



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Colegiado do CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FELIPE ROCHA RAGGI

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE *Rachiplusia Nu* (GUENÉE, 1852)

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

FELIPE ROCHA RAGGI

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Bacillus thuringiensis PARA O CONTROLE DE
Rachiplusia Nu (GUENÉE, 1852)**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Gislayne Trindade Vilas Boas

**Londrina – Paraná
2025**

R142s Raggi, Felipe Rocha .

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*
PARA O CONTROLE DE *Rachiplusia Nu* (GUENÉE, 1852) / Felipe Rocha
Raggi. - Londrina, 2025. 41 f. : il.

Orientador: Gislayne Trindade Vilas-Boas.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em
Ciências Biológicas, 2025.

Inclui bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis* - TCC. 2. *Rachiplusia nu* - TCC. 3. Controle - TCC. I.
Vilas-Boas, Gislayne Trindade . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 575.1

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gislayne Trindade Vilas Boas

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcelos

Laurival Antonio Vilas Boas

Londrina, 7 de fevereiro de 2025

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e todos esses cinco anos de graduação à minha querida avó paterna, Maria das Dores Teixeira de Rezende Raggi, que já não está mais comigo. Sem ela ao meu lado ao longo de 20 anos, eu não seria metade da pessoa que sou hoje.

Eu gostaria que você pudesse ter visto esse desfecho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, por todo suporte, acolhimento carinho e orientação ao longo de toda a minha graduação. À minha mãe, minha melhor amiga, conselheira e primeira linha de refúgio sempre que eu precisei.

À minha orientadora, Gislayne Trindade Vilas Boas, pelo apoio, suporte e comprometimento excepcional ao longo de toda minha monografia.

Ao meu orientador ao longo dos últimos 4 anos, Laurival Antônio Vilas Boas, por toda dedicação, ajuda, e principalmente paciência ao longo de toda minha graduação.

A todos meus colegas de laboratório, em especial, Nicolas Polidorio e Eduarda Andrade pelo auxílio fundamental durante os experimentos.

Aos meus queridos amigos da UEL, que sempre me apoiaram, principalmente nos momentos mais difíceis.

E a todos que me ajudaram de qualquer forma a me tornar um Biólogo e a finalizar este estudo.

RAGGI, Felipe R. **SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE *Rachiplusia Nu* (GUENÉE, 1852)** . 2025. 41fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva amplamente reconhecida pelo seu elevado potencial no controle biológico de pragas, seja na produção de bioinsumos ou no desenvolvimento de plantas transgênicas. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo identificar e caracterizar isolados dessa bactéria para o manejo de *Rachiplusia nu*, inseto-praga notoriamente associado ao desfolhamento de culturas de soja (*Glycine max* L. Merrill). Inicialmente, amostras de solo foram coletadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, das quais foram obtidos 28 isolados de Bt. A partir destes, 18 isolados foram selecionados, formando um banco de bactérias para subseqüentes análises. Separadamente, um conjunto de 24 isolados foi submetido a bioensaios de patogenicidade e virulência utilizando larvas neonatas de *R. nu*. Os experimentos, realizados em triplicata com avaliações diárias durante sete dias, permitiram identificar isolados com elevada atividade entomopatogênica. Dentre eles, o isolado BR07 destacou-se, atingindo 100% de mortalidade nos bioensaios de patogenicidade e apresentando, nos testes de virulência, valores de CL50 e CL95 de 16,370 ppm e 168,327 ppm, respectivamente. O sequenciamento do genoma do isolado BR07 possibilitou a identificação dos genes *cry* (*cry1Aa*, *cry1Ia*, *cry2Aa* e *cry2Ab*) e do gene *vip3Aa*, que codificam toxinas inseticidas com potencial para controlar lagartas resistentes à proteína Cry1Ac. Assim, os resultados sugerem que o isolado BR07 representa uma alternativa promissora para o manejo integrado de *R. nu*, podendo também servir como fonte genética para o desenvolvimento de novas plantas transgênicas resistentes.

Palavras-chave: Controle biológico; Isolamento; Sequenciamento genômico.

RAGGI, Felipe R. **SELECTION AND CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* ISOLATES FOR THE CONTROL OF *Rachiplusia nu* (GUENÉE, 1852)**. 2025. 41 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram-positive bacterium widely recognized for its significant potential in biological pest control, utilized in both bioinsecticide production and the development of transgenic plants. In this context, the present study aimed to identify and characterize isolates of this bacterium for managing *Rachiplusia nu*, an insect pest notably associated with the defoliation of soybean (*Glycine max* L. Merrill) crops. Initially, soil samples were collected from the Experimental Farm of the State University of Londrina, from which 28 Bt isolates were obtained. Of these, 18 isolates were selected, forming a bacterial bank for subsequent analyses. Separately, a set of 24 isolates was subjected to pathogenicity and virulence bioassays using neonate larvae of *R. nu*. The experiments, conducted in triplicate with daily evaluations over seven days, allowed for the identification of isolates with high entomopathogenic activity. Among them, isolate BR07 stood out, achieving 100% mortality in pathogenicity bioassays and presenting, in virulence tests, CL₅₀ and CL₉₅ values of 16.370 ppm and 168.327 ppm, respectively. Genome sequencing of isolate BR07 enabled the identification of *cry* genes (*cry1Aa*, *cry1Ia*, *cry2Aa*, and *cry2Ab*) and the *vip3Aa* gene, which encode insecticidal toxins with the potential to control larvae resistant to the Cry1Ac protein. Thus, the results suggest that isolate BR07 represents a promising alternative for the integrated management of *R. nu* and may also serve as a genetic source for the development of new resistant transgenic plants.

Keywords: Biological control; Isolation; Microorganism; Genomic sequencing.

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÕES	22
REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

O controle biológico de pragas agrícolas tem se destacado como uma alternativa sustentável frente aos métodos químicos tradicionais, sendo essencial para a redução dos impactos ambientais e a promoção da sustentabilidade no setor agrícola (Galzer, 2016). Dentre os microrganismos mais utilizados, o *Bacillus thuringiensis* (Bt) desempenha um papel crucial. Essa bactéria Gram-positiva, descoberta no início do século 20, possui a capacidade de produzir cristais proteicos contendo toxinas Cry, altamente específicas para determinadas ordens de insetos, especialmente Lepidoptera. Sua aplicação na agricultura, tanto como bioinseticida quanto na formulação de culturas transgênicas resistentes a pragas, revolucionou o manejo integrado de pragas em escala global (Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2007).

No Brasil, a introdução de culturas transgênicas Bt, como a soja (*Glycine max*), milho e algodão, tem sido fundamental para o controle de pragas agrícolas, reduzindo a dependência de inseticidas químicos. A soja, em particular, é uma das culturas mais relevantes economicamente, sendo o Brasil o maior produtor mundial (Embrapa, 2024). Contudo, desafios significativos ainda são enfrentados, como o desenvolvimento de resistência por parte de insetos-alvo, como a lagarta *Rachiplusia nu*, conhecida como falsa-medideira. Essa espécie, amplamente distribuída na América do Sul, tem apresentado resistência à toxina Cry1Ac, utilizada em culturas Bt. Essa resistência, de herança autossômica recessiva, representa uma ameaça à sustentabilidade das tecnologias Bt e exige uma abordagem integrada para manejo (Bernardi, 2016; Reis, 2024).

A resistência de *R. nu* à tecnologia Cry1Ac tem se mostrado preocupante, pois sua disseminação compromete a eficácia das estratégias de controle biológico baseadas em Bt. Pesquisas indicam que a ausência de áreas de refúgio, combinada ao uso intensivo de culturas transgênicas, contribui para a evolução dessa resistência. Além disso, a falta de custos adaptativos relevantes nos indivíduos resistentes pode acelerar esse processo. Como resultado, estratégias alternativas, como o uso de novas combinações de toxinas inseticidas (por exemplo, Cry1A.105 e Cry2Ab2) e o aprimoramento do manejo integrado de pragas (MIP), têm sido propostas como medidas para retardar a evolução da resistência e garantir a sustentabilidade dessas tecnologias (Nardon et al., 2021; Bueno; Sosa-Gómez,

2021).

Outro aspecto relevante é a busca por novas proteínas inseticidas, como as Vip (Vegetative Insecticidal Proteins), que apresentam modos de ação distintos das proteínas Cry, permitindo um controle mais eficaz de pragas resistentes. A combinação de toxinas Cry e Vip em culturas transgênicas tem demonstrado ser uma abordagem promissora para mitigar os impactos da resistência e prolongar a eficácia das tecnologias Bt (Soberón; Bravo, 2019).

Diante desse cenário, este trabalho visa a seleção e avaliação de novos isolados de *B. thuringiensis* quanto a eficácia no manejo de *R. nu*. A pesquisa busca, assim, contribuir para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis que assegurem a produtividade agrícola e a preservação ambiental, além de explorar inovações biotecnológicas capazes de superar os desafios impostos pela resistência de insetos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MANEJO DE INSETOS PRAGA NA AGRICULTURA

O controle de pragas na agricultura brasileira desempenha papel fundamental na manutenção da produtividade, competitividade e sustentabilidade do setor agrícola. O país é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, mas enfrenta desafios constantes relacionados ao aumento de pragas em culturas importantes, como soja, milho, algodão, café e cana-de-açúcar (IBGE, 2023). A variabilidade climática e ecológica presente no país favorece a disseminação de diversos tipos de pragas, o que exige uma ação coordenada (Santos, 2010).

