



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KAREN BIANCHI DOS SANTOS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À *Spodoptera eridania* (CRAMER), *Spodoptera cosmioides* (WALKER) E *Spodoptera frugiperda* (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

KAREN BIANCHI DOS SANTOS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À *Spodoptera eridania* (CRAMER), *Spodoptera cosmioides* (WALKER) E *Spodoptera frugiperda* (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro M. O. J. Neves

Co-Orientadora: Dra. Rose Monnerat

Londrina  
2008

KAREN BIANCHI DOS SANTOS

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS À *Spodoptera eridania* (CRAMER), *Spodoptera cosmioides* (WALKER) E *Spodoptera frugiperda* (SMITH)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes –  
EMBRAPA/CENARGEN

---

Profa. Dra. Gislayne F. Lemes Trindade Vilas-Boa –  
UEL

---

Dr. Flavio Moscardi – EMBRAPA/SOJA

---

Prof. Dr. Luis Francisco Angeli Alves – UNIOESTE

---

Prof. Dr. Amarildo Pasini – UEL

---

Prof. Dr. Daniel R. Sosa-Gómez EMBRAPA/SOJA

---

Prof. Dr. Mauricio Ursi Ventura – UEL

---

Prof. Dr. Pedro M. Oliveira Janeiro Neves  
Orientador UEL

Londrina, 06 de junho de /2008.

Aos meus pais Walter e Sueli Santos;  
e a minha irmã Rachel

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos de saúde, capacitação e oportunidade,

Ao Prof. Dr. Pedro M. O. J. Neves pela sua orientação, críticas, seu incentivo e sobretudo sua amizade e compreensão;

À Dra Rose Monnerat pela orientação, sugestões, apoio, incentivo, compreensão e amizade demonstrada na condução deste trabalho;

À Pesquisadora Ana Maria Meneguim pelos ensinamentos, sugestões, críticas, apoio, incentivo, compreensão e amizade demonstrada ao longo de minha vida acadêmica;

À Profa. Dra. Gislayne Vilas-Boas pelos ensinamentos, sugestões, críticas, apoio, incentivo, compreensão, amizade e boa vontade demonstrada ao longo deste trabalho;

Aos professores do curso de Doutorado em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina e professores/pesquisadores do IAPAR, pelos conhecimentos oferecidos;

À todo pessoal do laboratório de Entomologia do IAPAR, especialmente a funcionária e amiga Selia;

À todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia da Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnológicos, em especial, Érica, Lilian, Carol, Paulo, Felipe, Vinicius, por toda ajuda e amizade;

À todos os colegas da Bthek, em especial ao Marcelo e Renata, pelo apoio; A todos do setor de Informática e Biblioteca e serviços auxiliares; Aos funcionários do Departamento de Agronomia da UEL, especialmente à Veda e a Graciane;

À Profa Dra Inês Cristina Batista Fonseca pela colaboração nas análises estatísticas;

Ao Fernando pela compreensão e apoio;

À minha família, por sempre me apoiar e incentivar em tudo o que faço, em especial aos meus pais Walter Jorge dos Santos e Sueli Bianchi dos Santos e à minha irmã Rachel;

E a todos, que diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SANTOS, Karen Bianchi. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas à *Spodoptera eridania* (cramer) *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** 2008. 87f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

Entre as pragas de plantas cultivadas o complexo de espécies do gênero *Spodoptera* é uma das mais importantes. *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania* têm sido relatadas como pragas de algodão (*Gossypium hirsutum*) e soja (*Glycine max*), enquanto que *Spodoptera frugiperda* de milho (*Zea mays*) e algodão. Este estudo teve por objetivo selecionar estirpes de *Bacillus thuringiensis* altamente patogênicas a *S. cosmioides*, *S. eridania* e diferentes populações de *S. frugiperda*, além de identificar proteínas Cry para o controle dessas espécies. O intuito deste trabalho também foi caracterizar, por métodos morfológicos e moleculares, estirpes de *Bacillus thuringiensis* que possam ser empregadas no controle biológico de *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda* através de uma formulação. Cem estirpes que apresentaram toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera foram avaliadas através de bioensaio seletivo quanto a patogenicidade a três espécies de *Spodoptera*. Bioensaios de dose foram realizados com estirpes de *B. thuringiensis* que causaram mortalidade acima de 70% no bioensaio seletivo. Foi determinada a concentração letal (CL50) de estirpes de *B. thuringiensis* sobre *S. eridania*, *S. cosmioides* e populações de *S. frugiperda* dos estados da Bahia e Paraná. Após a caracterização molecular, as proteínas Cry, identificadas e comuns entre as estirpes, foram purificadas para a realização do bioensaio de dose contra as três espécies estudadas. As estirpes que demonstraram serem promissoras no controle das três espécies de *Spodoptera* foram formuladas. Para os bioensaios de dose e avaliação dos formulados preliminares, as concentrações foram preparadas e inoculadas em dieta artificial. A avaliação da mortalidade das lagartas foi realizada no segundo e quinto dia após o início do bioensaio de dose e dos formulados. As estirpes S608, BR9, BR10, BR37 e BR45 proporcionaram alta mortalidade sobre *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*, tendo sido identificadas, através de PCR, os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* e *cry2*; *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry2*; *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry3*; *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ad*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry2* e *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry3* no DNA das estirpes S608, BR9, BR10, BR37 e BR45 respectivamente. *S. eridania* e *S. cosmioides* foram mais susceptíveis a proteína Cry2A e Cry1Ab respectivamente, já *S. frugiperda* apresentou alta mortalidade às proteínas Cry1Aa e Cry1Ab. Com relação aos formulados, todos proporcionaram mortalidade de 100% na dose estudada. A identificação de estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas oferece novas perspectivas de controle dessas três espécies de *Spodoptera*.

**Palavras-chave:** *Bacillus thuringiensis*. *Spodoptera eridania*. *Spodoptera cosmioides*. *Spodoptera frugiperda*. Proteína Cry.

SANTOS, Karen Bianchi. **Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 87p. 2008. Thesis (Doctorate in Agronomy) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## ABSTRACT

Among the pests of cultivated plants the species of the gender *Spodoptera* is one of the most important. *Spodoptera cosmioides* and *Spodoptera eridania* were reported as cotton (*Gossypium hirsutum*) and soybean pests (*Glycine max*), while *Spodoptera frugiperda* corn (*Zea mays*) and cotton pests. The objectives of this research were select strains of *Bacillus thuringiensis* could be effective against *S. cosmioides*, *S. eridania* and different geographical populations of *S. frugiperda*, besides identifying proteins Cry for the control of those species. The intention of this work also was characterized by morphologic and molecular methods, strains that can be used in the biological control of *S. cosmioides*, *S. eridania* and *S. frugiperda* through a formulation. One hundred strains that presented toxicity to insects of the order Lepidoptera had been tested against larvae of three species of *Spodoptera* through selective bioassay. Dose Bioassay was accomplished with strains of *B. thuringiensis* that caused mortality above 70% in the selective bioassay. The CL50 of *S. eridania*, *S. cosmioides* and populations of *S. frugiperda* of the states of Bahia and Paraná were determined by strains of *B. thuringiensis*. After the molecular characterization, the proteins Cry, identified and common among the strains, were purified for the accomplishment of the dose bioassay against the three species. The strains that demonstrated are promising in the control of the three species *Spodoptera* were formulated. For the dose bioassay and evaluation of the formulated preliminaries, the concentrations were prepared and inoculated in artificial diet. The mortality evaluation of the caterpillars was accomplished in the second and fifth day after the dose bioassay and the formulation test. The strains S608, BR9, BR10, BR37 and BR45 showed high mortality to the larvae of *S. eridania*, *S. cosmioides* and *S. frugiperda*, were identified, through PCR, the genes cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB and cry2; cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB, cry2; cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB, cry3; cryIAa, cryIAb, cryIAd, cryIC, cryID, cryIE, cry2 and cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIB, cry3 in DNA of the strains S608, BR9, BR10, BR37 and BR45 respectively. *S. eridania* and *S. cosmioides* were more susceptibility the protein Cry2A and CryIAb respectively, *S. frugiperda* presented high mortality to the proteins CryIAa and CryIAb. The formulations caused 100% mortality. The identification of strains of *B. thuringiensis* with high level of insecticidal activity of three species *Spodoptera* offers new perspectives of control.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*. *Spodoptera eridania*. *Spodoptera cosmioides*. *Spodoptera frugiperda*. Protein Cry.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 8  |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 11 |
| 2.1 <i>Spodoptera</i> spp. NA CULTURA DO ALGODÃO.....   | 11 |
| 2.2 DESCRIÇÃO, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E HÁBITOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> .....  | 11 |
| 2.3 DANOS OCASIONADOS POR <i>Spodoptera frugiperda</i> .....  | 12 |
| 2.4 DESCRIÇÃO, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E HÁBITOS DE <i>Spodoptera eridania</i> E<br><i>Spodoptera cosmioides</i> .....  | 13 |
| 2.5 DANOS OCASIONADOS POR <i>Spodoptera eridania</i> e <i>Spodoptera cosmioides</i> .....   | 14 |
| 2.6 AMOSTRAGEM, MONITORAMENTO E MEDIDAS DE CONTROLE DE <i>S. frugiperda</i> , <i>S.</i><br><i>eridania</i> e <i>S. cosmioides</i> .....   | 15 |
| 2.7 CONTROLE MICROBIANO DE LEPIDOPTEROS.....  | 16 |
| 2.8 <i>Bacillus thuringiensis</i> .....   | 18 |
| 2.8.1 Modo de Ação das Proteínas-Cristal .....  | 18 |
| 2.8.2 Utilização de <i>B. thuringiensis</i> no Controle de Insetos-Pragas na Agricultura .....  | 19 |
| 2.8.3 Utilização de <i>B. thuringiensis</i> no Controle de <i>Spodoptera</i> spp.....   | 20 |
| 2.8.4 Proteínas-Cristal para o Controle de Insetos-Pragas .....   | 22 |
| 2.8.5 Plantas Geneticamente Modificadas.....  | 23 |
| 2.8.6 Bioinseticidas .....  | 25 |
| <b>3 ARTIGO: SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE<br/><i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> TÓXICAS À <i>Spodoptera eridania</i><br/>(CRAMER), <i>Spodoptera cosmioides</i> (WALKER) E <i>Spodoptera frugiperda</i><br/>(SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)</b> ..... | 27 |
| 3.1 INTRODUÇÃO .....  | 27 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 29 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 39 |
| <b>4 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....  | 62 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 63 |

## 1 INTRODUÇÃO

Entre os principais fatores que afetam a produtividade das culturas de interesse econômico, destaca-se a ocorrência de pragas. Os danos causados pelos insetos acarretam grandes prejuízos econômicos em todo o globo terrestre, ainda que somente cerca de 10% dos insetos conhecidos possam ser considerados pragas da agricultura ou pragas urbanas (ALVES, 1998; GALLO et al., 2002). Anualmente, no mercado mundial de defensivos agrícolas, são gastos cerca de US\$ 1,8 bilhão em agroquímicos, sendo que inseticidas e acaricidas correspondem a 30% desse total (RIBEIRO; PINEDO, 2001; ALMEIDA; BATISTA FILHO, 2001).

As culturas de milho, soja e algodão se destacam principalmente nos cerrados brasileiros. A produção de milho no Brasil tem sido contabilizada em duas grandes safras cultivadas durante o ano agrícola com uma área de maior extensão no período de verão, próxima aos 10 milhões de hectares, e na safrinha, no outono, sendo superior a 3 milhões de hectares na safra de 2002/2003 (REVISTA CORREIO AGRÍCOLA, 2004). A cultura do algodoeiro ocupa atualmente uma área de aproximadamente 1.100 mil hectares e no ano de 2005 produziu cerca de 1.309 mil toneladas de algodão. A Região Centro-Oeste é responsável por 64,9% da produção nacional de algodão em pluma, seguida da Região Nordeste com 23% e da Região Sudeste com 9,2% (CONAB, 2006). A soja é considerada uma cultura de grande expressão no Brasil, atendendo a demanda mundial de óleo e de proteína dessa leguminosa como fonte alimentar humana e animal (MASCARENHAS; TANAKA, 1995).

O ataque de pragas é um dos fatores que mais limitam a produtividade dessas "commodities", principalmente lepidópteros que as utilizam como hospedeiro durante todo o ciclo vegetativo. Nos sistemas agrícolas constituídos de soja, milho, feijão e algodão, há uma oferta contínua de alimento a insetos-pragas polípagos, como é o caso de espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) (SANTOS 2001, SANTOS et al., 2005; SANTOS, 2007). Além dessas culturas, outras como sorgo, tomate, hortaliças e frutíferas também são atacadas frequentemente por espécies desse gênero, provocando, através da alimentação, danos em diferentes órgãos das plantas, podendo ocasionar prejuízos significativos (KING; SAUNDERS, 1984; NORA et al., 1989; CAPINERA, 2001).

Santos (1997, 2007) relata que quando as lavouras de milho entram na fase de maturação, ocorre uma movimentação das mariposas de *Spodoptera frugiperda* (Smith) para áreas adjacentes cultivadas com o algodoeiro, ovipositando, e assim, iniciando-se o ciclo

biológico neste hospedeiro. *S. frugiperda* e *Spodoptera cosmioides* (Walker) são citadas por Silvie et al. (2001) como pragas na cultura do algodão no Brasil. Segundo Santos (2001), pode-se, atualmente, considerar *S. frugiperda* como uma das principais pragas do algodoeiro pela frequência de ataques e por causar danos no caule, folhas, botões florais e maçãs. Desde a safra 99/00, tem sido constatada de forma crescente a ocorrência de *Spodoptera eridania* (Cramer) e *S. cosmioides* em lavouras de algodoeiro, provocando desfolha e podendo ocasionar danos nos botões e maçãs (SANTOS et. al., 2005; SANTOS, 2007).

Para o controle efetivo dessas pragas, são necessárias aplicações de inseticidas de largo espectro, que muitas vezes, quando aplicados de forma inadequada e intensiva, podem acarretar desequilíbrio ecológico. Conseqüentemente, esse desequilíbrio afeta a dinâmica dos inimigos naturais e, em certas circunstâncias, promove o surgimento de populações de insetos resistentes. Desse modo, torna-se necessário a busca por alternativas de controle de pragas que resolvam parcial ou totalmente os problemas de impacto ambiental e de resistência. O controle biológico como tática de manejo integrado de pragas é promissor devido a sua seletividade e sustentabilidade, pois é realizado por diferentes organismos como insetos parasitóides, predadores e patógenos. No grupo dos patógenos, destacam-se os vírus, os fungos e as bactérias.

Entre as bactérias, o *Bacillus thuringiensis* Berliner é uma das mais utilizadas no controle de insetos pragas e vetores (ALVES, 1998; MONNERAT; BRAVO, 2000). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva que durante o processo de esporulação produz inclusões cristalinas. Estas são compostas por ô-endotoxinas, também denominadas proteínas-cristal ou proteínas Cry, que apresentam toxicidade para larvas de insetos. Essas bactérias são altamente específicas na sua atividade, de modo que não causam danos a insetos não-alvo, a vertebrados e ao meio ambiente (KRIEG; LANGENBRUCH, 1981; HOFTE; WHINTELEY, 1989; MONNERAT; BRAVO, 2000).

Bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* vêm sendo utilizados há mais de 40 anos no controle de lepidópteros e, mais recentemente, no controle de dípteros e coleópteros (DIAS, 1992; FEITELSON et. al., 1992). A maioria dos produtos à base de *B. thuringiensis* usada para controlar lepidópteros-praga consiste na mistura esporos-cristais produzida pela estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, que apresenta amplo espectro de atividade larvicida dentro da ordem Lepidoptera (NAVON, 1993). Entretanto, entre os lepidópteros, diversas espécies do gênero *Spodoptera* são pouco suscetíveis a esses produtos (MOAR et. al., 1990; INAGAKI et al., 1992; NAVON, 1993; LAMBERT et al., 1996). Outra alternativa é a inserção e expressão de genes *cry* em plantas de interesse econômico. Plantas transgênicas

apresentam vantagens em relação ao uso de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, tais como a persistência no meio ambiente e a proteção relacionada a degradação por raios UV (SCHNEPF et al.,1998; RIESENMAN; NICHOLSON, 2000).

*S. frugiperda* é a principal praga das lavouras de milho no Brasil, enquanto que *S. eridania* e *S. cosmioides* estão presentes em diversas áreas cultivadas com soja. Atualmente, observa-se nas regiões do cerrado brasileiro uma expansão da área de ocorrência dessas espécies de lepidópteros também nos cultivos de algodoeiro causando prejuízos às lavouras. Esse fato estimula a busca por conhecimentos sobre a eficácia de *B. thuringiensis* no controle dessas espécies de *Spodoptera*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Spodoptera* spp. NA CULTURA DO ALGODÃO

As espécies do complexo do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) são pragas importantes das plantas cultivadas como algodão, milho, soja, feijão, tomate, sorgo, hortaliças, frutíferas, danificando órgãos das plantas, podendo ocasionar prejuízos significativos (KING; SAUNDERS, 1984; SANTOS et al., 2005; SANTOS, 2007). A existência de culturas hospedeiras irrigadas, principalmente nas regiões de cerrado, prolonga no tempo a possibilidade de sobrevivência dos insetos, aumentando o número de gerações nos diferentes agroecossistemas. Nessas condições, as mariposas estabelecem um processo de dispersão entre lavouras formadas por espécies vegetais semelhantes, mas implantadas em épocas diferentes, como também entre espécies vegetais diferentes (SANTOS, 2007). *S. frugiperda* é considerada uma praga importante para o algodoeiro no Brasil, causando danos no caule, folhas, botões florais, flores e maçãs (SANTOS, 2001; SANTOS, 2007). Além de *S. frugiperda*, há evidências de que outras espécies do gênero *Spodoptera* estão ocorrendo em áreas cultivadas com algodão no cerrado. Nas últimas cinco safras, constatou-se de forma crescente a ocorrência de *S. eridania* e *S. cosmioides* em lavouras de algodão. Essas espécies estão mais presentes nas regiões de cerrado, causando desfolha e danificando os órgãos frutíferos (SANTOS, 2007).

### 2.2 DESCRIÇÃO, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E HÁBITOS DE *Spodoptera frugiperda*

*Spodoptera frugiperda* é um inseto da ordem Lepidoptera, família Noctuidae. As mariposas dessa espécie apresentam coloração cinza-escura, com asas de 35 mm de envergadura. As asas anteriores são mosqueadas, e as posteriores esbranquiçadas com borda cinza. Na metade das asas anteriores dos machos aparece uma mancha clara ovalada, bem definida e unida a uma outra mancha oblíqua em forma de V (CRUZ et al., 1995; CRUZ et al., 1997; SANTOS, 2007). As mariposas migram entre plantas e culturas hospedeiras existentes nas regiões agrícolas dando início a oviposição (SANTOS, 2007). As posturas são

colocadas sob folhas, no caule e em estruturas frutíferas, podendo atingir de 1500 a 2000 ovos por fêmea (SANTOS, 2007; SANTOS et al., 2003; ALVES et al., 1992; CRUZ et al., 1995; GALO et al 2002). Os ovos, inicialmente de cor rosada clara e estriados radialmente, tornam-se cinzas antes da eclosão, que ocorre entre 3 a 7 dias (GALLO et al., 2002; SANTOS, 2007).

Ao eclodir, a lagarta tem 1,5 mm de comprimento, cor verde-claro, cabeça preta, com cerdas negras, e pode atingir em média, no último instar, 40 mm de comprimento, apresentando coloração variando de esverdeada a pardo-escura. Ao longo do corpo, a lagarta apresenta uma linha mediana longitudinal de cor marrom-clara, entre duas listras laterais de coloração mais clara. A cabeça da lagarta é mais escura com sutura em forma de "Y" invertido. A pupa, de cor marrom-escura, possui entre 14 a 17 mm de comprimento com o extremo abdominal terminando em dois apêndices em forma de V invertido (NAKANO et al., 1981; GALLO et al., 2002; SANTOS et al., 2003; SANTOS, 2007).

O ciclo larval de *S. frugiperda* varia de 12 a 30 dias em temperaturas de 18,8 a 30°C (LUNGINBILL, 1928; LEIDERMAN; SAUER, 1953; MENSCHOY, 1956; SOUZA et al., 2001; GALLO et al., 2002; SARMENTO et al., 2002) e após esse período, as lagartas dirigem-se ao solo para empupar (GALLO et al., 2002). Nos primeiros estádios, as lagartas produzem um tipo de fio de seda e através deste, distribuem-se entre as plantas, podendo apresentar uma distribuição uniforme na lavoura (SANTOS, 2007).

### 2.3 DANOS OCACIONADOS POR *Spodoptera frugiperda*.

Lagartas de *S. frugiperda*, devido à alimentação, reduzem a área foliar, afetando a capacidade fotossintética da planta, além de danificarem estruturas frutíferas. Esses danos diferenciam-se de acordo com a espécie de planta atacada, estágio fenológico, época do ataque e intensidade de infestação (SARMENTO et al., 2002). Segundo Carvalho (1970), essa espécie pode reduzir em até 20% a produção de milho, sendo o florescimento o período crítico para a planta submetida ao seu ataque. Os danos provocados por *S. frugiperda* consistem em um dos fatores limitantes na produção de milho doce amarelo, uma vez que a espécie danifica as espigas em até 60% (MITCHEL, 1978).

Na cultura do algodoeiro, a lagarta de *S. frugiperda* ocasiona danos desde a emergência até a maturação das plantas. Nos sistemas de plantio direto, a espécie danifica as plantas jovens de algodão, cortando-as logo acima do coleto. À medida que as partes basais

do caule vão se lignificando, as lagartas cortam as partes superiores e mais tenras do caule. Inicialmente as lagartas recém-eclodidas raspam o parênquima das folhas e a epiderme das brácteas dos botões florais, flores e maçãs. As lagartas médias danificam flores e estruturas internas, podendo perfurar maçãs, em fase de maturação avançada. Antes da perfuração, as lagartas geralmente raspam as paredes externas do fruto (SANTOS, 2007). Segundo estudo realizado por Veloso e Nakano (1983), uma lagarta de *S. frugiperda* pode danificar 2,2 botões florais e 1,4 maçãs. Esta espécie pode causar sérios prejuízos à produção pela redução do estande e danos ocasionados principalmente nas maçãs (SANTOS, 2007).

#### 2.4 DESCRIÇÃO, PARÂMETROS BIOLÓGICOS, HÁBITOS DE *Spodoptera eridania* E *Spodoptera cosmioides*

Os adultos de *S. eridania* possuem entre as nervuras radial e mediana um ponto preto ou uma tarja preta longitudinal ao corpo do inseto em cada asa anterior (SANTOS, 2007; SANTOS et al., 2003). Adultos de *S. cosmioides* apresentam as asas anteriores cinza-clara, mosqueadas longitudinalmente e margeadas por uma franja, enquanto que as asas posteriores são de cor branca-pérola com franja. Pode-se diferenciar macho e fêmea através das asas, uma vez que as fêmeas possuem asas desenhadas como mosaico de tonalidade preta e bege (SANTOS et al., 2003; SANTOS, 2007).

