP, e apresenta um amplo espectro de toxicidade para diversas ordens de insetos, ácaros, nematoides e vertebrados, resultando em efeitos teratogênicos e mutagênicos (HANSEN & SALAMITOU, 2000). Por sua vez, a toxina tipo II é análoga ao UTP e é mais tóxica que a tipo I, especialmente para coleópteros (LEVINSON et al., 1990).

Devido à alta toxicidade para mamíferos, é necessário selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* que não produzam a β -exotoxina para a produção comercial (McCLINTOCK et al., 1995).

O gene *thuE* desempenha um papel crucial na detecção da β -exotoxina. Este gene codifica uma proteína que está envolvida no reconhecimento e ligação da β -exotoxina, compreender o mecanismo pelo qual o gene *thuE* funciona na detecção da β -exotoxina é essencial para o desenvolvimento de estratégias para neutralizar os efeitos tóxicos do *Bacillus thuringiensis* e para aumentar a segurança das práticas agrícolas e ambientais.

2.6.5 Plantas geneticamente modificadas expressando *Bacillus thuringiensis*

A biotecnologia deu novos rumos ao Bt possibilitando o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas que expressem as toxinas Cry, facilitando o controle de insetos (SOBERÓN et al., 2009). Em meados dos anos 90 iniciou a comercialização de plantas

transgênicas a empresa Calgene comercializou o tomate FLAVR-SAVR, para retardar seu amadurecimento pós-colheita. De 1996 a 2019 foram plantadas um total de 2.7 bilhões de hectares de cultivos geneticamente modificados em 29 países (ISAAA, 2021). As primeiras variedades comerciais de culturas transgênicas resistentes a insetos expressavam proteínas Cry com atividade específica contra Lepidópteros praga, como o algodão Bollgard® desenvolvido pela Monsanto expressando Cry1Ac e o milho desenvolvido pela Syngenta expressando Cry1Ab. Posteriormente, outras toxinas como a Cry1F e Cry2Ab2 foram piramidadas em uma única variedade - algodão Widestrike desenvolvido pela Dow Agrosciences expressando Cry1F e Cry1Ac e o Bollgard II desenvolvido pela Monsanto expressando Cry1Ac e Cry2Ab2 (JAMES, 2010 & GATEHOUSE et al., 2011).

Toxinas Cry3 com atividade contra Coleópteros-praga também foram utilizadas em culturas transgênicas, particularmente no milho como o Yieldgard desenvolvido pela Monsanto expressando Cry3Bb1, o milho Herculex RW desenvolvido pela Dow Agrosciences expressando Cry34Ab1 e Cry35Ab1 e o milho Agrisure RW da Syngenta. A Syngenta também lançou, em 2011, o milho Agrisure Viptera, a primeira variedade a explorar uma proteína não Bt a Vip3 (JAMES, 2010 & GATEHOUSE et al., 2011).

Após mais de 20 anos de implantação, o maior percentual de área com plantas geneticamente modificadas permanece distribuídos em algumas regiões como a América do Norte com 81,6 milhões de hectares (33%), América do Sul com 76,4 milhões de hectares (31%), Ásia com 73,8 milhões de hectares (30%), África com 9,2 milhões de hectares (4%) e Europa com 5 milhões de hectares (2%), sendo que as culturas mais cultivadas com Bt são o milho com 73,6 milhões de hectares (30%), algodão 66,8 milhões de hectares (27%), soja 52,1 milhões de hectares (21%), berinjela 3 milhões de hectares (21%), além de outras culturas 30,5 milhões de hectares (12%) (ISAAA, 2022). Culturas que expressam toxinas de Bt têm demonstrado substanciais benefícios ambientais e econômicos para os agricultores em vários países, reduzindo o número de aplicação de inseticidas e aumento da produtividade.

2.6.6 Resistência de *Bacillus thuringiensis*

Os bioinseticidas Bt consistem em vários tipos de proteínas cristalinas inseticidas, portanto, o desenvolvimento de resistência ocorre de forma lenta e difícil (FIUZA et al., 2017). A resistência desenvolvida no campo dos insetos é definida como uma diminuição geneticamente baseada na suscetibilidade de uma população a uma toxina causada pela exposição da população à toxina no campo. O principal objetivo do monitoramento da

resistência dos insetos às culturas Bt é detectar a resistência com antecedência suficiente para permitir a tomada de medidas preventivas antes que ocorram falhas (TABASHNIK, 1994).

Fortes evidências de resistência às toxinas Bt desenvolvida em campo em culturas transgênicas foi relatada para populações de três insetos noctuídeos; *Busseola fusca*, *H. zea* e *S. frugiperda*. A resistência às toxinas Bt em *S. frugiperda* presente no milho foi documentada em Porto Rico ao Cry1F (STORER et al., 2010), no Brasil ao Cry1F (FARIAS et al., 2014) e Cry1Ab (OMOTO et al., 2016), na Argentina para Cry1F (CHANDRASENA et al., 2018), e no sudeste dos EUA para Cry1F (HUANG et al., 2014; LI et al., 2016). A resistência de *S. frugiperda* ao milho Bt simples e piramidal pode resultar em resistência cruzada com outras culturas Bt (HORIYOSHI et al., 2016; HERRERO et al., 2016; MACHADO et al., 2020).

A resistência desenvolvida no campo do milho Bt que expressa Cry1Ab foi documentada por Van Rensburg em uma população de *B. fusca*, na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007). Uma segunda população resistente de *B. fusca* ao milho Bt foi detectada em outra área na África do Sul (KRUGER et al., 2009). A porcentagem de agricultores relatando danos médios ou severos ao milho Bt de *B. fusca* aumentou de 2,5% na safra de 2005–2006 para 58,8% na safra de 2007–2008. Nos EUA, a resistência de campo de *H. zea* ao algodão Bt produtor de Cry1Ac foi notada em algumas populações do inseto em 7–8 anos no sudeste dos EUA (LUTTREL & ALI, 2007). Na China, evidências de resistência desenvolvida em campo ao algodão Bt que expressa Cry1Ac foram detectadas em populações de *H. armigera* (LIU et al., 2010). Também foi documentada que *P. gossypiella* poderia desenvolver resistência no algodão Bt que produz Cry1Ac em quatro distritos da Índia. Como solução para este problema a empresa produziu outro algodão Bt expressando Cry1Ac + Cry1Ab (BAGLA, 2010).

Em contraste, fortes evidências de suscetibilidade às toxinas Bt em culturas transgênicas foram relatadas para populações de *H. armigera*, *Heliothis virescens*, *H. punctigera*, *Pectinophora gossypiella*, *Ostrinia nubilalis* em milho e algodão Bt (GAHAN et al., 2001; CACCIA et al., 2010; COATES et al., 2015; TAY et al., 2015).

2.6.7 Sequenciamento genômico de *Bacillus thuringiensis*

A melhoria dos inseticidas a base de *B. thuringiensis* depende da combinação de várias toxinas, da identificação de novas cepas, e da busca por genes que codificam novas proteínas com propriedades e especificidades inseticidas promissoras. Para isso, novos isolados são testados regularmente e com o avanço das técnicas de sequenciamento, muitos laboratórios realizam o sequenciamento do genoma completo das cepas de Bt que apresentem alta

toxicidade, acelerando a identificação de novos genes que potencialmente codificam fatores de virulência e toxicidade (HE et al., 2011).

Técnicas como a reação em cadeia de polimerase (PCR) ou uma combinação de técnicas de PCR e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) são utilizadas visando a caracterização de cepas de Bt para identificar genes que possam apresentar atividade inseticida (KUO et al., 1996; BRAR et al., 2006; LIU, et al., 2007; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; TAN et al., 2009; PALMA et al., 2013), porém estas técnicas são limitadas, pois identificam principalmente alelos de genes previamente descritos, novos genes geralmente exibem apenas um pequeno número de substituições sinônimas ou não sinônimas e codificam proteínas idênticas ou ligeiramente diferentes em comparação com alelos descritos anteriormente, provavelmente com toxicidade e hospedeiros semelhantes. Além de produzirem somente uma fração de sequência do gene, são necessárias diversas estratégias, que demandam tempo para a construção de bibliotecas genômicas para obtenção de uma única sequência completa (KUMAR et al., 2012; PALMA, 2014).

Atualmente estão disponíveis cerca de 781 genomas de diferentes cepas de Bt depositados em um banco de dados chamado National Center for Biotechnology Information (NCBI), responsável por armazenar dados provenientes de sequenciamentos genômicos em seu banco de dados. Este banco tem o objetivo de desenvolver novas informações para compreensão dos processos moleculares e genéticos, criando um sistema automatizado para armazenamento e análise de dados (NCBI, 2022).

A procura de cepas promissoras com atividade tóxica a diferentes insetos-praga tornou-se um objetivo de diversos trabalhos. Para isso diversas técnicas de sequenciamento têm sido adotadas, como os sequenciadores de nova geração ou SNG, cada vez mais genomas de Bt tem sido sequenciado, auxiliando assim nas descobertas e identificação de novos genes presentes nos genomas de Bt. Estes SNG fornecem uma estrutura rápida e confiável para a obtenção de sequências genômicas completas. Suas sequências podem ser montadas em contigs utilizando um computador comum, por softwares de bioinformática para montagem *De novo* ou montagem guiada por referência (HERNANDEZ et al., 2008).

A montagem de novo envolve a montagem do genoma sem depender de um genoma de referência, enquanto a montagem guiada por referência utiliza um genoma de referência conhecido como uma estrutura para alinhar as sequências curtas de DNA (WONG, 2019). Esta montagem do genoma pode ser desafiadora devido à sua natureza complexa, sequências repetitivas e possíveis variações genômicas. Porém esta ferramenta pode apresentar limitações da montagem como a necessidade de novas ferramentas de software que possam superar as

limitações técnicas das tecnologias de sequenciamento, bem como a dificuldade em reconstruir com precisão segmentos repetitivos de DNA. Além disso, a precisão e a qualidade da montagem podem ser afetadas por fatores como erros de sequenciamento, cobertura irregular e presença de contaminantes de DNA estranhos. Uma possível limitação do uso de bancos de dados de genoma de referência é que eles podem não conter todas as informações necessárias para caracterizar com precisão os micróbios que não possuem representantes culturais intimamente relacionados (ALKAN et al., 2011; HE et al., 2018; WANG et al., 2018; GU et al., 2018).

O genoma do Bt pode variar entre 2,4 a 6,9 Mb possuindo aproximadamente 34% de conteúdo G+C. Cerca de 10 a 20% de seu DNA pode ser composto por plasmídeos, que representa elementos genéticos extracromossomais que carregando importantes genes de virulência que podem variar de quantidade e tamanho. Um perfil plasmídico padrão parece estar relacionado com cada cepa. Podem ser reconhecidos dois grupos diferentes de plasmídeos: aqueles que têm ≤ 30 MDa e aqueles que têm ≥ 30 MDa, sendo estes últimos chamados de megaplasmídeos. Cada grupo é dividido de acordo com a visualização das bandas cromossômicas em gel de agarose, plasmídeos menores ficam abaixo e megaplasmídeos ficam acima (RAMÍREZ et al., 2008). Cada plasmídeo se distingue por seu papel na transferência horizontal de DNA e/ou pelos genes que carrega, cuja função e papel permanecem em sua maioria enigmáticos. Já para os megaplasmídeos sua principal função reconhecida é abrigar genes *cry* (BERRY et al., 2002; LOEZA-LARA et al., 2005; ROH et al., 2007; DE VOS et al., 2011; FAGUNDES et al., 2011; ZHENG et al., 2013; VALICENTE et al., 2017; FIEDORUK et al., 2017; GILLIS et al., 2018).

A predição e anotação dos genes inseticidas podem ser realizadas utilizando o Blast, a fim de realizar buscas e comparar sequências biológicas contra um banco de dados que contém uma abundância de informações, retornando sequências mais similares a pesquisa realizada com a utilização de um banco de dados personalizados (PALMA, et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Selecionar e caracterizar molecularmente cepas de *Bacillus thuringiensis* provenientes do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo que promovam alta mortalidade ($\geq 90\%$) dos insetos-praga *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmíodes*, *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar cepas de *B. thuringiensis* presentes no Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo quanto à taxa de mortalidade dos insetos-alvo;
- Selecionar cepas que apresentem mortalidade simultânea acima de 90% para os lepidópteros-praga *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. cosmioides*, *H. armigera* e *C. includens*, que não produzam β -exotoxinas;
- Sequenciar o genoma das cepas de *B. thuringiensis* mais eficientes no controle dos insetos-alvo;
- Identificar genes inseticidas presentes nos genomas das cepas mais eficientes no controle de insetos-alvo.

4. JUSTIFICATIVA

A utilização de plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas Bt proporcionam uma efetiva redução nos danos causados por insetos-praga e a redução do número de aplicações de agroquímicos. No entanto, com o rápido desenvolvimento da resistência pelos insetos, essa tecnologia sofre constantes desafios, tornando a busca por novas proteínas que promovam uma alta atividade inseticida uma necessidade. Com a grande variabilidade e a rica biodiversidade do Brasil, a análise da diversidade de *B. thuringiensis* se torna um ponto principal para serem evidenciadas novas cepas que apresentem um alto nível de mortalidade em insetos-praga. O Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo — Sete Lagoas/MG possui aproximadamente 4.600 cepas de *B. thuringiensis* isoladas de diversas regiões do Brasil (VALICENTE & BARRETO, 2003), estas cepas necessitam da identificação dos genes inseticidas para serem utilizadas como bioprodutos, demonstrando a importância desta ferramenta para prospecção de novos genes e/ou cepas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos bioprodutos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

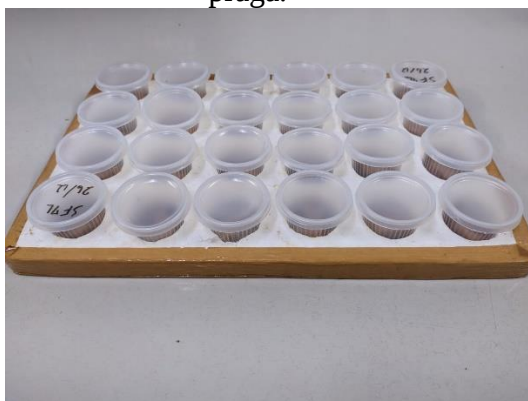
5.1 SELETIVIDADE DE CEPAS

5.1.1 Criação e manutenção da população dos insetos *Spodoptera frugiperda*, *S. eridania*, *S. cosmioides*, *Helicoverpa armigera* e *Chrysodeixis includens*.