Entre os métodos de controle de pragas mais utilizados no Brasil, destacam-se o manejo químico, biológico, cultural e integrado de pragas: Manejo Integrado de Pragas (MIP). O controle químico com uso de defensivos agrícolas ainda existe devido à sua ação direta. Inseticidas, fungicidas e herbicidas são amplamente utilizados para proteção de culturas, porém seu uso indiscriminado pode acarretar problemas como resistência de pragas, poluição ambiental e riscos à saúde humana (Veiga, 2006; Lopes, 2023). Por outro lado, o Controle Biológico Aplicado (CBA), que utiliza organismos como predadores, parasitas e agentes patogênicos para controlar pragas, tem gradualmente ganho atenção como uma abordagem sustentável. No Brasil, exemplos de sucesso incluem o uso da capacidade citotóxica advinda de *Bacillus thuringiensis* (Bt) em culturas como algodão e milho, juntamente com o uso de vespas *Trichogramma* em campos para combate a lagartas (Castro, 2022).

Sob a perspectiva agrícola, o controle biológico pode ser dividido em duas categorias principais: o Controle Biológico Natural e o Controle Biológico Aplicado. Conforme descrito por Parra (2002), o Controle Biológico Natural refere-se à presença de populações de inimigos naturais que ocorrem espontaneamente no ambiente. Esses organismos, como parasitoides e predadores, desempenham um papel essencial na mortalidade natural das pragas e ajudam a manter o equilíbrio populacional no agroecossistema. Para maximizar sua eficiência, é necessário preservar esses inimigos naturais, ajustando o ambiente de maneira favorável à sua sobrevivência e atividade. Esse processo, conhecido como conservação, é um dos pilares fundamentais do controle biológico.

Já o CBA envolve a criação em larga escala de parasitoides ou predadores em laboratório, que são posteriormente liberados de forma massiva nas áreas agrícolas

para reduzir rapidamente a população de pragas ao seu nível de equilíbrio. Essa abordagem tem ganhado popularidade no Brasil devido à sua eficácia comparável à dos inseticidas, além de ser bem aceita pelos produtores. No entanto, o sucesso do CBA depende de estudos aprofundados sobre a biologia e a relação entre o hospedeiro e o parasitoide, bem como de avanços em áreas como fisiologia, nutrição e genética (Parra, 2002).

Outro grande avanço no controle de pragas no Brasil é a introdução da biotecnologia na agricultura: o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas, como a soja Bt e o milho Bt, tornou-as resistentes a pragas, reduzindo a necessidade de pesticidas e ajudando a prevenir a degradação ambiental (FAO, 2025). No entanto, o uso de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) requer monitoramento cuidadoso para evitar o desenvolvimento de resistência de pragas, o que pode prejudicar a eficácia dessas tecnologias ao longo do tempo (Bernardi, 2016).

As consequências dessas medidas na agricultura brasileira foram significativas. O controle eficaz de pragas e doenças pode aumentar a produtividade, reduzir perdas e garantir estabilidade econômica para os agricultores. Pesquisas mostram que pragas podem destruir até 40% das plantações agrícolas no mundo e, no Brasil, a introdução de métodos eficazes reduziu significativamente essa perda (FAO, 2025). Além disso, o controle de pragas contribui para a competitividade do agronegócio brasileiro nos mercados internacionais, garantindo que os produtos sejam de altíssima qualidade e atendam aos padrões fitossanitários exigidos por outros países (Parra, 2002).

Por outro lado, os problemas associados aos métodos de controle de pragas não podem ser ignorados, especialmente o uso generalizado de defensivos agrícolas, incluindo poluição do solo e da água, remoção de organismos benéficos e riscos à saúde de trabalhadores agrícolas e consumidores, sendo, portanto, questões que exigem atenção contínua (Veiga, 2006). Para mitigar esses desafios, é necessário investir em tecnologias seguras, promover a educação ambiental entre os agricultores e implementar políticas que promovam a agricultura sustentável (Lopes, 2023).

Assim, o controle de pragas se mostra fundamental para prevenir perdas significativas na agricultura, que alcançam médias globais estimadas de 21,5% no trigo, 30% no arroz, 22,5% no milho, 17,2% na batata e 21,4% na soja (Savary, 2019). Essas perdas variam de acordo com fatores como condições climáticas, práticas de manejo e vulnerabilidades específicas de cada região. Em áreas marcadas pela insegurança alimentar, como o subcontinente Indo-Gangético e a África Subsaariana,

os prejuízos são ainda mais graves, podendo chegar a 40,9% no arroz e 41,1% no milho (Savary, 2019).

Apesar do progresso, o controle de pragas e doenças no Brasil ainda enfrenta desafios significativos. O combate aos patógenos é uma preocupação crescente, exigindo o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias de manejo. Além disso, as alterações climáticas podem alterar a dinâmica das populações de insetos, aumentando a sua propagação e aumentando o risco de epidemias (Skendžić, 2021). Nesse contexto, a pesquisa científica e a inovação tecnológica são essenciais para a agricultura brasileira sustentável.

2.2 CULTURA DA SOJA (*GLYCINE MAX*)

A soja, planta herbácea da família Fabaceae, é a oleaginosa mais cultivada no mundo. Com um alto teor de proteínas (40%), a soja se destaca como a principal matéria-prima para a produção de rações destinadas à alimentação de animais domésticos. Em 2006, o valor bruto da produção mundial de soja alcançou 47 bilhões de dólares (US\$ 220,00/t), sem levar em conta os benefícios indiretos gerados, que multiplicam significativamente essa quantidade (Embrapa, 2021).

As variedades comerciais mais comuns possuem caule híspido, com poucas ramificações, e raízes que apresentam um eixo principal acompanhado de diversas ramificações. Suas folhas são trifolioladas, exceto o primeiro par, que é simples e se encontra no nó acima do nó cotiledonar. As flores, típicas da subfamília Papilionoideae, são autógamas e podem ser brancas, roxas ou de tonalidades intermediárias. Essas plantas desenvolvem vagens ligeiramente curvadas que, durante o amadurecimento, passam da cor verde para tons de amarelo-pálido, marrom-claro, marrom-escuro ou cinza. As vagens podem conter de uma a cinco sementes, que possuem formato elíptico ou globoso, superfície lisa e tegumento de coloração amarelo-pálido, com hilo que varia entre preto, marrom ou amarelo-palha. (Embrapa-CNPSo, 2008).

A altura das plantas varia conforme a cultivar e as condições ambientais, sendo idealmente entre 60 e 110 cm. Essa faixa favorece a colheita mecanizada e reduz o risco de acamamento. O ambiente também exerce influência sobre a floração e o ciclo da cultura, sendo a soja sensível ao nictoperíodo, ou seja, à duração da noite. Comumente, usa-se o termo fotoperíodo, que se refere à duração

do dia, para descrever que a soja é uma planta de dias curtos, pois em dias longos seu florescimento é retardado e o ciclo se prolonga (Embrapa-CNPSO, 2008).

A soja apresenta melhor adaptação em regiões onde as temperaturas variam entre 20°C e 30°C, sendo que a faixa ideal para seu desenvolvimento situa-se em torno de 30°C. A sementeira, no entanto, não deve ser realizada quando a temperatura do solo estiver abaixo de 20°C, pois isso compromete tanto a germinação quanto a emergência das plantas. A faixa recomendada de temperatura do solo para a sementeira está entre 20°C e 30°C, sendo 25°C considerada a temperatura ideal para garantir uma emergência rápida e uniforme (Embrapa, 2021).

Regiões com temperaturas iguais ou inferiores a 10°C são inadequadas para o cultivo de soja, uma vez que nessas condições o crescimento vegetativo e o desenvolvimento da planta são extremamente reduzidos ou inexistentes. Em contrapartida, temperaturas superiores a 40°C impactam negativamente a taxa de crescimento, causam danos ao processo de floração e diminuem a capacidade de retenção das vagens. Esses efeitos adversos tornam-se ainda mais pronunciados em situações de deficiência hídrica (Embrapa, 2021).

A disponibilidade de água desempenha um papel crucial em dois momentos chave do desenvolvimento da soja: germinação/emergência e floração/enchimento de grãos. No estágio inicial, tanto o excesso quanto a falta de água podem comprometer o estabelecimento da cultura e a uniformidade da população de plantas, sendo o excesso hídrico mais prejudicial do que a carência. Para garantir uma boa germinação, a semente de soja precisa absorver pelo menos 50% de seu peso em água. À medida que a planta se desenvolve, a demanda por água aumenta, alcançando o pico durante a fase de floração e enchimento de grãos (7 a 8 mm/dia), reduzindo-se após essa etapa (Embrapa, 2021).

Segundo Neumaier (2000), os cultivares de soja podem apresentar 3 padrões de crescimento: determinado, indeterminado e semideterminado. No padrão determinado, a planta apresenta a característica de um baixo crescimento e nenhuma ramificação após o seu florescimento, que por sua vez ocorre ao mesmo tempo em toda a planta, assim como o desenvolvimento de vagens e grãos. As folhas do topo da planta são praticamente iguais às demais em tamanho e seu racemo é longo e com muitas vagens no nó terminal. Já o padrão do cultivar indeterminado é caracterizado por um grande crescimento da planta após o florescimento, que juntamente a formação de vagens, ocorre de forma escalonada

(de baixo para cima). Além disso as folhas do topo da planta são menores que as das demais partes e seu nó terminal apresenta poucas vagens. O tipo semideterminado é um intermediário entre os dois padrões anteriores.

A origem definitiva do cultivo da soja ainda é indefinida. Segundo a literatura chinesa, o cultivo e utilização como alimento da soja ocorreu centenas de anos antes do primeiro registro escrito, datado de 2938 A.C. no herbário PEN TS' AO KANG UM. Obras antigas fornecem indicações valiosas sobre os solos mais adequados para cultivo, métodos de plantio, melhores variedades para diferentes ocasiões e usos, sendo a recomendação mais antiga do ano de 2207 A.C. (Morse, 1950). É indicado que seu local de origem seria o leste da Ásia, segundo Morse (1950), mais especificamente a área central da China. A partir desse local a soja foi introduzida posteriormente na Coreia e Japão entre os séculos II e III A.C (Probst, 1973).

Sua introdução no território brasileiro foi feita por Gustavo D'utra no Estado da Bahia em 1882 (D'utra, 1882), a partir desse ponto, outros estudos foram feitos em diferentes pontos do país, contribuindo para o estabelecimento da cultura da soja no Brasil.