As posturas das mariposas de *S. eridania* e *S. cosmioides* são distribuídas em duas a três camadas, sendo a última camada recoberta por escamas oriundas do abdome das mariposas (SANTOS et al., 2003). As massas de ovos são irregulares, contendo aproximadamente 30 a 300 ovos (KING; SAUNDERS, 1984; SANTOS, 2007). Os ovos são inicialmente esverdeados, tornando-se marrons antes da eclosão.

As lagartas de ambas as espécies possuem características distintas. Ao eclodirem, as lagartas de *S. eridania* são verdes, com cabeça preta, permanecendo com um tom esverdeado durante todo o seu desenvolvimento (SANTOS et al., 2003). Nos primeiros estádios as lagartas apresentam quatro pontos escuros sobre o dorso na parte mediana do corpo. A partir do 3º ínstar, as lagartas possuem três listras longitudinais amareladas, duas laterais e uma dorsal. As lagartas de *S. cosmioides*, ao eclodirem, tendem ao marrom, possuindo cabeça preta. Nos primeiros estádios de desenvolvimento, a lagarta apresenta um tom pardo-negro-acinzentado, com 3 listras longitudinais alaranjadas, sendo uma dorsal e

duas laterais com pontos brancos. Acima dos pontos brancos estão presentes triângulos pretos apontando para o dorso do inseto. Lagartas desenvolvidas são pardas e apresentam uma faixa mais escura entre o 3º par de pernas torácicas e 1º par de falsas-pernas abdominais e dois pontos negros na extremidade final do abdome (GALLO et al., 2002; LEVY; HABECK, 1976; SANTOS et al., 2003; ZENKER et al., 2007).

Com relação ao ciclo larval, lagartas de *S. eridania* apresentam duração de 14 a 20 dias em temperaturas de 25 a 27 °C (PARRA et al., 1977; MATTANA; FOERSTER, 1988; SANTOS et al., 2005; CAPINERA, 2001). O número de instares varia entre seis e sete em temperaturas de 25 a 27 °C (REDFERN, 1967; PARRA et al., 1977; MATTANA; FOERSTER, 1988; SANTOS et al., 2005). Para lagartas de *S. cosmioides*, em temperaturas 22,3 a 30,4 °C, a variação da fase larval é de 13,4 a 28 dias (HABIB et al., 1983; BAVARESCO et al., 2002; BAVARESCO et al., 2003). O número de instares é de quatro a oito para esta espécie em temperaturas mencionadas anteriormente (SANTOS et al., 1980; HABIB et al., 1983; BAVARESCO et al., 2002; BAVARESCO et al., 2003).

## 2.5 DANOS OCASIONADOS POR *Spodoptera eridania* E *Spodoptera cosmioides*

Na cultura do algodoeiro, *S. cosmioides* e *S. eridania* ocorrem a partir da fase inicial da emissão dos botões florais e durante o pleno florescimento. A presença dessas espécies pode ser percebida ao serem constatados sinais de raspagem nas brácteas das estruturas de frutificação (SANTOS, 2007). As lagartas de *S. eridania* se alimentam principalmente de folhas e brácteas, raspam a casca das maçãs e podem danificar botões florais. No caso das lagartas de *S. cosmioides*, além de serem desfolhadoras, também perfuram botões florais e maçãs macias ao se alimentarem (SANTOS, 2007). Essas espécies podem ocasionar sérios prejuízos a cultura do algodoeiro, uma vez que uma lagarta de *S. eridania* pode danificar 1,7 botões florais e *S. cosmioides* pode provocar perfurações em 5,2 botões florais e 2,5 maçãs por lagarta (observação do autor).

Além do algodoeiro, lagartas de *S. eridania* e *S. cosmioides* eventualmente são encontradas na cultura da soja, *Glycine max*, (SANTOS et al., 2005; SANTOS, 2007), sendo consideradas as principais lagartas que atacam as vagens, assumindo importância a partir do início da fase reprodutiva da cultura (GAZZONI; YORINORI, 1995; REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 2000).

Essas espécies também foram relatadas ocasionando danos em culturas perenes, como de citrus (CAPINERA, 2001; SANTOS et al., 1980; GOMES, 1940). Nora et al. (1989) constataram a presença de *S. eridania* e *S. cosmioides* em pomares de maçã em Fraiburgo, SC, com posturas nas folhas e frutos. No 1° e 2° ínstaes, as lagartas alimentaram-se das folhas, e no 6° ínstar atacaram os frutos. A porcentagem de frutos danificados em dois pomares foi 35,4 e 24,7%.

## 2.6 AMOSTRAGEM, MONITORAMENTO E MEDIDAS DE CONTROLE DE *S. frugiperda*, *S. eridania* E *S. cosmioides* NA CULTURA DO ALGODOEIRO

De um modo geral, as infestações de *S. frugiperda* ocorrem através da dispersão de mariposas provenientes de áreas cultivadas com milho, milheto e outras gramíneas para o algodoeiro. Fato semelhante também ocorre com as espécies *S. eridania* e *S. cosmioides*, que migram de lavouras de soja para áreas cultivadas com algodoeiro (SANTOS, 2007). As pressões populacionais crescem a partir da fase de florescimento do algodoeiro. A postura é realizada freqüentemente sob as folhas desenvolvidas, próximas do caule e presentes na parte mediana das plantas (ADAMCZYK et al., 1977). Plantas com folhas necrosadas e brácteas raspadas pode ser uma indicação da presença de espécies de *Spodoptera* na lavoura. As condições de temperatura de 25 a 32 °C e baixa umidade relativa favorecem o seu crescimento populacional (PATEL, 1981; BAVARESCO et al., 2002; SARMENTO et al., 2002). A constatação de 10% de plantas com lagartas pequenas de *S. frugiperda* nas folhas e brácteas dos botões florais e maçãs, ou 5% de flores com lagartas médias, indica o momento adequado para controle (SANTOS, 1999) sendo as lagartas pequenas mais facilmente controladas pelos inseticidas. O melhor momento para o seu controle é durante o período em que estiver raspando sob as folhas e a epiderme das brácteas dos botões florais e maçãs. Os produtos reguladores de crescimento (IGR), carbamatos e naturalyte, têm mostrado boa eficiência contra lagartas pequenas e médias de *Spodoptera* spp. O monitoramento e medidas de controle para *S. eridania* e *S. cosmioides* são semelhantes àqueles recomendados para *S. frugiperda* (SANTOS, 2007).

Segundo Gallo et al. (2002), são recomendados vinte e nove ingredientes ativos para o controle químico de *S. frugiperda*. Entretanto, existem relatos de evolução da resistência de *S. frugiperda* aos inseticidas utilizados (DIEZ-RODRIGUES; OMOTO, 2001;

YU, 1991), mostrando que esta tática de controle tem sérias limitações práticas. Esse fato mostra a necessidade de investigar alternativas de controle que resolvam parcial ou totalmente os problemas de impacto ambiental e de resistência ocasionados pelos inseticidas químicos.

## 2.7 CONTROLE MICROBIANO DE LEPIDOPTEROS

O uso freqüente de inseticidas químicos onera os custos de produção, geram desequilíbrio e potencializam problemas ambientais. O controle biológico de pragas utilizando microorganismos, como vírus, fungos e bactérias, é uma das alternativas de controle, reduzindo ou substituindo a utilização de agrotóxicos. Uma das principais vantagens do uso de entomopatógenos é a sua alta especificidade com relação ao inseto-praga, não afetando outros insetos, plantas e animais (MONNERAT; BRAVO, 2000).

No grupo dos vírus, os baculovírus são os mais estudados e utilizados como bioinseticida (POLANCZYK, 2004). O nucleopolihedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) começou a ser aplicado em lavouras de soja no início da década de 80, demonstrando bons resultados (MOSCARDI, 1998). Outro vírus com grande potencial como bioinseticida é o nucleopolihedrovirus de *S. frugiperda*, produzido em formulação pó molhável pela Embrapa Milho e Sorgo (CRUZ, 2000). A infecção por esse entomopatógeno inicia-se por meio da ingestão de alimento contaminado e subsequente liberação das partículas virais nas células epiteliais do intestino médio, causando a morte do inseto em poucos dias (RIBEIRO et al., 1999). De acordo com Valicente e Cruz (1991), fatores como idade do inseto, virulência do isolado e condições climáticas são responsáveis pelo aparecimento dos sintomas e da morte do inseto.

O fungo *Beauveria bassiana* (Bals.), de ampla distribuição geográfica, ocorre com maior frequência em insetos e amostras de solo, sendo encontrado no campo em coleópteros, lepidópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros. A infecção pode ocorrer por via oral, pelo tegumento ou pelo espiráculo, sendo que 12 h após o contato com o inseto ocorre a germinação dos conídios. Decorridas 72 h, o inseto pode ser totalmente colonizado, advindo à morte em função da falta de nutrientes e do acúmulo de substâncias tóxicas. As condições favoráveis para o desenvolvimento da doença incluem umidade relativa em torno de 90% e temperatura entre 23 e 28 °C. Diversos estudos têm comprovado a eficiência de *B. bassiana* no controle de *S. frugiperda* (FRANÇA et al., 1989; RODRIGUES

JÚNIOR e PRATISSOLI, 1989) e *Alabama argillacea* (Hübner) (MARTINS et al., 2007). Outro fungo, *Nomuraea rileyi*, ocorre naturalmente sobre coleópteros, ortópteros e, principalmente, lepidópteros. *N. rileyi* apresenta potencial para controlar várias pragas de importância econômica, dentre elas espécies da família Noctuidae. Nesta família merecem destaque *A. gemmatalis*, principal praga da cultura da soja (KUMAR et al., 1997); *Pseudoplusia includens* (Walker) (KISH; ALLEN, 1978), praga secundária da soja e do algodoeiro e *S. frugiperda* (SANTOS, 2007) praga polífaga. A eficiência de *N. rileyi* no controle de *S. frugiperda* foi constatada em alguns países por Gladstone (1989), Lezama-Gutierrez et al. (1996), Lecuona e Lanteri (1999), sendo que no Brasil também existem vários relatos (HABIB; PATEL, 1990; MOSCARDI et al., 1992; SÍLOTO et al., 2000; TIGANO et al., 1995). Esse patógeno penetra no inseto via oral ou pelo tegumento, sendo que a germinação pode ocorrer em 12 h e a invasão da hemocele em 24 h. A colonização e morte do hospedeiro ocorrem entre três a cinco dias e seis a sete dias, respectivamente (ALVES, 1998).

Outro patógeno promissor no controle de pragas de importância econômica é a bactéria *B. thuringiensis*. Diversos biopesticidas à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* encontram-se disponíveis no mercado. Entre eles, merecem destaque os produtos comerciais Dipel® e Xentari® devido à eficácia no combate a diversas pragas agrícolas (BOWLING et al., 2007; DEQUECH et al., 2007; JANMAAT et al., 2007; MAHON et al., 2007). A eficiência de *B. thuringiensis* tem sido demonstrada no controle de *A. argilacea* (CAMPOS, 1981; MOREIRA; ALL, 1995; FERNANDES et al., 2003), *A. gemmatalis* (SOSA-GOMEZ et al., 1992; MONNERAT et al., 2007; MIKLOS et al., 2007; BUNDY; MCPHERSON, 2007), *P. includens* (BUNDY; MCPHERSON, 2007; ISAKOVA et al., 2007; MIKLOS et al., 2007) e *S. frugiperda* (MONNERAT et al., 2007). Essa bactéria, além de ser o microrganismo mais utilizado na fabricação de biopesticidas (WEISER, 1986), tem sido alvo de inúmeras pesquisas na construção de plantas de interesse comercial que expressam os genes *cry* para o controle de insetos-pragas (BARTON et al., 1987; FISCHHOFF et al., 1987; PERLAK et al., 1990; CHENG et al., 1992; CHENG et al., 1998; FUJIMOTO et al., 1993; NAYAK et al., 1997; KOZIEL et al., 1993; STEWART et al., 1996; BETZ et al., 2000; DE COSA et al., 2001).

## 2.8. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de solo Gram-positiva que, durante a fase vegetativa e de esporulação, produz proteínas com atividade entomopatogênica. Entre as proteínas produzidas por *B. thuringiensis*, as que apresentam maior interesse para o controle de insetos-pragas são as  $\delta$ -endotoxinas, denominadas também como proteínas-cristal ou proteínas Cry. As diversas proteínas Cry possuem especificidades diferentes contra várias ordens de insetos (HOFTE; WHINTELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998; DE MAAGD et al., 2003).

### 2.8.1 Modo de Ação das Proteínas-Cristal

As proteínas Cry, apresentam-se como protoxinas sem ação entomopatogênica e para que ocorra o desencadeamento dos efeitos tóxicos existe a necessidade de serem ativadas. Seu modo de ação se faz por via oral, dependendo de uma série de passos. Inicialmente, o cristal protéico deve ser ingerido pela larva de um inseto suscetível, ocorrendo em seguida a solubilização do cristal no intestino médio do inseto e o processamento proteolítico pela ação de proteases específicas, que liberam a toxina na forma ativa. Essa toxina se liga a receptores específicos, localizados na membrana das células epiteliais do intestino médio do inseto, e se inserem na membrana apical, criando poros ou canais de íons (DE MAAGD et al., 2003; SCHNEPF et al., 1998; KNOWLES, 1994).

Para a ação da proteína Cry, são necessárias a solubilização do cristal e a conseqüente liberação de seus monômeros, dependendo, basicamente, do pH alcalino do intestino do inseto. Diferenças verificadas nesse processo algumas vezes explicam o grau de toxicidade entre diferentes proteínas para um mesmo inseto, sendo a redução da solubilidade um dos mecanismos de resistência dos insetos às  $\delta$ -endotoxinas (MONNERAT; BRAVO, 2000; ARANTES et al., 2002).

Após a solubilização, as protoxinas são digeridas por proteases do intestino médio do inseto, principalmente as tripsinas. As proteínas ativadas ligam-se exclusivamente, e com alta afinidade, a receptores específicos do epitélio do intestino, sendo fator decisivo para a toxicidade e especificidade das  $\delta$ -endotoxinas produzidas por *B. thuringiensis*

(MONNERAT; BRAVO, 2000; ARANTES et al., 2002). Nos insetos pertencentes a ordem Lepidoptera, a intoxicação manifesta-se por paralisia imediata do tubo digestivo e das peças bucais, levando à lise celular e à interrupção da alimentação. Esses sintomas são seguidos por uma ruptura na integridade do intestino, inanição e posterior septicemia, ocasionando a morte do inseto (CAPALBO et al., 2005).

As diversas estirpes de *B. thuringiensis* produzem, em adição às proteínas Cry, uma série de outras proteínas, as quais podem ou não participar da ação entomopatogênica. Destas, a principal é a proteína Cyt que consiste em uma citolisina de ação inespecífica. Essa proteína é produzida principalmente pela variedade *israelensis*, sendo acumulada no cristal juntamente com a proteína Cry típica desta variedade (CAPALBO et al., 2005). *B. thuringiensis israelensis* é tóxico graças à síntese do cristal durante a esporulação, que contém quatro toxinas: Cry11Aa, Cry4Aa, Cry4Ba e Cyt1Aa. As toxinas agem em sinergia, entretanto, a Cry11Aa possui melhor atividade quando as toxinas são testadas individualmente. De acordo com estudos realizados por Beltrão (2004), a Cry11Aa liga-se a receptores específicos no epitélio das larvas, porém a afinidade do complexo não é elevada. Esse resultado indica que a ação do *B. thuringiensis israelensis* depende de interações complexas entre as toxinas.

### 2.8.2 Utilização de *Bacillus thuringiensis* no Controle de Insetos-Pragas na Agricultura

*B. thuringiensis* é o organismo entomopatogênico mais utilizado para o controle de insetos pragas da ordem Lepidoptera (CARMONA, 2002). A ação de *B. thuringiensis* é relatada no controle de diversos lepidópteros-praga. Kota et al. (1999) observaram mortalidade de 100% em lagartas de *Helicoverpa zea* (Boddie), praga extremamente nociva à cultura do milho e cujo dano vai desde o ataque dos cabelos até o consumo das espigas (GALLO et al., 2002).

A principal praga da soja, *A. gemmatilis*, que chega a provocar desfolhamento completo da planta, também pode ser controlada por *B. thuringiensis*. Schünemann et al. (2002) testificaram que das quinze estirpes estudadas, onze causaram 72% de mortalidade a essa praga.

Além de *A. gemmatilis*, Monnerat et al. (2007) constataram que de 1400 estirpes, vinte e sete demonstraram serem promissoras no controle de *S. frugiperda*,

importante praga do milho e algodão, e de *Plutella xylostella* (Linnaeus), praga de crucíferas. A eficiência de *B. thuringiensis* tem sido demonstrada no controle de outros lepidópteros-praga como *A. argillacea*, *Heliothis virescens* (Fabricius) (CAMPOS, 1981; MOREIRA; ALL, 1995; FERNANDES et al., 2003), *P. Includens* e *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (ISAKOVA et al., 2007).

Bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* vêm sendo utilizados no controle de lepidópteros e, mais recentemente, no controle de coleópteros (DIAS, 1992; FEITELSON et al., 1992). *Anthonomus grandis* (Boheman) é considerado praga principal do algodoeiro, pois pode causar grandes danos nos botões florais, flores e maçãs novas do algodão (SANTOS, 2007). No Brasil, estirpes de *B. thuringiensis* têm sido testadas com o bicudo do algodoeiro. De acordo com estudos realizados por Praça et al. (2004) as estirpes S234 e S997 foram as mais efetivas contra o bicudo, uma vez que apresentaram a concentração letal para matar 50% da população testada (CL50) inferior ( $10,4 \cdot 10^{-6}$  e  $1,8 \cdot 10^{-6}$  ug/cm<sup>2</sup> respectivamente) ao padrão *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ( $537 \cdot 10^{-6}$  ug/cm<sup>2</sup>). Isakova et al. (2007) constataram que das treze estirpes, três demonstraram alta atividade a *A. grandis*.

O coleóptero *Hypothenemus hampei* (Ferrari), que causa extremos prejuízos ao cafeeiro por atacar frutos em qualquer estado de maturação, é dificilmente controlado por métodos convencionais. Com isso, a utilização de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* seria uma estratégia eficiente, uma vez que é considerado altamente tóxico a essa espécie (MENDEZ- LOPEZ et al., 2003).

### 2.8.3 Utilização de *Bacillus thuringiensis* no Controle de *Spodoptera* spp.

Tendo em vista a importância de espécies do gênero *Spodoptera* como pragas, vários estudos estão sendo realizados com o objetivo de encontrar e caracterizar estirpes de *B. thuringiensis* que possam ser utilizadas na produção de bioinseticidas. A espécie *S. frugiperda*, por sua importância mundial, tem sido a mais estudada para seleção de estirpes patogênicas (HERNANDEZ, 1988; LOPES-EDWARDS et al., 1999; WERNECK et al., 2000; ADAMCZYK et al., 1998a). A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia constatou que 14 das 457 estirpes de seu banco de Bactérias Entomopatogênicas causaram 100% de mortalidade às lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*. Sendo que as estirpes S550 e S845

apresentaram CL<sub>50</sub> menor que o padrão *B. thuringiensis kurstaki*, relatado como uma das estirpes mais tóxicas contra lepidópteros (BATISTA et al., 2003).

Estudos de seleção de estirpes de *B. thuringiensis* contra outras espécies de *Spodoptera* foram realizados em *Spodoptera litura*, *Spodoptera littoralis* e *Spodoptera exigua*, contudo, estas espécies não apresentam registro de ocorrência no Brasil. A mortalidade por *B. thuringiensis* em *S. litura* verificada por Wang et al. (1989) foi de 80%. Para *S. littoralis* e *S. exigua*, Salama et al. (1995) e Kota et al. (1999) observaram mortalidade de 88,3% e 100% respectivamente.

Os estudos de seleção de estirpes de *B. thuringiensis* para espécies de *Spodoptera* têm mostrado que essas são pouco suscetíveis e difíceis de serem controladas (MOAR et al., 1990; INAGAKI et al., 1992; NAVON, 1993; LAMBERT et al., 1996). Isso pode ser observado em relação a *S. frugiperda*, uma vez que poucas estirpes apresentam patogenicidade contra essa espécie. Em estudo realizado por Bohorova et al. (1996), com 352 estirpes nativas do México, foi demonstrado que apenas uma estirpe ocasionou mortalidade entre 70 e 80%, enquanto que 149 provocaram mortalidade entre 0 e 10%. Hernandez (1988) observou que das 52 estirpes de *B. thuringiensis* testadas contra *S. frugiperda*, somente duas causaram 100% de mortalidade. Dias et al. (1999) testaram 23 estirpes, originadas da Argentina, contra lagartas de terceiro instar de *S. frugiperda*, e verificaram que oito estirpes apresentaram mortalidade de 100%. Arango et al. (2002) e Uribe et al. (2003), em estudos realizados na Colômbia, testaram 1.290 estirpes de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda*, obtendo resultados significativos para 11 destas, com CL<sub>50</sub> variando de 11 a 962 ng proteína/cm<sup>2</sup> dieta e mortalidade entre 70 e 95%.

Diversos estudos realizados com estirpes de *B. thuringiensis* originárias do Brasil, obtiveram resultados promissores no controle de *S. frugiperda* (SALVADORI et al., 1986; VALICENTE, 1995; VALICENTE; FONSECA, 2004; POLANCZYK, 2004; BARRETO, 2005). Recentemente, Monnerat et al. (2007) constataram que vinte e sete estirpes demonstraram alta patogenicidade a *S. frugiperda*. Werneck et al. (2000) estudaram o efeito de 205 estirpes de *B. thuringiensis* contra essa espécie, de modo que apenas uma causou mortalidade de 100%. Loguercio et al. (2001) testaram 3.408 estirpes nativas de *B. thuringiensis*, de forma que apenas 3,3% causaram mortalidade acima de 75% e 52% das estirpes mostraram-se pouco ativas (0 a 10%). Em avaliação realizada por Fatoletto (2002) sobre a eficiência de 115 estirpes de *B. thuringiensis* de várias regiões do Brasil contra *S. frugiperda*, foi comprovado 100% de mortalidade para 25 delas (21,7%) e acima de 75% para outras 31 estirpes (26,9%).

Até o momento, não existem trabalhos científicos relatando a seleção de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. eridania* e *S. cosmioides*.

#### 2.8.4 Proteínas-Cristal para o Controle de Insetos-Pragas

As proteínas-cristal são importantes para a agricultura e saúde pública, pois apresentam toxicidade para diversos insetos pertencentes às ordens Lepidoptera (Cry1 e Cry2), Diptera (Cry2, Cry4, Cry10 e Cry11) e Coleoptera (Cry3) (SCHNEPF et al., 1998). Com isso, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar proteínas Cry mais virulentas para insetos-pragas.

