

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DO
NORDESTE BRASILEIRO E SUA ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA
LEPIDÓPTEROS PRAGAS

por

MARIA CLEONEIDE DA SILVA

(Sob Orientação do Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

RESUMO

O Nordeste tem sido pouco explorado na busca de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) para o controle de pragas agrícolas como *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Esta pesquisa objetivou primeiro isolar *B. thuringiensis* de amostras (solos e insetos) dos estados do Nordeste e avaliar a atividade destes isolados em larvas neonatas de *P. xylostella* e de *S. frugiperda*. Segundo, caracterizar a morfologia, bioquímica e o conteúdo genético de isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram atividades letais e subletais às pragas. A forma bipiramidal de cristal predominou em 31% dos isolados. Nos testes de patogenicidade, 13 e 20 isolados provocaram mortalidade >30% para *P. xylostella* e *S. frugiperda*, respectivamente, enquanto 24 e 52 isolados causaram respectivamente >30% de inibição do crescimento das larvas. As CL₅₀s e CE₅₀s de 12 isolados e dos padrões *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (*Bta*) foram estimadas para ambas as espécies. O isolado LIIT-4311 apresentou a menor CL₅₀ e CE₅₀ tanto para *P. xylostella* como para *S. frugiperda*. O padrão *Bta* apresentou a menor CL₅₀ para *P. xylostella*. Já o *Btk* foi 1,5 vezes menos tóxico do que o isolado LIIT-4311. Para *S. frugiperda*, os isolados LIIT-4311, LIIT-4306 e LIIT-4406 foram mais ativos do que o *Bta*. A

análise de SDS-PAGE revelou que a maioria dos isolados produziu tamanho de banda de 130 kDa, sugerindo a presença das proteínas Cry1, Cry2, Cry8 e Cry9, e de fato, os genes *cry1*, *cry2*, *cry8* e *cry9* foram amplificados dos isolados de *B. thuringiensis*. Esses resultados sugerem uma ampla distribuição do *B. thuringiensis* em áreas do Nordeste brasileiro, com isolados que apresentam alta letalidade e que podem ser explorados para o desenvolvimento de novas tecnologias para o manejo de *P. xylostella* e *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: *Plutella xylostella*, *Spodoptera frugiperda*, bactéria entomopatogênica, inseticida microbiano, controle de pragas, biotecnologia.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911)
FROM NORTHEAST BRAZIL AND ITS ACTIVITY INSECTICIDE AGAINST
LEPIDOPTERAN PESTS

by

MARIA CLEONEIDE DA SILVA

(Under the Direction of Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

ABSTRACT

The Northeast of Brazil has been little explored in the search for *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) to control of agricultural pest such as the *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). This study aimed firstly to isolate *B. thuringiensis* from samples (soils and insects) of the Northeastern states and evaluate the activities of isolates towards neonate larvae of *P. xylostella* and *S. frugiperda*. Secondly, to characterize the morphology, biochemistry, and genetic content of the *B. thuringiensis* isolates that presented both lethal and sublethal activity to those pests. The bipyramidal form of crystal prevailed in 31 % of the isolates. In pathogenicity tests, 13 and 20 isolates caused mortality > 30% to *P. xylostella* and *S. frugiperda*, respectively, while 24 and 52 isolates caused respectively > 30% inhibition of larval growth. The LC₅₀s and CE₅₀s for 12 isolates and the standards *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) and *B. thuringiensis* var. *aizawai* (*Bta*) were estimated using both species. The LIIT-4311 isolate had the lowest LC₅₀ and EC₅₀ for both *P. xylostella* and *S. frugiperda*. The standard *Bta* had the lowest LC₅₀ for *P. xylostella*. The *Btk* was 1.5 times less toxic than the LIIT-4311 isolate. For *S. frugiperda*, the LIIT-4311, LIIT-4306, and LIIT-4406 isolates were more active than the *Bta*. The SDS-PAGE analysis revealed that most isolates produced band

sizes of 130KDa, suggesting the presence of Cry1, Cry2, Cry8, and Cry9 proteins, and indeed, the *cry1*, *cry2*, *cry8* and *cry9* genes were amplified from the *B. thuringiensis* isolates. These results suggest the widespread distribution of *B. thuringiensis* in areas from Northeast of Brazil with strains that show high lethality, which can be exploited to develop new technologies for the management of *P. xylostella* and *S. frugiperda*.

KEY WORDS: *Plutella xylostella*, *Spodoptera frugiperda*, entomopathogenic bacteria, microbial insecticide, pest control, biotechnology.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DO
NORDESTE BRASILEIRO E SUA ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA
LEPIDÓPTEROS PRAGAS

por

MARIA CLEONEIDE DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro - 2011

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DO
NORDESTE BRASILEIRO E SUA ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA
LEPIDÓPTEROS PRAGAS

por

MARIA CLEONEIDE DA SILVA

Comitê de Orientação:

Herbert Abreu Álvaro Siqueira - UFRPE

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

Reginaldo Barros - UFRPE

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DO
NORDESTE BRASILEIRO E SUA ATIVIDADE INSETICIDA CONTRA
LEPIDÓPTEROS PRAGAS

por

MARIA CLEONEIDE DA SILVA

Orientador:

Herbert Abreu Álvaro Siqueira - UFRPE

Examinadores:

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

Irene Maria Ramos Marques - UFPE

José Vitor Moreira Lima Filho - UFRPE

José Adriano Giorgi - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Francisco Umbilino Silva e Maria de Deus Pereira Silva, as minhas irmãs, Antônia Maria Pereira Silva Chaves e Maria Cleide da Silva e aos meus sobrinhos Tharliane Silva Chaves, Tércia Marília Silva Chaves, Maísa Marcela Aragão Silva, Francisco de Nazaré Silva Chaves e José Carlos Aragão Silva pelo o amor, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo que sou e tenho conquistado.

A Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pelo apoio e bolsa de estudo concedida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), que contribuiu para realização deste curso.

Ao professor Reginaldo Barros pelo apoio profissional.

Ao professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira pela amizade, apoio e orientação na realização desse trabalho.

Ao professor Edmilson Jacinto Marques pela co-orientação, apoio e amizade.

Ao professor Manoel Guedes Corrêa Gondim Jr pela presteza e competência profissional.

Ao professor José Vargas de Oliveira, pela amizade, ensinamentos e momentos de descontração.

Ao professor Jorge Braz Torres pelo profissionalismo e competência em coordenar o Curso de Entomologia Agrícola (UFRPE).

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, pela contribuição na minha formação profissional.

Ao professor José Vitor Moreira Lima Filho pela ajuda em ceder à mesa agitadora.

A Professora Rosa Mariano pela confiança no uso do Laboratório de Biologia Molecular da Fitopatologia.

Aos professores da UEMA Raimunda Nonata (Didi), Antonio Nilson, Sérgio Turibus, Marta Piovesan, Carlosmagnó Lima, Terezinha Maia, pelo apoio e compreensão, na minha liberação para realizar esse Curso.

Ao Eduardo Moreira Barros pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos de turma, Andréa Carvalho, Aleuny Reis, Franklin Cunha e Marco Aurélio.

Ao Eduardo Barros, Eddy Andrión, Jorge Torres, Franklin Cunha, Eliana Passos, Tadeu Martins, Cleiton Domingos, pelas amostras de solo que coletaram.

A Liliane Marques da Silva pela amizade e ajuda imensurável durante a realização dos experimentos.

A Suzana Silva, Aline, Maria Júlia, Dílvia, André Xavier, Wellington Marques, Andresa Oliveira Jerfeson e Felipe Colares pela ajuda nos experimentos.

As minhas amigas Andréia Serra Galvão e Ana Elizabete Lopes Ribeiro pelo apoio quando cheguei a Recife.