O cultivo da soja obteve grande sucesso no país graças a condições climáticas e logísticas favoráveis, incluindo a fácil adaptação das variedades e técnicas de cultivo vindas do sul dos Estados Unidos. Além disso, fatores como o uso da soja em sucessão ao trigo, que permitiu o aproveitamento da mesma área, máquinas, equipamentos, armazéns e mão de obra, contribuíram significativamente.

A política de autossuficiência do trigo possibilitou maior capitalização dos produtores, enquanto a viabilidade de mecanização total da cultura reduziu custos e aumentou a eficiência. Condições de mercado favoráveis, especialmente no cenário externo, e a demanda por óleos vegetais comestíveis como substitutos à gordura animal impulsionaram ainda mais o cultivo. Por fim, o rápido desenvolvimento do parque de processamento garantiu a absorção integral da matéria-prima, consolidando o sucesso da cultura no país (Bonato, 1987).

Hoje o Brasil é o maior produtor mundial de soja, seguido pelos Estados Unidos e Argentina. Na safra 2022/2023, a cultura ocupou uma área de 44.062,6 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 154.566,3 milhões de toneladas, tendo o Mato Grosso como o maior produtor brasileiro de soja. A produtividade média da soja brasileira foi de 3.508 kg/há (Embrapa, 2024).

2.3 RACHIPLUSIA NU

Rachiplusia nu (Guenee) (Figura 1) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como “falsa-medideira,” é uma espécie de lagarta amplamente distribuída em países da América do Sul, incluindo Brasil, Bolívia, Argentina, Chile e Uruguai. Com hábito alimentar polífago, essa lagarta se alimenta de diversas culturas, causando desfolha em plantas como soja (*Glycine max L.*), girassol (*Helianthus annuus L.*), milho (*Zea mays L.*), trigo (*Triticum sp L.*) e alfafa (*Medicago sativa L.*) (Aragón et al., 1997). Assim, polifagia pode criar refúgios para a praga, onde as técnicas de controle não são aplicadas, facilitando a disseminação das populações (Koppert, 2025).

R. nu tem por característica ovos arredondados e de tamanhos que podem chegar à 0,50 mm de diâmetro e 0,34 mm de altura (Angulo et al., 2008), com coloração amarelada brilhante após a oviposição e que escurecem até a eclosão das larvas (Rolim et al., 2013).

Enquanto lagarta, é eruciforme com coloração esverdeada nos segmentos torácicos e abdominais, com a presença de três filetes transversais de coloração verde-escuro, seguidos por uma linha esbranquiçada, sendo um localizado na região lateral, acima dos espiráculos, e dois na área dorsal. Seus pseudópodes possuem coloração castanha, com áreas de maior esclerotinização em um tom castanho-escuro. No último instar, as lagartas atingem, em média, 22,79 mm de comprimento, valor superior aos 21,00 mm registrados no quinto instar e inferior aos 24,00 mm observados no sexto instar (Barrionuevo, 2011).

O primeiro instar larvar de *R. nu* se alimenta do parênquima foliar sem danificar as nervuras foliares, e durante o quinto instar lavar é que ocorre o período de maior atividade (Luna, 1999). Associado com os primeiros instares larvares de *R. nu*, há também a presença de uma comunidade numerosa de parasitas, como *Campoletis sonorensis* e *Casinaría plusiaeque*, que ajudam a manter a comunidade de lagartas sob um controle e abaixo de níveis críticos de prejuízo econômico (De Moraes, 1991). Quando a população de *R. nu* atinge níveis capazes de causar prejuízos econômicos significativos, o uso de defensivos agrícolas é uma prática comum para controlar essa praga. No entanto, a aplicação inadequada desses compostos pode impactar negativamente as populações de inimigos naturais, como fungos e parasitoides, além de afetar outras plantas, peixes e anfíbios no ambiente. (Schneider et al., 2003; Rimoldi et al., 2008; Ronco et al., 2008).

Figura 1: Lagarta de *Rachiplusia nu*.



Fonte: Da Silva. B A, 2024.

A identificação de lagartas da subfamília Plusiinae em campo é desafiadora devido à ausência de critérios claros para diferenciá-las. Na maioria dos casos, a identificação precisa só é possível por meio da obtenção de adultos a partir das lagartas coletadas (Specht et al., 2006). Essa dificuldade pode comprometer as estratégias de manejo e controle, já que as lagartas frequentemente são confundidas com larvas de *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]). Segundo Rolim et al. (2013), as duas espécies são morfologicamente indistinguíveis, além de poderem ser confundidas com outros Plusiinae menos comuns.

Desde 2021, foram registrados danos causados por *R. nu* em soja geneticamente modificada com o gene *cry1Ac* de *B. thuringiensis* (Reis, 2024). Esses danos são atribuídos às lagartas neonatas resistentes à toxina Cry1Ac, que se desenvolvem em adultos férteis capazes de disseminar o gene de resistência, originado por mutação autossômica recessiva. Essa resistência tem sido associada à ausência de áreas de plantio de refúgio, uma técnica essencial para o Manejo da Resistência a Insetos (MRI). O MRI é uma estratégia crucial para retardar a evolução da resistência em pragas como *R. nu* e outras lagartas em cultivos de soja Bt (Bernardi, 2016).

As áreas de refúgio desempenham um papel importante ao promoverem o cruzamento de indivíduos resistentes com suscetíveis, contribuindo para o controle da

resistência (Irac, 2022). Durante a safra 2020/21, coletas realizadas em regiões produtoras confirmaram a presença de resistência nos estados do Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (Nardon et al., 2021). Embora essa resistência tenha sido identificada na tecnologia de primeira geração, que expressa apenas a toxina Cry1Ac, a tecnologia de segunda geração, com múltiplas proteínas inseticidas (Cry1Ac, Cry1A.105 e Cry2Ab2), ainda demonstra eficiência no controle de *R. nu* (Bueno; Sosa-Gómez, 2021).

Dado que a soja é uma cultura de grande relevância para a economia mundial, com Argentina, Brasil e Paraguai sendo responsáveis por mais da metade da produção global (USDA, 2024), é essencial desenvolver novas estratégias de controle para pragas como *R. nu*. O uso integrado de diferentes abordagens de manejo pode ajudar a prevenir a resistência às plantas transgênicas atualmente em uso. Além disso, a identificação de novas toxinas com atividade inseticida contra essa praga é uma medida promissora para mitigar o surgimento de resistência.

2.4 *BACILLUS THURINGIENSIS*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia facultativa, pertencente ao filo Firmicutes. Ela apresenta forma de bastonete e possui a capacidade de formar endósporos, uma característica que lhe confere resistência em condições ambientais adversas. Uma de suas peculiaridades fisiológicas é a produção de cristais proteicos paraesporais, compostos principalmente por proteínas tóxicas denominadas δ -endotoxinas ou toxinas Cry, que possuem atividade inseticida (Schnepf et al., 1998).

A primeira identificação de *B. thuringiensis* ocorreu em 1901 pelo cientista japonês Shigetane Ishiwata, que isolou a bactéria de larvas de bicho-da-seda mortas por uma doença. Posteriormente, em 1911, o bacteriologista alemão Ernst Berliner também descreveu a espécie ao isolá-la de larvas de traças da farinha (*Ephestia kuehniella*), nomeando-a em homenagem à província de Thuringia, na Alemanha, onde realizou suas pesquisas (Berliner, 1911).

Na natureza, *B. thuringiensis* é amplamente distribuída em diferentes habitats, como solo, água, plantas e em intestinos de insetos. Essa ubiquidade garante um alto sucesso evolutivo, garantindo também que a bactéria possa desempenhar um importante papel ecológico no controle de populações de insetos-praga (Glare; O'Callaghan, 2000).

A aplicação mais notável de *B. thuringiensis* está na agricultura, onde suas toxinas são amplamente utilizadas como bioinseticidas. Os cristais de proteínas Cry produzidos pela bactéria são tóxicos para uma variedade de insetos pragas, incluindo os das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Essas toxinas atuam de forma específica: ao serem ingeridas pelo inseto, os cristais são solubilizados no ambiente alcalino do trato digestivo, liberando pré toxinas que são convertidas em formas tóxicas que se ligam a receptores específicos como aminopeptidases N (APN), cadherinas específicas e glicosilfosfatidilinositol-ancoradas. Isso leva à formação de poros na membrana celular, causando lise celular, paralisia intestinal e, por fim, a morte do inseto (Bravo et al., 2007).

Apesar de seus benefícios, o uso extensivo de toxinas Cry em culturas Bt tem levantado preocupações sobre o desenvolvimento de resistência em populações de insetos pragas. Estratégias como o manejo integrado de pragas (MIP), a implementação de áreas de refúgio e a busca por novas toxinas com diferentes modos de ação são fundamentais para garantir a eficácia contínua do Bt como ferramenta de controle biológico (Tabashnik et al., 2009).

2.4.1 PROTEÍNAS CRY

As proteínas Cry, produzidas por *B. thuringiensis*, são toxinas que compõem cristais e são amplamente utilizadas no controle biológico de pragas agrícolas. Essas proteínas atuam como agentes inseticidas altamente específicos, direcionados a determinados grupos de insetos. Inicialmente sintetizadas como protoxinas, elas precisam ser ativadas para exercerem seu efeito tóxico. A ativação ocorre no intestino médio alcalino dos insetos, onde enzimas proteolíticas convertem as protoxinas em formas ativas (Bravo; Gill; Soberón, 2007). Após a ativação, as proteínas Cry se ligam a receptores específicos presentes na membrana epitelial do intestino, como aminopeptidases N (APN), enzimas presentes na borda em escova do epitélio intestinal, proteínas cadherinas e proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), incluindo proteínas alcalinas. Além disso, algumas toxinas reconhecem estruturas específicas de carboidratos, como manose e N-acetilgalactosamina, presentes nesses receptores, o que confere alta seletividade e especificidade às toxinas Cry. (Pigott; Ellar, 2007).