As lagartas utilizadas foram coletadas em campo e transportadas para o 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 proposta por Greene et al. (1976), em copos plásticos com capacidade de 50 mL e vedados com tampas de plástico (Figura 13) até a formação de pupas (VALICENTE & BARRETO, 2003).

Figura 13. Suporte plástico utilizado para apoio dos copos de criação massal de lepidópteros-praga.



Fonte: Agostini (2022).

As pupas foram mantidas em copos plásticos 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 ± 2 °C; fotofase 12 horas. A cada três dias as posturas foram coletadas e transferidas para sacos plásticos incubados em BOD com 25 ± 2 °C; fotofase 12 horas até a eclosão. Uma parte das lagartas recém-eclodidas foi utilizada para os bioensaios e o restante foi utilizado para manutenção da criação.

5.1.2 Cepas de *Bacillus thuringiensis*

As cepas de *B. thuringiensis* utilizadas neste trabalho foram obtidas do Banco de Microrganismos Entomopatogênicos da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG (Tabela 1). Foram selecionadas 80 cepas de forma aleatória. Estas cepas foram previamente isoladas, de diferentes regiões do Brasil (Valicente & Barreto 2003).

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

Cepa	Origem	Cepa	Origem	Cepa	Origem
594A	Guapé, MG	1124C	Rio Verde, GO	1297D1	Sta Helena, GO
681	Pereira Barreto, SP	1130E	Jataí, GO	1305A	Prudente de Moraes, MG
732D	Assis, SP	1132A	Rio Verde, GO	1355	Sete Lagoas, MG
718	Água Clara, MS	1109F	Rio Verde, GO	1373D	São Miguel dos Campos, AL
845F	Viçosa, MG	1109G	Rio Verde, GO	1373E	São Miguel dos Campos, AL
939F	Teixeiras, MG	1110I	Rio Verde, GO	1380B	Simão Dias, SE
941FC	Sacramento, MG	1115C	Rio Verde, GO	1386A	Maceió, AL
1074F	Coqueiral, MG	1130G	Jataí, GO	1387B	São Miguel dos Campos, AL
1090C	Boa Esperança, MG	1139E	Rio Verde, GO	1395A	Poço Verde, SE
1090G	Boa Esperança, MG	1165E	Rio Verde, GO	1401B	Pesqueira, PE
1099G	Guapé, MG	1166C	Rio Verde, GO	1402D	Sem Localização
1092A	Coqueiral, MG	1181D	Rio Verde, GO	1415D	São Domingos, SE
1110A	Rio Verde, GO	1243J	Sta Helena, GO	1416L	Caruaru, PE
1120G	Sta Helena, GO	1243J1	Sta Helena, GO	1440A	Arapiraca, AL
1121C	Jataí, GO	805DA	Viçosa, MG	1519A	Sem Localização
1124E	Rio Verde, GO	806BA	Ervália, MG	1529E	Sem Localização
1120F	Sta Helena, GO	1290F	Rio Verde, GO	1564E	Sem Localização
1124B	Rio Verde, GO	1290G	Rio Verde, GO	1571A	Prud de Moraes, MG
1581C	Prud de Moraes, MG	1651	Jaboticabal, SP	1753R	Jataí, GO
1583C	Prud de Moraes, MG	1660	Jaboticabal, SP	1754L	Portelândia, GO
1893C	Prud de Moraes, MG	1672	Jaboticabal, SP	1754M	Portelândia, GO
195E	Juarez Távora, PB	1674	Jaboticabal, SP	1756B	Montividiu, GO
1604A	Amazonas	1675	Maceió, AL	1755H	Portelândia, GO
1604B	Amazonas	1625	Sem localização	1756C	Montividiu, GO
1604C	Amazonas	1625C	Sem localização	1756D	Montividiu, GO
1604D	Amazonas	1680C	Sem localização	1730A	Rio Verde, GO
1725B	Rio Verde, GO	1715C	Itumbiara, GO		

Fonte: Banco de microrganismos - Embrapa Milho e Sorgo (2022)

5.1.3 Bioensaios de mortalidade

Cada cepa de *B. thuringiensis* foi cultivada em placas de Petri contendo 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) acrescido de sais minerais (0,002 g de FeSO₄, 0,002 g de ZnSO₄, 0,02 g de MnSO₄, 0,3 g de MgSO₄ e 2% de glucose) (VALICENTE & MOURÃO, 2008) e 12 g de ágar bacteriológico (pH 7,5) em 1000 mL de água deionizada autoclavada, em estufa a 28 ± 2 °C durante 72 h ou até sua total esporulação. A completa esporulação foi confirmada por microscopia de contraste de fase pela visualização dos esporos e cristais. Em seguida, as

placas foram raspadas e toda massa celular foi transferida para tubos cônicos de 15 mL contendo um total de 10 mL de água deionizada autoclavada com Tween 20[®] 0,1% (v/v). Os bioensaios foram realizados com a adição de 150 µL da suspensão bacteriana na concentração de 1×10^8 esporos/mL sobre a superfície da dieta artificial (1 cm³) específica para cada inseto armazenada em copos plásticos de 50 mL. Após a secagem completa da solução bacteriana na dieta, uma lagarta neonata foi adicionada em cada copo. Os bioensaios foram mantidos em sala climatizada a 25 ± 2 °C com umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 12:12 (luz: escuro), e a mortalidade foi mensurada de 3 a 7 dias após a inoculação e como controle negativo foi utilizado somente água deionizada autoclavada com Tween 20[®]. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições por tratamento, cada repetição contendo 16 lagartas. Os resultados foram submetidos a análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o software SISVAR[®] (FERREIRA, 2019). Foram consideradas tóxicas e utilizadas para os experimentos posteriores as cepas que atingiram mortalidade acima de 90% para todas as espécies testadas.

5.1.4 Bioensaios de β -exotoxinas

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo adicionando 10 µL da cepa de Bt em 10 mL de meio de cultura LB acrescido de sais. Após serem cultivados a 28 °C, 250 rpm por 16 h, foi realizada a contagem do número de células por câmara de Neubauer em microscópio de contraste de fase. Uma alíquota do pré-inóculo foi acrescentada a 50 mL de meio de cultura LB acrescido de sais de modo que a concentração inicial fosse de 1×10^6 células/mL e cultivada durante 144 h sob as mesmas condições citadas anteriormente. Posteriormente, a cultura foi centrifugada em tubos cônicos de 50 mL a 5.000 rpm por 20 min, o sobrenadante foi autoclavado a 121 °C durante 20 min e após esse tempo foi realizada a filtração com filtros de 0,45 µm e 0,22 µm e armazenado a -20 °C até seu uso.

Pedaços de dieta artificial de aproximadamente 1 cm³ foram colocados em copos plásticos de 50 mL e 150 µL do sobrenadante da cultura bacteriana foi colocada superficialmente sobre a dieta. Após total secagem, uma neonata de *S. frugiperda* foi adicionada. Cada tratamento consistiu em 4 repetições, contendo 24 lagartas por repetição. Água deionizada autoclavada foi utilizada como controle negativo e para o controle positivo foi utilizada a cepa HD-125 produtora de β -exotoxina.

A avaliação de mortalidade e a pesagem das lagartas foram efetuadas 8 dias após a montagem do bioensaio. Os dados foram submetidos a análise, sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância em software SISVAR[®] (FERREIRA, 2019).

5.1.5 Extração de DNA genômico de *Bacillus thuringiensis*

As cepas de *B. thuringiensis* que apresentaram mortalidade acima de 90% para as espécies testadas foram selecionadas para análises moleculares. Para extração do DNA genômico de Bt foi utilizado o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante. Para extração foi utilizado culturas crescidas a 28 ± 2 °C por 16 h sob agitação 220 rpm. A qualidade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e sua concentração e pureza foram mensuradas por espectrometria UV/Vis utilizando NanoDrop[®] ND-1000 (Thermofisher, EUA).

5.1.6 Detecção do gene *thuE* através de PCR

A detecção de β -exotoxinas em cepas de Bt também foi realizada a análise de PCR com o DNA das cepas selecionadas com *primers* específicos para detecção do gene *thuE*, sendo associado a produção de β -exotoxinas do tipo I. Para isso foram utilizados oligonucleotídeos BEF (5'-GCGGCAGCCGTTTATTCAAA-3') e BER (5' - CCCCTTCCCATGGAGAAACA-3'), além de BEF1 (5'-CAGTAAAAGGCCCATTTGGAA-3') e BER1 (5'-TTCCATGAATTTGCCGATTT-3') (SAUKA et al., 2014). As reações de amplificação foram elaboradas num volume final de 25 μ L contendo tampão 1X, 2 mM de MgCl₂, 0,125 mM de dNTP, 0,5 mM de cada oligonucleotídeos, 2 U de Taq DNA polimerase, 10 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em Termociclador Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA). As condições para amplificação foram: desnaturação inicial 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento 54 °C por 1 minuto e extensão 72 °C durante 1 minuto; extensão final 72 °C por 5 min. Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) e comparadas com marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen, USA).

5.1.7 Sequenciamento genômico

Para o sequenciamento genômico foram selecionadas quatro cepas que apresentaram mortalidade $\geq 90\%$ para todos os lepidópteros-praga testados. Para isso, uma alíquota de 50 μ g de DNA foi liofilizada e enviado para BGI Hong Kong (Beijing Genomics Institute) para as etapas de preparação das bibliotecas de DNA e sequenciamento. O sequenciamento foi

realizado através de plataforma NGS com tecnologia DNBSEQ™ a partir de *paired-end* com fragmentos de 2 × 150 pb segundo o protocolo do sistema Illumina HiSeq, as leituras com baixa qualidade do sequenciamento (com bases consecutivas cobertas por menos de cinco leituras) foram descartadas.

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

5.1.8 Identificação de genes que codificam proteínas

A identificação dos genes inseticidas presentes no genoma das cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C de *Bacillus thuringiensis* foi realizada utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997). O alinhamento local foi feito a partir de um banco de dados de sequências de genes que codificam proteínas inseticidas, disponível em <http://www.btnomenclature.info>. Os parâmetros avaliados incluíram a porcentagem de identidade, o tamanho do alinhamento, a quantidade de mismatches e gaps, além do e-value e bit score.

A fase aberta de leitura (ORFs - open reading frames) dos genes inseticidas encontrados, assim como a quantidade de nucleotídeos, aminoácidos e suas sequências, foi obtida pelo ORFfinder (ROMBEL et al., 2002). Em seguida, foi realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos utilizando o programa Clustal Ômega na plataforma UNIPROT para avaliar as diferenças entre os aminoácidos e anotar os SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) (THE UNIPROT CONSORTIUM, 2021). Para avaliar características físico-químicas, como a massa da proteína (kDa), utilizou-se o programa ProtParam na plataforma EXPASY (GASTEIGER et al., 2005).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Seleção de cepas de *Bacillus thuringiensis* por bioensaios de mortalidade

A avaliação da mortalidade foi realizada através da observação da coloração escura, aspecto seco e tamanho diminuto das lagartas. As cepas foram separadas quanto a sua toxicidade em grupos (Tabela 2). Dentre as 80 cepas de Bt testadas, 11% das cepas testadas (Grupo IV) apenas nove apresentaram mortalidade superior a 75% em todas as espécies testadas, destas, somente quatro foram selecionadas para os bioensaios posteriores (1074F, 1090G, 1139E e 1166C) por apresentarem mortalidade acima de 90% para as lagartas *S.*

frugiperda, *S. cosmioides*, *S. eridania*, *C. includens* e *H. armigera*, demonstrando grande potencial para serem utilizadas em experimentos posteriores (Fig. 14).

Tabela 2. Grupos de cepas de *Bacillus thuringiensis* baseados na toxicidade contra lepidópteros-pragas *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.

Grupo	Toxicidade contra insetos-praga em % de mortalidade	Nº de cepas	% de cepas
I	0 – 25	67	82,71
II	25,1 — 50	3	3,7
III	50,1 — 75	2	2,46
IV	75,1 — 100	9	11,11

Tabela 3. Mortalidade média (%) de cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas em bioensaios de seletividade em *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Crisodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.