Isakova et al. (2007) identificaram 13 estirpes contendo as proteínas Cry1A, Cry1B e Cry1C que ocasionaram mortalidade em *P. includens*, *Trichoplusia ni* (Hubner), *H. virescens*, *D. saccharalis*, *S. frugiperda* e *A. grandis*. Bravo et al. (1998) constaram que das proteínas Cry caracterizadas de 1.948 estirpes originárias do México, 246 continham 25 genes *cry1* diferentes. Ainda segundo os autores, nos bioensaios realizados contra lagartas neonatas de *S. frugiperda*, a maior atividade inseticida foi das toxinas Cry1C e Cry1D, com a CL50 variando entre 22 e 1124 ng proteína /cm<sup>2</sup> dieta. Resultados semelhantes foram observados por Aranda et al. (1996) para *S. frugiperda* com as proteínas Cry1C, Cry1D, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1E, de forma que a CL50 das duas primeiras foi de 31 e 77 ng proteína/cm<sup>2</sup> dieta, respectivamente. De acordo com Bohorova et al. (1997), as toxinas mais ativas para essa espécie foram Cry1D e Cry1F, causando mortalidade entre 90 e 100%, com CL50 para Cry1D de 1,54 ng toxina/g dieta artificial. Variações na eficiência das proteínas Cry contra *S. frugiperda* foram constatadas por Luo et al. (1999) cujas proteínas Cry1Bb e Cry1Fa foram mais tóxicas para essa espécie (CL<sub>50</sub> de 308 e 109 ng proteína/cm<sup>2</sup> dieta, respectivamente), enquanto que Cry1Ca foi pouco tóxica (CL<sub>50</sub> de 1144 ng proteína/cm<sup>2</sup> dieta).

### 2.8.5 Plantas Geneticamente Modificadas

Nestes últimos anos, vários genes de defesa das plantas, que conferem resistência a pragas ou patógenos, foram clonados e introduzidos nas plantas. A manipulação de genes de *B. thuringiensis* codificadores de toxinas distintas (proteínas Cry) permitiu a introdução destes genes em várias espécies de plantas cultivadas. Estas plantas, que os expressam em folhas e estruturas de frutificação, apresentam atividade de controle para insetos-pragas desfolhadores e destruidores de órgãos frutíferos de algodão (ICAC, 2000; WAKELYN et al., 2003; TRAXLER; GODOY-AVILA, 2004).

Cultivares transgênicos de algodoeiro que expressam endotoxinas de *B. thuringiensis* têm sido plantados desde 1996 nos Estados Unidos, México, Austrália, Argentina e África do Sul. Vários trabalhos realizados em condições de laboratório e campo com cultivares de algodão resistente a insetos, que expressam proteínas de *B. thuringiensis*, indicam eficiência no controle de *H. zea*, *H. virescens*, *Pectinophora gossypiella* (Saunders), *A. argillacea* (ICAC 2002; ALI et al., 2006) e *P. includens* (MIKLOS et al., 2007; BUNDY; MCPHERSON, 2007).

Em trabalho realizado com *H. virescens*, Henneberry et al. (2001) observaram que folhas e flores de algodoeiro que expressavam genes *cry* de *B. thuringiensis* proporcionaram, respectivamente 100 e 96% de mortalidade para essa espécie. Os mesmos autores observaram, também, que quando ingeridas, as folhas e flores de algodoeiro que expressavam as proteínas Cry ocasionaram, respectivamente, mortalidade de 95 e 47% para *T. ni* e 57 e 37% para *S. exigua*.

Trabalhos realizados com algodão Bollgard, que expressa a proteína Cry1Ac derivada de *B. thuringiensis*, demonstraram eficiência no controle de lagartas de curuquerê (*A. argillacea*), lagarta-da-maçã (*H. virescens*) e lagarta rosada (*P. gossypiella*) (RAMIRO et al., 2002; ICAC 2002; ALI et al., 2005). Em trabalho realizado por Ramiro et al. (2002), foi constatada a ausência de lagartas das espécies citadas acima no algodão Bollgard, enquanto que no algodão convencional, Delta Pine Acala 90, observou-se a infestação de curuquerê, lagarta-damaçã e lagarta rosada. Esse resultado comprova que a proteína Cry1Ac, contida em Bollgard, tem ação letal sobre essas espécies. Além da mortalidade, constatou-se que a produtividade do Bollgard foi semelhante a do convencional, sendo este submetido à aplicação de inseticidas para o controle de lagartas e superior ao algodão sem aplicação (RAMIRO et al., 2002).

Trabalhos mais recentes (PARISI et al., 2007; MIRANDA et al., 2007) indicaram que as variedades Bollgard demonstraram altos índices de mortalidade de larvas de *A. argillacea*. De acordo com Soares et al. (2007), os genótipos de algodoeiro modificados com a proteína Cry podem ser eficientes na mortalidade de *A. argillacea*. No caso de *S. frugiperda*, as cultivares DP90B e NUOPAL, que expressam a toxina Cry1Ac (Bollgard), não são resistentes ao ataque dessa praga (SANTOS, 2007). Em função desse fato, está em andamento no Brasil pesquisas a campo com a cultivar DP50, que expressa maior concentração das proteínas tóxicas Cry2Ab e Cry1Ac (Bollgard II - Monsanto), as quais são relatadas como eficientes para o controle de *S. frugiperda* (STEWART et al., 2000).

A modificação de plantas não é exclusividade apenas do algodoeiro. Existem outras plantas cultivadas que expressam proteínas Cry de *B. thuringiensis*, como a canola, a batata, o arroz, a soja e o milho (PANNETIER et al., 1995; RAMACHANDRAN et al., 2000; CHAN et al., 1996; STEWART et al., 1996; MIKLOS et al., 2007). Miklos et al. (2007) constataram alta mortalidade de *P. includens* e *A. gemmatilis* em variedades de soja que expressavam o gene *cry1*. Estudos em campo foram realizados para verificar a eficiência de milho híbrido que expressa a toxina de *B. thuringiensis*, no controle de *Ostrinia nubilalis* (Hubner), *H. zea* e *S. frugiperda*. Nas plantas híbridas de milho que expressam as proteínas Cry de *B. thuringiensis* houve uma redução significativa das pragas mencionadas acima, sendo que *O. nubilalis* teve 100% de controle (BURKNESS et al., 2002).

A redução dos prejuízos na lavoura proporcionada por cultivares que expressam genes de *B. thuringiensis* é evidente. Em experimento realizado por Adamczyk et al. (1998b) foi constatado dano de 60% na cultivar DP 5415 e de apenas 10% em plantas transgênicas Nucotn 33B, ocasionado por *S. frugiperda* e *S. exígua* em maçãs de algodoeiro. Com relação ao milho transgênico, o dano causado por *H. zea* foi de 21%, enquanto que em plantas de milho não-transgênico atingiu 65% (HASSELL; SHEPARD, 2002).

Além da *H. zea*, a broca-do-colmo, *D. saccharalis*, tem infestado a cultura do milho, causando prejuízos econômicos aos agricultores. Estudos realizados por Pícolo et al. (2002) indicaram que o híbrido MON810, que expressa a proteína Cry1Ac, controlou a lagarta-da-espiga, *H. zea* e da broca do colmo, *D. saccharalis*. Observou-se, também, a redução do número de lagartas e danos na espiga e no colmo, no milho MON810 quando comparado aos híbridos de milho convencional (C901, C909 e C806).

### 2.8.6 Bioinseticidas

Segundo Alam (2000) e Weiser (1986), *B. thuringiensis* é o microrganismo mais utilizado na fabricação de biopesticidas, de modo que diversas formulações têm sido testadas para o controle de insetos-pragas desde 1938. Devido a sua alta toxicidade e especificidade aos organismos alvos, *B. thuringiensis* tem sido a base da formulação dos bioinseticidas com maior sucesso comercial no mundo, sendo responsável por 90-95% do mercado de bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

Manifestações públicas contra o uso inadequado dos inseticidas convencionais e o surgimento de novas técnicas, especialmente aquelas voltadas para a tecnologia do DNA recombinante, acarretaram em um aumento do interesse dos órgãos de pesquisa e das indústrias sobre a utilização do *B. thuringiensis* na agricultura e na saúde pública (VAN FRANKENHUYZEN, 2000). As pesquisas sobre *B. thuringiensis* geraram informações sobre os aspectos determinantes na eficiência destes produtos, como a idade larval mais suscetível, o comportamento alimentar do inseto, as limitações ambientais, a segurança, o método de aplicação e a formulação (NAVON, 2000a). No entanto, nem sempre os resultados obtidos no laboratório correspondem aos de campo. O comportamento alimentar do inseto, a distribuição espacial e temporal dos insetos benéficos, além de outros fatores que influenciam a intensidade do contato entre *B. thuringiensis* e organismos não-alvo, podem reduzir o impacto desses biopesticidas sobre a praga (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

A utilização de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, no contexto mundial, tem tido resultados promissores no controle de insetos-pragas. Nos EUA, entre o período de 1980 e 1995, cerca de 2 milhões de hectares de florestas foram tratados com *B. thuringiensis kurstaki* para o controle de *Lymantria díspar*, em alguns casos, na redução drástica da população (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; VAN FRANKENHUYZEN, 2000). Na Austrália, produtos formulados com *B. thuringiensis* são utilizados para controle de pragas em algodão, frutíferas, ornamentais, fumo, entre outras culturas (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; VAN FRANKENHUYZEN, 2000). Em trinta províncias da China, produtos à base de *B. thuringiensis* são muito utilizados no controle de pragas de grandes culturas, florestas e hortaliças. No Egito, estes biopesticidas são utilizados principalmente, no controle de pragas do algodão. Em outros países como Israel, Indonésia, Malásia, Índia e países da África Ocidental, a utilização desse entomopatógeno no controle de pragas está em fase inicial de pesquisa e implementação (SALAMA; MORRIS, 1993). Países como Cuba e México lideram

a utilização dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* na América latina, especialmente para o controle de pragas nas culturas do algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho e pastagens. No Brasil, produtos à base de *B. thuringiensis* são utilizados para combater cerca de 30 pragas de importância agrícola, entretanto, a área de controle é pequena quando comparada à de Cuba (POLANCZYK; ALVES, 2003).

De acordo com Gelernter e Schab (1993) e Navon (2000b), as principais limitações em relação ao uso de *B. thuringiensis* são o elevado custo, que na maioria das vezes é superior ao dos inseticidas químicos; a baixa persistência em campo da maioria das formulações; o baixo espectro de ação e a ineficácia contra pragas de solo e endofíticas. A radiação solar é outro fator limitante, pois as proteínas Cry sofrem desnaturação pela ação do calor e pela luz UV (SILAPANUNTAKUL et al., 1983; DIAS, 1992; RIESENMAN; NICHOLSON, 2000;). Entretanto, esses autores enfatizam que pesquisas estão sendo desenvolvidas para minimizar essas desvantagens. Existem pesquisas voltadas a identificação de novos genes *cry*, o desenvolvimento de novas formulações, a expressão de genes *cry* em plantas, como também a ampliação dos conhecimentos sobre as interações de *B. thuringiensis* com outros entomopatógenos, predadores e parasitoides, e até mesmo inseticidas químicos.

### 3 ARTIGO A: SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* TÓXICAS A *Spodoptera eridania* (CRAMER), *Spodoptera cosmioides* (WALKER) E *Spodoptera frugiperda* (SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

#### 3.1 INTRODUÇÃO

O complexo de espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) tem demonstrado elevado potencial de dano sobre diversas plantas cultivadas. Esse gênero ataca as culturas de algodoeiro, milho, soja e tem sido referido com frequência em cultivos de sorgo, tomate, hortaliças e frutíferas, danificando, através da alimentação, diferentes órgãos das plantas, ocasionando prejuízos significativos (KING; SAUNDERS 1984; NORA et al. 1989, BAVARESCO et al., 2003; SANTOS, 2007). No Brasil, *Spodoptera frugiperda* (Smith) é considerada praga primária de milho e algodão (SANTOS, 1997; SILVIE et al., 2001; SANTOS, 2007) e as espécies *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) estão sendo relatadas como pragas importantes de algodão e soja (SANTOS, 2007). A ocorrência das espécies em sistemas agrícolas constituídos de soja, milho e algodão, os quais fornecem uma contínua oferta de alimento, tem demandado aplicações freqüentes e sucessivas de inseticidas, onerando os custos de controle e possibilitando o surgimento de resistência, como também danos ao ambiente e intoxicação para os operadores agrícolas.

Entre as alternativas de controle que minimizam os problemas de impacto ambiental, destaca-se a utilização de *Bacillus thuringiensis*. Esta bactéria gram-positiva produz inclusões cristalinas compostas por proteínas Cry, durante o processo de esporulação. As proteínas sintetizadas pela bactéria são tóxicas para larvas de insetos e, por serem altamente específicas na sua atividade, não causam danos a insetos não-alvo, a vertebrados e ao meio ambiente (KRIEG; LANGENBRUCH, 1981; HOFTE; WHITELEY, 1989; MONNERAT; BRAVO 2000). Em função disso, produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* são utilizados no controle de insetos pragas e vetores de doenças (VILAS-BÔAS et al., 2007; BORÉM, 2005).

Além da utilização direta de produtos formulados à base de *B. thuringiensis*, há uma busca por métodos mais práticos e eficientes para o aumento da produção de alimentos e fibras. Deste modo, as proteínas Cry têm sido utilizadas na obtenção de plantas transgênicas resistentes a insetos praga. As plantas que expressam as proteínas Cry permitem

a redução da quantidade de inseticidas e de intoxicações de agricultores, a diminuição do impacto ambiental e o aumento da margem de lucro, principalmente para pequenos produtores (BARROSO; HOFFMANN, 2007). Segundo estes autores, estudos estão sendo desenvolvidos para a obtenção de plantas constituídas de vários genes *cry* em sua estrutura, que proporcionem maior longevidade da resistência de plantas cultivadas a insetos.

Estudos com produtos comerciais à base de *B. thuringiensis kurstaki* para o controle de espécies de *Spodoptera* têm demonstrado que estas são pouco suscetíveis e de difícil controle (MOAR et al., 1990; INAGAKI et al., 1992; NAVON, 1993; LAMBERT et al., 1996). No entanto, segundo Beegle e Yamamoto (1992) estirpes de *B. thuringiensis aizawai* são consideradas patogênicas a lagartas de *Spodoptera* spp. A suscetibilidade pode estar atribuída não apenas ao modo de ação do patógeno e a variabilidade genética entre as populações da praga em diferentes hospedeiros (PASHLEY et al. 1985; MONNERAT et al. 2005), mas também a poucas formulações disponíveis. Devido a sua importância mundial entre as espécies do gênero, *S. frugiperda* tem sido a mais avaliada quanto a seleção de estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas (ADAMCZYK et al., 1998a; HERNANDEZ, 1988; LOPES-EDWARDS et al., 1999; WERNECK et al., 2000; MONNERAT et al., 2007). Para as espécies *S. eridania* e *S. cosmioides*, encontradas causando danos em áreas agrícolas no território nacional (SANTOS, 2007), não há relatos de trabalhos de prospecção de estirpes dessa bactéria. Em função disso, há a necessidade de identificação de estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas que possibilitem a produção de bioinseticidas e o desenvolvimento de plantas que expressem esses genes. Com isso, o presente estudo teve como objetivo: selecionar estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas sobre *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*; verificar a influência da origem geográfica de duas populações de *S. frugiperda* na susceptibilidade ao *B. thuringiensis*; caracterizar as estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas à *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda* através de métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares; determinar o grau de susceptibilidade das espécies de *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda* às proteínas Cry purificadas; e avaliar formulações preliminares à base de *B. thuringiensis* quanto à eficiência de mortalidade de *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Criação Estoque de Lagartas de *Spodoptera* spp.

As colônias de *S. eridania* e *S. cosmioides* foram iniciadas com indivíduos provenientes de lavouras de algodoeiro dos estados do Mato Grosso e Bahia, respectivamente. A criação de *S. frugiperda* foi iniciada com indivíduos provenientes de lavouras de algodoeiro dos estados da Bahia e Paraná. Essas espécies foram comparadas com espécimes identificados por taxonomistas e mantidos na coleção do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). A partir desses indivíduos, iniciou-se a criação estoque das três espécies estudadas em folhas de algodoeiro e dieta artificial à base de feijão-carioca, levedo de cerveja e gérmen de trigo (PARRA et al., 2001). A criação foi realizada no IAPAR em câmara climatizada à temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa (UR) de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 14h. Para a obtenção de postura de ovos, adultos foram colocados em gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro por 20 cm de altura), fechadas na extremidade superior com filó e na inferior com placa de Petri. Os adultos foram alimentados diariamente com solução aquosa de mel a 10% (SANTOS, 2005). A partir da criação estoque, foram obtidos ovos que originaram as lagartas de segunda geração em laboratório, utilizadas nos bioensaios.

#### 3.2.1.1 Criação estoque em folhas de algodão

Lagartas das três espécies foram criadas em recipientes plásticos tampados (7,5 cm de altura e 4 cm de diâmetro) contendo papel toalha umedecido com água destilada. Folhas de algodão da variedade IPR 120 foram utilizadas como alimento. As folhas foram lavadas em água corrente e submersas por 10 minutos em hipoclorito de sódio (2,5%) e, em seguida, lavadas em água corrente. O excesso de água das folhas foi retirado com papel toalha, antes de serem oferecidas às lagartas, evitando-se, assim, complicações digestivas. O alimento foi trocado diariamente até a obtenção de pupas (SANTOS, 2004), sendo estas transferidas para frascos plásticos (7,5 cm de altura e 4 cm de diâmetro) com papel toalha umedecido com água destilada, até a emergência do adulto. Casais emergidos no mesmo dia

foram individualizados em gaiolas cilíndricas de PVC e mantidos como descrito anteriormente (SANTOS, 2004). As posturas foram observadas e retiradas diariamente das gaiolas dos adultos. As massas de ovos foram colocadas em placa de Petri de 9,5 cm de diâmetro contendo papel filtro umedecido e mantidas em câmara climatizada a  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 14 h, até a eclosão.

### 3.2.1.2 Criação estoque em dieta artificial

A dieta foi preparada conforme procedimento descrito por Parra (2001). Os componentes nutricionais para a formulação da dieta basearam-se na dieta de Parra (2001). O feijão usado foi da variedade Carioca, previamente cozido, sendo a água do seu cozimento utilizada para o preparo da dieta. A dieta foi vertida ainda quente em recipientes plásticos tampados (7,5 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro). O suprimento de dieta foi de aproximadamente 1/3 do comprimento do recipiente, sendo colocadas três lagartas recém-eclodidas de cada espécie por recipiente.

As pupas obtidas foram sexadas e passadas para recipientes plásticos com tampa (7,5 cm de altura e 4 cm de diâmetro). Os adultos emergidos foram transferidos para gaiolas de PVC, como descrito anteriormente. As posturas de ovos efetuadas pelos casais nas gaiolas foram retiradas e colocadas em placa de Petri e mantidas à temperatura de  $27 \pm 2$  °C. Diariamente, observou-se a eclosão das lagartas para a realização dos bioensaios.

### 3.2.2 Seleção de estirpes de *B. thuringiensis*

Cem estirpes de *B. thuringiensis*, previamente identificadas como patogênicas a espécies da ordem Lepidóptera, pertencentes aos bancos de Entomopatógenos da Universidade Estadual de Londrina e da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (MONNERAT et al., 2007), foram submetidas a bioensaio seletivo realizado no IAPAR. Essas estirpes são originárias de amostras de solo e água de diferentes regiões do país.

### 3.2.2.1 Produção da suspensão de esporos-cristais

Estirpes de *B. thuringiensis* estocadas em papel de filtro contendo esporos e cristais foram recuperadas após imersão dos papéis em 1 ml de água destilada esterilizada seguida de breve agitação. Placas de Petri contendo meio Bacto-Peptonas (BP) (LECADET et al., 1980) foram inoculadas com 0,2 ml da suspensão bacteriana, sobre o meio de cultura com alça de Drygalski.

As placas foram incubadas em estufa a 30 °C até completa esporulação, a qual foi monitorada em microscópio óptico. Após dois dias de incubação, verificou-se a presença de colônias de *B. thuringiensis* em cada placa. O procedimento de recuperação das estirpes foi feito para as amostras que apresentaram contaminantes. Posteriormente, as estirpes foram multiplicadas em placas de Petri contendo meio BP, em número suficiente para a realização dos bioensaios, sendo as colônias recuperadas em água destilada esterilizada. As soluções obtidas com as diferentes estirpes tiveram sua concentração padronizada ( $10^8$  esporos/ml<sup>-1</sup>) através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e foram mantidas a -20 °C, até a realização dos bioensaios. Para comparação dos resultados, a estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, foi utilizada como padrão.

### 3.2.2.2 Bioensaio seletivo contra *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera frugiperda*

Bioensaios qualitativos, com cem estirpes de *B. thuringiensis* visando observar a mortalidade das lagartas, foram realizados espalhando-se 150 da mistura de esporos e cristais em 6 ml de dieta artificial (PARRA, 2001) distribuída previamente em recipientes plásticos de 100 ml. As suspensões de esporos e cristais foram absorvidas pela dieta e, em seguida, dez lagartas de segundo ínstar de cada espécie foram colocadas em cada recipiente, num total de três recipientes por bioensaio. Em seguida os insetos foram deixados em câmara climatizada à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 14h. Como testemunha, três recipientes foram mantidos sem a bactéria. O procedimento de bioensaio seletivo foi repetido duas vezes. A quantificação das lagartas mortas foi realizada no segundo e sétimo dia após o início do bioensaio.