A interação entre as toxinas Cry e esses receptores desencadeia mudanças conformacionais que resultam na formação de poros na membrana celular do epitélio

intestinal. Esses poros desregulam o equilíbrio osmótico, causando lise celular e destruição do epitélio intestinal. Como consequência, os insetos param de se alimentar, sofrem septicemia e morrem em poucos dias (Vachon; Laprade; Schwarz, 2012). A especificidade das toxinas Cry decorre da interação precisa com os receptores intestinais, o que garante sua eficiência contra pragas-alvo e minimiza impactos sobre organismos não-alvo (Soberón; Pérez; Bravo, 2019).

A aplicação das proteínas Cry na agricultura é ampla. Elas são empregadas tanto na formulação de bioinseticidas quanto no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs). Entre os OGMs mais conhecidos estão as culturas Bt, como soja, milho e algodão transgênicos, sendo um exemplo recente a utilização da soja *Intacta* e *Intacta 2 XTEND* pela Embrapa (Embrapa, 2024). Essas plantas oferecem vantagens significativas, como a redução do uso de inseticidas químicos, aumento da produtividade e proteção ambiental (James, 2017). Além disso, bioinseticidas baseados em *B. thuringiensis* são utilizados em programas de manejo integrado de pragas, especialmente em sistemas agrícolas sustentáveis (Jurat-Fuentes; Crickmore, 2016).

A inovação no uso das toxinas Cry continua a evoluir, com o desenvolvimento de proteínas piramidais que combinam múltiplas toxinas para superar a resistência em populações de insetos. Essa abordagem tem sido essencial para garantir a sustentabilidade das culturas Bt e prolongar a eficácia das toxinas Cry (Vachon; Laprade; Schwarz, 2012). Ademais, a identificação de novas toxinas Cry com diferentes modos de ação expande as possibilidades de controle de pragas e melhora a gestão da resistência.

2.4.2 PROTEÍNAS VIP

As proteínas Vip (Vegetative Insecticidal Proteins) são toxinas produzidas por alguns isolados de *B. thuringiensis* (Bt) durante sua fase vegetativa de crescimento. Elas apresentam características inseticidas distintas das proteínas Cry, tornando-se uma alternativa importante para o controle de pragas resistentes às toxinas Cry. As proteínas Vip possuem ação tóxica principalmente contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, dependendo de sua classe (VIP1, VIP2 ou VIP3) (Lee et al., 2003).

Entre as classes de proteínas Vip, as Vip3A são as mais estudadas devido à sua alta eficiência contra importantes pragas de Lepidoptera. Ao contrário das

proteínas Cry, as Vip3A não formam cristais e são secretadas diretamente no meio de cultivo pela bactéria durante sua fase vegetativa. Assim como as proteínas Cry, as Vip3A necessitam ser ativadas no intestino dos insetos. Após a ingestão, enzimas proteolíticas no intestino médio processam as protoxinas Vip3A, liberando uma forma ativa que se liga a receptores específicos presentes na membrana epitelial intestinal (Palma et al., 2014).

A ligação da Vip3A a seus receptores causa ruptura das células epiteliais devido à formação de poros na membrana celular, levando à desorganização do intestino, interrupção na alimentação e eventual morte do inseto. Estudos mostram que os receptores da Vip3A são distintos daqueles das proteínas Cry, o que permite seu uso complementar no controle de pragas resistentes a Cry (Soberón; Bravo, 2019).

As proteínas Vip têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de culturas transgênicas resistentes a pragas. Plantas geneticamente modificadas (OGMs), como milho e algodão, expressam genes *vip3A*, oferecendo proteção contra importantes pragas de Lepidoptera. A inclusão de proteínas Vip em combinações piramidais com toxinas Cry tem se mostrado eficaz na gestão da resistência de pragas, pois reduz a pressão seletiva sobre cada toxina individual (Chakraborty et al., 2016).

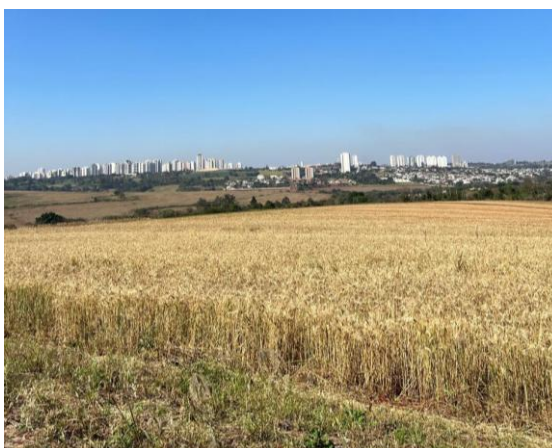
Além disso, o uso de Vip em bioinseticidas também vem sendo explorado, ampliando as opções para o manejo sustentável de pragas. Estudos continuam a investigar novos mecanismos de ação e ampliar a gama de insetos-alvo, reforçando a relevância das proteínas Vip na agricultura moderna (Lee et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DE NOVOS ISOLADOS

Para a prospecção de novos isolados de *B. thuringiensis*, foram realizadas coletas de solo basáltico na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (FAZESC), localizada nas coordenadas -23.34024638070184, -51.20958979217644 (Figura 2). O solo coletado provinha de uma área previamente utilizada para o cultivo de milho, sucedendo uma lavoura de algodão. As coletas foram organizadas em um grid de 10 x 10 metros, assegurando a representatividade espacial da área amostrada.

Figura 2: FAZESC.



Fonte: Próprio autor, 2024

Foram utilizados 15 tubos Falcon de 50 mL, esterilizados previamente em autoclave, para a coleta e armazenamento das amostras. Em cada tubo, foi adicionado um volume de aproximadamente 15 mL de solo descompactado, retirado a uma profundidade de 5 cm da superfície. Após a coleta, os tubos contendo as amostras foram imediatamente armazenados em refrigerador, em temperatura inferior a 5°C, para garantir a preservação das características do solo até a realização das análises.

Para o isolamento dos isolados de interesse, 1 g de solo foi pesado em balança de precisão e transferido para um novo tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de solução salina 0,85% esterilizada. A mistura foi agitada em vórtex por 15 minutos para garantir a homogeneização. Em seguida, 1,5 mL da solução homogênea foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 2 mL, seguindo-se tratamento térmico em banho-Maria a 80°C por 20 minutos e imediato de resfriamento em água a 0°C por 5 minutos. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a diluições seriadas em água destilada esterilizada até a diluição 10^{-7} .

Por fim, as amostras diluídas foram semeadas em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido NYSM (caldo nutritivo, extrato de levedura, KH_2PO_4 e solução

de sais), conforme descrito por Yousten (1984). As placas foram incubadas em ambiente controlado a 30°C por 5 dias para permitir o desenvolvimento e esporulação das colônias bacterianas.

Após o período de incubação, lâminas foram preparadas a partir das colônias isoladas e coradas utilizando os corantes fucsina (1 g de fucsina básica, 8 mL de fenol, 20 mL de álcool absoluto e 200 mL de água destilada) e amido-black (20 mg de Amido Black 10B, 20 g de ácido cítrico, 1000 mL de água destilada). Essas lâminas foram posteriormente analisadas por microscopia óptica, com o objetivo de identificar a presença de esporos e cristais, característica típica de isolados de *B. thuringiensis*. Essa etapa foi essencial para garantir a pureza e a especificidade dos isolados para futuros estudos.

3.2 PRODUÇÃO DO INÓCULO DE *BACILLUS THURINGIENSIS*

O inóculo foi preparado utilizando alças descartáveis para inoculação em frascos Erlenmeyer de 250ml, contendo 25 mL do meio líquido NYSM. As culturas foram incubadas em agitador orbital, a 120 rpm, a temperatura controlada de 30 ± 2°C, por um período de 72 horas.

Após o período de incubação, as culturas foram analisadas por microscopia óptica para verificar a presença de esporos, cristais proteicos e possíveis contaminantes. Apenas as culturas que apresentaram esporulação completa e estavam livres de contaminação foram selecionadas para as etapas subsequentes. Essas culturas foram transferidas para tubos Falcon de 50 mL e submetidas à centrifugação em centrífuga de rotor fixo (modelo T23 - JANETZKI) por 30 minutos a 6.000 × g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e o pellet obtido foi congelado a -20°C em freezer comum.

Após o congelamento completo, o pellet foi submetido ao processo de liofilização a -58°C (modelo L101 - LIOBRAS) por 24 horas. O material liofilizado foi, então, armazenado em temperatura ambiente, em condições protegidas da luz, para preservação até seu uso posterior.

3.3 DIETA ARTIFICIAL

A manutenção da criação de *R. nu* foi mantida em dieta artificial proposta no modelo de Greene et al. (1976), a qual apresenta perfil nutricional ajustado para se

assemelhar à composição nutricional de folhas de soja (Tabela 1). Essa dieta garante o fornecimento adequado de proteínas, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais indispensáveis para desenvolvimento uniforme e ausente de infecções dos primeiros instares larvais. Os componentes foram homogeneizados e fervidos por 20 minutos. Em seguida, a dieta foi vertida em caixas tipo Gerbox (11 cm x 11 cm x 3 cm), as quais foram armazenadas em refrigerador a 8°C. Para a manutenção da criação, a dieta foi suplementada com formaldeído, antifúngico (Nipagin) e antibiótico. No entanto, para os bioensaios, a dieta foi utilizada sem a adição desses componentes.