Aos Amigos Nicolle Ribeiro, Agna Rita, Vanessa Santos, Alexandre Conte, Cinthia Silva, Eliana Passos, Ellen Valente, Rosemary Castro, Roberta Lemes, Jennifer Guimarães, Felipe Colares, Solange França, Lígia Andrade, Alberto Belo, Tadeu Martins, Ricardo Lopes, Flávia Born, Mário Jorge, Martins Oliveira.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner 1911)	02
1.1.1 Aspectos gerais	02
1.1.2 Histórico e uso	02
1.1.3 Presença do <i>Bacillus thuringiensis</i> no ambiente	07
1.1.4 Caracterização.....	09
1.1.5 Nomenclatura e Classificação.....	11
1.1.6 Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
1.1.7 Modo de ação das proteínas Cry.....	13
1.2 Traça-das-crucíferas, <i>Plutella xylostella</i> (L.1758)	16
1.2.1 Aspectos bioecológicos	16
1.2.2 Manejo	17
1.3 Lagarta-do-cartucho, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith 1797).....	20
1.3.1 Aspectos bioecológicos	20
1.3.2 Manejo	22
1.4 Caracterização do problema e objetivo.....	24
LITERATURA CITADA.....	25

2	ISOLAMENTO DE <i>Bacillus thuringiensis</i> (BERLINER 1911) DO NORDESTE BRASILEIRO E SUA ATIVIDADE A <i>Plutella xylostella</i> (L. 1758) E <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH 1797)	43
	RESUMO.....	44
	ABSTRACT	45
	INTRODUÇÃO	46
	MATERIAL E MÉTODOS	48
	RESULTADOS	55
	DISCUSSÃO	58
	CONCLUSÃO	62
	AGRADECIMENTOS	62
	LITERATURA CITADA	62
3	CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> (BERLINER 1911) DO NORDESTE BRASILEIRO ATIVOS A <i>Plutella xylostella</i> (L.1758) E <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH 1797).....	76
	RESUMO.....	77
	ABSTRACT	78
	INTRODUÇÃO	79
	MATERIAL E MÉTODOS	81
	RESULTADOS	85
	DISCUSSÃO	87
	CONCLUSÃO	91
	AGRADECIMENTOS	91
	LITERATURA CITADA	92

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 9.000 espécies de insetos com *status* de praga afetam culturas de importância econômica no mundo, sendo a aplicação de inseticidas sintéticos a tecnologia mais utilizada para a proteção dessas culturas, com custo de 35 bilhões de dólares a cada ano em todo o mundo (Stephenson 2003). Nos últimos anos, o Brasil tem se tornado o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Segundo levantamento feito pelo Sindicato Nacional da Indústria Vegetal (SINDAG), o emprego de agrotóxicos na proteção de plantas no mercado nacional totalizou 673 milhões de toneladas e as vendas somaram US\$ 7,125 bilhões (ANDEF 2009).

A utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos para o controle de insetos tem gerado uma crescente preocupação mundial. A presença de resíduos em alimentos, no solo e nos lençóis d'água, além de ressurgência de pragas, aparecimento de novas pragas, surto de pragas secundárias e, principalmente, resistência de pragas aos inseticidas, são consequências deste uso indiscriminado.

A busca por alternativas mais seguras de controle de insetos-pragas, que não ocasionem problemas para o homem e o meio ambiente, é uma constante no meio científico. Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 70 anos, são alternativas práticas para o controle mais seletivo de insetos-pragas, que inclui principalmente, o emprego de microrganismos. Dentre os microrganismos empregados no controle biológico, à bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) é considerada o principal agente entomopatogênico, respondendo por 90% de todos os biopesticidas vendidos mundialmente (Polanczyk & Alves 2003).

1.1 A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911)

1.1.1 Aspectos gerais

O *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) é uma bactéria gram-positiva, catalase positiva, aeróbia, podendo crescer facultativamente em anaerobiose, mesófila, quimioheterotrófica, entomopatogênica e capaz de se movimentar devido à presença de estruturas de locomoção denominadas de flagelos peritríquios (Schnepf *et al.* 1998, Monnerat & Bravo 2000, Bobrowski *et al.* 2003). Possui forma de bastonete que varia de 1 a 1,2 µm de largura e 3 a 5 µm de comprimento (Habib & Andrade 1998), cuja temperatura ideal de crescimento é em torno de 30°C (Aronson & Thompson 1971).

Quando em condições ambientais adversas, essa bactéria interrompe sua divisão celular, dando início à fase de esporulação típica dos bacilos, gerando esporos elípticos e cilíndricos localizados na região central ou paracentral da célula (Bechtel & Bulla 1976). Durante os estágios III e IV desta fase, cristais paraesporais são sintetizados e acumulam-se na periferia dos esporos na forma de inclusões cristalinas sendo liberados juntamente com o esporo quando ocorre a lise da célula (Bechtel & Bulla 1976, Aronson 2002).

As inclusões cristalinas são constituídas de proteínas Cry (glicoproteínas) ou proteínas cristais inseticidas também denominadas de δ -endotoxinas codificadas por genes localizados em plasmídeos conjugativos (Aronson 2002). Estas toxinas são características de cada variedade de *B. thuringiensis*, as quais apresentam propriedades entomopatogênicas a insetos de várias ordens como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Orthoptera, e outros organismos, tais como, nematóides e ácaros (Höfte & Whiteley 1989, Feitelson *et al.* 1992).

1.1.2 Histórico e uso

O primeiro isolamento de *B. thuringiensis* foi realizado pelo bacteriologista japonês Shigetane Ishiwata em 1901 (Heimpel & Angus 1960), a partir de larvas mortas do bicho-da-

seda, *Bombyx mori* (L., 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), nomeando de “sotto disease bacillus”. Em 1908, Iwabuchi denominou-o de *Bacillus sotto* Ishiwata (Heimpel & Angus 1960). Aoki e Chigasaki, em 1915, demonstraram que a atividade inseticida era devido a toxinas presente em culturas esporuladas ao invés de culturas jovens de células vegetativas (Tanada & Kaya 1993). Em 1911, na Alemanha, Ernst Berliner isolou um bacilo, causando doença e morte em larvas de *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae), nomeando definitivamente em 1915 como *Bacillus thuringiensis* Berliner, em homenagem à província de Thuringia, onde foi encontrado o primeiro inseto de *A. kuehniella* infectado (Heimpel & Angus 1960).

O primeiro bioinseticida comercializado, denominado de Sporeine, surgiu em 1938 na França. No entanto, só em meados de 1950, surgiu o interesse em comercializar produtos microbianos em larga escala para o controle de insetos (Beegle & Yamamoto 1992). Embora Mattes e Berliner tenham notado a presença de corpos paraesporais na célula bacteriana em 1927, eles não os consideraram relacionados à toxicidade (Tanada & Kaya 1993). Em 1953, foi divulgada a presença de inclusões cristalinas em culturas esporuladas de *B. thuringiensis*, relacionando-as com a patogenicidade desse bacilo (Hannay 1953). A hipótese que estas inclusões deviam ter alguma relação com a formação de uma substância tóxica que induzia septicemia em larvas de insetos foi comprovada experimentalmente em 1956 (Angus 1956). Em 1957, nos EUA, foi produzido e disponibilizado um produto a base de *B. thuringiensis* para teste chamado de Thuricide (Beegle & Yamamoto 1992).

Em 1967, o *B. thuringiensis* foi considerado pela indústria como o primeiro entomopatógeno a ser amplamente explorado como agente de controle biológico, devido às suas características de adaptação a um grande número de programas de controle biológico. Com a otimização das formulações, a comercialização se intensificou surgindo diversos produtos com base em diferentes subespécies de *B. thuringiensis*. Desde então, esse

microrganismo tornou-se o mais importante agente de controle biológico comercializado, com mais de 100 formulações colocadas no mercado mundial, sendo responsáveis por mais de 90% do faturamento dos bioinseticidas (Schnepf *et al.* 1998, Polanczyk & Alves 2003).

Estima-se que a aplicação mundial anual de *B. thuringiensis* seja de 13.000 toneladas (Hansen & Salamitou 2000), sendo o continente americano responsável por 50% deste mercado, principalmente os Estados Unidos e Canadá (Tamez-Guerra *et al.* 2001). A América Latina, Cuba e México lideram a utilização de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis*, especialmente para o controle de pragas nas culturas do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), banana (*Musa* sp.), batata (*Solanum tuberosum* L.), citros, hortaliças, fumo (*Nicotiana tabacum* L.), milho (*Zea mays* L.) e pastagens. No Brasil, cerca de 30 pragas de importância agrícola e mosquitos vetores de doenças são controlados por *B. thuringiensis* (Polanczyk & Alves 2003).

A utilização desse microrganismo tem várias vantagens como sua ação restrita a insetos, principalmente, lepidópteros, coleópteros e dípteros, não afeta o ser humano, tem menor impacto ambiental, além de diminuir a utilização de inseticidas sintéticos (Whiteley & Schnepf 1986, Betz *et al.* 2000). Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* têm especificidade a determinados grupos de insetos e são incluídos em cinco subespécies: *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *morrisoni*, ambos letais para larvas de borboletas e mariposas, *B. thuringiensis* var. *israelensis* letal para larvas de mosquitos e simulídeos, *B. thuringiensis* var. *aizawai* letal para larvas de mariposa, *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, (conhecido por *san diego*) letal para larvas de besouros (Swadener 1994, Joung & Côté 2000).

Apesar das formulações à base de *B. thuringiensis* serem consideradas de maior sucesso comercial no mundo, existem diversos fatores que limitam sua utilização, como o 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, a ineficácia contra pragas de solo e endofíticas (Navon 2000). A radiação solar é outro fator importante que limita a utilização desses produtos, pois as proteínas Cry sofrem desnaturação pela ação do calor e pela luz UV (Navon 2000, Myasnik *et al.* 2001).