### 3.2.2.3 Determinação da concentração letal (CL<sub>50</sub>) de estirpes de *Bacillus thuringiensis*

A concentração letal de cada estirpe de *B. thuringiensis* indutora de 50% de mortalidade larval (CL<sub>50</sub>) para as três espécies de *Spodoptera* foi determinada utilizando-se suspensões liofilizadas de esporos e cristais. As estirpes que apresentaram mortalidade acima de 70% às espécies testadas foram cultivadas por 72 h a 30 °C em 600 mL em meio NYSM (YOUSTEN, 1984), em erlenmeyer de 1000 mL, sendo submetidas à 250 rpm de agitação. Em seguida, a cultura de cada estirpe foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 min a 4 °C, congelada por aproximadamente 16 h e liofilizada por 18 h. Posteriormente, os materiais liofilizados foram pesados em alíquotas de 10 mg, diluídas em 1000 de água destilada esterilizada. Foram preparadas sete concentrações com doses decrescentes do patógeno (100,0; 50,0; 10,0; 5,0; 1,0; 0,5 e 0,01 µg/ml de água destilada esterilizada). Foram aplicados 150 da suspensão de cada concentração sobre 6 ml de dieta artificial livre de anticontaminante, distribuída em recipientes plásticos de 100 ml nos bioensaios contra *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*. Após a absorção da suspensão de esporos e cristais pela dieta, dez lagartas de segundo instar foram colocadas em cada recipiente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições por concentração, totalizando 50 lagartas por concentração. Cinco recipientes contendo dez lagartas foram mantidos sem a adição da bactéria, como testemunha. Após 48h, as lagartas sobreviventes foram transferidas para novos recipientes contendo dieta sem a bactéria. A determinação do número de lagartas mortas foi realizada no segundo e quinto dia do bioensaio (SILVA-WERNECK e MONNERAT, 2001). O procedimento do bioensaio de dose para as populações de *S. frugiperda*, originadas de lagartas coletadas em lavouras de algodoeiro da Bahia e Paraná, foi semelhante ao descrito anteriormente. Entretanto, devido ao canibalismo, foram individualizadas 24 lagartas, das duas populações, para cada concentração. Os bioensaios de dose para as três espécies de *Spodoptera* foram repetidos três vezes e foram mantidos em câmara climatizada à temperatura de  $27 \pm 2$  °C, UR de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 14h. Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de Probit (Finney, 1971), para a determinação da concentração letal. As CL<sub>50</sub> obtidas das duas populações de *S. frugiperda* foram comparadas pelo teste T ao nível de 5% de probabilidade.

### 3.2.3 Caracterização molecular das estirpes de *Bacillus thuringiensis*

Os procedimentos de extração de DNA e da técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) foram realizados na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. A técnica de PCR foi usada para identificação dos genes *cry* presentes nas estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas às três espécies de *Spodoptera*. Todas as reações se processaram em tubos de polipropileno de 0,2 mL, em um termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100™).

Para a extração de DNA as estirpes foram cultivadas em meio agar NYSM (YOUSTEN, 1984) a 30°C por 16 h. Uma alçada de células foi transferida para 200 µL de água destilada, e incubada a - 80°C por 20 min, cada tubo foi incubado em banho-maria a 100°C por dez min e centrifugado a 12000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para as reações de PCR (BRAVO et al., 1998). Alíquotas de 10µL do sobrenadante da cultura foram transferidas para um tubo contendo 12,5 µM de cada iniciador, 100mM de mistura de dNTP (Desoxinucleotídeos trifosfatados), tampão de reação e 2,5 U de Taq DNA polimerase (PHT) em um volume total de 50 µL. As concentrações dos reagentes foram as mesmas utilizadas para todas as reações de PCR.

Foram usados iniciadores gerais para identificação de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, e específicos para identificação de *cry1*, *cry4* e *cry9* (Tabela 1). Para identificação de genes *cry1* nas estirpes foram usados os pares de iniciadores gerais *gral-cry1* (BRAVO et al., 1998) e para o de genes *cry9* (*spe-cry9A*, *spe-cry9B*, *spe-cry9C*). A amplificação foi processada em aparelho termociclador e as condições das reações de PCR foram de 94 °C por um minuto para a desnaturação, 52°C por um minuto para o pareamento dos iniciadores, 72°C por um minuto de extensão num total de 30 ciclos, e uma fase de extensão extra de 72°C por cinco minutos. As condições das reações de PCR foram similares para todos os iniciadores, exceto a temperatura de pareamento que foi de 51°C para *cry9*.

Os genes da subclasse *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1D*) foram identificados utilizando os pares de iniciadores específicos descritos por Ceron et al., (1994): CJ1/CJ2, CJ3/CJ2, CJ4/CJ5, CJ6/CJ7, CJ8/CJ9, CJ10/CJ11 e CJ12/CJ13, respectivamente. Nesta etapa as condições foram de 92°C por um minuto de desnaturação, 53°C por um minuto de pareamento, 72°C por um minuto de extensão num total de 25 ciclos e uma extensão extra a 72°C por 10 minutos.

Para genes *cry1E*, *cry1F* e *cry1G* foram utilizados os pares de iniciadores específicos CJ14/CJ15, CJ16/CJ17 e CJ18/CJ19, enquanto que para os genes *cry3* foram

usados os pares de iniciadores CJIII20/CJIII21(CERON et al., 1995). Para esse grupo o procedimento foi realizado nas condições de 95°C por um minuto de desnaturação, 48°C por um minuto de pareamento, 72°C por um minuto de extensão totalizando 30 ciclos e uma extensão final de a 72°C por 5 minutos.

Foram feitas as reações de PCR com os pares de iniciadores gerais *gral-cry2*; *cry4D* e *cry4R*, respectivamente, para identificação de genes *cry2* e *cry4* (IBARRA et al., 2003). As condições das reações de PCR foram as seguintes: 94°C por 45 segundos de desnaturação, 45°C por 45 segundos de pareamento, 72°C por um minuto de extensão, totalizando 35 ciclos.

**Tabela 1** – Características de iniciadores gerais e específicos.

| Iniciadores         | Pareamento (°C) | Seqüência   | Gene(s)       | Produto (pb) |
|---------------------|-----------------|---|---------------|--------------|
| CJ1/CJ2             | 53              | 5'TTATACTTGGTTCAGGCC3'<br>5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3'                          | <i>CryIAa</i> | 246          |
| CJ3/CJ2             | 53              | 5'AACAACCTATCTGTTCTTGAC3'<br>5'CTCTTATTATACTTACACTAC3'                      | <i>CryIAb</i> | 216          |
| CJ4/CJ5             | 53              | 5'GTTAGATTAATAAGTAGTGG3'<br>5'TGTAGCTGGTACTGTATTG3'                         | <i>CryIAc</i> | 180          |
| CJ6/CJ7             | 53              | 5'CAGCCGATTTACCTTCTA3'<br>5'TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA3'                          | <i>CryIAd</i> | 171          |
| CJ8/CJ9             | 53              | 5'CTTCATCACGATGGAGTAA3'<br>5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT3'                         | <i>CryIB</i>  | 367          |
| CJ10/CJ11           | 53              | 5'CATAATTTGGTCGTTCTGTT3'<br>5'AAAGATCTGGAACACCTTT3'                         | <i>CryIC</i>  | 130          |
| CJ12/CJ13           | 53              | 5'CAAACCTCTAAATCCTTTCAC3'<br>5'CTGCAGCAAGCTATCCAA3'                         | <i>CryID</i>  | 290          |
| Gral-cry1           | 52              | CTGGATTTACAGGTGGGGATAT (d)<br>TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT (r)                   | <i>CryI</i>   | 558          |
| CJ14/CJ15           | 72              | 5'GGAACCAAGACGAACTATTGC<br>5'GGTTGAATGAACCCTACTCCC                          | <i>CryIE</i>  | 147          |
| CJ16/CJ17           | 72              | 5TGAGGATTCTCCAGTTTCTGC<br>5'CGGTTACCAGCCGTATTTTCG                           | <i>CryIF</i>  | 177          |
| CJ18/CJ19           | 72              | 5'ATATGGAGTGAATAGGGCG<br>5'TGAACGGCGATTACATGC                               | <i>CrIG</i>   | 235          |
| Gral-cry2           | 50              | 5' GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT<br>(d)<br>5'GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG<br>(r) | <i>Cry2</i>   | 526          |
| CJIII20/CJIII<br>21 | 72              | 5'TTAACCGTTTTTCGCAGAGA<br>5'TCCGCACTTCTATGTGTCCAAG                          | <i>Cry3</i>   | 652 - 733    |
| Cry4d e<br>Cry4r    | 50              | 5'CGTTTTCAAGACCTAATAATATAATAC<br>C (d)<br>5'CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)   | <i>Cry4</i>   | 321          |
| spe-cry9A           | 59              | GTTGATACCCGAGGCACA (d)<br>5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)                       | <i>Cry9A</i>  | 571          |
| spe-cry9B           | 59              | TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC<br>(d)<br>5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)           | <i>Cry9B</i>  | 402          |
| spe-cry9C           | 59              | CTGGTCCGTTCAATCC (d)<br>5'CCGCTTCCAATAACATCTTTT (r)                         | <i>Cry9C</i>  | 306          |

Uma alíquota de 24 de cada produto de PCR foi misturada com tampão de amostra (azul de bromofenol - 0,05g; sacarose - 2,5g; EDTA 0,5M; água destilada) e aplicada em gel de agarose 2%. A corrida eletroforética foi processada em Tampão TBE (Tris-base - 54g. L<sup>-1</sup>; Ácido bórico - 27,5g. L<sup>-1</sup>; EDTA 0,5M - pH 8,0). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio diluído em água, na concentração de 1µg/ml por 20 minutos, sendo descorado em água destilada por 15 min. O gel foi observado em transluminador sob luz UV e fotografado em foto-documentador, modelo Eagle Eye (Stratagene). As estirpes de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* e *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* foram utilizadas como padrões.

### 3.2.4 Caracterização de proteínas através de SDS-PAGE

As proteínas presentes nos cristais das estirpes que apresentaram melhores resultados quanto à toxicidade foram submetidas à eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%), permitindo conhecer o perfil das proteínas produzidas. As estirpes foram previamente crescidas em 15 mL de meio NYSM em frascos erlenmeyer de 50 mL por 72 h em incubador rotativo a 28°C e 200 rpm. Em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com a metodologia proposta por Lecadet et al. (1991). Foram transferidos 1,5 ml das culturas bacterianas para tubos de microcentrifuga de 2 mL previamente autoclavados. Estes foram centrifugados a 12.800 rpm, 20 min. Os sobrenadantes, resultantes da centrifugação, foram descartados e os sedimentos lavados com 1,5 mL de NaCl 0,5 M por 20 minutos. Após o descarte do NaCl 0,5M, as paredes do tubo "eppendorf" foram secas com papel de filtro. Os sedimentos foram lavados por duas vezes com 1,5 mL de PMSF (fluoreto de fenilmetil sulfonil) a 1mM e centrifugados a 12.800 rpm por 20 min. Descartou-se o PMSF 1mM e os sedimentos foram ressuspensos em 500 µL de PMSF 1 mM e armazenados a -20 °C. As preparações de esporos-cristais das estirpes foram analisadas por SDS-PAGE, conforme procedimento descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados 15 µL das preparações de esporos-cristais para a realização da eletroforese, sob voltagem constante de 150 V, por 1 h e 30 min. A estirpe *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1 foi utilizada como padrão.

### 3.2.5 Caracterização ultra-estrutural de estirpes de *Bacillus thuringiensis*

A caracterização morfológica das estirpes quanto às suas inclusões protéicas foi feita por microscopia eletrônica de varredura. As estirpes foram cultivadas em meio NYSM em incubador rotativo a 200 rpm, a 30°C, por 48 a 72 horas até a verificação da esporulação da cultura. As inclusões cristalinas foram purificadas, utilizando o protocolo descrito por Thomas e Ellar (1983). Foram transferidos 200 mL das estirpes selecionadas e da linhagem *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* para tubos Falcon previamente esterilizados. A seguir, foi realizada a centrifugação a 12.800 rpm por 30 minutos a 5°C. Os sedimentos foram lavados por três vezes em 10 mL de uma solução contendo PMSF 0,1 mM e triton 0,01% e ressuspensos em 3 mL de solução de TTN (Triton 1%, Tris HCl 0,05M 8 pH e NaCl 0,01M). Em seguida, as suspensões foram sonicadas em gelo a 3 pulsos de 1 minuto para separar os esporos dos cristais. Um gradiente de sacarose foi preparado em tubo Ultraclear (Beckman<sup>R</sup>) de 30 mL, nas concentrações de 84%, 79%, 72% e 69%. Sobre as soluções de sacarose foram acrescentadas as suspensões de esporos-cristais. O gradiente foi centrifugado a 47.800 x g por 30 minutos a 15 °C. Após centrifugação das amostras, as regiões 65% e 72% contendo os cristais foram recuperadas, sendo colocadas em igual volume de água e centrifugadas a 12.800 x g por dez minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de solução triton 0,01%, diluídos e observados ao microscópio de contraste de fase. Em seguida, os sedimentos ressuspensos foram lavados novamente por 2 vezes com a mesma solução de triton. Os sedimentos finais foram ressuspensos em 500 µL de solução de PMSF 0,1 mM. As amostras foram analisadas em gel de proteínas para controle da pureza das mesmas e depois armazenadas a - 20°C.

As suspensões de cristais protéicos das estirpes foram liofilizadas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock 18. Posteriormente, as amostras foram depositadas sobre suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos, por meio de um metalizador Emitech Modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

### 3.2.6 Proteínas Cry purificadas

A metodologia para a obtenção das proteínas Cry purificadas é a mesma utilizada para a caracterização ultra-estrutural de estirpes de *Bacillus thuringiensis*.

### 3.2.7 Preparo de formulações a base das estirpes tóxicas

Três estirpes de *B. thuringiensis* foram selecionadas para servirem como base de um produto pré-formulado. Cada uma delas foi previamente inoculada em placas de Petri em meio sólido (NYSM) e incubadas em estufa a 27°C durante 12 h. Em seguida, uma amostra da colônia de *Bacillus* crescida em placa foi inoculada em erlenmyer de 4 L com 1 L de meio de cultura (NYSM) e incubada em incubador rotativo à temperatura de 30 °C, sob agitação de 200 rpm por 12 h. O material crescido foi transferido para um reator de 10 L, contendo 09 litros de meio de produção. Procedeu-se a fermentação por 10 h, a 30 °C, com agitação e aeração de forma a ter o oxigênio dissolvido em 10 a 15% da saturação. Utilizou-se Sage como antiespumante. Por fim, foi realizada a transferência de 10 L do material anteriormente crescido para um reator de 100 L contendo 90 litros de meios de produção. Procedeu-se a fermentação por 10 horas a 30 °C, com agitação e aeração, de forma a ter o oxigênio dissolvido em 10 a 15% da saturação.

Durante o processo controlou-se o pH em 7,0 através da adição de ácido (Ácido Acético) ou base (KOH 12,5N), temperatura a 30°C. O processo foi finalizado ao ser atingido 90% de esporulação. O caldo fermentado foi, em seguida, submetido a filtração tangencial, onde o complexo esporo-cristal foi separado do restante do caldo. As estirpes foram formuladas com uma composição de ingredientes utilizada rotineiramente na empresa Bthek Biotecnologia Ltda., que produz bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*. Esses ingredientes têm como principais funções: (1) fornecer proteção contra os raios ultra-violeta, (2) aumentar a aderência às folhas, (3) conservar a bactéria. A quantidade de ingrediente ativo, ou seja, do complexo esporos-cristais foi de 3%.

As estirpes formuladas foram submetidas a bioensaios contra as três espécies de *Spodoptera*. Para isso, a dieta artificial (PARRA, 2001) foi vertida ainda quente, em recipientes plásticos tampados de 7,5 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro. Foram realizados

bioensaios com os formulados preliminares na dose de 10ml/ 90ml de água destilada esterilizada. Para o produto comercial Xentari, a base de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, a dose utilizada foi de 1g/99ml de água destilada esterilizada. Os formulados preliminares foram aplicados sobre a dieta artificial. Após absorção da solução, 10 lagartas de segundo instar de *S. eridania* e *S. cosmioides* foram introduzidas nos recipientes, num total de 4 repetições por estirpe. Para *S. frugiperda*, originada de lavouras de algodão do Paraná, utilizou-se a metodologia anteriormente mencionada, sendo individualizadas 24 lagartas de 2º instar. As avaliações de mortalidade foram realizadas a 1, 2 e 5 dias após início do bioensaio. A mortalidade foi comparada através da análise de variância pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e os dados para análise foram transformados segundo raiz de  $X+0,5$ .

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Bioensaio seletivo de estirpes de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera frugiperda*

Das cem estirpes de *B. thuringiensis* testadas através de bioensaios seletivos, apenas seis apresentaram toxicidade acima de 70% para as espécies *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*. Entre elas, destacaram-se as estirpes S608, BR37 e HD1, que causaram 100% de mortalidade de lagartas das três espécies de *Spodoptera* (Tabela 2). Embora existam relatos na literatura de que espécies de *Spodoptera* apresentaram baixa susceptibilidade aos produtos a base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (MORALES e NOVOA, 1992; NA VON, 1993; BOHOROVA et al., 1996; NYOUKI et al., 1996), os bioensaios realizados demonstraram que a estirpe HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, foi altamente patogênica às três espécies de *Spodoptera* estudadas (Tabela 2).

A estirpe S608, pertencente a subespécie *fukuokaensis* embora relatada como patogênica a dípteros (GUERCHICOFF et al. 2001; YU, 1991), causou 100% de mortalidade a lagartas de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* (Tabela 2), sendo este o primeiro relato da atividade da subespécie *fukuokaensis* a essas três espécies de *Spodoptera*.

**Tabela 2** – Atividade patogênica (%) de *B. thuringiensis* ( $10^8$  esporos/mL<sup>-1</sup>) a *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda* obtida através de bioensaio seletivo após dois dias da inoculação. (Temperatura:  $27 \pm 2$  °C; UR:  $60 \pm 10\%$ ; fotofase: 14h.)

| Estirpes | Mortalidade (%)    |                      |                      |
|----------|--------------------|----------------------|----------------------|
|          | <i>S. eridania</i> | <i>S. cosmioides</i> | <i>S. frugiperda</i> |
| S997     | 95,0               | 15,0                 | 80                   |
| S1905    | 95,0               | 72                   | 100                  |
| S608     | 100                | 100                  | 100                  |
| BR9      | 96,9               | 95,0                 | 90,0                 |
| BR10     | 96,0               | 73,0                 | 85,0                 |
| BR37     | 100                | 100                  | 100                  |
| BR45     | 97,0               | 85,0                 | 100                  |
| HD-1     | 100                | 100                  | 100                  |

### 3.3.2 Determinação da concentração letal média (CL50) de estirpes de *Bacillus thuringiensis*

A CL50 das sete estirpes de *B. thuringiensis* para *S. cosmioides* variou de 0,09 a 1,57 µg/ml. A menor concentração letal foi proporcionada pela estirpe BR37, a qual não diferiu estatisticamente da estirpe S1905. Em comparação com a estirpe padrão, BR37 e S1905 causaram respectivamente, toxicidade de aproximadamente 6 e 1,5 vezes maior do que o padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (Tabela 3).

**Tabela 3** – CL<sub>50</sub> de estirpes de *B. thuringiensis* contra lagartas de segundo instar de *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda* após cinco dias do início do bioensaio de dose. Temperatura: 27 ± 2 °C; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14h.

| Estirpe | <i>S. cosmioides</i>         |                                    | <i>S. eridania</i>           |                                    | <i>S. frugiperda</i> (Bahia) |                                    | <i>S. frugiperda</i> (Paraná) |                                 |
|---------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
|         | CL50<br>(µg/ml) <sup>1</sup> | Intervalo de<br>confiança<br>(95%) | CL50<br>(µg/ml) <sup>1</sup> | Intervalo de<br>confiança<br>(95%) | CL50<br>(µg/ml) <sup>1</sup> | Intervalo de<br>confiança<br>(95%) | CL50<br>(µg/ml) <sup>1</sup>  | Intervalo de<br>confiança (95%) |
| HD-1    | 0,56 b                       | 0,26 – 1,04                        | 3,38 c                       | 2,17 – 4,72                        | 0,53 a                       | 0,29 – 0,91                        | 1,38 b                        | 0,69 – 2,80                     |
| BR9     | 1,01 b                       | 0,7 – 2,30                         | 1,64 b                       | 1,30 – 2,14                        | 1,27 ab                      | 0,48 – 2,79                        | 1,01 ab                       | 0,47 – 4,66                     |
| BR10    | 1,57 b                       | 0,70 – 3,56                        | 0,41 a                       | 0,20 – 0,67                        | 0,51 ab                      | 0,18 – 1,09                        | 1,57 b                        | 0,64 – 2,33                     |
| BR37    | 0,09 a                       | 0,03 – 0,16                        | 0,28 a                       | 0,08 – 0,61                        | 0,61 ab                      | 0,36 – 1,24                        | 0,63 ab                       | 0,46 – 1,03                     |
| BR45    | 0,90 b                       | 0,60 – 1,28                        | 0,49 a                       | 0,32 – 0,72                        | 0,43 a                       | 0,24 – 0,70                        | 0,35 a                        | 0,18 – 0,60                     |
| S608    | 0,61 b                       | 0,30 – 1,16                        | 0,22 a                       | 0,16 – 0,29                        | 2,00 bc                      | 1,03 – 4,33                        | 0,87 ab                       | 0,34 – 1,93                     |
| S997    | -                            | -                                  | 3,20 bc                      | 2,08 – 4,78                        | -                            | -                                  | 2,18 b                        | 0,81 – 5,39                     |
| S1905   | 0,40 ab                      | 0,16 – 0,78                        | 9,05 c                       | 4,43 – 18,79                       | 4,02 c                       | 1,94 – 9,40                        | 0,76 ab                       | 0,40 – 1,60                     |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Intervalo de Confiança, segundo o teste de Probit.

A estirpe S608, subespécie *fukuokaensis*, mostrou-se cerca de 15 vezes mais tóxica que a estirpe padrão para lagartas de *S. eridania* (Tabela 3). Segundo Melatti et al (2005) a toxicidade da estirpe S608 contra *S. frugiperda* foi cerca de duas vezes maior que a da estirpe *B. thuringiensis kurstaki*.

De acordo com os resultados, a estirpe S997 mostrou-se tão patogênica quanto o padrão, apresentando valor de  $CL_{50}$  semelhante para *S. eridania* e *S. frugiperda* (Tabela 3). Praça et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes, em bioensaios realizados com a estirpe S997 para o controle de *S. frugiperda*. No caso das estirpes BR9, BR10 e BR45 os valores de  $CL_{50}$  foram, respectivamente, cerca de 2, 8 e 7 vezes, mais tóxicas para *S. eridania* do que o padrão HD-1 (Tabela 3).

Para o controle de *S. frugiperda* originadas do Paraná, a estirpe BR45 foi a mais efetiva, uma vez que apresentou valor de  $CL_{50}$  menor do que o padrão HD-1 (Tabela 3). Monnerat et al. (2007) relataram que a estirpe S1905 foi cerca de 16 vezes mais tóxica que o padrão HD-1 para *S. frugiperda*. Resultados de superioridade ou semelhança de estirpes contra lepidópteros em relação ao padrão HD-1, também foram relatados por Souza (1999).

Observou-se variação de toxicidade entre as populações de *S. frugiperda* originadas dos Estados do Paraná e da Bahia. As estirpes BR10 e o padrão HD-1 foram cerca de 3 vezes mais tóxicas para as populações de *S. frugiperda* provenientes da Bahia do que as do Paraná (Tabela 4). Já as estirpes S608 e S1905 foram cerca de 2 e 5 vezes, respectivamente, mais tóxicas às lagartas de *S. frugiperda* provenientes do Estado do Paraná do que as da Bahia (Tabela 4). A população de *S. frugiperda* oriunda da Bahia apresentou menor susceptibilidade à estirpe S1905 do que a do Paraná (Tabela 4). O padrão HD-1 proporcionou maior toxicidade às lagartas de *S. frugiperda* da Bahia do que às do Paraná (Tabela 4). Monnerat et al. (2006) também observaram diferenças de toxicidade da estirpe S1905, quando testada em populações de *S. frugiperda* do México, Colômbia e Brasil. Esse fato se deve, provavelmente, à variabilidade genética intra-específica das populações.