Tabela 1: Dieta para lagartas de *Rachiplusia nu*

Composição	Quantidade
Feijão	125 g
Gérmen de trigo	100 g
Proteína de soja	50 g
Caseína	37,5 g
Levedura	62,5 g
Ágar	32,5 g
Ácido ascórbico	6 mL
Ácido sórbico	3 mL
Vitamina	12,5 mL
Água destilada	1700 mL
Formaldeído	7,5 mL
Nipagin	5,75 mL
Antibiótico	0,625 g

3.4 BIOENSAIOS

3.4.1 Bioensaios de patogenicidade

Os bioensaios de patogenicidade foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja, localizado no distrito de Warta. O objetivo foi identificar isolados de *B. thuringiensis* (Bt) com capacidade entomopatogênica contra lagartas de

R. nu, considerando uma taxa de mortalidade superior a 90%. Para isso, os materiais liofilizados foram pesados em 20 mg e diluídos em 100 mL de água destilada. Após uma homogeneização de 1 hora em agitador magnético, 50 µL da suspensão bacteriana foram aplicados sobre blocos de dieta artificial medindo aproximadamente 10 x 03 x 05 mm, previamente distribuídos em bandejas com 32 células.

Cada célula recebeu uma lagarta neonatal de *R. nu*, que foi mantida isolada e coberta por tampas de acrílico para evitar contaminação e a interferência de interações entre indivíduos. Três repetições foram realizadas, totalizando 16 subamostras por repetição, enquanto grupos controle foram mantidos sem a aplicação da suspensão bacteriana. Após a absorção completa da solução pela dieta, as bandejas foram armazenadas em câmara climatizada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As avaliações de mortalidade iniciaram 24 horas após o início do experimento e foram realizadas diariamente por um período de sete dias. No quarto dia, a dieta foi substituída por uma livre de bactérias, garantindo melhores condições para a continuidade do ensaio e posterior leitura no sétimo dia.

3.4.1 Bioensaios de virulência

O isolado selecionado nos bioensaios de patogenicidade foi submetido a testes de virulência para determinar as concentrações letais (CL50 e CL95) de esporos e cristais necessários para controlar a população de *R. nu*. Uma suspensão inicial, denominada solução A, foi produzida dissolvendo 20 mg do material em 100 mL de água destilada. Em seguida, seis diluições seriadas foram preparadas a partir da suspensão A, denominadas pelas letras B a G. Para tanto, 50 mL da suspensão A foram diluídos em 50 mL de água destilada, gerando a suspensão B, e assim sucessivamente até alcançar a última concentração (G), com os valores variando de 200 ppm a 3,125 ppm.

Cada bioensaio foi conduzido com três repetições por diluição, totalizando 16 subamostras por repetição, enquanto grupos controle foram mantidos sem a adição da solução bacteriana. As suspensões bacterianas foram aplicadas em blocos de dieta artificial, e após a completa absorção do líquido, as lagartas neonatas foram individualmente colocadas nas células das bandejas. As bandejas foram mantidas em

câmaras climatizadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com a mortalidade avaliada diariamente durante sete dias (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações de esporos e cristais de isolados de *B. thuringiensis* avaliados nos bioensaios de virulência.

Diluição	Concentração (ppm)
A	200
B	100
C	50
D	25
E	12,5
F	6,25
G	3,125

Os dados de mortalidade foram analisados utilizando o programa Polo Plus – Probit and Logit Analysis (Finney, 1971), permitindo a estimativa das concentrações letais CL_{50} e CL_{95} .

3.5 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS

A quantificação dos esporos presentes no material liofilizado utilizado nos bioensaios foi realizada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas de Petri contendo meio NYSM. Inicialmente, foi preparada uma solução-mãe diluindo 20 mg do material liofilizado em 100 mL de água destilada, nas mesmas condições utilizadas nos bioensaios. Em seguida, 100 μL dessa solução foram diluídos em 900 μL de solução salina a 0,85%, formando a diluição inicial (10^{-1}). Esse processo foi repetido sequencialmente até atingir a diluição final de 10^{-5} .

Para a contagem, foi utilizado o método de gotejamento em placa, com 10 μL de cada diluição aplicados em quatro repetições por placa. Após a incubação das placas a temperatura ambiente por 16 horas, as colônias formadas foram contadas, e a média dos valores obtidos nas quatro réplicas foi calculada. Esses resultados foram então multiplicados pelas diluições, permitindo estimar a quantidade total de esporos por grama do material liofilizado.

3.6 EXTRAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO DNA

A extração do DNA total, montagem das bibliotecas e sequenciamento do genoma do isolado BR07 foi realizada pela empresa IPEC (Instituto para Pesquisa do Câncer) de Guarapuava, através da plataforma Illumina Hiseq/Miseq.

3.6.1 Identificação de genes *cry* e *vip*

A sequência do genoma do isolado BR07 de *B. thuringiensis* foi comparada com sequências depositadas no banco de dados *Bacterial Pesticidal Protein Resource Center* (BPPRC) (<https://www.bpprc.org/>), acessado em 28 de janeiro de 2025. Esse banco é associado ao *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) e ao *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), contendo informações detalhadas sobre proteínas de *B. thuringiensis* com atividade entomopatogênica.

Utilizando a ferramenta *tblastp*, disponível no site do NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Translations&PROGRAM=tblastn&BLAST_PROGRAMS=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&DATABASE=n/a&QUERY=&SUBJECTS=), também acessada na mesma data, foi possível comparar as sequências de aminoácidos das proteínas do isolado com as sequências de nucleotídeos dos plasmídios, identificando genes relacionados à produção de proteínas tóxicas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTOS

Foram obtidos vinte e oito isolados de bactérias com morfologia compatível

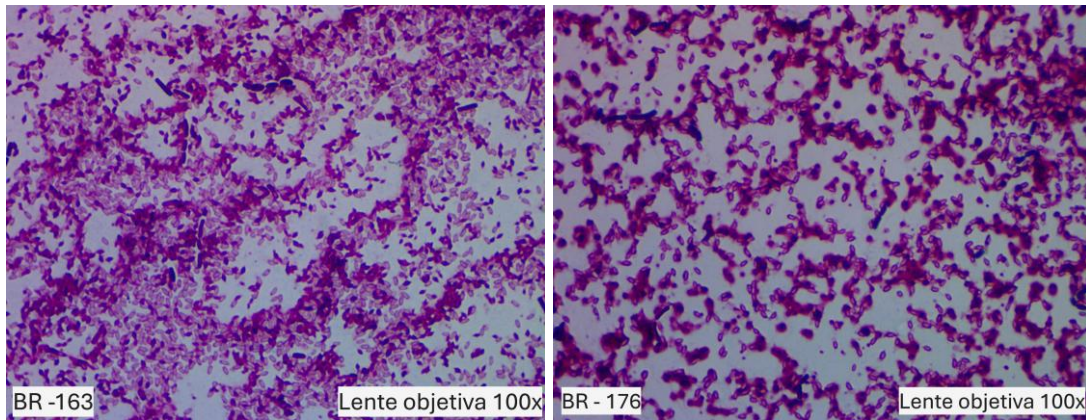
com o gênero *Bacillus* a partir de 4 amostras de solo e numerados de 1 a 28. Dentre esses, dezoito isolados foram selecionados com base na análise dos cristais proteicos característicos de *B. thuringiensis* e na morfologia das colônias, por fim, foram estocados no banco de bactérias do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias (UEL) para o uso em futuros testes de bioensaios, e numerados de BR163 a BR180 conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Distribuição dos 18 isolados de *B. thuringiensis* obtidos a partir de 4 coletas distintas de solo e sua identificação após estoque.

Amostra de Solo	Numeração	Isolado
1	9	BR163
	8	BR164
2	10	BR165
	11	BR166
3	12	BR167
	13	BR168
	15	BR169
	16	BR170
	17	BR171
	18	BR172
	20	BR173
4	21	BR174
	22	BR175
	24	BR176
	25	BR177
	26	BR178
	27	BR179
	28	BR180

A seleção considerou a distinção entre os isolados, evitando a redundância de linhagens morfologicamente semelhantes, com variações observáveis no formato e tamanho dos cristais proteicos, como também sua abundância na colônia em relação às células vegetativas e esporos de Bt (Figura 3).

Figura 3: Microscopia óptica de isolados de *B. thuringiensis* obtidos a partir de amostras de solo coletadas na Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina.



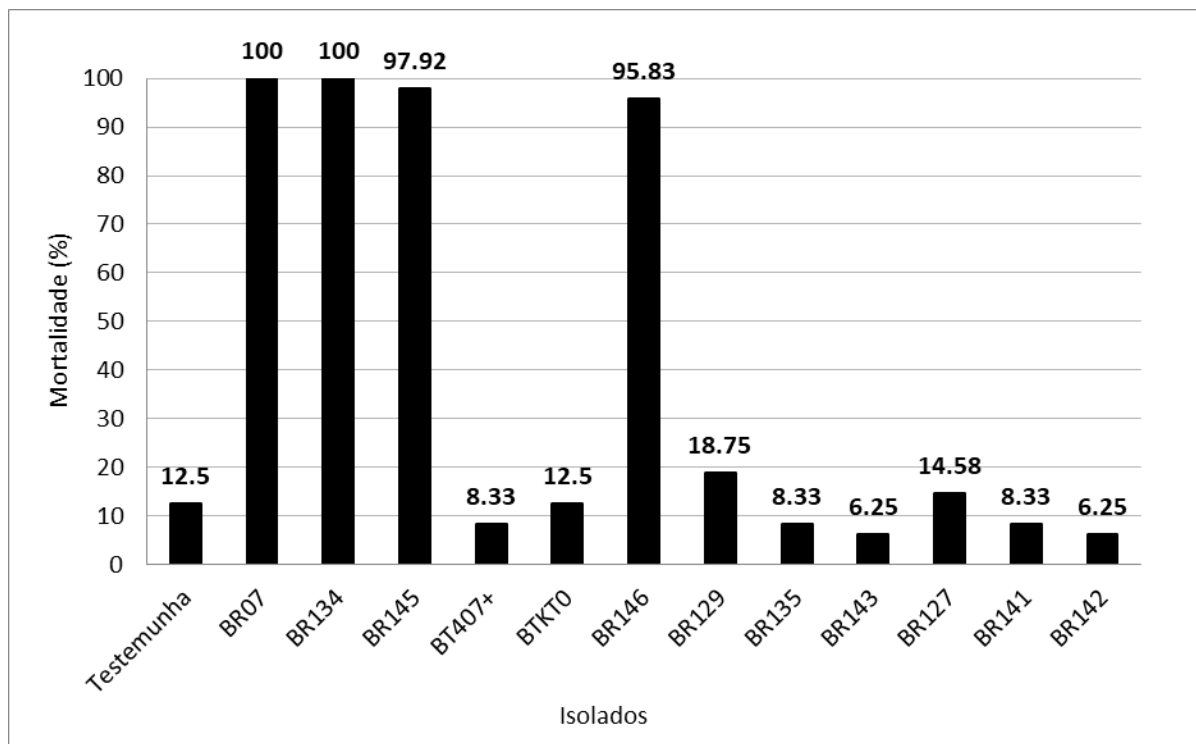
Fonte: Próprio autor, 2025

A obtenção de novos isolados de *B. thuringiensis* é fundamental, pois amplia o espectro de ação dos bioinseticidas, permitindo o controle de uma variedade maior de pragas agrícolas. Esses isolados podem ser utilizados em futuros experimentos na avaliação da atividade entomopatogênica contra diferentes pragas. No entanto, testes são necessários para verificar sua eficácia no controle de insetos-alvo.