CEPA	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
1090G	95,31 a	96,87 a	100 a	100 a	95,31 a
1166C	93,75 a	95,31 a	100 a	100 a	93,75 a
1139E	92,18 a	93,75 a	100 a	100 a	93,75 a
1074F	89,06 a	92,18 a	100 a	100 a	90,62 a
1660	87,5 a	81,25 a	100 a	100 a	90,62 a
1110A	82,81 a	81,25 a	96,87 a	100 a	89,58 a
1181D	81,25 a	78,12 a	95,31 a	100 a	89,06 a
1124B	79,68 a	75 ab	84,37 a	100 a	79,68 a
1090C	79,68 a	73,43 ab	79,68 a	98,43 a	79,68 a
1092A	70,31 ab	65,62 b	78,12 a	89,06 a	76,56 ab
1099G	65,62 b	64,06 b	75 ab	84,37 a	59,37 b
1355	31,25 c	28,12 c	37,5 c	50 b	31,25 c
1115C	26,56 c	18,75 c	21,87 c	23,43 c	26,56 c
1109G	26,56 c	17,18 c	14,06 c	23,43 c	14,06 c
1725B	25 c	14,06 c	12,5 c	20,31 c	14,06 c
939F	25 c	14,06 c	12,5 c	17,18 c	14,06 c
1571A	18,75 c	12,5 c	12,5 c	15,62 c	12,5 c
1130G	18,75 c	12,5 c	10,93 c	12,5 c	12,5 c
1415D	15,62 c	12,5 c	10,93 c	12,5 c	10,93 c
1395A	15,62 c	12,5 c	10,93 c	10,93 c	10,93 c
1121C	15,62 c	10,93 c	10,93 c	10,93 c	10,93 c
1109F	12,5 c	10,93 c	9,37 c	10,93 c	9,37 c
1756B	10,93 c	10,93 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c
1416L	10,93 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c

Tabela 3. Mortalidade média (%) de cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas em bioensaios de seletividade em *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Crisodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.

(Continua)

CEPA	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
1674	9,37 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c
1529E	9,37 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c	9,37 c
1440A	9,37 c	9,37 c	7,81 c	9,37 c	7,81 c
1380B	9,37 c	7,81 c	6,25 c	9,37 c	7,81 c
1124E	9,37 c	7,81 c	6,25 c	9,37 c	7,81 c
1120F	9,37 c	7,81 c	6,25 c	7,81 c	6,25 c
941FC	9,37 c	7,81 c	6,25 c	7,81 c	6,25 c
1755H	7,81 c	7,81 c	4,68 c	7,81 c	6,25 c
1680C	7,81 c	7,81 c	4,68 c	6,25 c	6,25 c
1581C	7,81 c	6,25 c	4,68 c	6,25 c	6,25 c
1386A	7,81 c	6,25 c	4,68 c	6,25 c	6,25 c
1132A	7,81 c	6,25 c	4,68 c	4,68 c	6,25 c
1130E	7,81 c	4,68 c	4,68 c	4,68 c	6,25 c
1124C	7,81 c	4,68 c	4,68 c	4,68 c	4,68 c
681	7,81 c	4,68 c	3,12 c	4,68 c	4,68 c
594^a	7,81 c	3,12 c	3,12 c	3,12 c	4,68 c
1715C	6,25 c	1,56 c	1,56 c	0 d	0 d
1893C	6,25 c	1,56 c	0 d	0 d	0 d
1519A	6,25 c	1,56 c	0 d	0 d	0 d
1402D	6,25 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1373E	6,25 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1305A	6,25 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1120G	6,25 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1529E	4,68 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1440A	4,68 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1380B	3,12 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1124E	3,12 c	0 d	0 d	0 d	0 d
1120F	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
941FC	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1755H	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1680C	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1581C	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1625	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1675	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1672	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1651	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1604D	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1604C	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1604B	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1604A	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1583C	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d

Tabela 3. Mortalidade média (%) de cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas em bioensaios de seletividade em *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Crisodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*.

(Conclusão)					
CEPA	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Chrysodeixis includens</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>
1564E	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1401B	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1387B	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1373D	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1297D1	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1290G	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1290F	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
806BA	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
805DA	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1243J1	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1243J	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1165E	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
1110I	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
845F	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
718	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d

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

Das cepas testadas, 82,71% apresentaram baixa mortalidade (0 – 25%) contra os insetos-praga testados, três cepas (3,7%) apresentaram baixa toxicidade, causando mortalidade de 25,1 – 50% e duas cepas (2,46%) foram moderadamente tóxicas (50,1 – 75%) (Tabela 2). Essa variação pode ocorrer devido à alta especificidade do modo de ação do Bt aos organismos alvos (GRANADO et al., 2001; FRANKENHUYZEN, 2009; MELO et al., 2016; EL-GHANY et al., 2017; LEETACHEWA et al., 2018). A proporção de cepas com alta toxicidade para diferentes espécies de insetos-praga é geralmente baixa, pela sua alta especificidade para o controle de insetos-praga (APAYDIN, et al., 2003; FRANKENHUYZEN, et al., 2009; VALICENTE et al., 2010, ABDELKEFI-MESRATI, et al., 2011 AZZOUZ, et al., 2015; FERNÁNDEZ-CHAPA, et al., 2018; WANG, et al., 2018).

Os resultados demonstram que nove cepas apresentam alta atividade inseticida (75 – 100% de mortalidade) contra as espécies de lepidópteros-praga testadas. A diferença na porcentagem de mortalidade das espécies pode ser devido à diferença entre os receptores específicos presentes no epitélio intestino médio dos insetos, uma vez que estes receptores são específicos para a funcionalidade das toxinas Bt, sendo essencial para sua atividade tóxica (BRAVO et al., 2007; PARDO-LÓPEZ et al., 2013; WANG et al., 2018). Além disso, a composição do pH intestinal dos insetos, e a atividade do intestino médio podem afetar a

solubilização ou o processamento proteolítico das toxinas Cry, levando a variações na suscetibilidade destas toxinas (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011; TALAEI-HASSANLOUI et al., 2013; DAQUILA et al., 2019).

As cepas de Bt são atraentes contra várias pragas de insetos devido às suas diversas propriedades inseticidas, diversidade genética e potencial para controle biológico. Isolados de Bt exibem um amplo espectro de atividade inseticida contra lepidópteros-praga, com algumas cepas causando 100% de mortalidade larval em várias espécies (GOTHANDARAMAN et al., 2022; KHURSHID et al., 2022; RANI et al., 2023). A produção de endotoxinas como as proteínas Cry pelas cepas Bt as torna eficazes contra diferentes ordens de insetos, incluindo lepidópteros, dípteros e coleópteros (HASSAN et al., 2021). Além disso, a modificação genética das cepas de Bt levou ao desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas (culturas Bt) que reduzem a necessidade de pesticidas químicos, beneficiando tanto os agricultores quanto o meio ambiente. Essas proteínas Cry, como Cry1Ac, Cry1F, Cry2Ab, Cry3A e VIP3Aa são as principais toxinas inseticidas usadas em culturas Bt, como algodão, milho e soja, para o controle eficaz de pragas (KAUR, 2012; CARRIÈRE et al., 2015; TETREAU et al., 2017; REN et al., 2021).

6.2 Bioensaios de produção de β -exotoxina e detecção do gene *thuE* através de PCR

As cepas de Bt 1074F, 1090G, 1139E e 1166C causaram mortalidade $\geq 90\%$ em lagartas neonatas de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. cosmioides*, *C. includens* e *H. armigera* foram selecionadas para os bioensaios de avaliação de produção de β -exotoxinas.

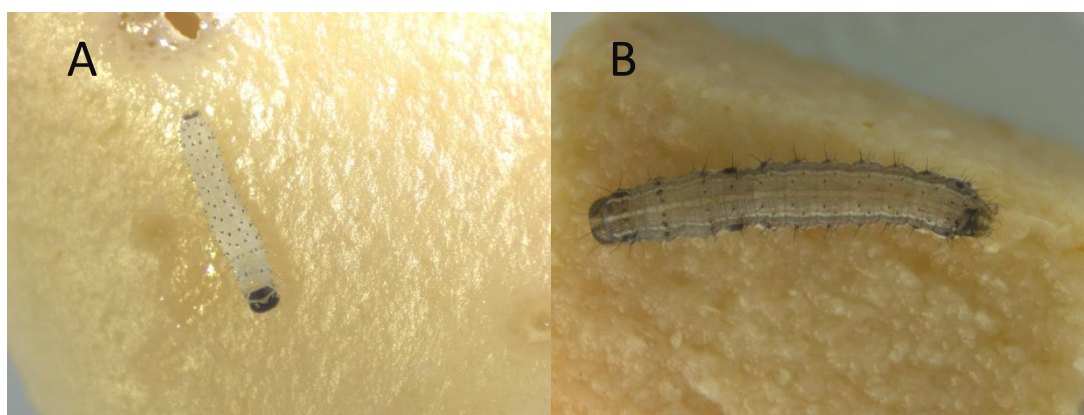
A ausência da produção de β -exotoxina foi avaliada com base em bioensaios de mortalidade e peso de lagartas vivas (Figura 14) (Tabela 3), quando comparadas as médias de mortalidade e peso dos tratamentos, os resultados da cepa HD-125 (controle positivo). Nenhuma das cepas avaliadas produziu β -exotoxina.

Tabela 3. Mortalidade e peso de lagartas de *Spodoptera frugiperda*, alimentadas com dieta artificial contendo sobrenadante autoclavado de cepas de *Bacillus thuringiensis* para avaliação da produção de β -exotoxina.

TRATAMENTO	MORTALIDADE (%)*	PESO (mg)*
HD-125 (+)	46,875 $\pm$ 6,50b	0,53 $\pm$ 0,06c
CONTROLE (-)	1,5625 $\pm$ 1,56a	59,88 $\pm$ 6,0ab
1074F	1,5625 $\pm$ 1,56a	106,8 $\pm$ 15,0a
1090C	1,5625 $\pm$ 1,56a	83,08 $\pm$ 5,0ab
1139E	1,5625 $\pm$ 1,56a	102,15 $\pm$ 6,0a
1166C	4,6875 $\pm$ 1,5625a	88,84 $\pm$ 4,0ab
1115C	6,2583 $\pm$ 1,625a	263,1 $\pm$ 16,0a
1130G	6,2583 $\pm$ 1,625a	262,7 $\pm$ 15,0a

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

Figura 14. Lagartas de *Spodoptera frugiperda* com tamanho diminuto (A) e lagarta com tamanho normal (B) em teste de β -exotoxina após 8 dias de alimentação.



Fonte: Agostini (2021)

Conforme as recomendações da OMS (Organização Mundial da Saúde), β -exotoxina fica proibido para uso em formulações de Bt por ter ação em mamíferos e insetos (como inimigos naturais), serem termolábeis e persistentes no ambiente, apresentando um amplo espectro de ação (DE BARJAC & DEDONDER, 1965; FARKAS et al., 1976; LEVINSON et al., 1990).

Para detecção destes tipos de β -exotoxina também foram realizados ensaios moleculares visando a detecção do gene *thuE*. As cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C não

geraram produto de amplificação, confirmando os bioensaios anteriores de mortalidade e peso de lagartas para a ausência de produção de β -exotoxina.

A presença do gene *thuE* em isolados de Bt está associada a síntese de β -exotoxina do tipo I, os *primers* BEF/BER são específicos para o gene *thuE* servindo como uma ferramenta de detecção da produção de β -exotoxina tipo I (SAUKA et al., 2014). Como a utilização de ensaios de PCR utilizando os *primers* BEF/BER só amplificam em cepas que apresentam β -exotoxina do tipo I, a utilização de bioensaios de mortalidade e peso de lagartas se torna primordialmente necessário, para detecção dos dois tipos de β -exotoxinas.

6.3 Sequenciamento genômico

O sequenciamento genômico das cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C foram realizados no BGI - Hong Kong (Beijing Genomics Institute) através de plataforma NGS com tecnologia DNBSEQ™. Foram obtidos 135 *scaffolds* resultando num cromossomo de 5.812.623 pb (1074F), 125 *scaffolds* num cromossomo de 5.783.457 pb (1090G), 135 *scaffolds* num cromossomo 5.784.297 pb (1139E) e 132 *scaffolds* num cromossomo de 5.820.845 pb (1166C), com conteúdo G+C $\geq$ a 34% (Tabela 6). Foram obtidos valores de phred $\geq$ 30, demonstrando a qualidade dos dados obtidos, indicando a probabilidade de 1 base em 1000 estar incorporada de forma incorreta (KEARSE et al., 2012). Esta é uma importante etapa para a eliminação de sequências com baixa qualidade, sem comprometer as informações.

Tabela 6. Análise gerada por QUAST para montagem do genoma das cepas de *Bacillus thuringiensis* 1074F, 1090G, 1139E e 1166C.

Parâmetros	1074F	1090G	1139E	1166C
Sequence size	5812623	5783457	5784297	5820845
Number of contigs	135	125	135	132
GC contente (%)	34.8	34.8	34.8	34.9
N50 value	327966	219809	331697	275758
L50 value	6	5	4	6
Shortest contig size	78	78	78	78
Longest contig size	693970	1086937	1239083	693970
Median sequence size	227	248	227	253
Mean sequence size	43056.5	46267.7	42846.6	44097.3

6.4 Determinação dos genes que codificam proteínas inseticidas nas cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C

O genoma das cepas de *B. thuringiensis* 1074F, 1090G, 1139E e 1166C foi utilizado para busca por genes codificadores de proteínas inseticidas. Para isso, seu genoma foi comparado com um banco local obtidos através de sequências públicas contendo genes que codificam proteínas inseticidas produzidas por *B. thuringiensis*. Após avaliação da porcentagem de identidade, o tamanho do alinhamento, a quantidade de mismatch, gaps, e-value e bit score foram identificadas cinco sequências de genes que correspondem as proteínas inseticidas Cry1Ib, Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac e Vip3Ag (Tabela 7)

Tabela 7. Genes codificadores de proteínas inseticidas identificados no genoma das cepas 1074F, 1090G, 1139E e 1166C de *Bacillus thuringiensis* através de Blastn.