Para minimizar essas limitações várias tecnologias têm sido utilizadas como a introdução de genes *cry* em outros organismos. Os genes *cry* introduzidos em *Escherichia coli* (Schnepf & Whiteley 1981), *B. subtilis* (Calogero *et al.* 1989), *B. megaterium* (Sekar & Carlton 1985) e *Pseudomonas fluorescens* (Huang *et al.* 2007) ampliaram as possibilidades de utilização dessa bactéria na agricultura.

Processos fermentativos com *Pseudomonas* recombinantes têm sido utilizados para produzir formulações contendo inclusões cristalinas encapsuladas por células mortas. Este tipo de formulação aumenta a persistência em campo destes biopesticidas devido à proteção contra a radiação ultravioleta (Schnepf *et al.* 1998). Tamez-Guerra *et al.* (2000) e Côté *et al.* (2001) verificaram a eficiência das formulações encapsuladas e microencapsuladas, com consequente aumento de persistência do *B. thuringiensis* e incremento na mortalidade dos insetos-alvo. O aumento do espectro de ação das toxinas foi obtido por Park *et al.* (2003) e Wang *et al.* (2006), por meio de métodos de recombinação para reordenar a composição protéica do cristal. Essa técnica elimina as toxinas com baixa atividade inseticida e incorpora outras com maior potencial. Os trabalhos anteriormente mencionados, além de agrupar toxinas mais eficientes, têm o objetivo de explorar o sinergismo entre essas toxinas.

Com a clonagem e a caracterização de genes de *B. thuringiensis*, novas perspectivas do uso desta bactéria e de suas proteínas inseticidas foram vislumbradas, como a possibilidade de se introduzir os genes de *B. thuringiensis* codificadores das toxinas nos genomas dos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta, atingindo, assim, apenas os insetos-pragas que se alimentam dos tecidos (de Maagd *et al.* 1999). Dessa forma,

programas de melhoramento de plantas têm produzido plantas resistentes a insetos, capazes de produzir a toxina do *B. thuringiensis* com intuito de minimizar as limitações para utilização dessa bactéria na agricultura.

A partir da metade da década de 80, foram obtidas as primeiras plantas transgênicas com a incorporação dos genes codificadores das proteínas tóxicas de *B. thuringiensis* nas culturas do fumo (Barton *et al.* 1987) e tomate (Fischhoff *et al.* 1987). Várias culturas como repolho (Bhattacharya *et al.* 2002), milho (Lynch *et al.* 1999), algodão (Jenkins *et al.* 1997), soja (*Glycine max* L) (Walker *et al.* 2000), arroz (*Oryza sativa* L.) (Ye *et al.* 2001) e canola (*Brassica napus* L.) (Ramachandran *et al.* 1998) dentre outras, têm sido modificadas geneticamente para expressar proteínas derivadas de *B. thuringiensis*, e são utilizadas em escala comercial em vários países, atingindo uma área de cerca de 134 milhões de hectares (James 2009).

No Brasil, essa tecnologia só chegou em 2005 com a regulamentação e liberação das plantas transgênicas (Fiúza & Pinto 2009). O algodoeiro Bollgard[®] evento MON531 foi à primeira planta transgênica a ser liberada para exploração comercial. Em 2009, nosso país passou a ser o segundo maior produtor de plantas transgênicas do mundo com 21,4 milhões de hectares plantados, sendo o algodão Bt responsável por 150 mil hectares e o milho Bt por 5 milhões de hectares plantados em diversas áreas (CIB 2010).

As principais vantagens do uso das plantas geneticamente modificadas são aumento na produção, diminuição dos efeitos ambientais, persistência no meio ambiente, proteção relacionada à degradação por raios UV e redução na aplicação de inseticidas, principalmente, os de largo espectro favorecendo a manutenção de inimigos naturais, que auxiliam no controle de pragas e contribuem para retardar a evolução da resistência (Navon 2000, Bobrowski *et al.* 2003).

Apesar das vantagens dessa biotecnologia, o cultivo em extensas áreas com plantas transgênicas, representa potenciais riscos de evolução de resistência, devido à pressão de seleção. Assim, estratégias de prevenção devem ser tomadas, visando retardar o desenvolvimento da resistência a plantas transformadas com proteínas Cry, como a adoção de áreas de refúgio e a utilização de materiais genéticos que possuam expressão da proteína Cry em alta dose (Tabashnik 1994, Gould 1998). As áreas de refúgio são áreas de plantas não resistentes a insetos dispostas interna ou externamente aos campos cultivados com plantas transgênicas (Gould 1998). Essa prática baseia-se na proposição de que populações não expostas a um determinado fator de seleção apresentam baixa frequência de alelos que se opõem a esta pressão seletiva (Perferoen 1997).

1.1.3 Presença do *Bacillus thuringiensis* no ambiente

A ecologia do *B. thuringiensis* tem sido bastante estudada (Chatterjee *et al.* 2007, Bizzarri & Bishop 2008), e é considerado um organismo ubíquo sendo encontrado na natureza predominantemente na forma de esporos, que podem se disseminar amplamente pelo ambiente, uma vez que esses esporos podem permanecer viáveis por longos períodos de tempo (de Maagd *et al.* 2003, Jensen *et al.* 2003). Essa bactéria pode ser isolada de solo (Martin & Travers 1989, Bernhard *et al.* 1997), filoplano de espécies vegetais (Smith & Couche 1991, Hansen *et al.* 1998), insetos vivos ou mortos e seus habitats (Itoua-Apoyolo *et al.* 1995, Bernhard *et al.* 1997), grãos estocados (Meadows *et al.* 1992, Bernhard *et al.* 1997), a partir de amostras de água (Iriarte *et al.* 2000) e sedimentos marinhos (Maeda *et al.* 2000).

Através dos estudos de prospecção de linhagens de *B. thuringiensis*, Meadows (1993) formulou três prováveis hipóteses para explicar sua distribuição cosmopolita e seu habitat. A primeira hipótese tem como base a evolução dessa bactéria com os insetos, sugerindo o *B. thuringiensis* como um entomopatógeno, pois para esse autor, seria impossível essa bactéria utilizar grandes quantidades de energia e nutrientes durante a esporulação para a formação de

um cristal que não apresentasse um grande valor adaptativo. Sem o cristal, o *B. thuringiensis* seria incapaz de colonizar o intestino médio de insetos com alto pH, devido isto ser um fator limitante para o desenvolvimento vegetativo da célula. A segunda hipótese sustenta o filoplano como o verdadeiro habitat natural de *B. thuringiensis*, de acordo com o trabalho de Smith & Couche (1991), que encontraram grandes quantidades de *B. thuringiensis* em uma série de espécies arbóreas, em frequência bastante alta para serem decorrente apenas da disseminação pelo vento ou pela chuva. De acordo com estes autores, o solo seria apenas um reservatório durante o inverno quando as chuvas caem. A terceira hipótese considera que o habitat natural do *B. thuringiensis* seja o solo. Para Meadows (1993) algumas explicações sustentam a hipótese que o solo seria um reservatório natural de esporos de *B. thuringiensis*, depositados a partir de cadáveres de insetos, folhas ou lagartas que descem para empupar. O *B. thuringiensis* poderia ser patogênico a insetos e outros animais habitantes comuns no solo, ou ainda, essa bactéria poderia crescer no solo quando nutrientes são disponíveis.

Alguns trabalhos têm mostrado que células vegetativas de *B. thuringiensis* não se multiplicam em solo, apresentando maior taxa de mortalidade em solo não esterilizado que em solo esterilizado (Thomas *et al.* 2000, Vilas-Bôas *et al.* 2000, Ferreira *et al.* 2003). Segundo Ferreira *et al.* (2003), as células vegetativas de *B. thuringiensis* parecem ser incapazes de competir com microrganismos naturais do solo. Para Thomas *et al.* (2000) as células vegetativas de *B. thuringiensis*, ao entrarem no solo, não adquirem nutrientes para manter o crescimento e entram na fase de esporulação. Com relação aos esporos, vários trabalhos relatam que a germinação no solo não ocorre (Ohana *et al.* 1987, Thomas *et al.* 2000, Vilas-Bôas *et al.* 2000).

As informações sobre o destino das toxinas de *B. thuringiensis* no solo são limitadas e estimativas da persistência de sua atividade no ambiente variam muito. Segundo algumas pesquisas as toxinas ligam-se a ácidos húmicos, suplementos orgânicos ou com partículas de

solo que as protegem da degradação por microorganismos, sem, no entanto, perder sua atividade inseticida (Crecchio & Stotzky 1998, 2001)

No solo, o número de células varia de 10² a 10⁴ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de solo, enquanto em plantas, esse número varia de 0 a 100 UFC cm⁻² (Damgaard 2000). Segundo Polanczyk & Alves (2003), a meia vida de esporos de *B. thuringiensis*, em folhas é muito menor que no solo (100-200 dias), variando, geralmente, de menos de um até três dias.