4.1 BIOENSAIOS

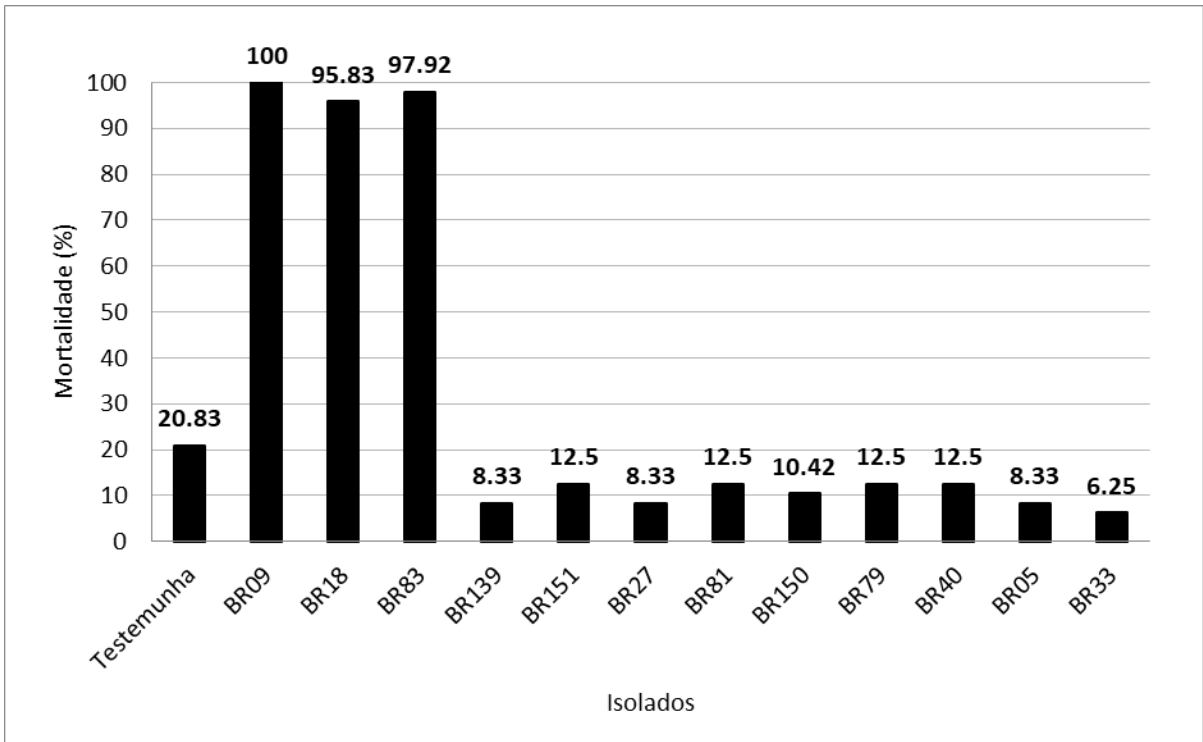
Os bioensaios de patogenicidade foram realizados com 24 isolados *B. thuringiensis*, excluindo aqueles obtidos através da Tabela 3, os quais foram divididos em dois lotes com 12 isolados cada um, para facilitar a montagem e avaliação dos resultados dos experimentos. Entre os isolados avaliados no primeiro de bioensaios, os isolados BR07, BR134, BR145 e BR146 tiveram destaque, provocando alto índice de mortalidade nas lagartas de *R. nu*. Os isolados BR07 e BR134 demonstraram 100% de mortalidade, resultando na morte de todas as 48 lagartas testadas. O isolado BR145 apresentou uma taxa de mortalidade de 97,92%, enquanto a BR146 alcançou 95,83%, com a morte de 46 das 48 lagartas utilizadas. Os demais isolados não exibiram atividade entomopatogênica significativa contra essa espécie, apresentando taxas de mortalidade entre 6,25% e 18,75%. (Gráfico 1).

Gráfico 1: Dados de mortalidade de lagartas de *Rachiplusia nu* após a primeira etapa de bioensaios com dose única de isolados de *B. thuringiensis*.



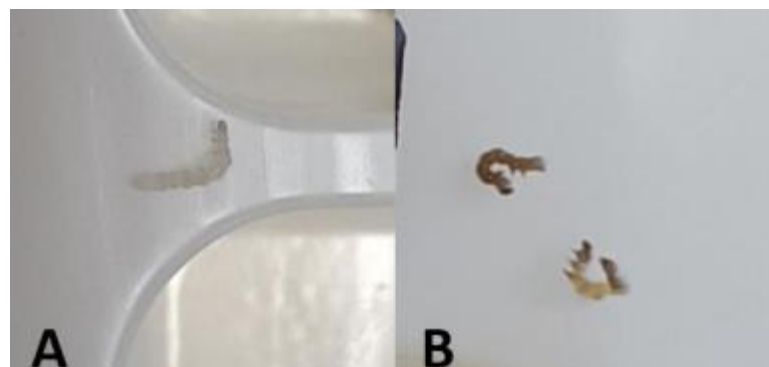
No segundo lote de bioensaios de patogenicidade frente a lagartas de *R.nu*, os isolados Bt BR09, BR18 e BR83 provocaram alta mortalidade de lagartas, variando de 95,83% a 100% dos indivíduos testados. O restante dos isolados testados não apresentou taxa de mortalidade significativa a ser considerada, variando de 6,25% a 20,83% (grupo controle) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Dados de mortalidade de lagartas de *Rachiplusia nu* após a segunda etapa de bioensaios com dose única de isolados de *B. thuringiensis*.



A comparação entre lagartas infectadas e saudáveis revelou sinais claros de infecção bacteriana. Enquanto as lagartas saudáveis mantiveram a coloração verde-clara característica, as infectadas apresentaram mudanças evidentes na coloração, tornando-se marrom, fosca e sem brilho. Além disso, as lagartas infectadas demonstraram sinais claros de susceptibilidade, como menor agilidade, com movimentos reduzidos e respostas pouco reativas ao toque, em contraste com as saudáveis, que reagiram de forma mais vigorosa aos estímulos. Alguns desses sinais, já relatados por Silva e Carvalho (2004), estão representados na Figura 4, destacando as diferenças visuais e comportamentais entre os dois grupos.

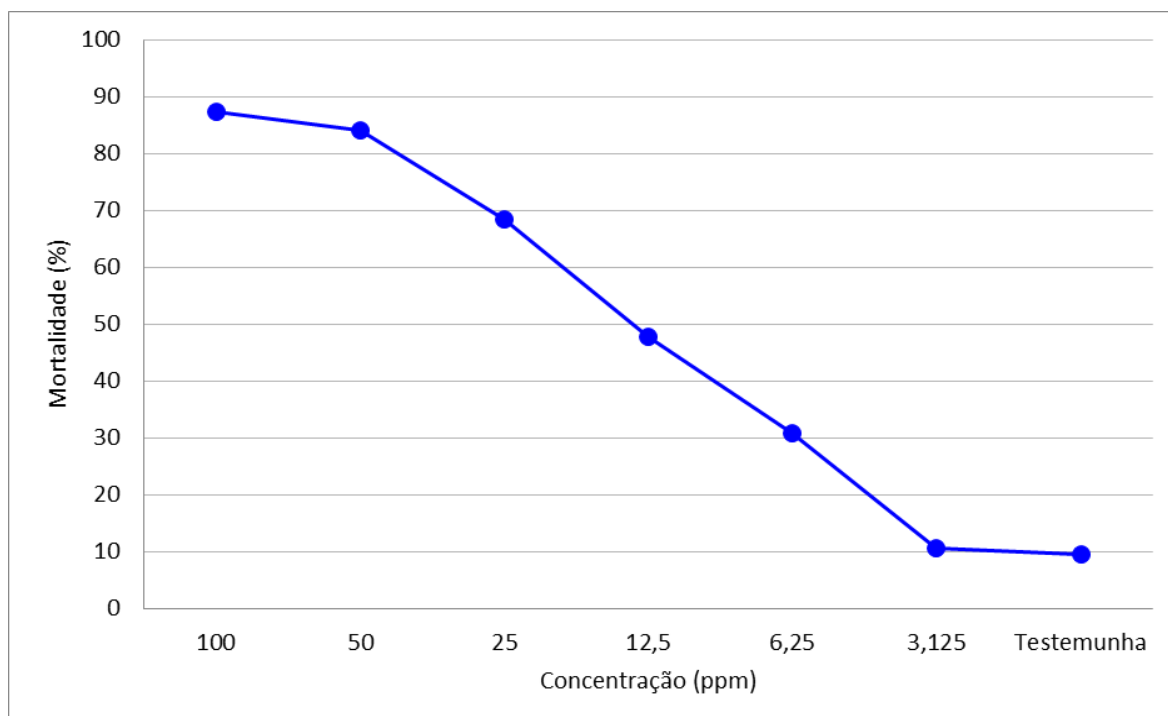
Figura 4: Lagartas de *Rachiplusia nu* após de sete dias de incubação com dieta contendo esporos e cristais de *B. thuringiensis* BR09. (A) Lagartas sadias (B) Lagartas infectadas.