Gene	Tamanho (pb)	Alinhamento (pb)	Identidade (%)	mismatches	gaps	e-value	bit score
<i>cry1Ib</i>	2160	2160	96,71	71	0	0	3591
<i>cry1Da</i>	3498	3500	92,31	265	4	0	4970
<i>vip1Ca</i>	2328	2328	99,82	5	0	0	4277
<i>vip2Ac</i>	1389	1387	98,20	25	0	0	2423
<i>vip3Ag</i>	2361	2362	93,69	146	0	0	3535

O intestino dos insetos é uma barreira física e imunológica essencial na proteção do hospedeiro contra microrganismos patogênicos (HUANG et al., 2015). Estudos recentes demonstram que o tecido epitelial do intestino médio desempenha um papel importante na interação entre as bactérias enteropatogênicas e o hospedeiro, e é capaz de desencadear respostas imunológicas em caso de infecção por patógenos ou por bactérias não patogênicas (LI et al., 2020). No entanto, a resposta imune do hospedeiro pode afetar a atividade inseticida das proteínas Cry e Vip, uma vez que estas toxinas agem no intestino médio dos insetos-alvo (MARTÍNEZ-SOLÍS et al., 2018; HERNÁNDEZ-MARTINEZ et al., 2017). A presença de genes *cry* e *vip* que expressam proteínas pesticidas com diferentes modos de ação pode ajudar a prevenir ou retardar o desenvolvimento de resistência nas populações de insetos-praga. Dessa forma, é importante entender como a resposta imune do hospedeiro pode afetar a eficácia dessas toxinas no controle de insetos-praga, a fim de desenvolver estratégias de controle mais eficazes e sustentáveis.

Diversas cepas de *B. thuringiensis* apresentam mais de um gene codificando proteínas inseticidas em seu plasmídeo (GONÇALVES et al., 2009; LI et al., 2017; REYAZ et al., 2021). Inicialmente, as proteínas Cry1 foram caracterizadas como tóxicas para as ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992; CHOI et al., 2000; VALICENTE et al., 2010; GALVIS & MORENO, 2018; JIN et al., 2021).

Vários estudos demonstraram que os genes *cry1Ib* e *cry1Da* apresentam toxicidade para diversas espécies de lagartas-praga, tais como *S. frugiperda*, *S. exigua*, *Ostrinia nubilalis*, *Chilo suppressalis*, *H. armigera*, *Phthorimae operculella*, *Plutella xylostella* e *Symmetrischema tangolias* (QUAN et al., 2013; HU et al., 2014; CHEN et al., 2017; LIU et al., 2019). O gene *cry1Ib* é altamente eficaz contra *H. armigera*, *S. exigua*, entre outras espécies de lagartas, apresentando uma mortalidade superior a 90% em seu controle (LIU et al., 2019). Vale ressaltar que a proteína codificada pelo gene *cry1I* já foi relatada em organismos geneticamente modificados.

Os genes *cry1* e *cry2* são comumente encontrados em análises de sequenciamento genômico de Bt, conforme relatado em vários estudos (BEN-DOV et al., 1997; BRAVO et al., 1998; KIM, 2000; ZHANG et al., 2000; WANG et al., 2002, VALICENTE et al., 2010; SINGH et al., 2021). Além disso, há evidências de sinergismo e antagonismo entre as proteínas Cry1 e Vip3, que podem afetar a atividade inseticida dependendo da espécie de inseto e proteína expressa. Estudos relatam que a piramidação desses genes em plantas transgênicas pode ser favorável, uma vez que os receptores das proteínas Vip ocupam diferentes sítios dos receptores das proteínas Cry no epitélio do intestino médio dos insetos (ESTRUCH et al., 1996; LEE et al., 2006; SENA et al., 2009; CHAKROUN et al., 2014; QUAN et al., 2021). O sinergismo entre as proteínas Cry1 e Vip3 foi observado em algumas espécies de *Spodoptera*, como *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*, e pode ser explorado para aumentar a eficácia do controle de insetos-praga.

Os genes *vip1* e *vip2* estão localizados no mesmo operon e codificam proteínas de 52 a 100 kDa. Essas toxinas são binárias e possuem dois componentes: A e B, sendo que o componente A inclui a proteína Vip2, enquanto o componente B envolve a proteína Vip1 (MAAGD et al., 2003; BARTH et al., 2004). Vip1 é uma proteína formadora de canal que atua como componente de ligação e translocação, enquanto Vip2 entra na célula causando a toxicidade (BLAUSTEIN et al., 1989; SCHMIDT et al., 1994; KNAPP et al., 2002; GUPTA et al., 2021). A Vip2 possui domínios distintos, sendo o domínio N-terminal (60 a 265 aminoácidos), o domínio C-terminal (266 a 461 aminoácidos) e um domínio de ligação NAD. Embora os domínios da Vip2 apresentem uma menor homologia de sequência, a análise

estrutural por cristalografia revela a presença de homologia estrutural entre eles (GUPTA et al., 2021). Estudos de alinhamento de sequência demonstram que o N-terminal da Vip1 apresenta 75 a 91% de identidade, sendo considerado altamente conservado, enquanto o C-terminal é considerado menos conservado, apresentando 23 a 35% de identidade (WARREN, 1997; SHI et al., 2004; SHI et al., 2007; GENG et al., 2019). Os genes *vip1Ca* e *vip2Ac* atuam em conjunto e são tóxicos para várias espécies de insetos-praga, incluindo *S. exigua*, *S. frugiperda*, *H. armigera* e *H. zea*, entre outras (CHEN et al., 2015; LIU et al., 2015; XIAO et al., 2014; AN et al., 2017).

O modo de ação das toxinas Vip1 e Vip2 ainda não foi completamente compreendido e requer mais estudos. Acredita-se que, mesmo sendo sintetizadas juntas, as proteínas não se associam e atingem o intestino médio do inseto como proteínas individuais. Após a ingestão, ocorre o processamento proteolítico pelas proteases semelhantes à tripsina no intestino médio do inseto, onde a Vip1 se liga a receptores específicos no epitélio intestinal, seguido pela formação de oligômeros. Nessa fase, ocorre o ancoramento entre Vip1 e Vip2, onde a Vip2 transloca seu componente tóxico para o citoplasma (SELLAMI et al., 2016; OPARIN et al., 2016; GENG et al., 2019; JIANG et al., 2022).

A proteína Vip3 é produzida e secretada durante a fase vegetativa de crescimento e os genes homólogos foram identificados em diferentes cepas de Bt. Muitas dessas proteínas apresentam alta atividade tóxica as espécies da ordem Lepidoptera. Vip3Aa foi a primeira proteína a ser descrita e a maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Vip3 foi realizada com essa proteína. Vários trabalhos descrevem que seu modo de ação é semelhante ao das toxinas Cry, formando poros nas células epiteliais presentes no intestino médio dos Lepidópteros (CHEN et al., 2022; DAHAL et al., 2022; ZHANG et al., 2022; LI et al., 2023). São sintetizadas como pro-toxinas processadas por proteases no intestino médio das lagartas, tomando assim sua forma ativa, que então se liga a receptores específicos presente no epitélio do intestino médio (SENA et al., 2009; BULUSHOVA et al., 2011; CACCIA et al., 2014; CHAKROUN et al., 2014; NÚÑEZ-RAMÍREZ et al., 2020). Após a ligação a proteína Vip3 induz a ruptura das células epiteliais do intestino médio formando assim o poro (YU et al., 1997; LEE et al., 2003; LIU et al., 2011; ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011). As toxinas Vip3 não compartilham os sítios de ligação com as proteínas Cry, complementando assim o espectro de ação das proteínas Cry, diminuindo também a chance de ocorrer resistência cruzada entre elas (LEE et al., 2003; KURTZ, 2010; CHAKROUN et al., 2014; CHAKROUN et al., 2016; PICKETT et al., 2017). O padrão de digestão visto nas proteínas Vip3Ag4 são correlatos com os padrões das proteínas Vip3 pela ação da tripsina e os extratos presentes no

intestino dos insetos (LEE et al., 2003; ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011; HAMADOU-CHARFI et al., 2013; CACCIA et al., 2014; GUNEY et al., 2019; QUAN et al., 2021).

Embora o modo de ação das proteínas Vip3 ainda não esteja completamente resolvido, há evidências de que elas se ligam a receptores específicos, formando poros no epitélio do intestino médio, semelhante às proteínas Cry (LEE et al., 2003; SENA et al., 2009; CHAKROUN et al., 2014; LÁZARO-BERENGUER et al., 2022). Além disso, estudos mostraram que as proteínas Cry também podem ativar diferentes vias intracelulares, levando à morte celular apoptótica (SMOUSE et al., 1997; LOEB et al., 2000; ZHANG et al., 2006; TANAKA et al., 2012; PORTUGAL et al., 2017).

A capacidade de produzir poros em suas células-alvo e de ativar diferentes vias intracelulares também foi descrita para outras bactérias. A apoptose é um tipo especial e altamente regulado de morte celular programada, que tem um papel fundamental em processos biológicos como o desenvolvimento, homeostase tecidual, resposta a danos no DNA e resposta imune (ELMORE, 2007).

Estudos recentes demonstraram que Vip3Aa pode induzir apoptose em células cultivadas com SF9 (*S. frugiperda*), mediada pelas vias mitocondriais e dependentes de caspase (JIANG et al., 2016). Além disso, Portugal et al., (2017) observaram que a atividade de formação de poros das proteínas Cry1A é necessária para induzir a apoptose em células cultivadas com CF1 (*Choristoneura fumiferana*), tornando as proteínas Cry1A necessárias para que as células entrem na via apoptótica para Vip3. Essas descobertas sugerem que a ação combinada de diferentes proteínas pode ter um efeito sinérgico no controle de pragas. Insetos que são suscetíveis à *Vip3ag* incluem a *S. frugiperda*, *S. exigua*, *H. armigera*, *P. xylostella* e a *P. gossypiella* (WANG et al., 2016; SANTOS et al., 2020). Estudos também demonstraram que a *Vip3ag* é eficaz contra populações resistentes a outras toxinas produzidas por Bt (ABDELKEFI et al., 2017; MAHROUBI et al., 2019), tornando-a uma ferramenta valiosa no controle de pragas agrícolas.

7. CONCLUSÕES

As cepas de *Bacillus thuringiensis* 1074F, 1090G, 1139E e 1166C foram eficientes no controle dos insetos-praga *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Chrysodeixis includens* e *Helicoverpa armigera*, apresentando mortalidade $\geq 90\%$, com potencial utilização no desenvolvimento de novos bioinseticidas. Tais cepas compartilham cinco genes codificadores de proteínas inseticidas: Cry1Ib, Cry1Da, Vip1Ca, Vip2Ac, Vip3Ag.

Novos estudos devem ser realizados a fim de determinar a toxicidade de cada proteína inseticida encontrada nos genomas das cepas de Bt para o controle de insetos-praga.

REFERÊNCIAS

- ABDELKEFI, H., et al. Characterization of the resistance mechanism to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 144, p. 23-29, 2017.
- ABDELKEFI-MESRATI, L., BOUKEDI, H., DAMMAK-KARRAY, M., SELLAMI-BOUDAWARA, T., JAOUA, S., TOUNSI, S. Study of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 106, 250-254, 2011.
- ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; CHAKROUN, M. KAMOUN, F.; AZZOUZ, HICHEM; TOUNSI, S.; ROUIS, S.; JAOUA, S. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephesia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. **J. Invertebr. Pathol.** 107, 198–201, 2011.
- ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In.: Tarlochan D, Sarjeet G (Eds.) Insect midgut and insecticidal proteins. Riverside, USA: **Advances in Insect Physiology**, 9-87, 2014.
- ADANG, M.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In insect Midgut and Insecticidal Proteins. **Advances in Insect Physiology**, 47, 39-87, 2014.
- AGROLINK – Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br>> Acesso em: 27/02/2019.
- ALFORD, A. R. & HAMMOND JUNIOR, A. M. Plussinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with loop lure-baited traps. **Journal of Economic Entomology**, v. 75, p. 647-650, 1982.
- ALI, A. & CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. *Tunisian Journal of Plant Protection*, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.
- ALIZON, S.; MICHALAKIS, Y. Adaptive virulence evolution: the good old fitness-based approach. **Trends in ecology & Evolution**, v. 30, 248-254, 2015.
- ALKAN, C.; SAJJADIAN, S.; EICHLER, E. E. Limitations of next-generation genome sequence assembly. **Nature Methods**, v. 8, p. 61 – 65, 2011.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389, 1997.
- AMMOUNEH, H.; HARBA, M.; IDRIS, E.; MAKEE, H. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* isolates from Syrian soil and testing of their insecticidal activities against some insect pests. **Turkish Journal of Agriculture & Forestry**, v. 35, p. 421-431, 2011.
- AN, S.; DENG, Y.; ZHAO, J.; ZENG, R. Expression of the *vip1Ca* gene in *Escherichia coli* and its insecticidal activity against *Spodoptera exigua*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 20, p. 261-266, 2017.

APAYDIN, Ö; YENIDÜNYA, A. F.; HARSA, S.; GÜNES, H. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habitats in Turkey. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 285-292, 2005.

ARAÚJO, A. C. Luta biológica contra *Heliothis armigera* no ecossistema agrícola “tomate de indústria”. 1990 **Dissertação para o Grau de Doutor em Entomologia**, Universidade de Évora, Évora, 1990.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry** v. 285, 12497-12503, 2010.

ARONSON, A. I. et al. The solubility of the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor of toxicity to insects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 12, p. 981–986, 1991.

ÁVILA, J. C.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular Técnica, 23).