1.1.4 Caracterização

A nomenclatura das espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* causa divergência entre os taxonomistas, devido à alta homologia genética. Esse gênero forma um grupo denominado de *B. cereus* que inclui seis espécies altamente similares: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*. Alguns estudos sugerem que *B. cereus* sensu stricto, *B. anthracis* e *B. thuringiensis* são espécies altamente relacionadas, e por isso, pertencentes a um único grupo, o do *B. cereus lato sensu* (Daffonchio *et al.* 2000, Helgason *et al.* 2000). No entanto, outros estudos têm obtido a discriminação entre *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis* (Chang *et al.* 2003, Cherif *et al.* 2003).

A classificação das subespécies de *B. thuringiensis* baseada em análises sorológicas foi introduzida no início da década de 1960 por de Barjac & Bonnefoi (1962). No entanto, a determinação do sorotipo nem sempre traduz a atividade inseticida de um isolado. Atualmente, mais de 100 sorotipos de *B. thuringiensis* são listados no Genbank.

A caracterização bioquímica não possibilita diferenciar *B. thuringiensis* de *B. cereus* e *B. anthracis*, devido essas espécies apresentarem um grau de parentesco bastante elevado, sendo considerado o principal critério utilizado para a distinção entre essas bactérias, a produção de corpos de inclusões paraesporais durante o processo de esporulação do *B. thuringiensis* (Travers *et al.* 1987, Drobniowski 1993, Henderson *et al.* 1995).

Com o advento das técnicas da biologia molecular, os dados moleculares começaram a ser usados na classificação de bactérias. A hibridização de DNA foi muito utilizada em *B. thuringiensis* (de Barjac & Frachon 1990, Carlson *et al.* 1994, Lecadet *et al.* 1999) sendo necessário um nível de no mínimo 70% de hibridização entre os genomas para se determinar que duas bactérias pudessem ser consideradas como pertencentes à mesma espécie (Wayne 1988). Embora esse método seja lento, ainda é considerado padrão para a delimitação de espécies bacterianas (Stackebrandt *et al.* 2002), sendo as espécies *B. thuringiensis*, *B. cereus* e *B. anthracis*, indistinguíveis por esse método (Drobniewski 1993, Carlson *et al.* 1994).

Desde a década de 90 até hoje, a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) tem se mostrado uma ferramenta poderosa na detecção de genes com ação inseticida específicos, em diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Bourque *et al.* 1993, Noguera & Ibarra 2010) e na detecção de novos genes *cry* (Kalman *et al.* 1993, Bravo *et al.* 1998, Ben-Dov *et al.* 1999, Santos *et al.* 2009). Todavia, o procedimento normal de PCR não pré-determina exatamente a atividade inseticida da linhagem, bem como, o nível de expressão dos genes *cry* presentes, que estão envolvidos no potencial inseticida de cada linhagem (Martínez *et al.* 2005).

O uso de PCR teve um grande aperfeiçoamento para a detecção de genes *cry*, contudo este método requer um amplo número de oligonucleotídeos. Diversos oligonucleotídeos universais e degenerados foram delineados para amplificar os membros conhecidos de diferentes subfamílias de genes *cry*. Embora o uso destes oligonucleotídeos degenerados incremente a probabilidade de amplificação de novos genes, a eficiência é restrita para detecção de genes relativos ao mesmo grupo (Beron *et al.* 2005). Técnicas mais específicas de PCR como RFLP, ribotipagem com sequências de nucleotídeos como 16S rRNA, têm contribuído na identificação da diversidade de genes *cry* (Song *et al.* 2003, Vilas-Bôas & Lemos 2004, Baig *et al.* 2010).

1.1.5 Nomenclatura e Classificação

Inicialmente a classificação das proteínas Cry era baseada na atividade inseticida das proteínas do cristal à ordem do inseto-alvo, relacionando-as com seus genes correspondentes (Höfte & Whiteley 1989). Assim, existiam quatro grupos: O gene *cryI* (codifica proteína tóxica a ordem Lepidoptera), *cryII* (codifica proteína tóxica a lepidópteros e dípteros), *cryIII* (codifica proteína tóxica a ordem Coleoptera) e *cryIV* (codifica proteína tóxica a ordem Diptera). Porém, com o aparecimento de vários outros genes *cry* e o cruzamento de especificidades, foram geradas muitas exceções e uma nova classificação foi proposta.

A nomenclatura atual é baseada apenas em relações moleculares entre as cadeias primárias das proteínas em função do grau de identidade de seus aminoácidos (Crickmore *et al.* 1998). O sistema adiciona à raiz “Cry” numerais arábicos e letras ordenadas em hierarquias indicando o grau de divergência filogenética. As superfamílias, indicadas por números, como em Cry1 apresentam até 45% de identidade. Os holótipos, designados por letras maiúsculas (Cry1A), denotam até 78%. A terceira categoria indicada por letra minúscula (Cry1Aa) denota identidade de até 95%. A quarta categoria indicada por números arábicos representa identidade superior a 95% (Cry1Aa1) (Crickmore *et al.* 1998).

1.1.6 Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

Várias toxinas com atividade inseticida podem ser produzidas por *B. thuringiensis* como: α -exotoxinas, β -exotoxinas, quitinases, proteínas inseticidas vegetativas (VIP – do inglês “vegetative insecticidal proteins”) e as δ -endotoxinas. As α -exotoxinas, conhecidas também como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, são enzimas com atividade citolíticas que agem sobre os fosfolipídeos presentes nas membranas celulares, sendo altamente tóxicas para alguns insetos (Wie *et al.* 1982, Hansen & Salamitou 2000).

As β -exotoxinas, também conhecidas como “thuringiensina”, são produzidas durante a fase vegetativa e sua atividade tóxica está relacionada com a inibição da RNA polimerase

através da competição com ATP, apresentando toxicidade para várias ordens de insetos (Habib & Andrade 1998, Hansen & Salamitou 2000). Estudos sobre as quitinases têm demonstrado que esta enzima presente em isolados de *B. thuringiensis* hidrolisa a quitina na membrana peritrófica do inseto, causando a formação de poros e facilitando o contato entre as δ -endotoxinas e seus receptores no epitélio intestinal, aumentando a toxicidade de *B. thuringiensis* (Regev *et al.* 1996, Liu *et al.* 2002, Arora *et al.* 2003).

As proteínas VIPs são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura (Estruch *et al.* 1996). O gene *vip3A*, por exemplo, codifica uma proteína de aproximadamente 88,5 kDa, que apresenta atividade tóxica contra insetos pouco sensíveis à maioria das proteínas Cry (Yu *et al.* 1997), principalmente contra lepidópteros (Loguercio *et al.* 2002), provocando paralisia alimentar em baixas concentrações e uma degeneração progressiva das células epiteliais do inseto suscetível (Lee *et al.* 2003).

Existem dois tipos de δ -endotoxinas, as Cyt e as Cry (Crickmore *et al.* 1998). As proteínas Cyt possuem atividade citolítica e são constituídas pelos grupos Cyt1, Cyt2 e Cyt3. A classe Cyt1 apresenta quatro proteínas Cyt1Aa, Cyt1Ab, Cyt1Ba e Cyt1Ca, a classe Cyt2 é formada pelas proteínas Cyt2Aa, Cyt2Ba, Cyt2Bb, Cyt2Bc e Cyt2Ca e a classe Cyt3 apresenta a proteína Cyt3Aa, sendo tóxicas para dípteros e coleópteros (Crickmore *et al.* 2011). Já as δ -endotoxinas Cry, também conhecidas como proteínas Cry, são proteínas altamente eficazes no controle de insetos, sendo consideradas as principais proteínas com atividade inseticida do *B. thuringiensis*. Mais de 450 genes *cry*, que codificam as proteínas Cry, já foram sequenciados e as proteínas Cry estão classificadas em 68 grupos organizados em diferentes subgrupos (Crickmore *et al.* 2011).

A estrutura tridimensional das proteínas Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb, Cry4Aa e Cry4Ba foram determinadas por cristalografia de raios-X (Li *et al.* 1991, Grochulski *et al.* 1995, Galitsky *et al.* 2001, Morse *et al.* 2001, Boonserm *et al.* 2005, Boonserm *et al.* 2006).

Todas essas proteínas possuem alto grau de similaridade e apresentam três domínios: I, II e III, sugerindo similar modo de ação.