**Tabela 4** – CL<sub>50</sub> de estirpes de *B. thuringiensis* contra lagartas de segundo instar de *S. frugiperda* originadas de populações da Bahia e do Paraná após cinco dias do início do bioensaio de dose. Temperatura: 27 ± 2 °C; UR: 60 ± 10%; fotofase: 14h.

| Estirpe | <i>S. frugiperda</i> (Bahia) | <i>S. frugiperda</i> (Paraná) |
|---------|------------------------------|-------------------------------|
|         | CL50 (µg/ml) <sup>1</sup>    | CL50 (µg/ml) <sup>1</sup>     |
| HD-1    | 0,53± 0,4085 a               | 1,38± 0,1502 b                |
| BR9     | 1,27± 0,7869 a               | 1,01± 0,4186 a                |
| BR10    | 0,51± 0,5984 a               | 1,57±0,2147 a                 |
| BR37    | 0,61± 0,5166 a               | 0,63± 0,3500 a                |
| BR45    | 0,43± 0,2844 a               | 0,35± 0,1791 a                |
| S608    | 2,00± 0,2801 a               | 0,87± 0,6721 a                |
| S1905   | 4,02± 0,3128 a               | 0,76± 0,7545 b                |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem entre si ao nível de 5%, segundo o teste-T.

O primeiro relato de variações na suscetibilidade a *B. thuringiensis* entre indivíduos de diferentes populações de *S. frugiperda* coletados em um único hospedeiro (milho), foi constatado por López-Edwards et al. (1999). Neste trabalho, foi analisada a suscetibilidade de lagartas de primeiro instar originadas de cinco populações mexicanas (Aguascalientes, Nuevo León, Coiima, Sinaloa e Yucatán) à *B. thuringiensis kenyae*. Indivíduos pertencentes às populações de Aguascalientes e Nuevo León mostraram maior suscetibilidade a esta subespécie de *B. thuringiensis*, de modo que a CL<sub>50</sub> variou entre 0,001 e 0,005 mg toxina/mL de água destilada. Segundo os autores, essa variação pode ter ocorrido devido ao isolamento geográfico e conseqüente isolamento reprodutivo de *S. frugiperda*, originando populações fisiologicamente diferentes, com suscetibilidade diferenciada às estirpes de *B. thuringiensis*. Pashley et al. (1985) constataram diferenças fisiológicas entre populações de *S. frugiperda* que se alimentam de diferentes hospedeiros. Ainda de acordo com os autores, essa diferenciação pode ocorrer em função das variações de preferência por hospedeiros, de forma que o intercruzamento torna-se reduzido, acarretando o surgimento de novos biotipos. Em 2006, Monnerat et al., demonstraram que populações geograficamente diferentes de *S. frugiperda* apresentavam diferenças na susceptibilidade a toxinas de *B. thuringiensis*, devido a ausência de receptores específicos da parede do epitélio intestinal.

Em uma análise conjunta, a estirpe mais eficaz contra *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda* foi a BR37, que apresentou, respectivamente, CL50 cerca de 12; 6 e 2 vezes menor do que a da estirpe HD-1 (Tabela 3). Desse modo, devido a seu amplo espectro de ação sobre o complexo *Spodoptera*, essa estirpe apresenta grande potencial para ser utilizada no controle dessas pragas.

### 3.3.3 Caracterização proteica e molecular das estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas às três espécies de *Spodoptera*

A caracterização eletroforética das proteínas das misturas de esporos-cristais das estirpes estudadas, mostrou a presença de dois polipeptídios principais de aproximadamente 130 e 65 kDA (Tabela 5). Essas massas moleculares são freqüentemente relacionadas às proteínas-cristal das classes Cry1 e Cry2, respectivamente, sendo ativas contra lepidópteros (SCHNEPF et al., 1998; LERECLUS et al., 1993), confirmando os resultados de bioensaios apresentados pelas estirpes.

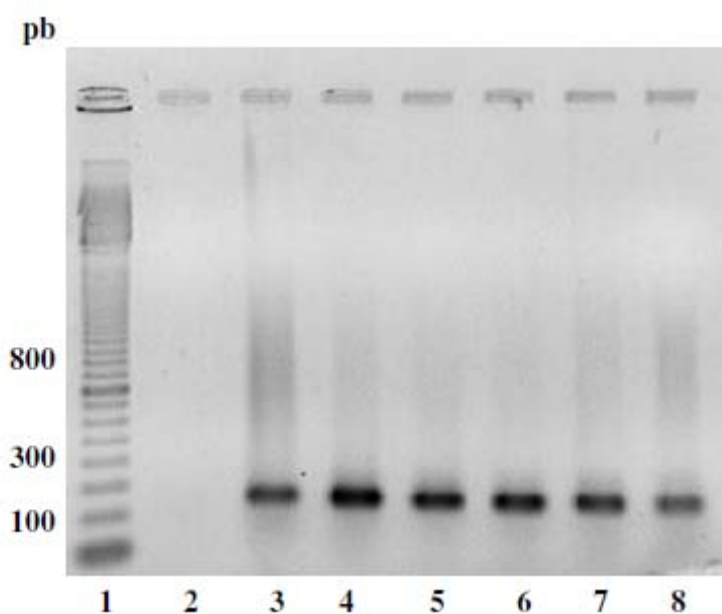
Através da técnica de PCR, usando DNA total das estirpes S608, BR37, BR45, BR10 e BR9 e iniciadores específicos para a detecção de genes da classe *cryI*, foram obtidos fragmentos de tamanhos esperados segundo as referências dos iniciadores (BRAVO et al., 1998; CERON et al., 1994; CERON et al., 1995). Segundo Batista (2006), a estirpe S1905 possui os mesmos genes *cry* que a estirpe HD-1. As estirpes S608, BR9 e BR10 apresentaram os genes *cry1Ac* e *cry1B* semelhante à estirpe HD-1. O gene *cry1Aa* foi detectado apenas nas estirpes S608, BR37, BR9 e BR10, enquanto que o gene *cry1Ab* foi constatado em todas as estirpes estudadas (Fig. 1 e Tabela 5). Van Rie et al. (1990) afirmaram que espécies de *Spodoptera* são resistentes as proteínas Cry1 Aa e Cry1Ab. Aranda et al. (1996) relataram que a proteína Cry1Ab, produzida pela estirpe HD-1, não foi tóxica para *S. frugiperda*. Em contrapartida, Aronson (1995) verificou que a presença da protoxina Cry1Ab foi importante para a solubilidade das inclusões protéicas produzidas por uma estirpe de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, podendo ser um dos fatores responsáveis pela mortalidade de insetos como *S. frugiperda*.

A estirpe BR37 apresentou oito genes, sendo que sete pertencem ao grupo *cryI* (Tabela 5), demonstrando a freqüente aparição de genes *cryI* nas estirpes de *B. thuringiensis* (BEN-DOV et al., 1997; BRAVO et al., 1998). A estirpe BR45 apresentou

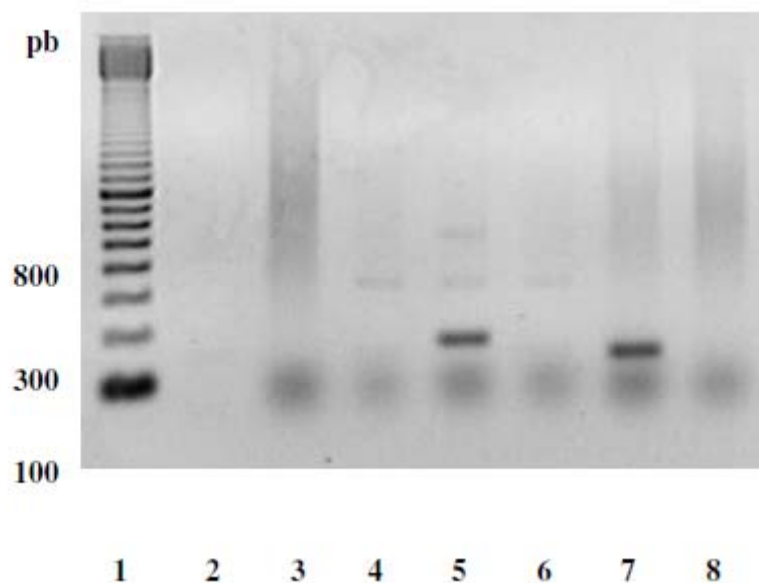
apenas os genes *cry1Ab*, *cry1E* e *cry2* (Tabela 4) (Fig. 1; 2; 3). Bourgouin et al. (1988) constataram que algumas estirpes de *B. thuringiensis* apresentam um único gene, enquanto que outras apresentam cinco genes diferentes.

**Tabela 4** – Genes *cry* e perfil protéico presente em estirpes de *B. thuringiensis*.

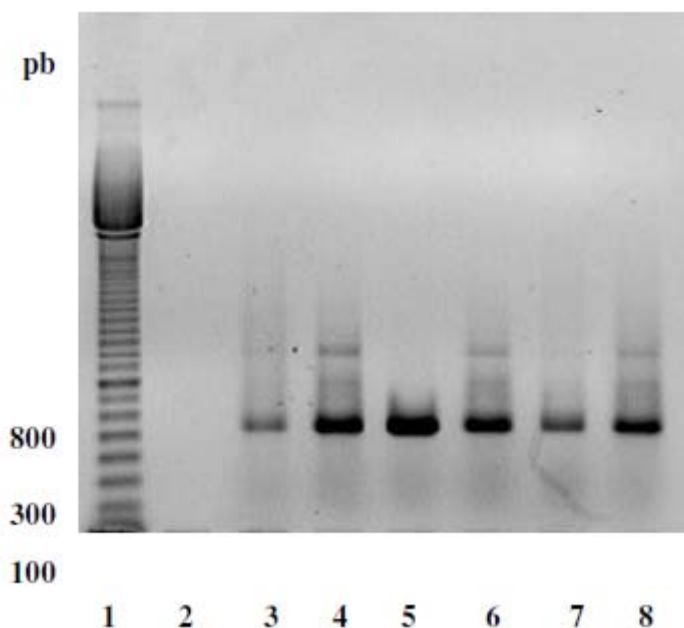
| Estirpe | Conteúdo Gênico  | Perfil Protéico (kDA) |
|---------|--|-----------------------|
| HD-1    | <i>cryIAa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>   | 130 e 65              |
| S608    | <i>cryIAa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>   | 130 e 65              |
| BR37    | <i>cryIAa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ad</i> , <i>cry1C</i> , <i>cry1D</i> ,<br><i>cry1E</i> , <i>cry1F</i> e <i>cry2</i> | 130 e 65              |
| BR9     | <i>cryIAa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> e <i>cry2</i>   | 130 e 65              |
| BR45    | <i>cry1Ab</i> , <i>cry1E</i> e <i>cry2</i>   | 130 e 65              |
| BR10    | <i>cryIAa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> , <i>cry2</i> e <i>cry3</i>                                   | 130 e 65              |



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ3/CJ2 para o gene *cry1Ab*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.



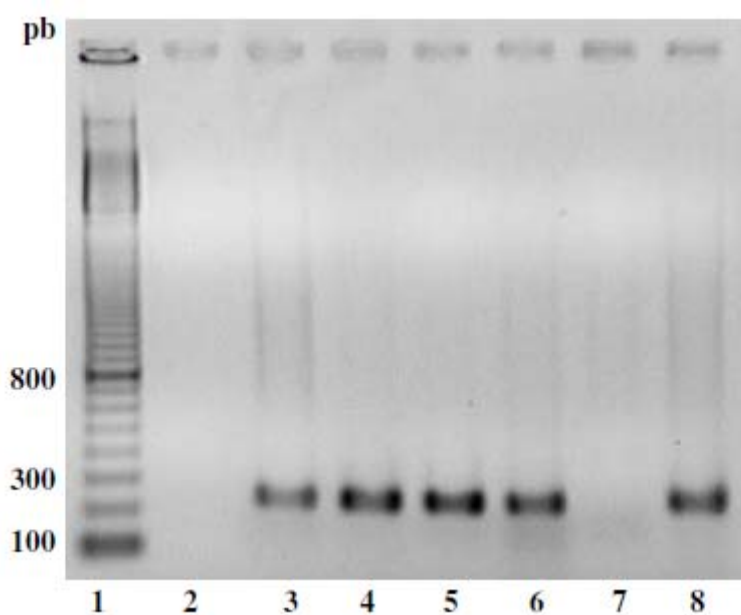
**Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ16/CJ17 para o gene *cryIE*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 -BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.



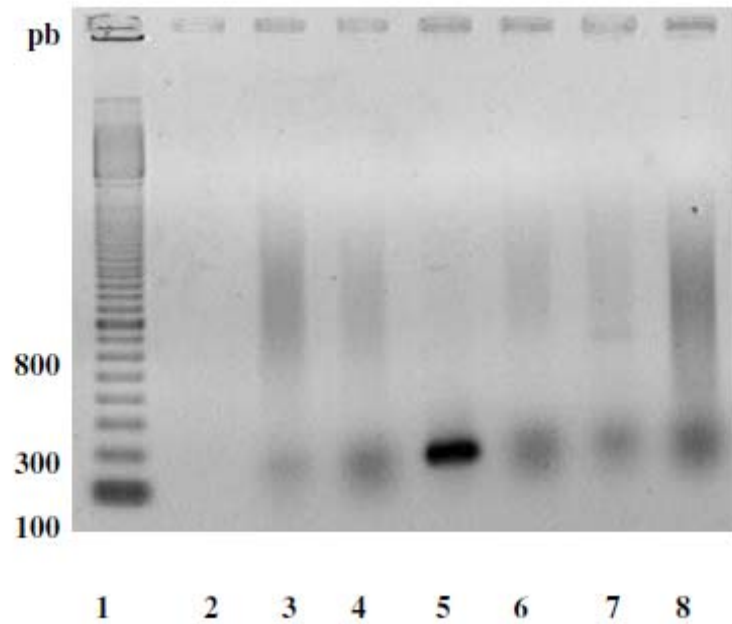
**Figura 3** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico Gral-cry2 para o gene *cry2*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 -BR45 e 8 - BR10.

No caso da estirpe BR37, constatou-se a presença de *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAd*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE* e *cryIF* (Tabela 4) (Fig. 1; 2; 4; 5; 6; 7; 8). Em estudo realizado por Visser et al. (1990), foi demonstrado que o sinergismo entre *cryIC* e *cryIE* proporciona

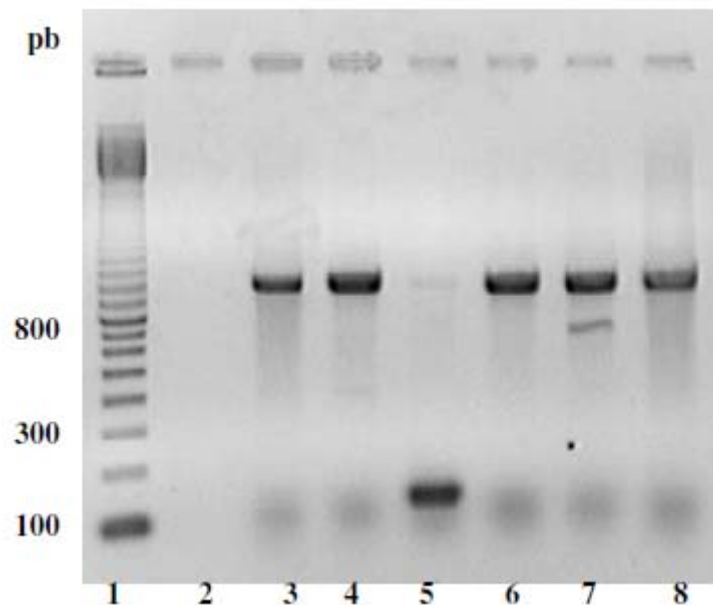
alta toxicidade a *Spodoptera exigua*. A interação entre *cryIC* e *cryID*, tem sido reportada por ser altamente tóxica a espécies de lepidopteros (CERON et al., 1994; BRAVO et al., 1998). Aranda et al. (1996) e Bravo et al. (1998) enfatizam a eficiência de *cryIC* no controle de *S. frugiperda* e o potencial de *cryID* para o manejo desta espécie. De acordo com Fatoletto (2002) e Loguercio et al. (2001), a toxina Cry1E em combinação com outras toxinas, tem elevado potencial de controle para *S. frugiperda*. Chambers et al. (1991) relataram que o gene *cryIF* possui uma atividade inseticida significativa contra *H. virescens*, *S. exigua* e *O. nubilalis*.



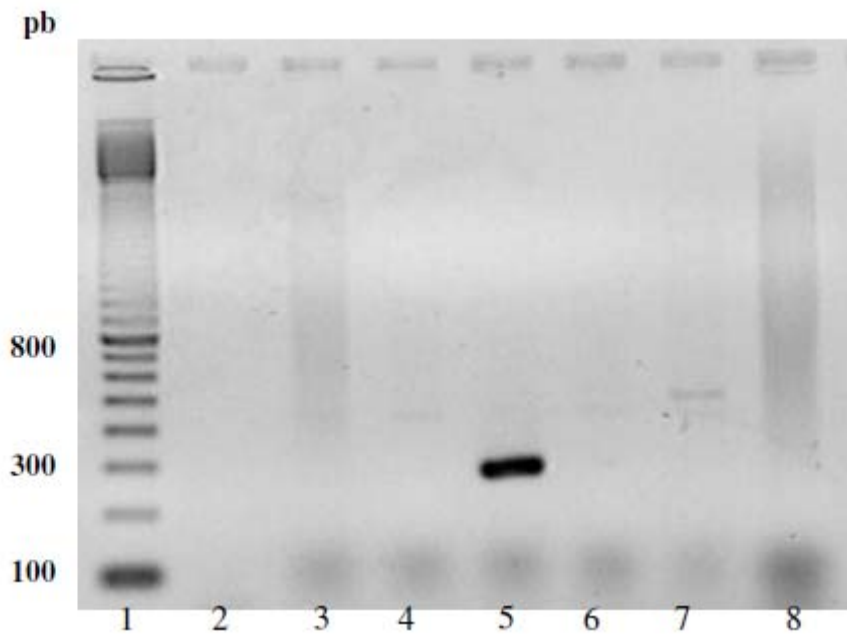
**Figura 4** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ1/CJ2 para o gene *cryIAa*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.



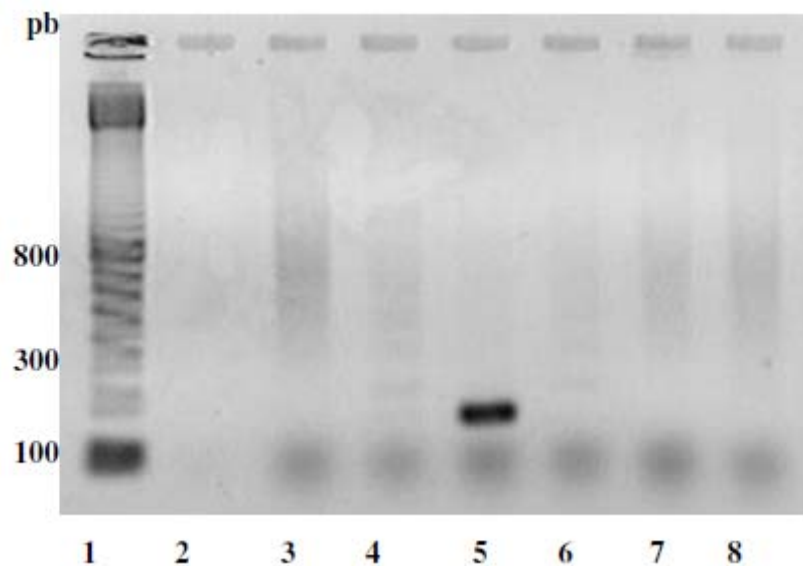
**Figura 5** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ6/CJ7 para o gene *cryIA*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.



**Figura 6** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ10/CJ11 para o gene *cryIC*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.



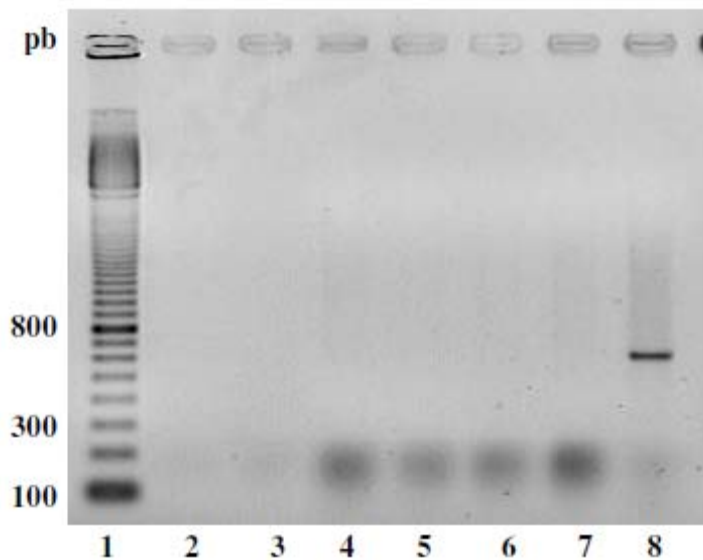
**Figura 7** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ12/CJ13 para o gene *cryID*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 -BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.



**Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJ16/CJ17 para o gene *cryIF*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10

Quando o DNA das estirpes S608, BR37, BR45, BR10 e BR9 foi amplificado com iniciador geral *cry2* (IBARRA et al., 2003), foi obtido um produto de 526 pb indicando a presença do gene *cry2* (Tabela 4). A PCR do padrão HD-1 também apresentou o mesmo fragmento. A atividade entomopatogênica das estirpes contra insetos da ordem Lepidoptera pode ocorrer em função da presença dos genes *cryIA*, como também pela presença do gene *cry2* (DANKOCSIK et al., 1990; WU et al., 1991).

A estirpe BR10 apresentou fragmento do tamanho esperado (652 a 733 pb) confirmando a presença do gene *cry3* (Tabela 4, Fig. 9). Provavelmente, esta estirpe também possa ser patogênica a insetos da ordem Coleoptera, pois o gene *cry3* possui atividade descrita para esta ordem (DONOVAN et al., 1988).