Fonte: Eduarda Andrade Lima.

Desde que na primeira etapa de bioensaios três isolados provocaram 100% de mortalidade das lagartas de *R. nu* utilizando a concentração de 200 ppm (Gráficos 1 e 2), um desses isolados foi escolhido para ser utilizado na segunda etapa de bioensaios, com o objetivo de determinar os valores de CL50 e CL95. Nessa etapa, considerando que o uso da concentração 200 ppm provocou 100% de mortalidade, os testes foram feitos a partir da concentração de 100 ppm, tendo sido produzidas diluições sucessivas até a obtenção da concentração de 3,125 ppm (conforme item 3.4.1). Os dados apresentados no gráfico 3 evidenciam que, à medida que as concentrações iniciais passaram por diluições seriadas, houve uma redução gradativa na mortalidade, confirmando a relação entre a concentração de esporos e cristais do isolado BR07 e toxicidade contra as lagartas de *R. nu*.

Gráfico 3: Dados de mortalidade de larvas de *Rachiplusia nu* em bioensaio com diferentes concentrações de esporos e cristais de *B. thuringiensis* BR07.



As concentrações letais CL50 e CL95 foram estimadas com base na análise dos dados de toxicidade onde foram aplicados os modelos Probit e Logit. A Tabela 3

apresenta os resultados da determinação da concentração letal CL50 e CL95 para o isolado BR07.

Tabela 3: Concentrações letais médias de *B. thuringiensis* BR07 em ensaios com lagartas neonatas de *Rachiplusia nu* e parâmetros resultantes da análise probit.

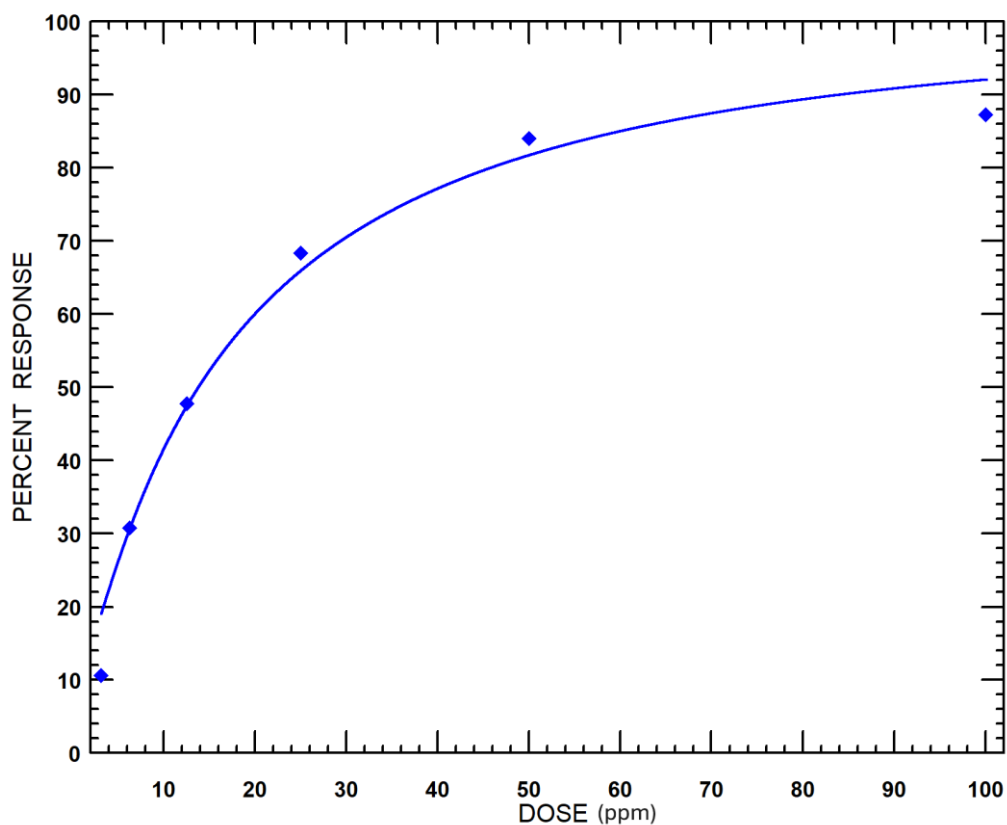
	N¹	Valor estimado (ppm)	X²	Graus de liberdade	Desvio padrão	Limites de confiança 0,95
CL50	95	16,370	4,8266	4	0,026	11,08 - 22,59
CL95	95	168,327	4,3157	4	0,026	96,14 - 458,19

¹ Número de insetos

Os dados obtidos a partir do isolado BR07 se assemelham aqueles obtidos também com o isolado BR09 (Silva et al., 2024) e evidenciam a toxicidade de ambos os isolados contra as lagartas de *R. nu*. O Gráfico 4 relaciona a mortalidade de *R. nu* com diferentes concentrações de esporos e cristais de *B. thuringiensis*, expressas em partes por milhão, revelando uma curva em escala logarítmica. Essa curva evidencia que o aumento das concentrações resulta em uma maior taxa de mortalidade das larvas, até atingir um limite máximo significativo. O valor de CL50, determinado em 16,370 ppm, representa a concentração necessária para provocar mortalidade em 50% da população de larvas. Já a CL95, estimada em 168,327 ppm, corresponde à dose capaz de eliminar 95% das larvas testadas.

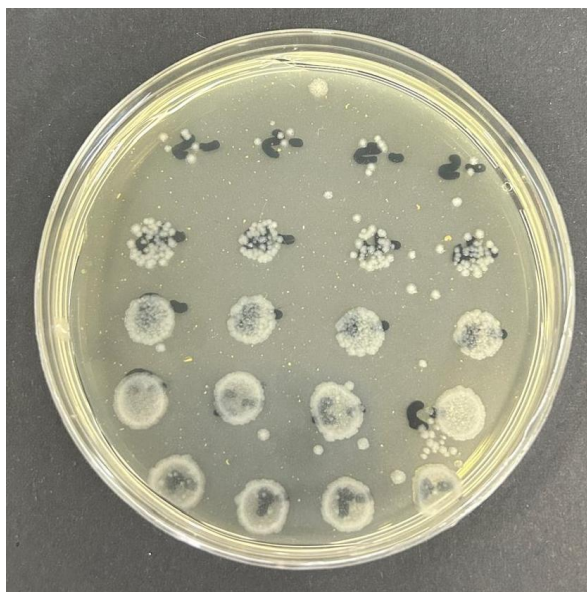
Apesar dos resultados observados, ainda não existem registros na literatura que definam as concentrações ideais de esporos e cristais de *B. thuringiensis* para o controle de *R. nu*. Estudos anteriores, entretanto, relataram doses consideravelmente diferentes ao avaliar outros isolados do microrganismo, o que reforça a necessidade de pesquisas adicionais para determinar as concentrações mais adequadas para o manejo dessa praga específica.

Gráfico 4. Curva dose-resposta - mortalidade de lagartas de *Rachiplusia nu* em função das concentrações de esporos e cristais de *B. thuringiensis* BR07.



Utilizando 20 mg do produto liofilizado diluídos inicialmente em 100 mL de água, seguiu-se uma série de diluições até atingir a concentração de 10^{-5} da linhagem BR07, o que permitiu estimar a quantidade de esporos associada aos valores de CL50 e CL95 (Figura 5).

Figura 5: Placa contendo a contagem de colônias da linhagem BR07



Fonte: Próprio autor, 2025

A contagem revelou que 1 g do material liofilizado contém cerca de 3×10^{11} esporos da linhagem BR07. Assim, com base em um valor de 16.370 ppm para a CL50, calcula-se que a suspensão utilizada para obter 50% de mortalidade nas lagartas de *R. nu* contenha aproximadamente 5×10^9 esporos. De forma análoga, para alcançar 95% de mortalidade—valor de 168.327 ppm—estimou-se a necessidade de 5×10^{10} esporos. Até o momento, há apenas um estudo na literatura que relata a contagem de esporos de *B. thuringiensis* empregada no controle de *R. nu*, estimados em 3×10^{11} esporos para CL50 e $1,5 \times 10^{12}$ esporos para CL95 (Silva et al., 2024).

4.2 SEQUENCIAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES *CRY* E *VIP*

O sequenciamento do genoma do isolado BR07 possibilitou uma análise do genótipo do mesmo, revelando os genes responsáveis pela produção das toxinas Cry e Vip. Por meio da ferramenta tblastp, foram identificados quatro genes *cry* (*cry1Aa*, *cry1Ia*, *cry2Aa* e *cry2Ab*) e um gene *vip* (*vip3Aa*), os quais codificam proteínas com ação tóxica contra insetos da ordem Lepidoptera (Vilas-Bôas, Peruca e Arantes, 2007). Conforme dados do banco de dados BRPC (2024) (https://www.bpprcdb.org/search_data_association/), as proteínas Cry1Aa e Cry2Ab estão associadas ao controle de *C. includens* e *Spodoptera frugiperda*, afetando, respectivamente, lagartas do primeiro e segundo instar. Enquanto a proteína Cry1Ia é relatada apenas para lagartas de *S. frugiperda*, a Cry2Aa possui ação bioinseticida contra lagartas de *C. includens*. Além disso, a proteína Vip3Aa demonstra eficácia contra lagartas de ambas as espécies, ressaltando o potencial do isolado BR09 para aplicações no manejo biológico de pragas.