AZZOUZ, H., KEBAILI-GHRIBI, J., DAOUD, F., ABDELMALAK, N., ENNOURI, K., BELGUITH-BEN HASSAN, N., TOUNSI, S., ROUIS, S. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against pyralid stored product pests. **Journal of Applied Entomology**. 139, 690-700, 2015.

BAEK, I. et al. Comparative genomic and phylogenomic analyses clarify relationships within and between *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: proposal for the recognition of two *Bacillus thuringiensis* genomovars. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1978, 2019.

BAGLA, P. Hardy cotton-munching pests are latest blow to GM crops. **Science** 327, 1439, 2010.

BAIG, D. N.; MEHNAZ, S. Determination and distribution of cry-type genes in halophilic *Bacillus thuringiensis* isolates of Arabian Sea sedimentary rocks. **Microbiological Research**, v. 165, n. 5, p. 376–383, 2010.

BALLARDO, C. et al. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. **Waste Management**, v. 70, p. 53–58, 2017.

BANYULS, N.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; QUAN, Y.; FERRÉ, J. Artefactual band patterns by SDS-PAGE of the Vip3A_f protein in the presence of proteases mask the extremely high stability of this protein. **Int. J. Biol. Macromol.** 120, 59–65, 2018.

BARFIELD, C. S. et al. Life history strategies and migration in fall armyworm and velvetbean caterpillar. **Proc. Tropical/Subtropical Agric. Res. Symp.** p. 23, 1986.

BARJAC, H. DE; DEDONDER, R. Isolement d'un nucléotide identifiable a la "toxine thermostable" de *Bacillus thuringiensis* var. Berliner. **Compt. Rend. Acad. Sci., Paris**, 260, 7050-7050, 1965.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRUTMACHER, A. D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**. 33, 993-998, 2004.

BEL, Y.; BANYULS, N.; CHAKROUN, M.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Insights into the structure of the Vip3Aa insecticidal protein by protease digestion analysis. **Toxins**, 9, 131, 2017.

BEN-DOV, E., ZARITSKY, A., DAHAN, E., BARAK, Z., SINAI, R., MANASHEROB, R., KHAMRAEV, A., TROITSKAYA, E., DUBITSKY, A., BEREZINA, N., MARGALITH, Y. Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 63, 4883–4890, 1997.

BEN-DOV, E.; SAXENA, D.; WANG, Q.; MANASHEROB, R.; BOUSSIBA, S.; ZARITSKY, A. Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Entomology**, v. 27, p. 146-152, 2003.

BERGAMASCO, V. B., MENDES, D. R. P., FERNANDES, O. A., DESIDÉRIO, J. A., & LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* cry1ia10 and vip3aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp.(lepidoptera). **journal of invertebrate pathology**, 112(2), 152–158, 2013.

BERLINER, E. Eber die schlaffsucht der Mehlmotenraupe. (*Ephesia kuehniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Z. ang. **Entomology**, v. 2, p. 29-56, 1915.

BERLING, M.; BLACHERE-LOPEZ, C.; SOUBABERE, O.; LERY, X; BONHOMME. A.; SAUPHANOR, B.; LOPEZ-FERBER. *Cydia pomonella granulovirus* Genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, 2009.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T. G.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of Bt toxins, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 5082 – 5095, 2002.

BHALLA, R.; DALAL, M.; PANGULURI, S. K.; JAGDISH, B.; MANDAOKAM, A. D.; SINGH, A. K.; KUMAR, P.A. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters** 243, 467-472, 2005.

BLAUSTEIN, R. O.; KOEHLER, T. M.; COLLIER, R. J.; FINKELSTEIN, A. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 86, 2209-2213, 1989.

BOREGAS, K. G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v. 72, p. 61-70, 2013.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO, J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochem.** 41:323–342, 2006.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011.

BRAVO, A., SARABIA, S., LOPEZ, L., ONTIVEROS, H., ABARCA, C., ORTIZ, A., ORTIZ, M., LINA, L., VILLALOBOS, F.J., PENA, G., NUNEZ-VALDEZ, M.E., SOBERON, M., QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 64, 4965–4972, 1998.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435. 2007.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B. I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**, v.6, 17-26, 2012.

BRAVO, A.; JANSSENS, S.; PEFFEROEN, M. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 237-246, 1992.

BRETSCHNEIDER, A.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. Three toxins, two receptors, one mechanism: mode of action of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* in *Heliothis virescens*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 76, 109–117, 2016.

BULUSHOVA, N. V.; ELPIDINA, E. N. Complex of digestive proteinases of *Galleria mellonella* caterpillars. Composition, properties, and limited proteolysis of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, p. 581-589, 2011.

CABI, 2019. Datasheet. *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). Invasive Species Compendium. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.29810>, 2016. Data de acesso: 04/04/2024.

CACCIA, S., CHAKROUN, M., VINOKUROV, K. & FERRÉ, J. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins by two *Spodoptera* species. **J. Insect Physiol.** 67, 76–84, 2014.

CACCIA, S.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; MAHON, R. J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; BAUTSOENS, N. Binding site alteration is responsible for field-isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species. **PLoS ONE**, v. 3, 2010.

CAMUZ AUGOSTO, J. M. L; SOCÍAS, M. G.; MURÚA, M. G.; PRIETO, S.; MEDINA, S. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedade Entomológica Argentina**, v. 69, 209-231, 2010.

CANERDAY, T.D. & ARANT, F. S. Biology of *Pseudoplusia includens* and notes on biology of *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia ou* and *Autographa biloba*. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, p. 870-871, 1967.

CAO, Z.; TAN, T. T.; JIANG, K.; MEI, S. Q.; HOU, X. H.; CAI, J. (2018). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* L-7601, a wild strain with high production of melanin. **Journal of Biotechnology**, 275, 40–43, 2018.

CAPINEIRA, J. L. Handbook of vegetable pest. **New York: Academic Press**, p. 762, 2001.

CAPINERA, J. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Publication EENY098**. University of Florida, Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, p. 1-6, 1999.

CAPINERA, J. L. 2005. Southern armyworm, *Spodoptera eridania* (Cramer) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **University of Florida**. Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/southern_armyworm.htm.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N. TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 161 – 168, 2015.

CHAKROUN, M., & FERRÉ, J. In vivo and in vitro binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites using 125I-radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**, 80(20), 6258–6265, 2014.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 80, 329–350, 2016.

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. In vivo and in vitro binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by 125I radiolabeling. **Appl. Environ. Microbiol.** 80, 6258–6265, 2014.

CHANDRASENA, D.I; SIGNORINI, A. M.; ABRATTI, G.; STORER, N. P.; OLACIREGUI, M. L. Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F δ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest Management Science**, v. 74 p. 746–754, 2018.

CHANG, X. et al. Determining the involvement of two aminopeptidase Ns in the resistance of *Plutella xylostella* to the Bt toxin Cry1Ac: cloning and study of in vitro function. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology**, Hoboken, v. 26, n. 2, p. 60-70, 2012.

CHEN, H.; VERPLAETSE, E.; SLAMTI, L.; LERECLUS, D. Expression of the *Bacillus thuringiensis* vip3A insecticidal toxin gene is activated at the onset of stationary phase by VipR, an autoregulated transcription factor. **Microbial Genetics**, 2022.

CHEN, J., ZHANG, X., LIU, S., CAI, J., & LI, X. Insecticidal activity of Vip1Ca and its effects on the survival and growth of *Spodoptera exigua* larvae. **Toxicon**, 107, 365-370, 2015.

- CHEN, J., ZHANG, X., ZHANG, Y., & CAI, J. Insecticidal activity and binding characteristics of a modified Cry1Ie toxin with improved activity against *Spodoptera exigua*. **Toxicon**, 127, 15-20, 2017.
- CHOI, S. K., SHIN, B. S., KONG, E. M., RHO, H. M., & PARK, S. H. Cloning of a New *Bacillus thuringiensis* cry1I-Type Crystal Protein Gene. **Current microbiology**, 41(1), 65-69, 2000.
- COATES, B. S. Linkage of an ABCC transporter to a single QTL that controls *Ostrinia nubilalis* larval resistance to the *Bacillus thuringiensis* Cry1Fa toxin. **Insect Biochem Mol Biol.**, v. 63, p. 86–96, 2015.
- COPPING, L. G. & MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.
- CRESSLER, C. E.; MCLEOD, D.; ROZINS, C.; HOOGEN, J. V. D.; DAY, T. The adaptative evolution of virulence: a review of theoretical predictions and empirical tests. **Parasitology**, v. 143, 915-930, 2016.
- CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T. R.; BONNING, B. C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, 2-5, 2021.
- CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T. R.; BONNING, B. C. **Bacterial Pesticidal Protein Resource Center**. Disponível em: <<https://www.bpprc.org>> acesso em: 05/04/2022.
- CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T. R.; BONNING, B. C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. 2020.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R; FEITELSON, E.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal Crystal proteins. **Microbiol. Mol. Bio. Ver.** 62, 807-813, 1998.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo**, 1995.
- CRUZ, I. Manejo de pragas na cultura do milho. In: SEMINÁRIO SOBRE A CULTURA DO MILHO “SAFRINHA”, 5., Barretos, 1999. **Cursos**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, p. 27-56, 1999.
- CRUZ, I. Milho: ataque precoce. **Cultivar Grandes Culturas**, v.11, n. 118, p. 20-23, 2009.
- CZEPAK, C. et al. (2011) *Spodoptera* no tomate industrial. Disponível em www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=24939&secao=Sanidade%20Vegetal. Acesso em :20 fev. 2019.

CZEPAK, C. et al. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DA SILVA, D. M.; BUENO, A. F.; STECCA, C. S.; ANDRADE, K.; NEVES, P. M. O. J.; OLIVEIRA, M. N. N. Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 4, p. 752-760, 2017.

DAHAL, S.; SIJAPATI, J.; RIJAL, S. Screening and confirmation of Vip3 gene presence in *Bacillus thuringiensis* strains native to Nepal. **Internation Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 10, 2022.

DAQUILA, B. V., SCUDELER, E. L., DOSSI, F. C., MOREIRA, D. R., PAMPHILE, J. A., CONTE, H. Action of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) in midgut of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 184, 2019.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. **Entomophaga**, v. 7, p. 5-31, 1962.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and Evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Gen.** 37, 409-433, 2003.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 40, p. 193-199, 2001.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.** 37, 409–433, 2003.

DE RIJK, T. C., VAN DAM, R. C., ZOMER, P., BOERS, E. A., DE WAARD, P., Y MOL, H. G. Development and validation of a confirmative LC-MS/MS method for the determination of β -exotoxin thuringiensin in plant protection products and selected greenhouse crops. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 405, 1631-1639, 2013.

DE VOS, P.; LOGAN, N. A. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. New York, NY: Springer, 2011.

DOGGETT, N. A.; STUBBEN, C. J.; CHERTKOV, O.; BRUCE, D. C.; DETTER, J. C. H.; JOHNSON, S. L. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis strain HD-789. **Genome Announc.** 6, e01023–13, 2013.

DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA, M.; VILLANUEVA, M.; ESCRICHE, B.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; CABALLERO, P. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* proteins against Coleopteran pests. **Toxins**. 1-29, 2020.

DONOVAN, W.P. et al. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 72, p. 713–719, 2006.

EARLY, R.; GONZÁLEZ-MORENO, P.; MURPHY, S. T.; DAY, R. Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda* the fall armyworm. **NeoBiota**, v. 40, 25-50, 2018.

EBERT, D.; BULL, J. J. Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? **Trends in Microbiology**, v. 11, 15-20, 2003.

EICHLIN, T.D. & CUNNINGHAM, H. B. The Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) of America north of Mexico; emphasizing genitalic and larval morphology. **Technical Bulletin**, United State Department Agriculture, n. 1567, p. 122, 1978.

ELMORE, S. A. A review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, 35, 495–516, 2007.

ENDO, H.; AZUMA, M.; ADEGAWA, S.; KIKUTA, S.; SATO, R. Water influx via aquaporin directly determines necrotic cell death induced by the *Bacillus thuringiensis* Cry toxin. **FEBS Lett.** 591, 56–64, 2017.

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 Science**, v. 93, n. 11, p. 5389–5394, 1996.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 5389–5394, 1996.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93, 5389–5394, 1996.

LI, X.; TAN, A.; VOEGTLIN, M.; BEKELE, S.; CHEN, C.; AROIAN, R. V. Expression of Cry5B protein from *Bacillus thuringiensis* in plant roots confers resistance to root-knot nematode. **Biological Control**, v. 47, n. 1, p. 97-102, 2008.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 2014.

FARKAS, J. et al. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechia*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, p. 1118–1120, 1969.
FERNÁNDEZ-CHAPA, D., RAMÍREZ-VILLALOBOS, J., GALÁN-WONG, L. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: Na Overview. **Protecting Rice Grains in the Post-Genomic Era**. IntechOpen, 218, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 37, n. 4, 529-535.

FIEDORUK, K.; DANILUK, T.; MAHILLON, J. Genetic environment of cry1 genes indicates their common origin. **Genome Biol Evol**, v. 9, p. 2265 – 2275, 2017.

FIGUEIREDO, C. S., LEMES, A. R. N. SEBASTIÃO, I., DESIDÉRIO, J. A. Synergism of the *Bacillus thuringiensis* cry1, cry2 and vip3 proteins in *Spodoptera frugiperda* control. **Applied biochemistry and biotechnology**, 188, 798-809, 2019.

FIGUEIREDO, E. et al. Lagarta do tomate in AMARO, F. & MEXIA, A. **Proteção integrada em tomate de indústria**. Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, 2006.

FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and Use in the Field of Biocontrol. **Springer, Cham**, 2017.