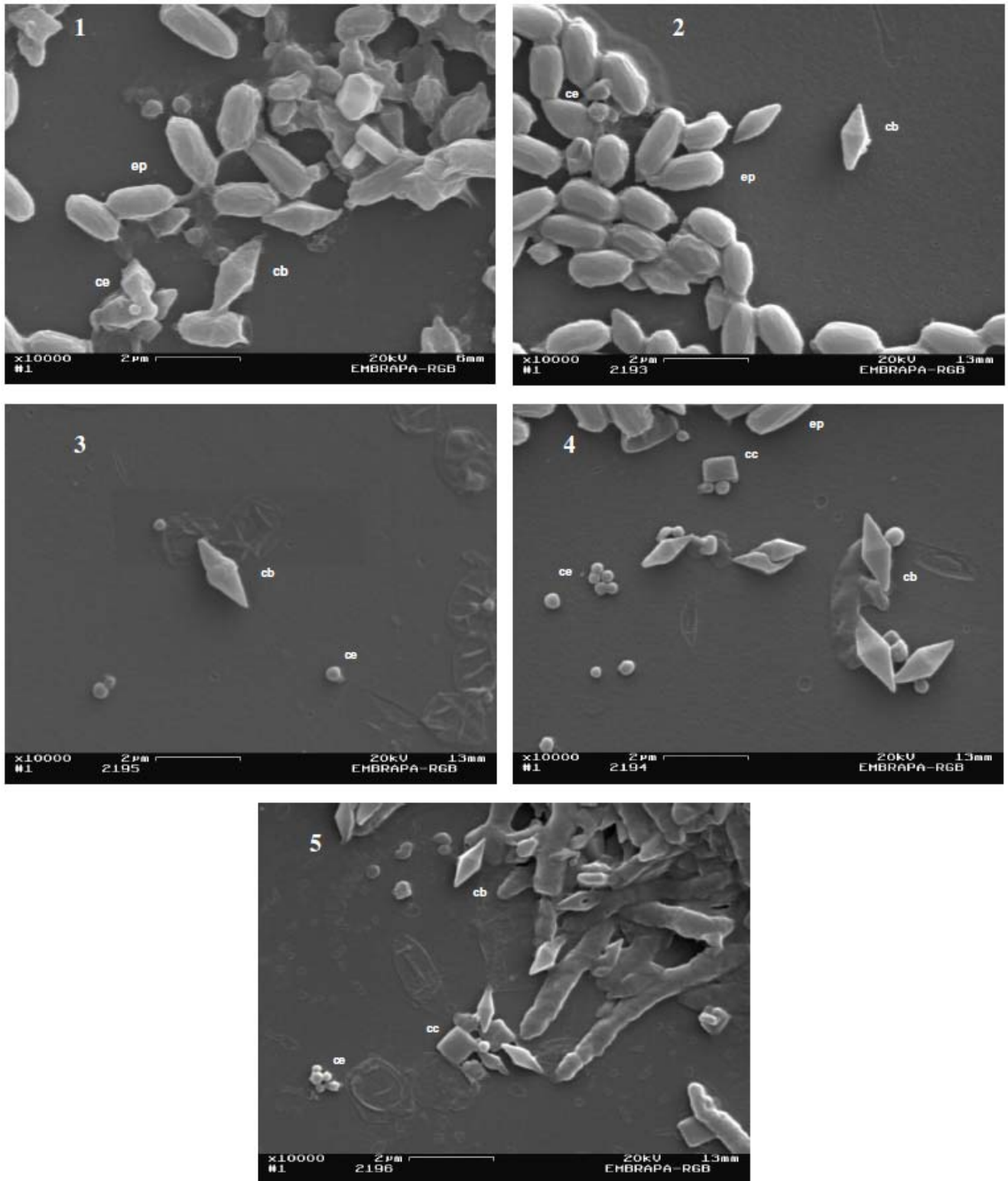


**Figura 9** – Eletroforese em gel de agarose (2%) dos produtos obtidos através de amplificação PCR com o iniciador específico CJIII20/CJIII21 para o gene *cry3*. 1 - Marcador molecular, 100bp DNA Ladder (Pharmacia), 2- Controle negativo, 3 - HD-1, 4 - S608, 5 - BR37, 6 - BR9, 7 - BR45 e 8 - BR10.

A toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ocorrer devido às interações sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos, existindo dificuldade para se estabelecer à contribuição de cada toxina, devido à variação nos resultados de toxicidade de proteínas individuais (VISSER et al., 1990; LEE et al., 1996; AMEEN et al., 1998; GLARE; CTCALLAGHAM, 2000). As expressões múltiplas das toxinas de *B. thuringiensis* podem reduzir a ocorrência de resistência da praga (MOAR et al. 1990).

### 3.3.4 Caracterização ultra-estrutural de estirpes de *Bacillus thuringiensis*

A microscopia eletrônica possibilitou a detecção de diferentes inclusões protéicas. As estirpes S608, BR37 e BR45 apresentaram cristais bipiramidais e esféricos (Fig. 1). Nas estirpes BR9 e BR10 foram observadas três diferentes inclusões cristalinas: bipiramidais, esféricas e cuboides (Fig. 10). Através de exames microscópicos, a morfologia dos cristais de uma estirpe pode fornecer informações sobre sua atividade inseticida (MARTIN; TRAVERS, 1989; KARAMANLIDOU et al., 1991; MEADOWS et al., 1992; TAYLOR et al., 1992; LERECLUS et al., 1993; SAADOUN et al., 2001). Os cristais bipiramidais são relacionados à presença de proteínas do tipo Cry1, eficazes contra insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, enquanto que, os cristais cuboides associados às proteínas Cry2, são efetivas contra lepidópteros e dípteros (SILVA et al., 2004).



**Figura 10** – Microscopia eletrônica de varredura de mistura esporos - cristais da estirpe *Bacillus thuringiensis*. 1- S608; 2- BR37; 3- BR45; 4- BR9; 5- BR10. cb - cristal bipiramidal; ep - esporo; ce - cristal esférico; cc - cristal cubóide.

### 3.3.5 Determinação da concentração letal (CL<sub>50</sub>) de proteínas Cry purificadas de *Bacillus thuringiensis*

A variabilidade na toxicidade com relação às estirpes testadas para cada espécie, pode estar associada à ação das diferentes proteínas Cry presentes nas estirpes de *B. thuringiensis*. Os ensaios mostraram que houve diferença entre os resultados de CL<sub>50</sub> para as proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A ao serem testadas em *S. eridania*, *S. frugiperda* e *S. cosmioides* (Tabela 6). Entre as proteínas Cry estudadas, observou-se que a toxicidade variou muito entre as espécies. Essas diferenças foram estatisticamente significativas. As proteínas Cry1Aa e Cry1Ab foram as mais tóxicas a *S. frugiperda*, a proteína Cry1Ab foi a mais tóxica a *S. cosmioides* e a proteína Cry2A foi a mais tóxica *S. eridania* (Tabela 6). Cabe ressaltar que Cry2A foi pouco tóxica a *S. cosmioides*, Cry1Ac pouco tóxica a *S. frugiperda* e Cry1Aa e Cry1Ab pouco tóxicas a *S. eridania*. Bohorova et al. (1997) constataram que a proteína Cry1Ab purificada foi mais tóxica para *S. frugiperda* do que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac juntas. Waquil et al. (2004) observaram que a proteína Cry1Ab ocasionou a inibição do acúmulo de biomassa das lagartas de *S. frugiperda* em 89,81%. Além de ocasionar mortalidade, a proteína Cry1Ab pode afetar o desenvolvimento biológico de indivíduos sobreviventes, por inibição da alimentação. Esse fato tem implicações importantes no desenvolvimento de estratégias para o manejo de insetos-pragas, como *S. cosmioides*.

**Tabela 6** – Resultados dos bioensaios de dose realizados com proteínas Cry purificadas efetivas sobre *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*

| Proteínas Cry | <i>S. cosmioides</i>      |                              | <i>S. eridania</i>        |                              | <i>S. frugiperda</i>      |                              |
|---------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|
|               | CL50 (µg/ml) <sup>1</sup> | Intervalo de confiança (95%) | CL50 (µg/ml) <sup>1</sup> | Intervalo de confiança (95%) | CL50 (µg/ml) <sup>1</sup> | Intervalo de confiança (95%) |
| Cry1Aa        | 0,58 ab                   | 0,14 – 1,52                  | 74,74 c                   | 42,83 – 121,4                | 0,32 a                    | 0,14 – 0,72                  |
| Cry1Ab        | 0,37 a                    | 0,12 – 0,82                  | 62,33 c                   | 37,34 – 188,22               | 0,88 a                    | 0,40 – 1,74                  |
| Cry1Ac        | 2,77 b                    | 1,20 – 6,26                  | 21,34 b                   | 14,29 – 33,97                | 10,90 b                   | 4,78 – 30,65                 |
| Cry2A         | 23,98 c                   | 8,91– 171,1                  | 1,00 a                    | 0,42 – 2,36                  | 1,87 ab                   | 0,70 – 5,30                  |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Intervalo de Confiança.

Aranda et al. (1996) e Bohorova et al. (1997) conferiram potencial tóxico à *S. frugiperda* maior de outras proteínas quando comparadas a Cry1Aa. Segundo Cardenas et al. (2001), o fator mais determinante na suscetibilidade de um inseto a diferentes toxinas Cry é a origem geográfica do mesmo. Monnerat et al. (2006) observaram diferenças de toxicidade da estirpe S1905 quando testada em populações de *S. frugiperda* do México, Colômbia e Brasil. Desse modo, pode-se atribuir que as diferenças nos resultados deste estudo com as proteínas Cry em relação a literatura citada ocorreram, provavelmente, devido a variabilidade genética intra-específica das populações de *S. frugiperda*, resultante do isolamento geográfico.

Com relação a proteína Cry2A, verificou-se que lagartas de 2º instar de *S. eridania* apresentaram susceptibilidade a essa proteína de *B. thuringiensis*. A mortalidade proporcionada pela proteína Cry2A foi, respectivamente, cerca de 75; 62 e 21 vezes maior que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, sendo a mais promissora entre as proteínas testadas para o controle de *S. eridania*. Em diversos estudos, a proteína Cry2A apresentou toxicidade a diferentes espécies da ordem Lepidoptera, entre elas, *Heliothis virescens* (GREENPLATE et al., 2003; GORE et al., 2005), *Helicoverpa zea*, *Pectinophora gossypiella* (TABASHNIK et al., 2002), *Plutella xylostella* (CHEN et al., 2002), *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa punctigera* (Hübner) (LIAO et al., 2002) e *S. frugiperda* (AGUIAR et al., 2006). No presente estudo comprovou-se a eficiência da proteína Cry2A no controle de *S. eridania* que é considerada praga de crescente importância nas culturas de soja e algodão devido principalmente, ao elevado desfolhamento que ocasiona (SANTOS, 2007). Nos bioensaios realizados para o controle de *S. cosmioides*, *S. frugiperda* e *S. eridania*, a proteína Cry1Ac foi a menos efetiva para as três espécies (Tabela 6). Esse resultado assemelha-se ao obtido por Luttrell et al. (1999), que observaram baixa eficiência da proteína Cry1Ac no controle de *S. frugiperda*.

Na seleção de estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas a insetos, como *Spodoptera* spp., diversos fatores podem influenciar a suscetibilidade do inseto-alvo. A obtenção da toxina isolada, sem a interação de outras proteínas Cry como comumente são expressas em *B. thuringiensis*, impede o efeito de competição entre as toxinas na ligação com receptores do intestino do inseto suscetível (AGUIAR et al., 2006).

A ligação das proteínas Cry com o receptor pode ser influenciada diretamente pela competição entre as diferentes proteínas, podendo ocorrer disputa por um mesmo receptor. Cardenas et al (2001), ao selecionar toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*, demonstraram que a proteína Cry 1Ac compete com Cry 1Ab pelo mesmo receptor. De

acordo Gould et al. (1992) e Roush (1997), essa competição pode diminuir a toxicidade contra insetos susceptíveis, uma vez que proteínas com baixa atividade inseticida para o inseto-alvo podem se ligar ao mesmo receptor de proteínas altamente patogênicas, inibindo sua ação.

A variação da toxicidade entre as proteínas Cry testadas para cada espécie pode estar associada também ao modo de ação do patógeno. A ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal é determinante para que ocorra a toxicidade ao inseto. Entretanto, os receptores são específicos para determinadas toxinas Cry. Para algumas espécies como *Manduca sexta*, foi determinado que o receptor para Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1C é uma N-aminopeptidase (glicoproteína), com peso molecular de 120 kDa e uma proteína do grupo caderina (Ct-Ri), com peso molecular de 210 kDa. Diversas N-aminopeptidases foram identificadas como principais receptores para Cry1 em *Bombyx mori*, *H. virescens*, *Lymantria dispar*, *M. sexta*, *P. xylostella* e *T. ni*. Outro receptor também foi encontrado em *M. sexta*, e identificado como um glicolípido (GARCZYNSKI; ADANG, 2000; GÓMEZ et al., 2001). Para as espécies de *Spodoptera* estudadas, os receptores envolvidos na ligação com as toxinas Cry ainda não foram identificados.

Em alguns casos, essa ligação pode não ser suficiente para causar a morte do inseto (GOULD et al., 1992). Aranda et al. (1996) realizaram estudo para verificar a interação entre as toxinas Cry e as células epiteliais do intestino médio de *S. frugiperda*. Os autores observaram que as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2 B se ligam aos receptores, entretanto, essa ligação não implicou em toxicidade para o inseto. Esse fato ocorre devido a essas toxinas apresentarem reduzida especificidade, resultando numa ligação pouco estável e reversível com o receptor, ou seja, a toxina apenas reconhece o receptor, mas não se liga irreversivelmente a ele (POLANCZYK, 2004). Já as toxinas Cry1C e Cry1D foram altamente tóxicas para *S. frugiperda*, por se ligarem de forma estável e altamente específica com o receptor, promovendo a formação do poro no epitélio e conseqüente morte do inseto.

A afinidade entre os receptores e as proteínas Cry é fundamental para determinar o grau de suscetibilidade de uma espécie-alvo. Em alguns casos, a ativação da protoxina pelas proteases pode ser o principal fator determinante para eficiência do patógeno, como foi observado para *H. virescens* por Forcada et al. (1996). Esses autores constataram que as enzimas digestivas de indivíduos resistentes dessa espécie são capazes de degradar as toxinas, diminuindo significativamente a quantidade de toxina ativa no lúmen do intestino médio, o que conseqüentemente reduz a sua ação tóxica.

As proteínas Cry são altamente específicas na sua atividade patogênica (WAQUIL et al., 2002). Deste modo, um bioinseticida a base de *B. thuringiensis* é

considerado promissor por conter várias proteínas Cry, permitindo um amplo espectro de ação. Esse fato depende da combinação das proteínas Cry presentes nos cristais (ESTRUCH et al., 1997). As proteínas Cry apresentam durabilidade variável, sendo assim, o esporo se torna de grande importância por favorecer a persistência no ambiente e a mortalidade da praga (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Segundo Morales (1973) em alguns casos o inseto-praga pode não ser suscetível ao cristal protéico, no entanto, a ingestão deste com o esporo ocasiona a germinação dos esporos e a produção de uma fosfolipase C que provoca a morte do inseto-praga.

No entanto, apesar das inúmeras vantagens dos bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, estes possuem algumas limitações. Fatores relacionados à perda de estabilidade, à ausência de translocação nas plantas, ao espectro limitado de ação e à degradação rápida pela ação da luz ultravioleta podem restringir sua utilização a campo (NAVON, 2000a). Além disso, a aplicação desse patógeno como bioinseticida requer elevadas concentrações do agente ativo, sendo aplicado em grandes quantidades nas folhas (MORAES et al., 1998). Em virtude dessas observações, pesquisas estão sendo desenvolvidas visando obter produtos mais eficientes e com maior estabilidade, além de um espectro de ação mais amplo (MONNERAT, 2004).

Novas perspectivas do uso dessa bactéria e das proteínas Cry surgiram devido à clonagem e à caracterização de genes de *B. thuringiensis* codificadores de proteínas responsáveis pela atividade tóxica a insetos (SCHNEPF; WHITELEY, 1981). Uma das possibilidades é a introdução dos genes de *B. thuringiensis* codificadores das toxinas nos genomas de organismos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo, assim, apenas os insetos-praga (DE MAAGD et al., 1999).

Plantas que expressam proteínas Cry podem ser adotadas como alternativa de controle, pois apresentam grande potencial de proteção contra as perdas ocasionadas por insetos-praga, além da redução do uso de inseticidas químicos (SCHULER et al., 1998; HILDER; BOULTER, 1999; BETZ et al., 2000; BOBROWSKI et al., 2003). Exemplo disso são as variedades de algodão Bollgard, comercialmente disponíveis, que expressam a proteína Cry1Ac, as quais proporcionam o controle de pragas como *H. virescens* e *P. gossypiella* (MACINTOSH et al. 1990). No entanto, essa proteína não é eficiente no controle de espécies de *Spodoptera* e *Pseudoplusia includens* (Walker) (STEWART et al., 2000; STEWART et al., 2001; ARMSTRONG et al., 2007). Vohlk et al. (2007) avaliaram a eficiência das variedades de algodão transgênico DP90 e NUOPAL, atualmente registradas no Brasil, que expressam o gene cry1Ac. Nas avaliações foram constatados danos ocasionados por *P. includens* e

espécies de *Spodoptera*, principalmente *S. eridania*. Segundo os autores, devido aos danos causados por essas pragas, houve a necessidade de aplicações de inseticidas nessas variedades. Em outro estudo a campo, realizado com as cultivares DP90B e NUOPAL, Miranda et al. (2007) observaram sua eficiência sobre *A. argillacea* e *H. virescens*. No entanto, houve a necessidade de aplicações adicionais de inseticidas para o controle de *S. cosmioides*. As constatações de Miranda et al. (2007) e Vohlk et al. (2007) evidenciaram a baixa eficiência da proteína Cry 1Ac sobre *S. cosmioides* e *S. eridania* em cultivares que expressam o gene dessa proteína no Brasil. Os dados obtidos neste trabalho mostraram que Cry1Ac é pouco tóxica a essas espécies e confirmam os resultados obtidos pelos autores citados.

Com a finalidade de aumentar o espectro de ação, foram desenvolvidos estudos que resultaram no lançamento de variedades de algodoeiro que expressam duas proteínas Cry (GREENPLATE et al., 2000a). O algodão Bollgard II foi desenvolvido através da incorporação da proteína Cry 2Ab de *B. thuringiensis*, em variedades de algodão Bollgard (Cry1Ac) (GREENPLATE et al., 2000 a, b). A inserção da proteína Cry2Ab promove um aumento da atividade inseticida em variedades de algodão Bollgard. Estudos relatam a maior eficiência de Bollgard II em relação à Bollgard (VOTH et al. 2001, PENN et al. 2001), por conter as proteínas Cry2Ab e Cry1Ac, proporcionando um controle mais abrangente de insetos-pragas como *Spodoptera* spp. e *P. includens* (STEWART et al., 2000, STEWART et al., 2001). Stewart et al. (2001) observaram que nenhuma lagarta de *H. virescens*, *S. frugiperda* e *S. exigua* sobreviveu até o estágio de pupa, quando alimentadas com Bollgard II, entretanto, houve 7% de sobrevivência de lagartas dessas espécies criadas em Bollgard. Avaliação a campo realizada na Carolina do Sul, E.U.A, demonstrou que o controle de *Helicoverpa zea* e *P. includens* foi significativamente maior em Bollgard II do que em Bollgard (RIDGE et al. 2000). No Brasil, estão em andamento pesquisas a campo com a cultivar DP50, que expressa maior concentração das proteínas tóxicas Cry2Ab e Cry1Ac (Bollgard II - Monsanto) (SANTOS, 2007), as quais são relatadas como eficientes no controle de *S. frugiperda* (STEWART; KNIGHTEN, 2000). O Bollgard II além de ser efetivo contra as pragas controladas pelo Bollgard, controla satisfatoriamente *H. zea*, *S. frugiperda*, *S. eridania* e *Trichoplusia ni* (ALEEN et al., 2000; CHITKOWSKI et al., 2003; DEGRANDE; FERNANDES, 2006; LI et al., 2007). Esses resultados mostram a eficiência de plantas que expressam diferentes proteínas Cry no controle de pragas, como é o caso do algodão Bollgard II, podendo ser implantadas em áreas onde múltiplas espécies de lepidopteros-pragas atingem níveis de dano econômico em plantas cultivadas. Além do Bollgard II, outras cultivares de

algodão que expressam toxinas de *B. thuringiensis*, como WideStrike (Cry 1Ac e Cry 1F) e VipCot (VIP3), estão em processo de desenvolvimento e registro (ICAC, 2004).

Portanto, variedades de algodão que expressam as proteínas Cry têm demonstrado ser uma valiosa ferramenta para produtores no controle de lepidópteros-pragas. Porém, esses insetos têm a habilidade de desenvolver resistência às proteínas expressas em plantas cultivadas, devido à adaptação das pragas às condições adversas. A implantação extensiva e continuada de lavouras com variedades de algodão que expressam genes *cry* proporciona aumento do risco de desenvolvimento de resistência para todos os lepidópteros-pragas. Como a proteína é produzida ao longo do ciclo vegetativo da planta durante toda a estação, os insetos-alvos são expostos à proteína por mais de uma geração a cada ano. Essa constante pressão de seleção favorece o aumento da frequência de alelos de resistência na população, podendo conduzir a níveis altos de tolerância em um curto espaço de tempo (GOULD, 1998).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar a tolerância de insetos-pragas a proteínas Cry purificadas (STONE et al., 1989; GOULD et al., 1992, 1995; MOAR et al., 1995). Deste modo, para minimizar o desenvolvimento de resistência das pragas faz-se necessária a adoção de táticas de manejo de resistência. A principal estratégia do manejo de resistência é a utilização de altas doses da toxina associada à adoção de refúgio estruturado (GORE, 2002). Essa estratégia se refere ao uso de um cultivar que expresse a toxina *B. thuringiensis* em alta concentração, em todos os tecidos da planta, combinado com a adoção de refúgios (GORE, 2002). Os refúgios são áreas ocupadas por plantas hospedeiras dos insetos-alvos, da mesma espécie vegetal da cultivar transgênica, mas que não expressam a toxina (CORSO et al., 1999; GORE, 2002). O refúgio auxilia na manutenção da suscetibilidade às toxinas de *B. thuringiensis* nas populações das pragas-alvos. Ao se acasalarem com as populações da área proveniente da cultura transgênica, os indivíduos suscetíveis contribuem para diluir os alelos de resistência, retardando o processo de desenvolvimento da resistência (GORE, 2002). No entanto, Gore (2002) preconiza que essa estratégia pode ser insuficiente, devido ao sincronismo da emergência dos adultos e a redução do número de indivíduos sobrevivente dos refúgios, limitando o acasalamento entre as populações resistentes e susceptíveis.