O domínio I (terminal-N) é constituído por um feixe de sete α -hélices, em que a α -hélice 5 é hidrofóbica e circundada por 6 hélices anfipáticas. O domínio II (terminal-N) é formado por três folhas β -antiparalelas e o domínio III (terminal-C) consiste de duas folhas β -antiparalelas formando um β -sanduíche. O domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro, enquanto que os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor (de Maagd *et al.* 2001, Bravo *et al.* 2007). Acredita-se que o domínio III esteja também fortemente envolvido na formação de poros (Schnepf *et al.* 1998).

As características dos cristais, como o formato, têm correlação com a atividade inseticida das proteínas. Os cristais bipiramidais podem estar associados às proteínas do tipo Cry1, de aproximadamente 130 kDa, que apresentam atividade contra lepidópteros e coleópteros (Bradley *et al.* 1995, Bravo *et al.* 1998), enquanto que os cristais cubóides com peso molecular em torno de 65 kDa podem estar associados com as proteínas do tipo Cry2, que apresentam atividade contra lepidópteros e dípteros (Höfte & Whiteley 1989, Wu *et al.* 1991). Já os cristais rombóides com peso molecular 73 a 75 kDa, podem estar associados com as proteínas do tipo Cry3, que apresentam atividade contra coleópteros (Lambert *et al.* 1992) e os cristais ovóides, com peso molecular de 72 a 135 kDa, são tóxicos contra dípteros e podem estar associados às proteínas Cry4 (Höfte & Whiteley 1989).

1.1.7 Modo de ação das proteínas Cry

A maioria dos estudos sobre o modo de ação das proteínas Cry foi realizado, principalmente, em lepidópteros. Os sintomas observados a partir do momento em que as larvas suscetíveis ingerem os cristais e esporos de *B. thuringiensis* são: perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a

morte (Aronson *et al.* 1986). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escuro. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib & Andrade 1998, Monnerat & Bravo 2000).

O mecanismo de ação das proteínas Cry é bastante complexo, caracterizado pelas etapas de solubilização e processamento das toxinas, reconhecimento e ligação ao receptor e inserção na membrana, agregação e formação do poro (Monnerat & Bravo 2000). Na etapa de solubilização, os cristais produzidos por *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos por larvas de insetos suscetíveis, são solubilizados no intestino médio, liberando uma ou mais proteínas Cry, também conhecidas como pró-toxinas. A solubilização das proteínas depende do pH alcalino de lepidópteros e dípteros. Uma menor efetividade destas proteínas em coleópteros pode ser devida ao pH neutro ou pouco ácido, necessitando, então, de uma ativação *in vitro*. A principal protease digestiva de lepidópteros e dípteros é a serino-protease, enquanto nos coleópteros ocorre principalmente cisteíno-protease e aspartato-proteases (de Maagd *et al.* 2001)

Na segunda etapa, após a ativação das pró-toxinas, ocorre a ligação com receptores específicos localizados nas microvilosidades das membranas apicais das células colunares do intestino dos insetos suscetíveis (Hofmann *et al.* 1988, Höfte & Whiteley 1989, Bravo *et al.* 1992). A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Hofmann *et al.* 1988, Van Rie *et al.* 1990, Liang *et al.* 1995). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schnepf *et al.* 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (Van Rie *et al.* 1989). Em geral, quatro receptores protéicos têm sido

descritos como possíveis moléculas para ligação das proteínas Cry às células do epitélio intestinal dos insetos suscetíveis: proteínas do tipo caderina (CADR), aminopeptidase-N ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), fosfatase alcalina ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e um glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.* 2007, Gómez *et al.* 2007).

Na última etapa, a toxina Cry se une rapidamente e de forma irreversível à membrana plasmática das células epiteliais, com subsequente abertura ou formação de poros, ocorrendo, assim, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino das larvas de insetos suscetíveis (Van Rie *et al.* 1990, Liang *et al.* 1995).

Além das toxinas, os esporos também podem contribuir com a patogenicidade através da ação sinérgica desempenhada junto com as proteínas Cry (Johnson & McGaughey 1996, Tang *et al.* 1996). Isso ocorre quando o conteúdo das células do intestino médio mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para a germinação dos esporos, provocando um quadro de septicemia na larva. Com a germinação dos esporos, outros fatores patogênicos ocasionados pelas células vegetativas podem contribuir com a patogenicidade, devido à produção de proteínas inseticidas vegetativas (VIP) (Estruch *et al.* 1996).

O complexo modo de ação do *B. thuringiensis* possibilita vários prováveis mecanismos de resistência dos insetos às toxinas, como a não ativação da toxina, devido a ausência de proteases específicas (Oppert *et al.* 1997), mudanças de pH no lúmen do intestino médio (Ma *et al.* 2005), redução na capacidade de ligação aos receptores nas microvilosidades apicais do mesêntero (Sayyed *et al.* 2004) e baixa eficiência pelo rápido reparo dos danos causados pela toxina às células afetadas (Loeb *et al.* 2001). Outro possível mecanismo da redução da atividade da toxina é o seu sequestro pelas proteases (Milne *et al.* 1995). Mutações nos genes que codificam os receptores para as proteínas Cry (Ballester *et al.* 1999). Existem naturalmente genes de resistência nas populações de insetos. O aumento da frequência desses

genes ocorre devido intensas e constantes aplicações das toxinas de *B. thuringiensis*, comprometendo a eficiência desse controle. O uso adequado desse bioinseticida com a utilização de diferentes toxinas é muito importante para reverter à resistência e dar continuidade aos programas de manejo.

1.2 Traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L. 1785)

1.2.1 Aspectos bioecológicos

A traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), é considerada uma praga cosmopolita, oligófaga e altamente migratória (Chapman *et al.* 2002, Campos *et al.* 2003), responsável por cerca de 90% de prejuízos às culturas das brássicas em todo mundo, com custo médio anual de controle ultrapassando um bilhão de dólares (Talekar & Shelton 1993, Yang *et al.* 1994).

No Brasil, a presença de *P. xylostella* tem sido observada praticamente durante todo o ano, causando elevados prejuízos na produção de brássicas, particularmente em repolho, o segundo produto hortícola mais consumido, com redução variando de 58 a 100% da qualidade final do produto, e seu controle pode atingir até 30% dos custos totais da produção (Barros *et al.* 1993, Imenes *et al.* 2002), inviabilizando a produção dessa hortaliça, que tem seu cultivo tanto de subsistência como em escala comercial.

O comportamento fisiológico de *P. xylostella* depende de fatores como temperatura, fotoperíodo, umidade relativa e qualidade do alimento (Haseeb *et al.* 2001, Crema & Castelo Branco 2004). Adultos de *P. xylostella* têm coloração parda, sendo que nos machos a margem posterior das asas anteriores é branca formando, quando em repouso, uma mancha alongada característica sobre a face dorsal (Imenes *et al.* 2002), que lembra um diamante esculpido. São ativos no final da tarde e início da noite, quando ocorre o acasalamento e a postura (Talekar & Shelton 1993, Chapman *et al.* 2002). Os ovos são depositados isoladamente ou em grupo, na

parte inferior das folhas, com período médio de incubação de 2,58 a 2,87 dias, podendo cada fêmea ovipositar, em média, até 19 ovos por dia, alcançando em média, um total de 333 ovos por fêmea (Barros & Vendramim 1999, Golizadeh *et al.* 2009, Chagas Filho *et al.* 2010). A fase larval apresenta quatro instares com duração de $6,60 \pm 0,11$ a $7,82 \pm 0,20$ dias, e a fase de pupa varia de $3,31 \pm 0,11$ a $5,09 \pm 0,24$ dias (Barros & Vendramim 1999, Golizadeh *et al.* 2009), dependendo da temperatura, umidade e planta hospedeira. As injúrias causadas por esse inseto ocorrem na fase larval. As larvas penetram no interior das folhas após eclosão onde ficam durante dois ou três dias alimentando-se, em seguida, abandonam a galeria e passam a alimentar-se da epiderme inferior da folha. Em repolho, ao se alimentarem das folhas, as larvas deixam-nas com aspecto rendado e furos na cabeça. Com isso, acarretam a depreciação do produto, o atraso no crescimento e até mesmo a morte da planta. Após o completo desenvolvimento larval, ocorre a formação das pupas no interior de um pequeno casulo de seda na face inferior da folha.

Os adultos alimentam-se de orvalho e néctar e apresentam curto período de longevidade de $4,9 \pm 0,13$ a $8,86 \pm 0,55$ dias à fêmea e $5,1 \pm 0,13$ a $6,8 \pm 0,46$ dias o macho (Golizadeh *et al.* 2009, Chagas Filho *et al.* 2010). O ciclo da praga é relativamente curto e dependendo dos fatores ambientais, é encontrado maior número de gerações e maior potencial de dano da praga em regiões de clima quente (Talekar & Shelton 1993).