FLORES-ESCOBAR, B.; RODRÍGUEZ-MAGADAN, H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Differential role of *Manduca sexta* aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, 4543-4550, 2013.

FORNAZIER, M. J.; PRATISSOLI, D.; MARTINS, D. S. Principais pragas da cultura do tomateiro estaqueado na região de montanhas do Espírito Santo. **Tomate**, p. 185-226, 2010.

FRANKENHUYZEN, K. V. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. 101, 1-16, 2009.

FRIZZAS, M. R. et al. Genetically modified corn on fall armyworm and earwig populations under field conditions. **Ciência Rural**, v. 44, p. 203-209, 2014.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, v. 293, p. 857-860, 2001.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GALVIS, F. MORENO, L. Identification of Cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxic effect Against *Milax gagates*, a pest on lettuce (*Lactuca sativa*). **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 27, 2017.

GAO, M., DONG, S., HU, X., ZHANG, X., LIU, Y., ZHONG, J., LIU, X. Roles of midgut cadherin from two moths in different *Bacillus thuringiensis* action mechanisms: Correlation among toxin binding, cellular toxicity, and synergism. **Journal of agricultural and food chemistry**, 67(48), 13237-13246. 2019.

GAO, Q.; ZHENG, J.; ZHU, L.; RUAN, L.; PENG, D.; SUN, M. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* tenebrionis 4AA1, a typical strain with toxicity to Coleopteran insects. **Journal of Biotechnology**, 204, 15–16, 2015.

GARBUTT, J.; BONSTALL, M. B.; WRIGHT, D. J.; RAYMOND, B. Antagonistic competition moderates virulence in *Bacillus thuringiensis*. **Ecology Letters**, 14, 765-772, 2011.

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

GATEHOUSE, A. M. R.; FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; BELL, H. A. Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 2011.

GATEHOUSE, J.A. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. **Plant Physiol.** 146, 881–887, 2008.

GAYEN, S.; HOSSAIN, M.A.; SEN, S.K. Identification of the bioactive core component of the insecticidal Vip3A toxin peptide of *Bacillus thuringiensis*. **J. Plant Biochem. Biotechnol.** 21, 128–135, 2012.

GENETICALLY ENGINEERED CROPS: EXPERIENCES AND PROSPECTS. The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine. Washington, DC: **The National Academies Press**. ed. 1, 2017.

GENG, J.; JIANG, J.; SHU, C.; WANG, Z.; SONG, F.; GENG, L.; DUAN, J.; ZHANG, J. *Bacillus thuringiensis* Vip1 functions as a Receptor of Vip2 toxin for binary insecticidal activity against *Holotrichia parallela*. **Toxins**. 11, 440, 2019.

GENG, J.; JIANG, J.; SHU, C.; WANG, Z.; SONG, F.; GENG, L.; DUAN, J.; ZHANG, J. *Bacillus thuringiensis* Vip1 functions as a receptor of Vip2 toxin for binary insecticidal activity against *Holotrichia parallela*. **Toxins**, v. 11, 2019.

GILLILAND, A.; CHAMBER, C. E.; BONE, E. J.; ELLAR, D. J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Endotoxin binding in determining potency during Lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, 1509-1515, 2022.

GILLIS, A.; FAYAD, N.; MAKART, L.; BOLOTIN, A.; SOROKIN, A. KALLASSY, M.; MAHILLON, J. Role of plasmid plasticity and mobile genetic elements in the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* serovar israelenses. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, p. 829 – 856, 2018.

GINETTI, F.; PEREGO, M.; ALBERTINI, A. M.; GALIZZI, A. *Bacillus subtilis* mutS mutL operon: identification, nucleotide sequence and mutagenesis. **Microbiology**, v. 142, 1996.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley**, 350p, 2000.

GOATER, B. et al. Noctuidae Europeae. **Soro: Entomological Press**, v. 10, p. 452, 2003.

GOMIS-CEBOLLA, J.; DE ESCUDERO, I. R.; VERA-VELASCO, N. M.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; CEBALLOS, T.; FERRÉ, J.

Insecticidal spectrum and mode of action of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Ca insecticidal protein. **Journal of invertebrate pathology**, 142, 60-67, 2017.

GOTHANDARAMAN, R.; VENKATASAMY, B.; THANGAVEL, T. Molecular characterization and toxicity evaluation of indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates against key lepidopteran insect pests. **Egypt J Biol Pest Control**, v. 32, 2022.

GRANADOS, R.R.; FU, Y.; CORSARO, B.; HUGHES, P.R. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancin from *Trichoplusia ni* granulovirus. **Biol. Control**, v. 20, p. 153–159, 2001.

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

GU, G. X.; CHEN, C.; BUEHLER, M. J. *De novo* composite design based on machine learning algorithm. **Extreme Mechanics Letters**, v. 18, p. 19 – 28, 2018.

GUNEY, E.; ADIGUZEL, A.; DEMIRBAG, Z.; SEZEN, K. *Bacillus thuringiensis* kurstaki strains produce vegetative insecticidal proteins (Vip3) with high potential. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. 29:81, 1-6, 2019.

GUO, Y. Y. Progress in the research on migration regularity of *Helicoverpa armigera* and relationships between the pest and its host plants. **Acta Entomologica Sinica**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 1997.

GUOQING, L. et al. Natural oviposition-deterrent chemicals in female cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Journal of Insect Pathology**, v. 47, n. 9, p. 951-956, 2001.

GUPTA, B. L. et al. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic K⁺-transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, *in vitro*. **Journal of Cell Science**, v. 74, p. 137-152, 1985.

GUPTA, M.; KUMAR, H.; KUAR, S. Vegetative Insecticidal Protein (VIP): A Potential contender from *Bacillus thuringiensis* for efficient management of various detrimental agricultural pests. **Front. Microbiol.**, 2021.

HABIB, M. E. M. & ANDRADE, C. E. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

HAMADOU-CHARFI, D.B.; BOUKEDI, H.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **J. Invertebr. Pathol.** 114, 139–143, 2013.

HANSEN, B. M. & SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Amsterdam: Kluwer Academic Publishers**, 41–44, 2000.

HARDWICK, D. The corn earworm complex. **Memories Entomology Society**, v. 40, p. 246, 1965.

HASSAN, A. A.; YOUSSEF, M. A.; ELASHTOKHY, M. M. A. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains native of the Eastern Province of Saudi Arabia. **Egypt J Biol Pest Control**, v. 31, 2021.

HAYAKAWA, T.; SHITOMI, Y.; MIYAMOTO, K.; HORI, H. 2004. GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. **FEBS Lett.** 576, 331–335, 2004.

HE, J. J.; WANG, W.; YIN, X.; SHAO, H.; ZHENG, M.; LI, Y.; ZHAO, M.; SUN, S.; WANG, Z. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43. **J. Bacteriol.** 193, 3407–3408, 2011.

HE, J.; WANG, J.; YIN, W. SHAO, W.; ZHENG, H.; LI, M.; ZHAO, Y.; SUN, M.; WNAG, S.; YU, Z. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *chinensis* strain CT-43. **J Bacteriol.**193:3407–3408, 2011.

HE, L.; WEISBROD, C. R.; MARSHALL, A. G. Protein *de novo* sequencing by top-down and middle-down limitations imposed by mass measurement accuracy and ga sequence coverage. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 427, p. 107 – 113, 2018.

HECKEL, D. G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? Na evolutionary perspective. **Arch. Insect. Biochem. Pysiol.**, 1-12, 2019.

HECKEL, D. G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 104, 2020.

HERNANDEZ, D.; FRANCOIS, P.; FARINELLI, L.; OSTERAS, M.; SCHRENZEL, J. *De novo* bacterial genome sequencing: Millions of very short reads assembled on a desktop computer. **Genome Res.** 18, 802–809, 2008.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P. et al. Lack of Cry1Fa binding to the midgut brush border membrane in a resistant colony of *Plutella xylostella* moths with a mutation in the ABCC2 locus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6759-6761, 2012.

HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; GOMIS-CEBOLLA, J.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Changes in gene expression and apoptotic response in *Spodoptera exigua* larvae exposed to sublethal concentrations of Vip3 insecticidal proteins. **Scientific Reports**, v. 7, p. 16245, 2017.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C.S.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **J. Invertebr. Pathol.** 13, 78–81, 2013.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S. et al. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 219–225, 2009.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** 53, 242–255, 1989.

HU, X., FAN, M., LIU, Y., ZHOU, B., LIU, Q. Cloning and bioassay of a novel *cry1Ib* gene from a *Bacillus thuringiensis* strain toxic to *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 116, 15-21, 2014.

HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER, R. L.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS One** v. 9, 2014.

HUANG, J.-H., JING, X. & DOUGLAS, A. E. The multi-tasking gut epithelium of insects. **Insect biochem. Mol. Biol.** 67, 15–20, 2015.

ISAAA, Brief 54: Global Status of commercialized Biotech/GM Crops: 2018. Em: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2018 - ISAAA Brief 54-2018 | ISAAA.org. Acesso em: 10/01/2023.

ISAAA, Brief 55: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2019 Em B55-ExecSum-English.pdf Acesso em: 10/04/2024.

ISAAA, Key Developments in Agriculture Help Ensure Food Security for the World's Growing Population. Disponível em: <https://www.isaaa.org/blog/entry/default.asp?BlogDate=6/15/2022>. Acesso em 12/04/2024.

ISHIWATA S. On a kind of severe flacherie (sotto disease) (No. 1), **Dainihon Sanshi Kaiho**, v.114, p. 1–5, 1901 (original em japonês).

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops. Ithaca, NY: **isaaa**. 44, 2011.

JESUS, F. G. et al. Desenvolvimento de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 4, p. 430-435, 2013.

JIANG, K. ET AL. Vip3Aa induces apoptosis in cultured *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. **Toxicon** 120, 49–56 (2016).

JIANG, K.; CHEN, Z.; SHI, Y.; JIAO, X.; CAI, J.; GAO, X. Functional characterization of multidomain protein Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* reveals a strategy to increase its insecticidal potency. **BIORXIV**, 2022.

JIN, M.; YANG, Y.; SHAN, Y.; CHAKRABARTY, S.; CHENG, Y.; SÓBERON, M.; BRAVO, A.; LIU, K.; WU, K.; XIAO, Y. Two ABC transporters are differentially involved in the toxicity of two *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the invasive crop-pest *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pest Management Science**. 77 (3), 1492-1501, 2021.

JOHNSON, D.E., PETERSON, R.E., 1983. Limitations of HPLC for the detection of b-exotoxin in culture filtrates of *Bacillus thuringiensis*. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 17, 231–234, 1983.

JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, 5-10, 2017.

JURAT-FUENTES, J. L.; HECKEL, D. G.; FERRÉ, J. Mechanisms of Resistance to Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**. 66, 121-140, 2021.

KALMYKOVA, G.; BURTSEVA, L.; MILNE, R.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Activity of spores and extracellular proteins from six Cry+ strains and a Cry- strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against the western spruce budworm, *Choristoneura occidentalis* (Lepidoptera: Tortricidae). **Can. J. Microbiol.** 55, 536– 543, 2009.

KAUR, S. Risk assessment of Bt transgenic crops. (eds) *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. **Springer**, Dordrecht, 2012.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MEINTJES, P.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics** 28:1647–1649, 2012.

KIM, H.S., 2000. Comparative study of the frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* from three environments. **Curr. Microbiol.** 41, 250–256, 2000.

KING, A. B. S; SAUNDERS, J. L. The invertebrate pest of annual food crops in Central America. **London: Overseas Development Administration**, 166p., 1984.

KNAPP, O.; BENZ, R.; GIBERT, M.; MARVAUD, J.; POPOFF, M. R. Interaction of *Clostridium perfringens* iota-toxins with lipid bilayer membranes. Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component. **J. Biol. Chem.** 277, 6143-6152, 2002.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 24, p. 275–308, 1994.

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*—Models for their mechanism of action on the insect gut. **Bioessays**, 15, 469–476, 1993.

KOCH, M. S. et al. The food and environmental safety of Bt crops. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p. 1–22, 2015.

KOGAN, M. & COPE, D. Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 67, p. 66-72, 1974.

KOGAN, M. Dynamics of insect adaptations to soybean: Impact of integrated pest management. **Environmental Entomology**, v. 10, p. 363-371, 1981.

KOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 243–270, 1998.

KONECKA, E. et al. Analysis of cry gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. **Current Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 217–222, 2007.

KRUGER, M.; VAN RENZBURG, J. J.; VAN DEN BERG, J. Prospective on the development of the stem borer resistance to Bt maize and refuge compliance at the Vaalharts irrigation scheme in South Africa. **Crop Port**, 28, 684–689, 2009.

KUMAR, R. A real-time immuno-PCR assay for the detection of transgenic Cry1Ab protein, **Eur. Food Res. Technol.** 234, 101–108, 2012.

KUO, W.S.; CHAK, K.F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, 1369–1377, 1996.

KURTZ, R. W. A review of Vip3A mode of action and effects on Bt Cry protein-resistant colonies of lepidopteran larvae. **Southwest. Entomol.** 35, 391–394, 2010.

LACEY, L. A. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015.

LALANNE-CASSOU, B., J.F. SILVAIN, L. MONTI, & C. MALOSSE. 1999. Mecanismes d'isolement reproducteur chez les especes du complexe neotropical *Spodoptera latifascia* – *S. cosmioides* – *S. descoinsi* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ann. Soc. Entomol. Fr.** v. 35, p. 109–116, 1999.

LAND, M., HAUSER, L., JUN, S. R., NOOKAEW, I., LEUZE, M. R., AHN, T. H., KARPINETS, T.; LUND, O.; USSERY, D. W. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Functional & integrative genomics**, 15(2), 141–161, 2015.