Além do refúgio, diversas táticas foram propostas para a minimização da resistência de insetos-praga. O uso de genes combinados, que consiste na introdução e expressão de mais de um gene na mesma planta e, cuja ligação ocorre em diferentes receptores (VAN RIE, 1991), reduz a probabilidade de um inseto ser simultaneamente

resistente a mais de uma toxina (BOBROWSKI et al., 2001; DEGRANDE; FERNANDES, 2006). Outros fatores como o uso de inimigos naturais em conjunto com as proteínas Cry (MONNERAT, 1995) e a rotação entre produtos biológicos e químicos são importantes para evitar o surgimento de resistência (MONNERAT; BRAVO, 2000). A resistência só deixará de ser um problema se a área tratada for bem monitorada (MONNERAT; BRAVO, 2000). Neste contexto, o manejo integrado de pragas torna-se fundamental para evitar o aparecimento da resistência, uma vez que utiliza a diversidade de recursos de controle, a redução da pressão de seleção, o uso de refúgios e o monitoramento da resistência (MONNERAT; BRAVO, 2000). Atualmente há uma busca por estirpes de *B. thuringiensis* com alta atividade tóxica e múltiplas proteínas Cry, para a obtenção de diferentes especificidades a insetos-praga (BOBROWSKI et al., 2003). Este fato é importância tanto para a utilização destas estirpes como fonte de genes para a obtenção de plantas geneticamente modificadas resistentes a pragas, como para a produção de novos biopesticidas (BOBROWSKI et al., 2001).

Os dados obtidos neste estudo devem servir de alerta para que sejam realizados estudos de susceptibilidade de cada inseto alvo primário ou secundário frente a cada estirpe ou toxina candidata a ser utilizada no manejo. Pragas secundárias e atualmente pouco importantes para a cultura do algodão podem se tornar pragas primárias, caso o manejo de controle não seja bem feito. Usando as toxinas estudadas nesse trabalho pode-se alertar para o risco da utilização desses genes para o controle do complexo de *Spodoptera*, pois a susceptibilidade das espécies é diferente. Usando o gene *cryIAa* ou *cryIAb* como exemplo, pode-se teorizar que se poderia estar selecionando *S. eridania* e talvez elevando seu "status" de praga secundária para praga primária.

Por outro lado, a construção de transgênicos "piramidais" expressando mais de uma toxina pode ser uma boa alternativa para o controle do complexo de espécies do gênero *Spodoptera*. No caso das espécies estudadas uma boa opção seria a utilização dos genes *cryIAa* ou *cryIAb* (codificadores de toxinas ativas a *S. frugiperda* e *S. cosmioides*) e *cry2A* (codificador da toxina ativa a *S. eridania*). Nesse contexto, o uso de produtos biológicos à base de estirpes nativas que expressem essas toxinas também seria uma estratégia recomendada.

### 3.3.6 Avaliação de Mortalidade em Formulações Preliminares de *B. thuringiensis*

De acordo com os resultados obtidos, as proteínas Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry 1Ac e Cry 2A foram tóxicas às espécies de *S. eridania*, *S. frugiperda* e *S. cosmioides*. Desse modo, as estirpes mais promissoras e que continham essas proteínas foram formuladas para a avaliação da mortalidade frente às espécies de *Spodoptera* estudadas. No primeiro dia após o início do bioensaio, em dieta na concentração de 10 ml/90 ml, foi observada mortalidade acima de 77% em todos os tratamentos para *S. frugiperda*, merecendo destaque a estirpe S1905, que causou 100% de mortalidade. Para *S. eridania* foi constatada que as estirpes BR37 e BR45 ocasionaram mortalidade acima de 70%, sendo estatisticamente semelhante ao Xentari. No caso de *S. cosmioides*, a estirpe BR37 ocasionou maior mortalidade ao ser comparada as demais estirpes testadas. Houve mortalidade de 100% de *S. frugiperda* nos diferentes tratamentos, no 2º dia após o início do experimento (Tabela 7). No quinto dia, foi constatada mortalidade de 100% para as espécies estudadas em todos os tratamentos. Esses resultados comprovam que os formulados preliminares, na concentração estudada, foram tão eficientes para o controle de *S. eridania*, *S. frugiperda* e *S. cosmioides* quanto o produto comercial Xentari (Tabela 7).

Os resultados corroboraram com os de Morales et al. (1995) e Barreto et al. (2005), demonstrando que a mortalidade dos insetos-alvo proporcionada por *B. thuringiensis* varia entre as espécies e estirpes testadas. Ignoffo et al. (1977), constataram que lagartas de *A. gemmatalis* foram 12 vezes mais suscetíveis à *B. thuringiensis* var. *kurstaki* do que lagartas de *P. includens*. A variação de suscetibilidade tem sido constatada em diversos trabalhos (LUTTRELL et al., 1982, ABAS ALI; YOUNG 1993), podendo ser atribuída às diferentes proteínas Cry presentes em cada formulação.

Os resultados aqui obtidos mostram que os produtos à base de estirpes que expressam os genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry2A* são bons candidatos a controlar as espécies *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda* que ocorrem em diferentes cultivos agrícolas.

**Tabela 7** – Mortalidade (%) de lagartas de segundo instar de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* causada por estirpes de *B. thuringiensis* em diferentes dias após inoculação.

| Tratamentos | 1 dia                        |                            |                              | 2 dias                       |                            |                              | 5 dias                       |                            |                              |
|-------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|             | <i>Spodoptera frugiperda</i> | <i>Spodoptera eridania</i> | <i>Spodoptera cosmioides</i> | <i>Spodoptera frugiperda</i> | <i>Spodoptera eridania</i> | <i>Spodoptera cosmioides</i> | <i>Spodoptera frugiperda</i> | <i>Spodoptera eridania</i> | <i>Spodoptera cosmioides</i> |
| BR37        | 82,5 a                       | 75 a                       | 92,5 a                       | 100 a                        | 87,5 a                     | 100 a                        | 100 a                        | 100 a                      | 100 a                        |
| S1905       | 100 a                        | 12,5 bc                    | 45 bc                        | 100 a                        | 40 b                       | 97,5 a                       | 100 a                        | 100 a                      | 100 a                        |
| BR45        | 82,5 a                       | 82,5 a                     | 57,5 bc                      | 100 a                        | 85 a                       | 70 a                         | 100 a                        | 100 a                      | 100 a                        |
| S608        | 82,5 a                       | 35 ab                      | 57,5 bc                      | 100 a                        | 42,5 b                     | 75 a                         | 100 a                        | 100 a                      | 100 a                        |
| xentari     | 77,5 a                       | 85 a                       | 85 ab                        | 100 a                        | 100 a                      | 92,5 a                       | 100 a                        | 100 a                      | 100 a                        |
| testemunha  | 0 b                          | 0 c                        | 0 c                          | 0 b                          | 0 c                        | 0 b                          | 0 b                          | 0 b                        | 0 b                          |

\*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, dados para análise foram transformados segundo raiz de X+0,5.

#### 4 CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo possibilitou a identificação de estirpes patogênicas, simultaneamente, às espécies *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*, fato este que até o momento não havia sido relatado. Os resultados obtidos demonstram que as espécies de *Spodoptera* possuem susceptibilidade variada com relação as proteínas Cry. As estirpes S608, S1905, BR37 e BR45, por conterem proteínas como Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2A, apresentam potencial para serem utilizadas como fonte de genes no desenvolvimento de produtos biológicos e/ou de plantas geneticamente modificadas com expressão de proteínas tóxicas para o controle do complexo *Spodoptera*.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; YOUNG S.Y. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* activity against larvae of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae) on cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 1064-1068, 1993.

ADAMCZYK J. J. Jr. MASCARENHAS VJ, CHURCH GE, LEONARD BR, GRAVES JB, DUGGER P (ED.), RICHTER D. Cotton boll susceptibility to fall armyworm and beet armyworm injury. In: BELTWISE COTTON CONFERENCES, 1998, San Diego. **Proceedings...** Memphis, Tennessee, National Cotton Council, 1998a., v. 2, p.1170-1172.

ADAMCZYK J.J. Jr. HOLLOWAY, J.W.; CHURCH, G.E.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B. Larval survival and development of the fallarmyworm the *Bacillus thuringiensis* cryIA (c) delta-endotoxina. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 539-545, 1998b.

AGUIAR, R.W.S.; MARTINS, É.S.; FERNANDEZ, R.S.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G.; RIBEIRO, B.M. Avaliação da toxicidade da proteína recombinante inseticida Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* contra larvas de *S. frugiperda*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 139, 38p., nov. 2006.

ALAM, G. **A Study of biopesticides and biofertilisers in Haryana, India**. Gatekeeper Series, 2000, n° 93, 24p.

ALI, M.I., LUTTRELL R.G.; YOUNG, S.Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 1, p.164-75, 2006.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A. **Banco de microrganismos entomopatogênicos: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 20, p. 30-33, 2001.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: Manole, 1998. 407p.

AMEEN, A. O.; FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomology Science**, v. 33, p.129-135, 1998.

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARANGO, J. A.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Applied Microbiology**. v. 92, p. 466-474, 2002.

ARANTES, O. M. N; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no Controle Biológico. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: Edusc, 2002. p. 269-293. v. 2.

ARMSTRONG, J. S.; ADAMCZYK Jr, J. J.; GREENBERG, S. M. Fall Armyworm susceptibility to Bollgard I, Bollgard II, and Widestrike cotton as determined by a leaf-dish assay.. **Abstract...** Entomological Society of America Proceedings, Febr., 2007.

ARONSON, A. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4057-4060, 1995.

BARRETO, R. M. **Prospecção e caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com potencial para o controle de insetos-praga da cultura da soja**. 2005. 107p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V. Algodoeiro geneticamente modificado. In: FREIRE E.C. (Ed), **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007, p. 141-174.

BARTON, K. A.; WHITELEY, H. R.; YANG, K. S. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tobacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**, v. 85, p. 1103-1109, 1987.

BATISTA, A. C.; BARROS, P.C.; PRAÇA, L.B.; MONNERAT, R.G. Estudo da eficiência de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Spodoptera frugiperda*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 9., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2003.

BATISTA, A. C. **Desenvolvimento de um bioinseticida a base de *Bacillus thuringiensis* para controle de pragas agrícolas do DF**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília. 2006.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRUTZMACHER, A. D.; RINGENBERG, R.; FORESTI, J. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 993-998, 2003.

BAVARESCO, A.; MAURO, S.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORESTI J.; RINGENBERG R. Biologia e exigências térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.31, n.1, p. 49-54, 2002.

BELTRÃO H. M. Interação da toxina cry11Aa do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis israelensis* com epitélio intestinal de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 2004, Gramado. **Resumos...** Gramado, 2004. p. 284-284.

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 *B. thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4883-4890, 1997.

BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. **Regulatory, Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v. 32, p. 156-173, 2000.

BOBROWSKI, V.L.; PASQUALI, G. ; ZANETTINI, M. H. B. ; FIUZA, L. M. Detection of cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera:Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.105-109, 2001.

BOBROWSKI V.L.; FIUZA, L. M. ; PASQUALI, G. ; ZANETTINI, M. H. B.. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 1-9 Santa Maria, set/out. 2003.

BOHOROVA, N.; MACIEL, A.M.; BRITO, R.M.; AGUILART, L.; IBARRA, J.E.; HOISINGTON, D. Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. **Entomophaga**, v. 41, n. 2, p. 153-165, 1996.

BOHOROVA, N.; CABRERA, M.; ABARCA, C.; QUINTERO, R.; MACIEL, A.M.; BRITO, R.M.; HOISINGTON, D.; BRAVO, A. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. **Journal of Economic Entomology** , v. 90, n. 2, p. 412-415, 1997.

BOREM, A. (Org.). **Biotecnologia e meio ambiente**. 1. ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2005, v. 1, 425p. 2005.

BOWLING, R.; D. HIGGINS, R.A; AHMAD, A.; WILDE, G. Feeding behavior and growth of corn earworm (Lepidoptera : Noctuidae) larvae on *Bacillus thuringiensis*-treated (Dipel 4L) and untreated meridic diet. **Journal of Economic Entomology**. v. 100, n. 4, p. 1221-1228, 2007.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p.3575-3583, 1988.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERON, M.; QUINTERO. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.12, p.4965-4972, 1998.

BUNDY, C. S.; MCPHERSON, R. M. Cropping preferences of common lepidopteran pests in a cotton/soybean cropping system. **Journal of Entomological Science**, v. 42, n.1, p. 105-118, 2007.

BURKNESS, E. C.; HUTCHISON, W.D.; WEINZIERL, R.A.; WEDBERG, J.L.; WOLD S.J.; SHAW, J.T. Efficacy and risk efficiency of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for Lepidopteran pest management in the Midwestern US. **Crop Protection**, Oxford, v.21, n. 2, p.157-169, 2002.

CAMPOS, A. R. **Táticas de manejo integrado de *Heliothis* spp.(Lepidoptera: Noctuidae) no algodoeiro: seletividade de inseticidas, eficiência de *Bacillus thuringiensis* e artrópodosbenéficos**. 1981. 72p. Trabalho (Graduação)-Faculdade Ciências Agroveterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1981.

CAPALBO D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM A. (Ed). **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005, 425 p.

CAPINERA, J. L. **Handbook of vegetable pests**. San Diego: Academic Press, 2001. 729p.

CÁRDENAS, M.I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas cry contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, v. 4, p. 51-62, 2001.

CARMONA, A. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* toxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bioagro**, v.14, n.1, p 3-10, 2002.

CARVALHO, R. P. L. **Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e suscetibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo.** 1970. 170p. Tese (Doutorado em Ciências)- Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1970.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 353-356, 1994.

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CHAN, M. T.; CHEN, L. J.; CHANG, H. H. Expression of *Bacillus thuringiensis* (B.t.) insecticidal crystal protein gene in transgenic potato. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 37, p. 17-23, 1996.

CHAMBERS, J. A.; JELEN, A.; GILBERT, M. P.; JANY, C. S., JOHNSON, T. B.; GAWRON-BURKE, C. Isolation and Characterization of a Novel Insecticidal Crystal Protein Gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 3966-3976, 1991.

CHENG, J.; BOLYARD, M.G.; SAXENA, R.C.; STICKLEN, M.B.. Production of insect resistant potato by genetic transformation with a delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. **Plant Science**, v. 81, p. 83-92, 1992.

CHENG, X.; SARDANA, R.; KAPLAN, H.; ALTOSAAR, I. Agrobacteria-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p. 2767-2772, 1998.

CHITKOWSKI, R.L.; TURNIPSEED, S.G.; SULLIVAN, MJ; BRIDGES, W.C. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. **Journal of Economic Entomology**, v.96, n.3, p. 755-762, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Quarto levantamento de avaliação da safra 2005/2006 abril/06**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em: 01 mar. 2008.

CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; NERY, M.E. Efeito de doses de refúgio sobre a seletividade de inseticidas a predadores e parasitóides de pragas da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1529-1538, 1999.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. 45p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H. ; SANTOS, J. P. ; WAQUIL, J. M. ; VIANA, P. A.. **Manual de Identificação de Pragas da Cultura de Milho**. 1. ed. Sete Lagoas:MG, Embrapa Milho e Sorgo, 1997, 71p.

CRUZ, I. Utilização do baculovírus no controle da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-Meio Ambiente, 2000. v.3, p.201-230.

DANKOCSIK, C.; DONOVAN, W. P.; IANY, C. S. Activation of acryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. **Molecular Microbiology**, v.4, p. 2087-2094, 1990.

DE COSA, B.; MOAR, W.; LEE, S.B.; MILLER, M.; DANIELL, H. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 71-74, 2001.

DEGRANDE, P. E; FERNANDES, M. G. O Brasil com Bt. In: **Cultivar Grandes Culturas120**, Pelotas, RS: Cultivar, v. 8, n. 87, p. 16-21, jul. 2006.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v.37, p. 409-433, 2003.

DEQUECH, S.T.B.; FIUZA, L.M.; SILVA, R.F.P.; ZUMBA, R.C. Histopatologia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis aizawai* e com ovos de *Campoletis flavicincta* (Hym., Ichneumonidae). **Ciencia-Rural**, v. 37, n. 1, p. 273-276, 2007.

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 59-76, 1992.

DIAS, S. C.; SAGARDOY, M. A.; SILVA, S. F. Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* isolates from Argentinean soils. **BioControl**, Paris, v. 44, p. 59-71, 1999.

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

DONOVAN, W. P.; GONZÁLEZ, J.M; M. GILBERT, P.; DANKOCSIK, C. Isolation and characterization of EG 2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae, and nucleotide sequence of the toxin gene. **Molecular and General Genetics**, v. 214, p. 365-372, 1988.

ESTRUCH, J.J.; CAROZZI, N.B.; DESAI, N.; DUCK, N.B.; WARREN, G.W.; KOZIEL, M.J. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, v.15, p.137-141, 1997.

FATORETTO, J.C. **Associação de bioensaio e caracterização molecular para seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera***. 2002. 105p. Monografia (Graduação)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2002.

FEITELSON, J. S.; PAYNE J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FERNANDES, M. C.; BORTOLI, S. A.; OLIVEIRA, J. E. M. Influência do *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 (Dipel) sobre *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) e *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (*Gossypium hirsutum* Linnaeus) em dois sistemas de cultivo do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: Embrapa-CNPA, 2003. 1-CD-ROM.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.

FISCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/technology**, v.5, p. 807-813, 1987.

FRANÇA, M. M.; TIGANO, M. S.; CARVALHO, R. S. Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* aos fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Nomuraea rileyi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., 1989, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: SEB, 1989. p.254.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M. D.; TATO, A.; MARTINEZ, R. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 31, p. 257-272, 1996.

FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, M.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **Bio/technology**. v. 11, p. 1151-1155, 1993.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BASTISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMINI, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. 3. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GAZZONI, D. L.; YORINORI, J. T. **Manual de identificação de pragas e doenças da soja**. Brasília: EMBRAPA - SPI, 1995. 128p. (Manuais de Identificação de Pragas e Doenças, 1).

GLADSTONE, S. Trial with the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, for the control of tobacco worms (J.E Smith), in irrigated maize cultivated in the dry season. **Revista de la Escuela de sanidad Vegetal**, Nicaragua, v. 1, p. 10 -13, 1989.

GARCZYNSKI, S. F.; ADANG, M. J. Investigations of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxin receptor structure and function, p. 181-197. In J.-F. Charles, A. Delecluse, and C. Nielsen-Leroux (ed.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, 2000.

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

GOMES, J. G. Chave de campo para determinação das principais pragas dos citrus. **Revista da Sociedade Brasileira de Agronomia**, v. 3, n. 1, p. 58-108, 1940.

GOMEZ, I.; OLTEAN, D. I.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Mapping the epitope in cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin interaction using phage display. **Journal Biology Chemistry**, v. 276, p. 28906-28912, 2001.

GORE, J.; ADAMCZYK, J. J.; BLANCO, C. A. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of *Bacillus thuringiensis* proteins. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 88-94, 2005.

GOULD, F. A.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; ANDERSON, A.; FERRE, J.; SILVA, F.J.; MOAR, W.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 7986-7990, 1992.

GOULD, F.A.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.; BUMGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review Entomology**, v. 43, p.701-726, 1998.

GREENPLATE J. T.; MULLINS, J. W.; PENN, S. R.; DAHM, A.; REICH, B. J.; OSBORN, J. A.; RAHN, P. R.; RUSCHKE, L.; SHAPPLEY, Z. W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, p. 340-347, 2003.

GREENPLATE, J. T.; PENN, S. R.; SHAPPLEY, Z.; OPPENHUIZEN, M.; MANN, J.; REICH, B.; OSBORN, J. Bollgard II efficacy: Quantification of lepidopteran activity in a 2-gene product,. In: DUGGER, P.; RICHTER, D. (Ed.). **Proc. Beltwide Cotton Conf. National Cotton Council**, Memphis: TN, 2000b, p. 1041-1043.

GREENPLATE, J. T. PENN, S. R.; MULLINS, J. W.; OPPENHUIZEN, M. Seasonal CryIAC levels in DP50B: The .Bollgard basis. for Bollgard II,. In: DUGGER, P.; RICHTER, D.(Ed.). **Proc. Beltwide Cotton Conf. National Cotton Council**. Memphis: TN, 2000a, p. 1039-1040.

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

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq., 1998, p.383-446.

HABIB M. E. M.; PATEL, P. N. Patogenicidade de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson em larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), praga de milho. **Revista de Agricultura**, Piracicaba. v. 65, p. 83-90, 1990.

HABIB, M. E. M.; PALEARI, L. M.; AMARAL, M. E. C. Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walk., 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 177-182, 1983.

HASSELL, R. L.; SHEPARD, B. M. Insect populations on *Bacillus thuringiensis* transgenic sweet corn. **Journal of Entomological Science**, v. 37, n. 4, p. 285-292, 2002.

HERNANDEZ, J. L. L. Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. **Entomophaga**, v. 33, p. 163-171, 1988.

HILDER, V.A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, Oxford, v.18, p.177-191, 1999.

HOFTE, H.; WHINTELEY, H.R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

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

ICAC - INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE. Genetically engineered cotton in the world - 2002. **The ICAC Recorder**, Washington, v.20, n. 4, p. 8-12, Dec. 2002.

ICAC - INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE . Report of an expert panel on biotechnology in cotton, 2000. Washington (P.J. Wakelyn, Chair).

ICAC - INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE. Update Genetically engineered cotton. **The ICAC Recorder**, Washington, v.22, n. 2, p. 12-15, Dec. 2004.

IGNOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L.; SIKOROWSKI, P. P.; SUTTER, G.; BROOKS, W. M.. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet light source. **Environmental Entomology**, v. 6, p. 411-415, 1977.

INAGAKI, S.; MIASONO, M.; ISHIGURO M.; TAKEDA T.; HAYASHI, Y. Proteolytic processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 60, p. 64-68, 1992.

ISAKOVA, I. A.; ISAKOV, Y.B.; RYMAR, S.E.; KORDIUM, V.A. Specificity of Ukrainian *Bacillus thuringiensis* Berliner strains for agricultural pests of the southeastern United States. **Journal of Entomological Science**, v. 42, n. 2, p. 272-285, 2007.

JANMAAT, A. F; WARE, J.; MYERS, J. Effects of crop type on *Bacillus thuringiensis* toxicity and residual activity against *Trichoplusia ni* in greenhouses . **Journal of Applied Entomology**, v. 131, n. 5, p. 333-337, 2007.

KARAMANLIDOU, G.; LAMBROPOULOS, A.; KOLIAIS, S.; MANOUSIS, T.; ELLAR, D.; KASTRITSIS, C. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2277-2282, 1991.

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

KISH, L. P.; ALLEN, G. E. **The biology and ecology of *Nomuraea rileyi* and a program for predicting its incidence on *Anticarsia gemmatilis* in soybean**. Gainesville: University of Florida, 1978. 58p. (Agriculture Experimental Station Technical Bulletin, 795).

KNOWLES, B. H. Mechanism of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, p.275-308, 1994.

KOTA, M.; DANIELL, H.; VARMA, S.; GARCZYNSKI, S.F.; GOULD, F.; MOAR, W.J. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proceeding of the National Academy of Science**. Washington, v. 96, n. 5, p.1840-1845, 1999.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G.L., BOWMAN, C.; CAROZZI, C. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Bio/Technology**, v. 11, p. 194-200, 1993.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: H.D. BURGESS (Ed.) **Microbial control of pests and plant disease 1970-1980**. London: Academic, 1981, p. 837-896.