1.2.2 Manejo

Em todas as regiões do mundo, onde as brássicas são cultivadas, o controle de *P. xylostella* é realizado principalmente com o uso de inseticidas. No Brasil, o controle químico é considerado a principal forma de controle dessa praga (Barros *et al.* 1993, Castelo Branco *et al.* 2003), com um grande número de aplicações de diversos inseticidas em campos de produção de brássicas para o controle de *P. xylostella*, pulverizados até quatro vezes por semana (Castelo Branco *et al.* 2001, Castelo Branco & Medeiros 2001).

O excesso de aplicações tem contribuído para o aumento nos custos de produção, a intoxicação dos agricultores, produtos agrícolas com altos índices de resíduos químicos, poluição do meio ambiente, eliminação de inimigos naturais e seleção de populações resistentes de *P. xylostella*. Populações desse inseto são praticamente resistentes a todos os grupos de inseticidas usados para o seu controle, sendo esse inseto identificado como o lepidóptero que tem resistência a mais de 70 inseticidas sintéticos (Whalon *et al.* 2008).

A ocorrência de *P. xylostella* em níveis elevados advém de vários fatores como ciclo biológico curto, grande capacidade migratória, alto potencial biótico, sobreposição de geração, hábito alimentar (fase larval endofítica), disponibilidade de hospedeiros, coexistindo durante o ano todo nas áreas, proporcionando à praga quantidade abundante e contínua de alimento. Além disso, o uso intensivo de produtos químicos tem proporcionado o rápido aparecimento de populações resistentes, o que tem dificultado o controle desse inseto em campo (Barros & Vendramim 1999, Imenes *et al.* 2002, Castelo Branco *et al.* 2003, Kwon *et al.* 2004, Baek *et al.* 2005).

Dessa forma, o manejo integrado para o controle de *P. xylostella* deve ser implementado com a utilização de vários métodos de controle como o uso de amostragem e níveis de dano (Guilloux *et al.* 2003), uso de inseticidas seletivos, rotação de inseticidas de grupos químicos com modos de ação distintos (Castelo Branco *et al.* 2001), uso de inseticidas naturais (Torres *et al.* 2001). Além deste uso do controle químico de forma racional, outros métodos devem ser usados previamente ao químico ou estarem associados a ele, como por exemplo, o uso de feromônio sexual (Michereff *et al.* 2000), variedades resistentes (Andrahennadi & Gillott 1998), plantas transgênicas e plantas armadilhas (Shelton *et al.* 2008) e controle biológico (predadores, parasitóides e patógenos) (Silva *et al.* 2003, Silva-Torres *et al.* 2010), os quais juntos podem minimizar as injúrias causadas pela traça-das-crucíferas e, conseqüentemente, reduzir os custos e perdas nos cultivos de brássicas.

Inseticidas biológicos a base da bactéria *B. thuringiensis* têm sido amplamente utilizados devido ao excelente desempenho destes produtos no controle populações de *P. xylostella*, mas também pela especificidade do produto e menor impacto ambiental. Atualmente, existem sete produtos à base de *B. thuringiensis* registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de *P. xylostella* na cultura de repolho. No entanto, aplicações intensivas desses inseticidas têm exercido forte pressão de seleção, resultando no aparecimento de populações resistentes de *P. xylostella* em diversos locais do mundo (Tabashnik *et al.* 1990, Zhao *et al.* 1993, Perez & Shelton 1997). No Brasil, recentemente, foram identificadas populações de *P. xylostella* com significativos níveis de resistência a formulações comerciais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®]WP) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari[®]WDG) (Zago 2008).

A resistência de populações desse inseto tem sido verificada a várias toxinas como Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry1C (Tabashnik *et al.* 1993, Liu *et al.* 1996, Tabashnik *et al.* 1998, Sayyed *et al.* 2000, Sayyed & Wright 2001), além de casos de resistência cruzada entre raças e toxinas de *B. thuringiensis* como entre Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1C, Cry1Fa e Cry1Ja (Tabashnik *et al.* 1994, Granero *et al.* 1996, Liu *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2001).

Tecnologia mais avançada, como o uso de crucíferas geneticamente modificadas expressando toxinas de *B. thuringiensis*, tem sido considerada uma alternativa bastante viável no manejo dessa praga. No entanto, variedades geneticamente modificadas de brócolis expressando toxinas Cry1Ac e Cry1C e repolho expressando a toxina Cry1Ab têm o seu potencial de controle comprometido, pois já foram detectadas populações expressando altos níveis de resistência (Tabashnik *et al.* 1998).

A resistência da traça-das-crucíferas ao *B. thuringiensis* pode ser atribuída, principalmente, a uma alteração nos sítios de ligação membrana-toxina, reduzindo a afinidade

dos receptores da membrana com as proteínas tóxicas e ocorrência de mutações em sítios de ligação de toxinas (Tang *et al.* 1996, Luo *et al.* 1997, Sayyed *et al.* 2005). De acordo com Denolf *et al.* (1997) e Luo *et al.* (1997), as aminopeptidases N são os prováveis receptores das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac nas células do epitélio intestinal em insetos suscetíveis de *P. xylostella*. Além disso, foram descritos mecanismos de resistência a *B. thuringiensis* envolvendo genes diferentes em *P. xylostella* (Tabashnik *et al.* 1997), tornando o controle desse inseto cada vez mais difícil. Com isso, há necessidade da busca por novas fontes de proteínas tóxicas para geração de produtos com alta eficiência para o controle de *P. xylostella*.

1.3. Lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797)

1.3.1. Aspectos bioecológicos

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga altamente polífaga que utiliza mais de 80 plantas como hospedeiro (Pashley 1988, Pogue 2002, Capinera 2008). Ocasiona perdas significativas a diversas culturas de importância econômica, principalmente em plantas da família Poaceae (gramíneas), a qual tem o milho como principal hospedeiro, além de arroz e trigo (*Triticum aestivum* L.) (Cruz 1995, Busato *et al.* 2002, Busato *et al.* 2004). No entanto, esta também tem ocorrido em plantas dicotiledôneas como o algodão (Luttrell & Mink 1999, Barros *et al.* 2010) e é uma praga promissora para a cultura da soja, devido à intensa exposição da cultura à pressão populacional desse inseto (Sá *et al.* 2009, Barros *et al.* 2010).

Apesar do hábito alimentar generalista, a *S. frugiperda* proporciona significativas perdas na produção do milho, reduzindo a produção em cerca de 50% (Cruz 1995, Cortez & Waquil 1997, Cruz *et al.* 1999), acarretando prejuízos estimados em mais de 400 milhões de dólares/ano (Cruz *et al.* 1999). Na cultura do algodoeiro *S. frugiperda* ocasiona perdas de até 30% na produção (Miranda & Ferreira 2005).

Dentre os fatores abióticos que influenciam o desenvolvimento de *S. frugiperda*, a temperatura, provavelmente, é o mais importante, afetando praticamente todas as fases do ciclo de vida. Os adultos são mariposas com aproximadamente 35 mm de envergadura e com cerca de 15 mm de comprimento do corpo. Este inseto possui hábito noturno, com fêmeas apresentando asas anteriores pardo-escuras e posteriores branco-acinzentadas e machos se diferenciam por manchas mais clara nas asas anteriores (Cruz 1995).

Na cultura do milho, o acasalamento ocorre cerca de três dias após a emergência e as fêmeas ovipositam preferencialmente nas folhas, tanto nas superfícies abaxial quanto adaxial (Ali *et al.* 1989, Beserra *et al.* 2002). Cada fêmea pode ovipositar mais de 1.000 ovos, durante todo o seu período de oviposição, com massas de até 911 ovos (Cruz *et al.* 1999, Barros *et al.* 2010). O período de incubação varia de três a cinco dias, dependendo da temperatura, e quanto à coloração dos ovos, estes são inicialmente verde-claros, passando a alaranjados após doze a quinze horas, tornando-se escurecidos próximo à eclosão das lagartas (Cruz 1995). Após a eclosão, as lagartas alimentam-se raspando o limbo foliar e, posteriormente, dispersam para o cartucho da planta, onde se alimentam perfurando as folhas jovens, causando o sinal de “folhas raspadas”. A partir deste momento, atacam todas as folhas centrais da região do cartucho, podendo destruí-lo totalmente, até completarem a fase larval (Cruz 1995, Barros *et al.* 2010).

Dependendo do hospedeiro, o período de desenvolvimento larval de *S. frugiperda* pode variar de 12,9 a 22,3 dias (Giolo *et al.* 2002, Barros *et al.* 2010). Prestes a empupar, a lagarta abandona o cartucho e desce para formar a pupa no solo próximo a base da planta, permanecendo até a emergência do adulto. O período pupal também varia em função de diferentes dietas, podendo alcançar 13 dias (Giolo *et al.* 2002).