LÁZARO-BERENGUER, M.; QUAND, Y.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J. In vivo competition assays between Vip3 proteins confirm the occurrence of shared binding sites in *Spodoptera littoralis*. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

LEE, M. K., MILES, P., & CHEN, J. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 339(4), 1043–1047, 2006.

LEE, M. K., WALTERS, F. S., HART, H., PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 4648–4657, 2003.

LEETACHEWA, S.; KHOMKHUM, N.; SAKDEE, S.; WANG, P.; MOONSOM, S. Enhancement of insect susceptibility and larvicidal efficacy of Cry4Ba toxin by calcofluor. **Parasites Vectors**, v. 11, p. 515, 2018.

LEUBER, M.; ORLIK, F.; SCHIFFLER, B.; SICKMANN, A.; BENZ, R. Vegetative Insecticidal Protein (Vip1Ac) of *Bacillus thuringiensis* HD201: Evidence for oligomer and channel formation. **Biochemistry**. 45, 283–288, 2006.

LEVINSON, B. L., KASYAN, K. J., CHIU, S.S., CURRIER, T.C., Y GONZÁLEZ, J. M. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**. 172, 3172-3179, 1990.

LI, G.; REISIG, D.; MIAO, J.; GOULD, F.; HUANG, F.; FENG, H. Frequency of Cry1F non-recessive resistance alleles in North Carolina field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One**, v.11, 2016.

LI, S., DE MANDAL, S., XU, X., JIN, F. The Tripartite interaction of host immunity–*Bacillus thuringiensis* infection–gut microbiota. **Toxins**, 12(8), 514. 2020.

LI, X. Q.; TAN, A.; VOEGTLINE, M.; BEKELE, S.; CHEN, C. S.; AROIAN, R. V.; LI, X.; ZHANG, Y.; ZHAN, Y.; TIAN, H.; YAN, B.; CAI, J. Utilization of a strong promoter combined with the knockout of protease genes to improve the yield of Vip3Aa in *Bacillus thuringiensis* BMB171. **Pest Management Science**, V. 79, P. 1713-1720, 2023.

LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y. C.; HUANG, F. WANG, Y.; ZHOU, W. SHEN, J. Evidence of field evolved resistance to Cry1Ac expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* in northern China. **Pest Manag Sci**, 66, 155–161, 2010.

LIU, G.; SONG, L.; SHU, C. H.; WANG, P.; DENG, C. H.; PENG, Q. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD73. **Genome Announcements**, 1, e00080–13, 2013.

LIU, J. G., YANG, A. Z., SHEN, X. H., HUA, B. G.; SHI, G. L. Specific binding of activated Vip3Aa10 to *Helicoverpa armigera* brush border membrane vesicles results in pore formation. **Journal of Invertebrate Pathology** 108, 92–97, 2011.

LIU, J., JI, L., PETERS, B. M., LI, L. LI, B. Whole genome sequence of two *Bacillus cereus* strains isolated from soy sauce residues, **Basic & Clin. Pharmacol. Toxicol.** 118, 34, 2016.

LIU, J.; CHEN, D.; PETERS, B. M.; LI, L.; LI, B. Staphylococcal chromosomal cassettes *mec* (SCC*mec*): a mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, **Microb. Pathog.** 101, 56e67, 2016.

LIU, J.; LI, L.; PETERS, B.; LI, B.; CHEN, D.; XU, Z.; SHIRTLIFF, M. E. Complete genome sequence and bioinformatics analyses of *Bacillus thuringiensis* strain BM-BT15426. **Microbial Pathogenesis**, vol. 108, p. 55–60, 2017.

Liu, S., Chen, J., Zhang, X., Li, X., & Cai, J. Insecticidal activity of Vip1Ca against *Spodoptera exigua* and its effect on the physiological and biochemical indices. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 123, 23-29, 2015.

LIU, X., RUAN, L., PENG, D., LI, L., SUN, M., Y YU, Z. (2014). Thuringiensin: Thermostable Secondary Metabolite from *Bacillus thuringiensis* with

Insecticidal Activity against a Wide Range of Insects. **Toxins**. 6, 2229-2238, 2014.

Liu, Y., Zhang, Q., & Hu, X. The insecticidal activity of Cry1Ib from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 126, 1023-1030, 2019.

LIU, Y., ZHANG, Q., HU, X. The insecticidal activity of Cry1Ib from *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120, 1023-1030.

LOEB, M. J. Et al. Apoptosis in cultured midgut cells from *Heliothis virescens* larvae exposed to various conditions. **Arch. Insect Biochem Physiol**. 45, 12–23, 2000.

LOEZA-LARA, P. D.; BENINTENDE, G.; COZZO, J.; OCHOA-ZARZOSA, A. BAIZABAL-ZGUIRRE, V. M.; VALDE-ALARCÓN, J. J.; LÓPEZ-MEZA, R. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. **Plasmid**, v. 54, p. 229 – 240, 2005.

LUGINBILL, P. The Fall Armyworm. U. S. Dep. Agric. Tech. Bull. No. 34, 1-91p, 1928.

LUTTREL, R. G. & ALI, M. I. Exploring selection for Bt resistance in *Heliothines* results of laboratory and field studies. **Proceedings**, 9-12, 2007.

MADDAMSETTI, R.; HATCHER, P. J.; CRUVEILLER, S.; MEDIGUE, C.; BARRICK, J. E.; LENSKI, R. E. Horizontal gene transfer may explain variation in Os. **Arxiv**, 2012.

MAHROUBI, M. et al. Susceptibility of resistant *Plutella xylostella* to Vip3Aa toxin and its efficacy in controlling field populations of the pest in Iran. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 2, p. 853-860, 2019.

MALOVICHKO, Y. V.; NIZHNIKOV, A. A.; ANTONETS, K. S. Repertoire of the *Bacillus thuringiensis* virulence factors unrelated to major classes of protein toxins and its role in specificity of host-pathogen interactions. **Toxins**, 11, 6, 347, 2019.

MARSARO JUNIOR, A.L. et al. Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no estado de Roraima. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 71-76, 2010.

MATTEN, S. R.; HEAD, G. P.; QUEMADA, H. D. How governmental regulation can help the integration of Bt crops within IPM programs. **Springer**, 27–39, 2008.

MATTHEWS, M. **Heliothinae moths of Australia: a guide to pest bollworms and related noctuid groups**. Melbourne: CSIRO, p. 320, 1999.

McCLINTOCK, J. T.; SCHAFFER, C. R.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 45, n. 2, p. 95–105, 1995.

MENSAH, R. K. Supression of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast. **Australian Journal of Entomology**, v. 35, n. 4, p. 323-329, 1996.

MESRATI, L. A.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. **FEMS Microbiology Letters**. 244,353-358, 2005.

MICHEREFF FILHO, M. et al. Effect of some biorational insecticides on *Spodoptera eridania* in organic cabbage. **Pest Management Science**, v. 64, p. 761-767, 2008.

MILES, P.; KRAMER, V.; SHEN, Z.; SHOTKOSKI, F.; WARREN, G. Novel pesticidal toxins. **European Patent: 1377157**, 2004.

MONNERAT, R. G. & BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 163-200, 2000.

MONNERAT, R. G. & PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (Ed.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina: Embrapa Cerrado, p. 121-155, 2006.

MORAES, G. J.; LOECK, A. E.; BELARMINO, L. C. Flutuação populacional de *Plusiinae* e *Anticarsia gemmatilis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 51-56, 1991.

MOSCARDI, F. Soybean integrated pest management in Brazil. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 41, p. 91-100, 1993.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. D. F.; SOSA-GÓMEZ; D. R. ROGGIA, S.; HOFFMAN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; S. Artrópodes que atacam as folhas da soja. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**, p. 213-309, 2012.

MUHAMMAD A. K.; MIRZA A. M.; MUHAMMAD A., MUHAMMAD M. A.; NADEEM A.; MUHAMMAD I.; AKHTAR H.; AREEBA R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* from cotton fields and its effectiveness against *Spodoptera litura*. **Plant Protection**, v. 6, 2022.

NASREEN, A. & MUSTAFA, G. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hbn) reared in laboratory on natural diet. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 3, n. 10, p. 1668-1669, 2000.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em 12/04/2024.

NORA, I. W. REIS FILHO, W.; STUCKER, H. Danos de lagartas em frutos e folhas da macieira: Mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares. **Agropec. Catarin.**, v. 2, p. 54-55, 1989.

NÚÑEZ-RAMÍREZ, R.; HUESA, J.; BEL, Y.; FERRÉ, J.; CASINO, P.; ARIAS-PALOMO, E. Molecular architecture and activation of the insecticidal protein Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. **Nature Communications**, v. 11, 2020.

OLSON, S. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. **Outlooks Pest Management**. 26, 203-206, 2015.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, p. 1727–1736, 2016.

PAINI, D.R.; SHEPPARDA, A. W.; COOK, D. C.; DE BARRO, P.J.; WORNER, S.P.; MATTHEW, B. T. Global threat to agriculture from invasive species. **PNAS**, v. 113, 7575-7579, 2016.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, 3296-3325, 2014.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, 3296-3325, 2014.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. Draft Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Serovar Tolworthi Strain Na205-3, an Isolate Toxic for *Helicoverpa armigera*. **Genome Announc.** 6, 1490–1504, 2014.

PALMA, L.; RUIZ DE ESCUDERO, I.; MAEZTU, M.; CABALLERO, P.; MUÑOZ, D. Screening of vip genes from a Spanish *Bacillus thuringiensis* collection and characterization of two novel Vip3 proteins highly-toxic to five lepidopteran crop pests. **Biol. Control**. 66, 141–149, 2013.

PAPA, G. & CELOTO, F.J. **Lagartas na soja**. 2007.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology**, v.37, 3-22, 2013.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology Review**. 35, 3-22, 2013.

PARRA, J. R. P.; PRECETTI, A. A. C. M.; KASTEN JUNIOR, P. Aspectos biológicos de *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja e algodoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 6, p. 147-155, 1977.

PERCHAT, S., BUISSON, C., CHAUF AUX, J., SANCHIS, V., LERECLUS, D., Y GOHAR, M. *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. **Journal of Invertebrate Pathology**. 2, 90, 2005.

PETERSON, A. Egg types among moths of the Noctuidae. **Florida Entomologist**, v. 47, p. 71-100, 1964.

PICKETT, B. R., GULZAR, A., FERRÉ, J. & WRIGHT, D. J. *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin resistance in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl. Environ. Microbiol.** 83, 23, 2017.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology**, v. 71, 255-281, 2007.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 71, 255–281, 2007.

POGUE, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

POLANCZYK, R. & ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003.

PORTUGAL, L., MUÑOZ-GARAY, C., DE CASTRO, D. L. M., SOBERÓN, M. & BRAVO, A. Toxicity of Cry1A toxins from *Bacillus thuringiensis* to CF1 cells does not involve activation of adenylate cyclase/PKA signaling pathway. **Insect Biochem. Mol Biol.** 80, 21–31, 2017.

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.

PRATISSOLI, D. & GONÇALVES, J. R. Broção. In: PRATISSOLI, D. (Org.) **Pragas Emergentes no Estado do Espírito Santo**. Alegre: UNICOPY, p. 46-53, 2015.

PRATISSOLI, D. Tomate: *Spodoptera* em tomate. **Cultivar: Frutas e Hortalças**, v. 54, p. 7, 2009.

QI, L.; QIU, X.; YANG, S.; LI, R.; WU, B. Cry1Ac protoxin and its activated toxin from *Bacillus thuringiensis* act differentially during the pathogenic process. **J. Agric. Food Chem.** 68, 5816–5824, 2020.

Quan, Y., Zhang, X., Cai, J., Li, X., & Zhang, Y. Insecticidal activity and binding properties of a fusion protein of a truncated Cry1Ie and a novel Cry1Ac1. **Journal of Invertebrate Pathology**, 112(2), 105-110, 2013.

QUAN, Y.; FERRÉ, J. Structural Domains of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Af Protein Unraveled by Tryptic Digestion of Alanine Mutants. **Toxins**, 11, 368, 2019.

QUAN, Y.; LAZARO-BERENGUER, M.; HERNANDEZ-MARTINEZ, P.; FERRE, J. Critical domains in the specific binding of radiolabeled Vip3Af insecticidal protein to brush border membrane vesicles from *Spodoptera* spp. and cultured insect cells. **Applied and Environmental Microbiology**. 87:24, 2021.

QUEIROZ-SNATOS, L.; CASAGRANDE, M. M.; SPECHT, A. Morphological Characterization of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) **Neitropical Entomology**, 47, 517-542, 2018.

RAMÍREZ, R.; IBARRA, J. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, p. 125 – 129, 2008.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J; FRUTOS, R. Novel Vip3-Related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology** 71:6276-6281, 2005.

RAYMOND, B.; CRICKMORE, N. Biopesticides. **US, Patent Application Publication**, 16/638, 357, 2020.

RAYMOND, B.; ELLIOT, S. L.; ELLIS, R. J. Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD-1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, 307-313, 2008.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends Microbiol.** 18, 189–94, 2010.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; WRIGHT, D. J.; ELLIS, R. J.; CRICKMORE, N. BONSALL, M. B. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. **Environmental Microbiology**, v. 11, 2556-2563, 2009.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P.R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: An impotent pathogen? **Trends Microbiol.** 18, 189–194, 2010.

RAYMOND, B.; SAYYED, A. H.; WRIGHT, D. J. Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Proc. R. Soc. B**, 272, 1519–1524, 2005.