KUMAR, V.; SINGH, G.P.; BABU, A.M.; DATTA, R.K. Study on the invasion of *Nomuraea rileyi* (Farlow) on silkworm, *Bombyx mori* Linn. causing green muscardine. **Mycopathologia**, v. 138, p. 141-44, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMBERT, B. B.; DECOCK C; JANSSENS S; PIENS C.; SAYE B; SEURINCK J.; VAN AUDENHOVE K.; VAN RIE J.; A. VAN VLIET A.; PEFEROEN M. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 80-86, 1996.

LECADET, M. M.; CHAUFAX, J.; RIBIER, J.E.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 840-849, 1991.

LECADET, M. M.; BLONDEL, M. O.; RIBIER, J. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. berliner 1715, using bacteriophage CP54 Ber. **Journal Genetic Microbiology**, v. 121, p. 203-212, 1980.

LECUONA, R. E.; LANTERI A. A. Control microbiano con hongos entomopatógenos en la Argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica**, Argentina. v. 58, p.301-306, 1999.

LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.A.; DEAN, D.H.. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 583-586, 1996.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milharais. **O Biológico**, São Paulo, v. 6, n. 9, p. 105-113, dec. 1953.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENWISTLE, P. F. et al. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. 5. ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 1993. p. 37-69.

LEVY R.; HABECK D. H. Descriptions of the larvae of *Spodoptera sunia* and *S. latifascia* with a key to the mature *Spodoptera* larvae of the eastern United States (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 69, p. 585-588, 1976.

LEZAMA-GUTIERREZ, R.; ALATORRE-ROSAS, R.; BOJALIL-JABER, L. F.; MOLINA-OCHOA, J.; ARENAS-VARGAS, M.; GONZALEZ-RAMIREZ, M.; REBOLLEDO-DOMINGUEZ, O. Virulence of five entomopathogenic fungi (Hyphomycetes) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs and neonate larvae. **Vedalia**, v. 3, p. 5-39, 1996.

LI, Y.X.; GREENBERG, S.M.; LIU, T.X. Orientation behavior, development and survival of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera : Noctuidae) larvae on cotton expressing CryIAc and Cry2Ab and conventional cotton. **Journal of Insect Behavior**, v. 20, n. 5, p. 473-488, 2007.

LIAO, C.; HECKEL, D. G.; AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, p. 55-63, 2002.

LOGUERCIO, L. L.; SANTOS, C.G.; BARRETO, M.R.; GUIMARÃES, C.T.; PAIVA, E.. Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 362-367, 2001.

LÓPEZ-EDWARDS, M.; HERNANDEZ-MENDOZA, J.L.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; HAMM, J.J.; WISEMAN, B.R. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, v. 82, p. 254-262, 1999.

LUNGINBILL, P. **The fall armyworm**. Washington: USDA, 1928, 92p. (USDA. Technical Bulletin, 34).

LUO, K.; MCLACHLIN, J. R.; BROWN, M. R.; ADANG, M. J.. Expression of a glycosylphosphatidylinositol-linked *Manduca sexta* aminopeptidase N in insect cells. **Protein Expression and Purification**, v. 17, p. 113-122, 1999.

LUTTRELL, R. G.; YOUNG, S. Y.; YEARIAN, W.C.; HORTON, D.L. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* - spray adjuvant-viral insecticide combination against *Heliothis* spp (Lepidoptera, Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 11, p. 783-787, 1982.

LUTTRELL, R.G; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology** v. 92, n.1, p. 21-32, 1999.

MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P. L.; GREENPLATE, J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F.J.; FISCHOFF, D. A.; FUCHS, R. L. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 56, p. 258-266, 1990.

MAHON, R. J.; OLSEN, K.; GARSIA, K.; YOUNG, S. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in Australia. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 894-902, 2007.

MARTIN, P.; TRAVERS, R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2437-2442, 1989.

MARTINS, G. L. M.; MARUYAMA, L. C. T.; MARUYAMA, W. I. Agentes microbianos no controle de *Alabama argillacea* (Huebner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 23-27, jan./mar., 2007.

MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T. Crescimento em vasos, de cultivares de soja e de trigo em função da saturação de alumínio. **Scientia Agrícola**, v. 52, n. 2, p. 257-262, 1995.

MATTANA, A. L.; FOERSTER, L. A. Ciclo de vida de *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) em um novo hospedeiro, Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (Leguminosae). **Anais Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 17, p. 173-183, 1988.

MEADOWS, M.; ELLIS, D.; BUTT, J.; JARRETT, P.; BURGESS, H. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1344-1350, 1992.

MELATTI, V.; BATISTA, A. C.; DEMO, C.; PRAÇA, L.; MONNERAT, R.G. Determinação da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. v. 88, p. 1-14, 2005.

MENDEZ-LOPEZ, I.; BASURTO-RIOS R.; IBARRA J. E. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, n. 1, p. 73-77, Sept. 2003.

MENSCHOY, A. B. Pragas do milho, métodos de defesa. **Boletim Técnico do Instituto Agrônomo do Sul**, Pelotas, v. 10, n. 16, p. 1-18, 1956.

MIKLOS, J. A.; ALIBHAI, M.F.; BLEDIG, S.A.; CONNOR-WARD, D.C.; GAO, A.G.; HOLMES, B.A.; KOLACZ, K.H.; KABUYE, V.T.; MACRAE, T.C.; PARADISE, M.S.; TOEDEBUSCH, A.S.; HARRISON, L.A. Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene that confers a high degree of resistance to lepidopteran pests . **Crop-Science**, v. 47, n. 1, p. 148-157, 2007.

MIRANDA, J.E.; BARBOSA, K. A.; COUTO, A. F.; FERNADES, J. I. Flutuação populacional e necessidades de controle químico de pragas em algodoeiro transgênico BT1. **Anais...** VI Congresso Brasileiro de Algodão, Goiás: Fialgo, 2007. CD-ROOM.

MITCHEL, E. R. Relationship of planting date to damage by earworms in commercial sweet corn en norte central Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 61, n. 4, p. 251-255, dec. 1978.

MOAR, W. J.; MASSON, L; BROUSSEAU R.; TRUMBLE J.T. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Tricoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2480-2483, 1990.

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M.J. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2086-2092, 1995.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. S.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.; FALCAO, R.; BERRY, C. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P.; ORDUZ, S.; BENITENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M.D.; IBARRA, J.; BRAVO, A. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7029-7035, 2006.

MONNERAT, R. G.; DIAS, D.G.S.; SILVA, S. F.; Martins, E.; BERRY, C.; FALCAO, R.; GOMES, A.C. M.; PRAÇA, L.; SOARES, C.M.S. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 2, p. 103-106, 2005.

MONNERAT, R.G. Utilização de *Bacillus thuringiensis* endofíticos para controle de insetos-praga do algodoeiro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Abril 2004. Disponível em: <<http://www.facual.org.br>>. Acesso em: 08 de Abril 2008.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: Modo de ação e resistência. In: ITAMAR MELO. (Org.). **Controle biológico**. 1 ed. São Paulo: Embrapa, 2000, v. 3, p. 163-192.

MONNERAT, R.G. Interrelation entre la teigne des cruciferes *Plutella xylostella* (L.) (Lep.: Yponomeutidae), son parasitoide *Diadegma* sp. et la bacterie entomophatogene *Bacillus thuringiensis* Berliner. Montpellier: École Nationale Superieure Agronomique de Montpellier, 1995, 160 p. (Tese Doutorado)

MORAES, I.O. Obtenção de inseticidas bacterianos por fermentação submersa. Dissertação de Mestrado, FEA/Unicamp, Campinas, 1973, 60p.

MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F.; ARRUDA, R.O.M. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 815-843.

MORALES, G. G.; NOVOA, A. S. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* para control de insectos lepidópteros. **Southwestern Entomologist**, v. 17, n. 1, p. 63-67, 1992.

MOREIRA, A. F. C.; ALL, J. Screening of bioinsecticides against the cotton bollworm on cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 307-312, 1995.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 509-539.

MOSCARDI, F.; KASTELIC, J. G.; SOSA-GOMEZ, D. R. Suscetibilidade de três Espécies de Lepidopteros, Associados a Soja, a três Isolados do Fungo *Nomuraea rileyi*. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 21, n. 2, p. 93-100, 1992.

NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; ZUCCHI, R. A. **Entomologia econômica**. Piracicaba: Livroceres, 314p. 1981.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LeROUX, C. (Ed.) **Entomopathogenic bacteria: from Laboratory to Field Application**. Dordrech: Kluwer Academic Publishers, 2000b, p. 355-365.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. **Crop Protection**, v. 19, p. 669-676, 2000a.

NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F. et al. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 125-146.

NAYAK, P.; BASU, D.; DAS, S.; BASU, A.; GHOSH, D.; RAMAKRISHNAN, N. A.; GHOSH., M.; SEN, S. K. Transgenic elite indica rice plants expressing CryIAc delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 2111-2116, 1997.

NORA, I.; REIS FILHO, W.; STUKER, H. Danos de lagartas em frutos e folhas de macieira: mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares. **Agropecuária Catarinense**, v. 2, p. 54-55, 1989.

NYOUKI, F. F. R.; FUXA, J. R.; RICHTER, A. R. Spore-toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v. 31, n. 1, p. 52-62, 1996.

PANNETIER C.; GUIDERDONI, E.; HAU, B. Genetic engineering and the improvement of rice and cotton. **Agriculture et Developpement**. v. 6, p. 16-27, 1995.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 6. ed. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001. 134p.

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

PASHLEY, D. P.; JOHNSON, S. J.; SPARKS, A. N. Genetic population structure of migratory moths: The fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals Entomology Society America**, v. 78, p. 756-762, 1985.

PATEL, P. N. **Estudos de fatores bióticos de controle natural em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 1981. 98f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade de Campinas, Campinas, 1981.

PENN, S.; REICH, R.B.; OSBORN, J.; EMBRY, K.; GREENPLATE, J. Quantification of lepidopteran activity in a 2-gene product: a 2-year summary of Bollgard II. In: DUGGER, P.; RICHTER, D. (Ed.). **Proc. Beltwide Cotton Conf. National Cotton Council**. Memphis: TN, 2001, p. 830-832.

PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.A.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v. 8, p. 939-943, 1990.

PICOLI, R.; FERNANDES, O.D.; MONTEZUMA, M.C. Biotecnologia eficiência do milho Mon810 no controle da broca-do-colmo *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS, 1794) infestada em diferentes estádios fenológicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19, 2002, Manaus. **Resumos...** Manaus: Inpa, 2002.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2004. 158p. Tese (Doutorado em Ciência)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideu, v. 7, p. 1-10, 2003.

PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, É.S.; SIQUEIRA, C.B.; de S. DIAS, D.G.; GOMES, R. FALCÃO, A.C.M.M.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 39, p. 11-16, 2004.

RAMACHANDRAN, S.; BUNTIN, G.D.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; STEWART, C.N. Intraspecific competition of an insect-resistant transgenic canola in seed mixtures. **Agronomy Journal**, v. 92, p. 368-374, 2000.

RAMIRO Z. A., SANTOS, W. J.; MONTEZUMA, M. C. Estudo da eficiência do algodão Bollgard para o controle do curuquerê, *Alabama argillacea*, da lagarta da maçã *Heliothis virescens* e da lagarta rosada *Pectinophora gossypiella*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 9., 2002, Manaus. **Anais...** Manaus: Inpa, 2002. p. 328.

REDFERN, R. E. Instars of southern armyworm determined by measurement of head capsule. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, p. 614-615, 1967.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL., 28., 2000, Santa Maria.  
**Recomendações técnicas para a cultura de soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2000/2001.** Santa Maria: UFSM/CCR/Departamento de Defesa Fitossanitária, 2000. 148p.

REVISTA CORREIO AGRÍCOLA: a revista da Bayer CropScience para a agricultura moderna. 01/2004.

RIBEIRO, B. M.; PINEDO, F. J. R. Baculovírus recombinante para controle de praga. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 22. p. 50-58, 2001.

RIDGE, R.L.; TURNIPSEED, S.G.; SULLIVAN, M.J. Field comparison of genetically modified cottons containing one strain (Bollgard) and two strains (Bollgard II) of *Bacillus thuringiensis* Kurstaki. Pp. 1057-1058. In: **Proceedings, Beltwide Cotton Conferences.** National Cotton Council, Memphis, Tenn, 2000.

RIESENMAN, P. J.; NICHOLSON, W. L. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 620-626, Feb. 2000.

RODRIGUES, C.; PRATISSOLI, D. Avaliação de patogenicidade dos fungos entomógenos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 12., 1989, Belo Horizonte. **Resumos...** Belo Horizonte: SEB, 1989. p.223.

ROUSH, R. T. Bt-transgenic crops: just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? **Pesticide Science**, v. 51, p. 328-334, 1997.

SAADOUN, I.; AL-MOMANI, F.; OBEIDAT, M.; MEQDAM M.; ELBETIEHA, A. Assessment of toxic potential of local Jordanian *Bacillus thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera). **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 866872, 2001.

SALAMA, H. S.; MORRIS, O. N. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. In: ENTWISTLE, P. F. et al. (Ed.) ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticides: theory and practice.*** Chichester: John Wiley, 1993. p. 237-253.

SALAMA, H. S.; ZAKI, F.N; SALEM, S; RAGAEI, M. The use of *Bacillus thuringiensis* to control two lepidopterous insect pests (*Agrotis ypsilon* and *Spodoptera littoralis*). **Anzeiger fur Schadlingskunde, Pflanzenschutz**, v. 68, n. 1, p. 15-17, 1995.

SALVADORI, J. R.; QUINTELA, E. D.; CORREIA, A. C. B.; ALVES, S. B. Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 10., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Entomológica do Brasil, 1986. v. 1, p. 201.

SANTOS, G. P.; COSENZA, G. W.; ALBINO, J. C. Biologia de *Spodoptera latifascia* (Walk., 1856) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre folhas de eucalipto. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 24, n. 2, p. 153-155, 1980.

SANTOS, K. B. **Biologia e preferência alimentar de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros.** 2004. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SANTOS, K. B.; NEVES, P. M. O. J. ; MENEGUIN, A. M. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: **Algodão: Tecnologia de Produção.** Embrapa Agropecuária Oeste; Embrapa Algodão. Embrapa Agropecuária Oeste, 2001, p. 296.

SANTOS, W. J. Manejo das Pragas do Algodão com destaque para o Cerrado Brasileiro. In: FREIRE E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil.** Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p. 403-521.

SANTOS, W. J. Manejo Integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. P: 48-71. In: **Algodão,** Fundação MT, Rondonópolis, MT, 1997, Boletim 02, 107p.

SANTOS, W. J.; SANTOS, K. B.; SANTOS, R. B. Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera* spp. em algodoeiro no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: Embrapa CNPA, 2003.

SARMENTO, R. A.; AGUIAR, R.W.S.; AGUIAR, R.A.S.S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H.G.; HOLTZ, A.M. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, p. 41-48, dec. 2002.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 775-806, 1998.

SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 78, p. 2893-2897, 1981.

SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.16, p.168-174.1998.

SCHÜNEMANN, R.; BODANESE-ZENETTINI, M.H.; FIUZA, L.M. Patogenicidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* contra a lagarta da soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 19, 2002, Manaus. **Título...** Manaus: Inpa, 2002, p. 328.

SILAPANUNTAKUL, S.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A.; CHAAROENSIRI, K. The comparative persistence of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae in different kinds of environments. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, p. 387-392, 1983.

SILOTO, R.C.; ALMEIDA, J.E.M.; RAGA, A. Epizooty of *Nomuraea rileyi* in *Spodoptera frugiperda* larvae in the corn crop, *Zea mays*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY, 21., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstract Book**. Londrina: Embrapa, 2000, v. I, p. 542-542.

SILVA, S. B.; SILVAWERNECK, J.O.; FALCAO, R.; OLIVEIRA NETO, O.B.; SÁ, M. F.G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R.G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, p. 1-6, 2004.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. **Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis***. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 5p. (Circular Técnica, 10).

SILVIE P.; LEROY, T.; JEAN-LOUIS, B.; MICHEL, B. **Manual de Identificação das pragas e seus danos no algodoeiro**. Boletim Técnico, n.34, Cascavel: Coodetec/Cirad-CA, 2001. 100p.

SOARES, J. J.; FREIRE, E.C.; SANTOS, J.W.; NASCIMENTO, A.R.B.; SILVA, M.V. **Efeito de genótipo de algodoeiro com gene BT na biologia de *Alabama argillacea***. Campina Grande: PB, Embrapa Algodão Outubro, 2007. (Comunicado Técnico 314).

SOSA-GOMEZ, D. R.; ABOT, R.A.; MOSCARDI, F.; PARO, F. E.; SOLDORIO, I. Suscetibilidade de diferentes instares de *Anticarsia gemmatalis* ao *Bacillus thuringiensis* e avaliação da resistência cruzada em populações resistentes ao *Baculovirus anticarsia*. In:

SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., 1992, Aguas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDIA, 1992. p. 193.

SOUZA, A. M. L.; CRÉBIO, J. A.; PARRA, J. R. P. Consumo e utilização de aliento por *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Pyralidae), *Hrliothis virescens* (Fabr.) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas temperaturas. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 1, p. 11-17, 2001.

SOUZA, M. T.; LIMA, M.I.; SILVA-WERNECK, J.O.; DIAS, J.C.S.; RIBEIRO, B.M. Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. **Biocell**, v. 23, p. 43-49, 1999.

STEWART JR., C. N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; RAYMER, P.L.; RAMACHSNDRAN, S.; PARROTT, W.A. Insect control and dosage effect in transgenic canola, *Brassica napus* L. (Brassicaceae). containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene. **Plant Physiology**, v. 112, p.115-120, 1996.

STEWART, S. D.; ADAMCZYK, J.J.; KNIGHTEN, K.S.; DAVIS, F. M. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of Noctuid (Lepidoptera) larvae. **Journal Economic Entomology**, v. 94, p. 752-760, 2001.

STEWART, S. D.; KNIGHTEN, K. S.; DAVIS, F. M. Efficacy of Bt Cotton Expressing Two Insecticidal Proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on Selected Caterpillar Pests. In: : DUGGER, P.; RICHTER, D. (Ed.), **Proceeding of the Beltwide Cotton Conference**, National Cotton Council, Memphis: TN, v. 2, p. 1043-1048, 2000.

STONE, T. B.; SIMS, S. R.; and MARRONE, P.G. Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 228-234, 1989.

TABASHNIK, B.E.; LIU, Y.B.; DENNEHY, T.J.; SIMS, M.A.; SISTERTSON, M.; BIGGS, R.; CARRIÈRE, Y. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 95, p. 1018-1026, 2002.

TAYLOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, v. 6, p.1211-1217, 1992.

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

TIGANO, M. S.; FARIA, M.R.; LECUONA, R.E.; SARTORI, M.R.; ARIMA, E.Y.; DIAZ, B.M. Análise de patogenicidade, germinação e isoenzimas do fungo *Nomuraea rileyi* isolado no Distrito Federal. **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 24, n. 1, p. 53-60, 1995.

TRAXLER, G.; GODOY-AVILA, S. Transgenic cotton in Mexico. **AgBioForum**, v. 7, n. 1/2, p. 57-62, 2004. Disponível em: <<http://www.agbioforum.org>>. Acesso em: 08 de Janeiro 2008.

URIBE, D.; MARTINEZ, W.; CERÓN, J. Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 82, p. 119-127, 2003.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. de. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.201-230.

VALICENTE, F. H. ; FONSECA, M. M. Susceptibilidade da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Minas Gerais, v. 3, n. 1, p. 21-29, 2004.

VALICENTE, F. H. Biological Control of *Spodoptera frugiperda* with Baculovirus and *Bacillus thuringiensis* in Brazil. In: INTERNATIONAL PLANT PROTECTION, 1995, Hague. **Abstract...** Hague: Kluwer Academic, 1995.

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

VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE P. F. et al. ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and Practice**, New York, 2000. p.1-35.

VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W.H.; JOHNSON, D.E.; BARNETT, B.D.; MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 247, p. 72-74, 1990.

VELOSO, V. R. S.; NAKANO, O. Determinação do número de estruturas frutíferas do algodoeiro danificadas por lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em diferentes épocas de desenvolvimento da cultura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 13, n. 1, 1983.

VILAS-BOAS, G.F.L.T.; PERUCA, A.P.S.; ARANTES, O.M.N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 673-687, 2007.

VISSER, B.; MUNSTERMAN, E.; STOKER, A.; DIRKSE, W.G. A Novel *Bacillus thuringiensis* Gene Encoding a *Spodoptera exigua* - Specific Crystal Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 6783-6788, 1990.

VOHLK, P.H.F.; SILVIE, P.; TAKIZAWA, E.; MELO, F.L.A. Avaliação e Manejo de pragas dos algodoeiros Bt: primeira safra no Mato Grosso, Brasil. **Anais... VI Congresso Brasileiro de Algodão**, Goiás: Fialgo, 2007. CD-ROOM.

VOTH, R. D.; GREENPLATE, J.T.; MANN, J.E.; MULLINS, J.W.. Bollgard® II cotton technical review. In: DUGGER, P.; RICHTER, D. (Ed.). **Proceeding of the Beltwide Cotton Conference National Cotton Council**, Memphis: TN, 2001. p. 830.

WAKELYN, P. J.; MAY, O. L.; MENCHEY, E. K. Cotton and Biotechnology. In: CHRISTOU, P.; KLEE, H. (Ed.). **CRC Handbook of plant biotechnology**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2003.

WANG, A. F.; HUANG, J. N.; HAN, P. E. A study on the control of insects on vegetables with preparations of *Bacillus thuringiensis*. **Zhejiang Agricultural Science**, v. 2, p. 79-81, 1989.

WAQUIL, J. M.; VILELLA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência de milho (*Zea mays* L.) transgênico à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG., v. 1, n. 3, p. 1-11, 2002.

WAQUIL, J. M.; VILELLA, F. M. F.; SIEGFRIED, B.D.; FOSTER, J. E. Atividade biológica das toxinas do Bt, Cry1A(b) e Cry1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 2, p. 153-163, 2004.

WEISER J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A., HUGER, A. M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft**. Berlin: Dahlem Heft, 1986. v. 233, p. 37-50.

WERNECK, J. O. S.; ABREU NETO, J.R.M.V.; TOSTES, A.N.; FARIA, L.O.; SOUSA DIAS, J.M.C. Novo Isolado de *Bacillus thuringiensis* Efetivo Contra a Lagarta-do-cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n.1, p. 221-227, 2000.

WU, D.; CAO, X.L.; BAI, Y.Y.; ARONSON, A.I. Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, p. 31-35, 1991.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 315-343, 1984.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 39, p. 84-91, 1991.

ZENKER M. M.; SPECHT, A.; COURSEUIL, E. Estágios de imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 1, p 99-107. mar. 2007.