1.3.2. Manejo

Fatores como inúmeros hospedeiros, grande capacidade de dispersão e localização da lagarta (dentro do cartucho) contribuem para a redução da eficácia do manejo da lagarta-do-cartucho. O controle químico, principal medida empregada para evitar que os prejuízos atinjam o nível de dano econômico, muitas vezes não tem a eficácia desejada e apresenta alto custo, pois geralmente são necessárias várias aplicações como 10 a 14 vezes na cultura do milho no Brasil (Dequech *et al.* 2007).

Apesar dos benefícios, o controle químico pode contaminar os grãos deixando resíduos nos alimentos podendo causar problemas de saúde pública e ambientais. Os agrotóxicos utilizados no controle de pragas de milho podem prejudicar a entomofauna benéfica, impedindo que o controle biológico natural atue, favorecendo a ressurgência e o surgimento de novas pragas. Além disso, existem várias pesquisas relatando a evolução da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas sintéticos (Diez-Rodríguez & Omoto 2001, Morillo & Notz 2001, Yu 2006).

Devido a estes fatores, a busca por alternativas que possam minimizar ou até mesmo substituir os inseticidas convencionais foi intensificada e novas táticas abrangem uma série de alternativas como plantas resistentes, inseticidas seletivos, uso de feromônio sexual, parasitóide e microrganismos entomopatogênicos (Malo *et al.* 2001, Dequech *et al.* 2004, Barreto *et al.* 2005, Busato *et al.* 2006, Murúa *et al.* 2009), bem como plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas de *B. thuringiensis* para o controle da *S. frugiperda* e outros lepidópteros pragas do milho (Fernandes *et al.* 2003).

Entre os microrganismos entomopatogênicos, o *B. thuringiensis* destaca-se pela sua ampla utilização no combate dos insetos-pragas, especialmente lepidópteros. Entretanto, as espécies do gênero *Spodoptera* são pouco suscetíveis à maioria das δ -endotoxinas (Garczynski *et al.* 1991, Aranda *et al.* 1996, Luttrell *et al.* 1999, Monnerat *et al.* 2006, Santos

et al. 2009), sendo estes insetos de difícil controle por não serem sensíveis as linhagens comerciais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Moar *et al.* 1990, Garczynski *et al.* 1991, Bohorova *et al.* 1997, Sena *et al.* 2009).

A dificuldade em encontrar linhagens de *B. thuringiensis* ativas contra *S. frugiperda* tem sido relatada por várias pesquisas. Loguercio *et al.* (2001), avaliaram a atividade inseticida de 3.408 isolados de *B. thuringiensis* contra larvas de primeiro instar de *S. frugiperda* e conseguiram obter apenas 3,3% dos isolados causando mortalidade acima de 75%. Monnerat *et al.* (2007), avaliaram a toxicidade de 1.400 isolados de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda* e constataram que menos de 2% foram 100% ativos. Santos *et al.* (2009), em bioensaios seletivos, testaram 100 estirpes de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda* e apenas sete apresentaram toxicidade acima de 70%.

Processos biotecnológicos, utilizando-se da tecnologia do DNA recombinante, a qual permite a introdução de genes exógenos em um determinado organismo, possibilitaram a obtenção de plantas geneticamente modificadas e têm-se mostrado uma alternativa promissora com a inserção e expressão de genes *cry* em plantas atacadas por esse inseto. Plantas transgênicas apresentam vantagens em relação ao uso de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, tais como a persistência no meio ambiente e a proteção relacionada à degradação por raios UV (Schnepf *et al.* 1998, Riesenman & Nicholson 2000).

O controle de *S. frugiperda* utilizando a tecnologia do DNA recombinante não teve no início o sucesso esperado, devido às primeiras plantas transgênicas, como algodão e milho, expressarem as proteínas Cry1Ac (Jouanin *et al.* 1998, Schuler *et al.* 1998), que é pouco tóxica para *S. frugiperda* (Adamczyk Jr. & Sumerford 2001, Perlak *et al.* 2001) e Cry1Ab (Jouanin *et al.* 1998, Schuler *et al.* 1998), que exerce apenas controle parcial sobre *S. frugiperda* (Adamczyk Jr. & Mahaffey 2008). A tolerância de *S. frugiperda* tem sido relatada em cultivo de plantas transgênicas (Williams *et al.* 1997, Abel & Adamczyk Jr. 2004), sendo

necessário aumentar o nível de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, a inserção de genes piramidados para expressão também de proteínas como Cry1F tanto no algodão como no milho (Adamczyk Jr. & Gore 2004, Buntin 2008) ou ainda, pulverizações suplementares de inseticidas (Adamczyk Jr. *et al.* 2004), para auxiliar no controle desse inseto. Desta forma, a busca por novos isolados que apresentem atividade a esta espécie de inseto tem sido uma constante, para um manejo mais eficiente de *S. frugiperda*.

1.4 Caracterização do problema e objetivo

No Brasil, alguns trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter isolados de *B. thuringiensis* com atividade entomopatogênica (Regis *et al.* 2000, Valicente & Barreto 2003, Polanczyk *et al.* 2004, Vilas-Bôas & Lemos 2004, Medeiros *et al.* 2005, Araújo *et al.* 2007). Na região Nordeste os levantamentos têm sido muito restritos a *Bacillus* com atividade a insetos vetores de doenças (Regis *et al.* 2000, Medeiros *et al.* 2005, Araújo *et al.* 2007), com poucos trabalhos direcionados a busca de isolados ativos a pragas agrícolas em alguns estados do Nordeste (Valicente & Barreto 2003, Vilas-Bôas & Lemos 2004, Polanczyk *et al.* 2004). Em virtude da região Nordeste ser pouco explorada nesse sentido, e por ser formada por uma grande diversidade de ecossistemas, acredita-se que essa região apresenta um alto potencial em conter estirpes de *B. thuringiensis* com alta atividade entomopatogênica.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi inicialmente isolar e caracterizar isolados de *B. thuringiensis* oriundos de amostras de solos e de insetos infectados naturalmente, obtidos em diversas áreas de estados do Nordeste do Brasil, para aplicação em programas de controle de insetos-pragas de importância agrícola. Em consequência, a construção e manutenção de um banco de *Bacillus* spp. irá permitir posteriormente a prospecção de novos genes com potencial para controle de outros insetos, seja através de formulações ou de inserção em plantas através de engenharia genética.

Literatura citada

- Abel, C.A. & J.J. Adamczyk Jr. 2004.** Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. *J. Econ. Entomol.* 97: 1737-1744.
- Adamczyk Jr., J.J. & D.V. Sumerford. 2001.** Potential factors impacting season-long expression of Cry1Ac in 13 commercial varieties of Bollgard[®] cotton. *J. Insect. Sci.* 1: 1-6.
- Adamczyk Jr., J.J. & J. Gore. 2004.** Laboratory and field performance of cotton containing Cry1Ac, Cry1F, and both Cry1Ac and Cry1F (Widestrike[®]) against beet armyworm and fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomol.* 87: 427-432.
- Adamczyk Jr., J.J. & J.S. Mahaffey. 2008.** Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests. *Fla. Entomol.* 91: 570-575.
- Adamczyk Jr., J.J., R. William & J. Meredith. 2004.** Genetic bases for viability of Cry1Ac expression among commercial transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) cotton cultivars in the United States. *J. Insect. Sci.* 8: 17-23.
- Ali, A., R.G. Lutell, H.N. Pitre & F.M. Davis. 1989.** Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. *Environ. Entomol.* 18: 881-885.
- ANDEF – Associação Nacional de Defesa Vegetal. 2009.** Tecnologia em primeiro lugar: O Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. *Rev. Defesa Vegetal* 5: 16-17.
- Andrahennadi, R. & C. Gillott. 1998.** Resistance of brassica, especially *B. juncea* (L.) Czern, genotypes to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Crop Prot.* 17: 85-94.
- Angus, T.A. 1956.** Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of *Bacillus sotto* Ishiwata. *Can. J. Microbiol.* 2: 122-131.
- Aranda, E., J.A. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca & A. Bravo. 1996.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212.
- Araújo, A.P., M.A.V.M. Santos, S.O. Carlos, E.M. Rios, L. Regis. 2007.** Evaluation of a new experimental product based on *Bacillus thuringiensis* sorovar. *Israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera: Culicidae). *Biol. Control* 41: 339-347.
- Aronson, A. 2002.** Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell Mol. Life Sci.* 59: 417-425.
- Aronson, A.I., W. Beckman & P. Dunn. 1986.** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.