Além disso, os genes identificados no isolado BR07 – *cry1Aa*, *cry1Ia*, *cry2Aa* e *cry2Ab* e *vip3Aa* – são semelhantes aos observados em um estudo preliminar que avaliou a ação entomopatogênica contra *R. nu* (Silva et al., 2024). Nesse experimento, os isolados demonstraram potencial no controle das lagartas neonatas, sugerindo que esse conjunto genético pode contribuir para a produção de cristais proteicos com atividade bioinseticida. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esses achados e esclarecer de forma mais detalhada o papel desses genes em estratégias de manejo biológico.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo identificou sete isolados de *B. thuringiensis* entre os 24 avaliados com potencial para o controle dos primeiros instares larvais de *R. nu*. Dentre estes, o isolado BR07 destacou-se, apresentando uma CL₅₀ de 16,370 ppm e uma CL₉₅ de 168,327 ppm, evidenciando sua eficácia no manejo dessa praga em estágios iniciais de desenvolvimento.

Além disso, os genes identificados no isolado BR07 – *cry1Aa*, *cry1Ia*, *cry2Aa*, *cry2Ab* e *vip3Aa* – demonstraram similaridade com aqueles observados em outro estudo preliminar. Essa correspondência indica que tais genes podem estar associados à produção de cristais proteicos com potencial entomopatogênico.

Continuamente, a busca por novos isolados de *B. thuringiensis* se mostra fundamental, pois sua diversidade genética pode ampliar as alternativas disponíveis para o manejo integrado de pragas, especialmente diante dos desafios impostos pelo desenvolvimento de resistência em populações de insetos.

Em resumo, o trabalho fornece bons indícios de que a abordagem empregada pode contribuir para aprimorar as estratégias de controle biológico de pragas, ressaltando a importância de investigações complementares em ambiente controlado e em campo para aprofundar esse conhecimento.

REFERÊNCIAS

- ANGULO, A. O.; OLIVARES, T.; WEIGER G. T. H. Estados inmaduros de Lepidópteros Noctuidos de importancia agrícola y forestal en Chile y claves para su identificación (Lepidoptera: Noctuidae). 3 ed. **Concepción: Universidad de Concepción**, 2008. 154p.
- ARAGÓN JR, Molinari A, Lorenzatti De Diez S. 1997. Manejo integrado de plagas. In: Giorda LM, Baigorri HEJ, editors. El Cultivo de la Soja en Argentina. **Coordinacion Subprograma Soja (INTA)**. Córdoba: Agro 4 de Co´rdoba, p. 247–308.
- BARTHOLOMEW, J. W.; MITTWER, T. The Gram Stain. **Bacteriological Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1–29, 1952.
- BERLINER, E. Über die schlaffsucht der mehlmotenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell.) und ihren erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für angewandte Entomologie**, v. 2, n. 1, p. 29-56, 1911.
- BERNARDI, Oderlei et al. Manejo da resistência de insetos a plantas Bt. Edição. PROMIP–Manejo Integrado de Pragas, Engenheiro Coelho, SP, Brasil, 2016.
- BONATO, Emidio Rizzo et al. A soja no Brasil: história e estatística. 1987.
- BRAVO, A. et al. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.
- BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Ocorrência de *Rachiplusia nu* e *Crociosema aporema* em soja-Bt na safra 20/21 e principais orientações de manejo aos produtores para a safra 21/22. **Nota Técnica**. Embrapa Soja. 6 p.
- CASTRO, B. G.; OLIVEIRA, M. S. Controle biológico no Brasil: desafios e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 48, n. 5, p. 1204-1212, 2022.
- CHAKROUBORTY, S.; MONDAL, M. H.; DUTTA, P. Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Protein for Resistance against Insect Pests: Potential and Future Directions. **Plant Biotechnology Reports**, v. 10, n. 2, p. 99-112, 2016.
- D 'UTRA, G. Soja. **Jornal do Agriculto r**, 4(168):185-6, 1882.
- DE MORAES, Rejane Rocha; LOECK, Alci Enimar; BELARMINO, Luiz Clóvis. Inimigos naturais de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) e de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 57-64, 1991.
- EMBRAPA**. Manejo Integrado de Pragas. Disponível em: <https://www.embrapa.br>. Acesso em: 19 jan. 2025.

FAO. Food Loss and Waste Database. Disponível em: <https://www.fao.org>. Acesso em: 19 jan. 2025.

FINNEY, D. Probits analysis. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1971. 80p.

GALZER, Elisângela; AZEVEDO FILHO, Wilson. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2016.

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

IBGE. Produção Agropecuária. 2023. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/>. Acesso em: 19 jan. 2025.

IRAC-BR. Importância da adoção de área de refúgio para o manejo de resistência de insetos. Disponível em: <https://www.illac-br.org/single-post/a-import%C3%A2nciada-ado%C3%A7%C3%A3o-de-%C3%A1rea-de-ref%C3%BAgio-para-o-manejo-daresist%C3%A2ncia-de-insetos>. Acesso em: 20 jan. 2025.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017. ISAAA Brief No. 53. Ithaca: ISAAA, 2017.

JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 1-10, 2016.

KOPPERT. **Lagarta do cartucho – Biocontrole, danos e ciclo de vida.** Disponível em: <https://www.koppert.com.br/pragas-de-plantas/lagartas/lagarta-do-cartucho/>. Acesso em: 26 fev. 2025.

LEE, M. K.; WALTON, L. M.; GOULD, F. Quantitative Genetics and Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Vegetative Insecticidal Proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 3, p. 227-232, 2003.

LOPES, A. M.; SILVA, J. L. Impacto do uso de defensivos agrícolas no meio ambiente e na saúde humana. **Revista Brasileira de Agricultura Sustentável**, v. 12, n. 2, p. 45-53, 2023.

LUNA MG, Sanchez NE. 1999. Parasitoid assemblages of soybean defoliator Lepidoptera, in north-western Buenos Aires province, Argentina. **Agricultural and Forest Entomology**, 1:255–260.

LUZ, P. M. C.; AZEVEDO FILHO, W. S.; SPECHT, Alexandre. Caracterização morfológica dos estágios imaturos de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) e lista de plantas hospedeiras. **Caderno Pesqui**, v. 26, p. 65-76, 2014.

MORSE, W.J. History of soybean production. In: MARKLEY, K. S. **Soybeans and soybean products**. New York: Interscience, 1950, p. 3-59.

NARDON, et al. Primeiro registro de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) sobrevivendo em soja Bt no Brasil. **Entomological Communications**, v. 3, ec03028, 2021. DOI: 10.37486/2675-1305.ec03028.

NEUMAIER, N.; NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Estádios de desenvolvimento da cultura da soja. In: BONATO, E. R. (Ed.). Estresses em soja. Passo Fundo: **Embrapa Trigo**, 2000, p. 19-44.

PALMA, L.; MUNOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PARRA, José Roberto Postali. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. **Editora Manole Ltda**, 2002.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PROBST, A.H. & JUDD, R. W. Origin, US history and development, and world distribution. In: CALDWELL, B. E. ed. **Soybeans; improvement, production and uses**. **Madison**: ASA, 1973, p. 1-15.

REIS, Alexandre C. et al. Genetic basis of resistance to Cry1Ac in *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae): inheritance mode, cross-resistance patterns and fitness cost. **Pest Management Science**, 2024.

RIMOLDI, F.; Schneider, M.I.; Ronco, A.E. 2008. Susceptibility of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) to conventional and biorational insecticides. **Environmental Entomology**, 37:1252–1257.

ROLIM, A. A. S. G.; SILVIA, YANO, S. A. C.; SPECHT, A.; ANDRADE, C. G. T. J.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Morphological and Molecular Characterization of the Eggs of Some Noctuid Species Associated with Soybean in Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbia, v. 106, n. 5, p. 643-651, 2013.

RONCO, A.E.; CARRIQUIRIBORDE, P.; NATALE, G.S.; MARTIN, M.L.; MUGNI, H.; BONETTO, C. 2008. Integrated approach for the assessment of biotech soybean pesticides impact on low order stream ecosystems of the Pampasic Region. In: Chen J, Guo C, editors. **Ecosystem Ecology Research**. New York: NOVA Science Publishers, p. 209–239.

SANTOS, B. PRAGAS DAS PLANTAS CULTIVADAS. A origem e a importância dos insetos como praga das plantas cultivadas. 2010. Disponível em: https://docs.ufpr.br/~parasito.florestal/arquivos/origem_praga.pdf. Acesso em: 19 jan. 2025.

SAVARY, S. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

SCHNEIDER, M.I.; SMAGGHE, G.; GOBBI, A.; VIN˘UELA, E. 2003. Toxicity and pharmacokinetics of seven novel insecticides on pupae of *Hyposoter didymator* (Hymenoptera: Ichneumonidae), a parasitoid of early larval instars of lepidopteran pests. **Journal of Economic Entomology**, 96:1054–1065.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SKENDŽIĆ, Sandra et al. The impact of climate change on agricultural insect pests. **Insects**, v. 12, n. 5, p. 440, 2021.

SILVA, B. A. SELEÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* COM TOXICIDADE PARA *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852). 2024. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (não publicado) – Bacharelado em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

SILVA, LKF da; CARVALHO, AG de. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1909) em lagartas de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera, Hesperidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 2, p. 249-252, 2004.

SOBERÓN, M.; PÉREZ, C.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* uses multiple mechanisms for toxic activity against insect pests. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 567-574, 2019.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 552-561, 2009.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, vol. 22, n.º.11, Rio de Janeiro, p. 2391-2399, Nov/2006.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARZ, J. L. Cry toxins: the mode of action, their current uses and future potential for insect control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 1-18, 2012.

VILAS-BÔAS, G. 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, n. 6, p. 673-687, 2007.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnological Processes**, New York, NY, v. 3, p. 315–343, 1984.