REN, Y.; ZHOU, X.; DONG, Y.; ZHANG, J.; WANG, J.; YANG, M. Exogenous gene expression and insect resistance in dual bt toxin *Populus x euramericana* ‘Neva’ transgenic plants. **Sec. Plant Pathogen Interactions**, v. 12, 2021.

ROH, J. Y.; CHOI, J. Y.; LI, M. S.; JIN, B. R.; HOJE, Y. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, p. 547 – 559, 2008.

ROH, J.Y.; CHOI, J.Y.; LI, M.S.; JIN, B.R.; JE, Y.H. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **J. Mol. Biol.** 17, 547–559, 2007.

SÁNCHEZ-SOTO, A. I., SAAVEDRA-GONZÁLEZ, G. I.; IBARRA, J. E.; SALCEDO-HERNÁNDEZ, R.; BARBOZA-CORONA, J. E.; DEL RINCÓN-CASTRO, M. C. 2015. Detection of β -exotoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis* using an easy bioassay with the nematode *C. Aenorhabditis elegans*. **Lett. Appl. Microbiol.** 61, 562–567, 2015.

SANSONETTI, P. J. War and peace at mucosal surfaces. **Nat. Rev. Immunol.** 4, 953, 2004.

SANTIAGO, G. P. Avaliação dos efeitos de extratos aquosos de plantas sobre a biologia da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) mantida em dieta artificial. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)**. Universidade Federal do Piauí, 2005.

SANTOS, J. M., et al. Susceptibility of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3Aa20 and other Cry toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Crop Protection**, v. 132, p. 105172, 2020.

SANTOS, K. B. MENEGUIM, A. M.; NEVES, P. M. O. J. Biology and consumption of *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) in different hosts. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

SAUKA, D. H., PERALTA, C., PÉREZ, M. P., ONCO, M. I., FIODOR, A., CABALLERO, J., PALMA, L. *Bacillus toyonensis* biovar Thuringiensis: A novel entomopathogen with insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests. **Biological Control**, 167, 104838. 2022.

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

SCHMID, A.; BENZ, R.; JUST, I.; AKTORIES, K. Interaction of *Clostridium botulinum* C2 toxin with lipid bilayer membranes. Formation of cation-selective channels and inhibition of channel function by chloroquine. **J. Biol. Chem.** 269, 16706-16711, 1994.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62, 775–806, 1998.

SCRIBER, J. M. Sequential diets, metabolic costs and growth of *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) feeding upon dill, lima bean and cabbage. **Oecologia**, v. 51, p. 175-180, 1981.

SEBESTA, K., Y HORSKA, K. Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica Et Biophysica Acta**. 209, 357-376, 1970.

SELLAMI, S.; TOUNSI, S.; JAMOSSI, K. Les protéines insecticides binaires Vip1, Vip2 de la souche entomopathogène *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture (ASJP)**, v. 7, p. 80-85, 2016.

SENA, J. A., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S., & FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, 75(7), 2236–2237, 2009.

SERAFINI, L. A. & BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. A. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. 433 p.

SHAVER, A. C.; DOMBROWSKI, P. G.; SWEENEY, J. Y.; TREIS, T.; ZAPPALA, R. M.; SNIEGOWSKI, P. D. Fitness evolution and the rise of mutator alleles in experimental *Escherichia coli* populations. **Genetics**, v. 162, 557-566, 2002.

SHEN, Z.; KRAMER, V.; SHOTKOSKI, F.; WARREN, G. Novel Vip3 proteins and methods of use. **European Patent: 1499176**. 2003.

SHI, Y.; MA, W.; YUAN, M.; SUN, F.; PANG, Y. Cloning of *vip1/vip2* genes and expression. Of *Vip1Ca/Vip2Ac* proteins in *Bacillus thuringiensis*. **World Journal of Microbiological Biotechnology**. 23, 501-507, 2007.

SHI, Y.; XU, W.; YUAN, M.; TANG, M.; CHEN, J.; PANG, Y. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. **Journal of Applied Microbiology**. 97, 757-764, 2004.

SHOUR, M. H. & SPARKS, T. C. Biology of the soybean looper, *Pseudoplusia includens*: Characterization of last-stage larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 74, p. 531-535, 1981.

SILVA, D. M. et al. Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola**, v. 74, p. 18-31, 2017.

SILVA, M. S.; BUENO, A. F.; STECCA, C. S.; ANDRADE, K.; NEVES, P. M. O. J.; OLIVEIRA, M. C. N. Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioidea* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants. **Florida Entomologist**, 100 (4), 752-760, 2017.

SILVAIN, J.F. & B. LALANNE-CASSOU. Distinction entre *Spodoptera latifascia* (Walker) et *Spodoptera cosmioidea* (Walker), bona species (Lepidoptera: Noctuidae). **Rev. Franc. d'Entomol.** v. 19, p. 95-97, 1997.

SINGH, D.; SAMIKSHA; THAYIL, S. M.; SOHAL, S. K.; KESAVAN, A. K. Exploration of insecticidal potential of Cry protein purified from *Bacillus thuringiensis* VIID1. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, 362-369, 2021.

SMILOWITZ, Z. Electrophoretic patterns in hemolymph protein of cabbage looper during development of the parasitoid *Hyposoter exiguae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, p. 93-99, 1973.

SMITH, J. L.; LEPPING, M. D.; RULE, D. M.; FARHAN, Y.; SCHAAFSMA, A. W. Evidence for field-evolved resistance of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F *Bacillus thuringiensis* protein and transgenic corn hybrids in Ontario, Canada. **Journal of Economy Entomology**. 110, 2217-2228, 2017.

SMOUSE, D. & NISHIURA, J. A *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin induces programmed cell death in mosquito larvae. **Cell Death Differ.** 4, 1997.

SOBERÓN, M. MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of Action of Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis* and Resistance Mechanisms. **Microbial Toxins**, 1, 2018.

SOSÁ-GOMEZ, D. R. et al. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: **Embrapa-CNPSO**, p. 90, 2010.

SOUZA, H. S. Aspectos bionômicos de *Spodoptera eridania* (Cramer): Uma praga em expansão na cultura da soja no cerrado brasileiro. **EntomoBrasilis**, v. 7, n. 2, p. 75-80, 2014.

SPARKS, T. C. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 1, p. 8–17, 2013.

SPETCH, A. et al. Identificação morfológica e molecular *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e amplificação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n.6, 2013.

SRIVASTAVA, C. P. et al. *Helicoverpa armigera* management in pulses-present scenario and future strategies. In: **Recent Advances in Helicoverpa armigera Management**, p. 265-286, 2005.

STEINHAUS, E. A. On the correct author of *Bacillus sotto*. **Journal of Insect Pathology**, v. 3, p. 97-100, 1961.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology** v. 103, p. 1031–1038, 2010.

STRAYER, J. & GREEN, G. L. Soybean insect management. **Florida Cooperation Extension Service Circular**, v. 395, p. 1-15, 1974.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu Rev Entomol.** 39, 47–49, 1994.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–521, 2013.

TAILOR, R.; TIPPETT, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular microbiology**, 6(9), 1211-1217, 1992.

TALAEI-HASSANLOUI, R., BAKHSHAEI, R., HOSSEININAVEH, V., KHORRAMNEZHAD, A. Effect of midgut proteolytic activity on susceptibility of lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Front Physiology**. 4, 406, 2013.

TAN, F.R.; ZHU, J.; TANG, J.; TANG, X.M.; WANG, S.Q.; ZHENG, A.P.; LI, P. Cloning and characterization of two novel crystal protein genes, cry54Aa1 and cry30Fa1, from *Bacillus thuringiensis* strain BtMC28. **Curr. Microbiol.** 58, 654–659, 2009.

TANAKA, S., YOSHIZAWA, Y. & SATO, R. Response of midgut epithelial cells to Cry1Aa is toxin-dependent and depends on the interplay between toxic action and the host apoptotic response. **FEBS J.** 279, 1071–1079 2012.

TANAKA, S.; MIYAMOTO, K.; NODA, H.; JURAT-FUENTES, J. L.; YOSHIZAWA, Y. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **FEBS J.** 280, 1782–1794, 2013.

TAY, W. T.; MAHON, R. J.; HECKEL, D. G.; WALSH, T. K.; DOWNES, S. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab is conferred by mutations in an ABC transporter subfamily A protein. **PLoS Genet**, v. 11, 2015.

TEODORO, A. V. et al. *Spodoptera cosmioideis* (Walker) e *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae): Novas Pragas de Cultivos da Região Nordeste. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 131, p. 1-8, 2013.

TETREAU, G.; WANG, R.; WANG, P. Fitness of Bt-resistance cabbage loopers on bt cotton plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 15, p. 1322 – 1330, 2017.

THE UNIPROT CONSORTIUM, UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021, **Nucleic Acids Research**, v. 49, p. 480–489, 2021.

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal–endotoxin: effects on insect and mammals cells *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Cell Science**, v. 60, p. 181–197, 1983.

TOJO, A. & AIZAWA, K. Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta–endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombyx mori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 576–580, 1983.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **J. Invertebr. Pathol.** 111, 1–12, 2012.

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

VALICENTE, F. H. Manejo integrado de pragas da Cultura do Milho. **Circular Técnica. Embrapa**, 2 – 13, 2015.

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**, 37, 702-708, 2008.

VALICENTE, F.H. & I. CRUZ. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovírus. Sete Lagoas, Embrapa, 1, 23p., 1991 (**EMBRAPA-CNPMS, Circular Técnica**, 15).

VALVERDE, L. Microestructura del huevo de *Spodoptera eridania* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Zoologica Lilloana**, v. 51, p. 53-56, 2007.

VALVERDE, L.; VIRLA, E. Parasitismo natural de huevos de las principales especies de Noctuidae (Lepidodoptera) plagas en el cultivo de soja en tucumán, Argentina. **Boletín de sanidad vegetal**, v. 33, p. 469-476, 2007.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **J. Invertebr. Pathol.**, v. 101, p. 1–16, 2009.

VAN RENSBURG, J. J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola lufusca* to Bt transgenic maize. **S. African J. Plant Soil**, 24, 147–151, 2007.

VILARINHO, E. C. et. al. Movement of “*Spodopetra frugiperda*” adults (Lepidoptera: Noctuidae) in maize in Brazil. **The Florida Entomologist**, v. 94, p. 480-488, 2011.

VILAS-BÔAS, G. T.; LEMOS, M. V. F. Diversity of cry genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 605-613, 2004.

WANG, F., et al. Efficacy of Vip3Aa20 protein against lepidopteran pests of maize. **Pest Management Science**, v. 72, n. 5, p. 1055-1061, 2016.

WANG, J., BOETS, A., RIE, J. V., REN, G. Characterization of *cry1*, *cry2* and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, 63-71, 2003.

WANG, S.; KAIN, W.; WANG, P. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exert toxicity by multiple pathways in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 102, 59-66, 2018.

WANG, Z.; NORRIS, S.; BERO, L. The advantages and limitations of guideline adaptation frameworks. **Implementation Science**, v. 13, 2018.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. **Advances in Insect Control**. 109-121, 1997.

WOLFERSBERGER, M. G. 1990. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia**. 46:475–77, 1990.

WONG, K. Big data challenges in genome informatics. **Biophysical Reviews**, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines Specification for Bacterial Larvicides for Public Health Use, WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2. Report of the WHO.

Xiao, Y., Zhang, T., Liu, Y., & Zhao, Z. Cloning, expression and insecticidal activity of *vip1Ca* gene from *Bacillus thuringiensis* GZ1-7. **Biocontrol Science and Technology**, 24(6), 644-655, 2014.

YANG, J., QUAN, Y., SIVAPRASATH, P., SHABBIR, M. Z., WANG, Z., FERRÉ, J., & HE, K. Insecticidal activity and synergistic combinations of ten different bt toxins against *Mythimna separata* (walker). **toxins (basel)**. 10(11), 2018.

YU, C.G.; MULLINS, M.A.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Appl. Environ. Microbiol.** 63, 532–536, 1997.

YU, G. G. et al. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 532–536, 1997.

YUDINA, T. G; KONUKHOVA, A. V; REVINA, L. P; JOSTINA, L. I; ZALUNIN, I. A; CHESTUKHINA, G. G. Antibacterial activity of Cry- and Cyt- proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Can J. Microbiol.** 49, 37-44, 2003.

ZHANG, H.Y., YU, Z.N., DENG, W.X. 2000. Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. **J. Invertebr. Pathol.** 76, 191–197, 2000.

ZHANG, J. T.; YAN, J. P.; ZHENG, D. S.; SUN, Y. J.; YUAN, Z. M. Expression of *mel* gene improves the UV resistance of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiol**, v. 105, 151-157, 2008.

ZHANG, X., CANDAS, M., GRIKO, N. B., TAUSSIG, R. & BULLA, L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 9897–9902, 2006.

ZHANG, Y.; LI, X.; TIAN, H.; AN, B.; YAN, B.; CAI, J. Vegetative insecticidal protein Vip3Aa is transported via membrane vesicles in *Bacillus thuringiensis* BMB171. **Toxins**, v. 14, 2022.

ZHENG, J. et al. Evolution and dynamics of megaplasmids with genome sizes larger than 100 kb in the *Bacillus cereus* group. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2013.

ZHOU, L.; SLAMTI, L.; LEROUX, C.; LERECLUS, D. RAYMOND, B. The social biology of quorum sensing in a naturalistic host pathogen system. **Current Biology**, v.24, 2417-2422, 2014. XU, C.; WANG, B. C.; YU, Z.; SUN, M. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. **Toxins**, 6:2732–2780, 2014.