- Aronson, J.N. & F.M. Thompson. 1971.** *Bacillus thuringiensis* sporulation at suboptimal temperature. J. Bacteriol. 105: 445-448.
- Arora, N., A. Selvapandiyar, N. Agrawal & R.K. Bhatnagar. 2003.** Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 310: 158-162.
- Baek, J.H., J.I. Kim, D.W. Lee, B.K. Chung, T. Miyata & S.H. Lee. 2005.** Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. Pestic. Biochem. Physiol. 81: 164-175.
- Baig, D.N., D.A. Bukhari & A.R. Shakoori. 2010.** *cry* Genes profiling and the toxicity of isolates of *Bacillus thuringiensis* from soil samples against american bollworm, *Helicoverpa armigera*. J. Appl. Microbiol. 109: 1967-1978.
- Ballester, V., F. Granero, B.E. Tabashnik, T. Malvar & J. Ferre. 1999.** Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 65: 1413-1419.
- Barreto, M.R., C.T. Guimaraes, F.F. Teixeira, E. Paiva & F.H. Valicente. 2005.** Effect of *Baculovirus spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. Neotrop. Entomol. 34: 67-75.
- Barros, E.M., J.B. Torres & A.F. Bueno. 2010.** Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. Neotrop. Entomol. 39: 996-1001.
- Barros, R. & J.D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). An. Soc. Entomol. Bras. 28: 469-476.
- Barros, R., I.B.J. Alberto, A.J. Oliveira, A.C.F. Souza & V. Lopes. 1993.** Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em repolho. An. Soc. Entomol. Bras. 22: 463-469.
- Barton, K.A., H.R. Whiteley & N.S. Yang. 1987.** *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Pl. Physiol. 85: 1103-1109.
- Bechtel, D.B. & L.A. Bulla. 1976.** Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol. 127: 1472-1481.
- Beegle, C.C. & T. Yamamoto. 1992.** Invitation paper (c.p. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. Can. Entomol. 124: 587-616.
- Ben-Dov, E., Q. Wang, A. Zaritsky, R. Manasherob, Z. Barak, B. Schneider, A. Khamraev, M. Baizhanov, V. Glupov & Y. Margalith. 1999.** Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3714-3716.

- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers & H.D. Burges. 1997.** Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70: 59-68.
- Beron, C.M., L. Curatti & G.L. Salerno. 2005.** New strategy for identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 761-765.
- Beserra, E.B., C.T.S. Dias & J.R.P. Parra. 2002.** Distribution and natural parasitism of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) eggs at different phenological stages of corn. *Fla. Entomol.* 85: 588-593.
- Betz, F.S., B.G. Hammond & R.L. Fuchs. 2000.** Safety and advances of *Bacillus thuringiensis*-Protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32:156-173.
- Bhattacharya, R.C., N. Viswakarma, S.R. Bhat, P.B. Kirti & V.L. Chopra. 2002.** Development of insect-resistant transgenic cabbage plants expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Sci.* 83: 146-150.
- Bizzarri, M.F. & A.H. Bishop. 2008.** The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microb. Ecol.* 56:133-139.
- Bobrowski, V.L., L.M. Fiuza, G. Pasquali & M.H. Bodanese-Zanettini. 2003.** Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Cienc. Rural* 33: 843-850.
- Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo. 1997.** Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412-415.
- Boonserm, P., P. Davis, D.J. Ellar & J. Li. 2005.** Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348: 363-382.
- Boonserm, P., M. Mo, C. Angsuthanasombat & J. Lescar. 2006.** Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188: 3391-3401.
- Bourque, S.N., J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie & R.C. Levesque. 1993.** Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523-527.
- Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, K.D. Biever & L.S. Bauer. 1995.** The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 162-173.
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.

- Bravo, A., K. Hendrickx, S. Jansens & M. Peferoen. 1992.** Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran mudgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 247-253.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Pena, M.E. Nunez-Valdez, M. Soberon & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Buntin, G.D. 2008.** Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. *Fla. Entomol.* 91: 523-530.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo & A.F. Martins. 2002.** Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. *Neotrop. Entomol.* 31: 525-529.
- Busato, G.R., A.D. Grutzmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo, G.J. Stefanello Júnior & M.J. Zotti. 2004.** Preferência para alimentação de biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por milho, sorgo, arroz e capim-arroz. *R. Bras. Agrociência* 10: 215-218.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, M.J. Zotti, S.D. Nörnberg, T.R. Magalhães & J.B. Magalhães. 2006.** Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. *Cienc. Rural* 36: 15-20.
- Calogero, S., A.M. Albertini, C. Fogher, R. Marzari & A. Galizzi. 1989.** Expression of a cloned *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 446-453.
- Campos, W.G., J.H. Schoereder & M.C. Picanço. 2003.** Performance of an oligophagous insect in relation to the age of the host plant. *Neotrop. Entomol.* 32: 671-676.
- Capinera, J.L. 2008.** Encyclopedia of entomology. Dordrecht, Springer, 4346p.
- Carlson, C.R., D.A. Caugant & A.B. Kolsto. 1994.** Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1719-1725.
- Castelo Branco, M. & M.A. Medeiros. 2001.** Impacto de inseticidas sobre parasitóides da traça-das-crucíferas em repolho, no Distrito Federal. *Pesqu. Agropec. Bras.* 36: 07-13.
- Castelo Branco, M., F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001.** Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. *Hortic. Bras.* 19: 60-63.

- Castelo Branco, M., F.H. França, L.A. Pontes & P.S.T. Amaral. 2003.** Avaliação da suscetibilidade a inseticidas de populações da traça-das-crucíferas de algumas áreas do Brasil. *Hortic. Bras.* 21: 549-552.
- Chagas Filho, N.R., A.L. Boiça Jr & T.F. Alonso. 2010.** Biologia de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) em cultivares de couve-flor. *Neotrop. Entomol.* 39: 253-259.
- Chang, Y.H., Y.H. Shangkuan, H.C. Lin & H.W. Liu. 2003.** PCR assay of the groEL gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4502-4510.
- Chapman, J.W., D.R. Reynolds, A.D. Smith, J.R. Riley, D.E. Pedgley & I.P. Woiwod. 2002.** High-altitude migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* to the U.K.: a study using radar, aerial netting, and ground trapping. *Ecol Entomol* 27: 641-650.
- Chatterjee, S.N., T. Bhattacharya, T.K. Dangar & G. Chandra. 2007.** Ecology and diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil environment. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 1587-1591.
- Cherif, A., L. Brusetti, S. Borin, A. Rizzi, A. Boudabous, H. Khyami-Horani & D. Daffonchio. 2003.** Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1108-1119.
- CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia. 2010.** Brasil passa a ser o segundo maior produtor de transgênicos do mundo. Disponível em: http://www.cib.org.br/em_dia.php?id=1252. Acesso 05/01/2011.
- Cortez, M.G.R. & J.M. Waquil. 1997.** Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. *An. Soc. Entomol. Bras.* 26: 407-410.
- Côté, J.C., C. Vincent, K.H. Son & S.H. Bok. 2001.** Persistence of insecticidal activity of novel bio-encapsulated formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Phytoprotection* 82: 73-82.
- Crecchio, C. & G. Stotzky. 1998.** Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. Biochem.* 30: 463-470.
- Crecchio, C. & G. Stotzky. 2001.** Biodegradation and insecticidal activity of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* bound on complexes of montmorillonite-humic acids-Al hydroxypolymers. *Soil Biol. Biochem.* 33: 573-581.
- Crema, A. & M. Castelo Branco. 2004.** Impacto da temperatura e fotoperíodo no desenvolvimento ovariano e oviposição de traça-das-crucíferas. *Hortic. Bras.* 22: 305-308.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum & D.H. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.

- Crickmore, N., D. Zeigler, A. Bravo, J. Feitelson, E. Schnepf, D. Lereclus, J. Baum, J. Van Rie & D. Dean. 2011.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em 18/01/2011.
- Cruz, I. 1995.** A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, Embrapa milho e sorgo, 45p. (Circular Técnica 21).
- Cruz, I., M.L.C. Figueiredo, A.C. Oliveira & C.A. Vasconcelos. 1999.** Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. *Int. J. Pest Manage.* 45: 293-296.
- Daffonchio, D., A. Cherif & S. Borin. 2000.** Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "*Bacillus cereus* group". *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5460-5468.
- Damgaard, P.H. 2000.** Natural occurrence and dispersal of *Bacillus thuringiensis* in the environment, p. 23-40. In J.F. Charles, A. Delécluse & C. Nielsen-LeRoux (eds.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht, Kluwer Academic, 529p.
- de Barjac, H. & A. Bonnefoi. 1962.** Essai de classification biochimique et sorologique de 24 souche de *Bacillus* du type *Bacillus thuringiensis* *Entomophaga* 7: 5-31.
- de Barjac, H. & E. Frachon. 1990.** Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *BioControl* 35: 233-240.
- de Maagd, R., A. Bravo & N. Crickmore. 2001.** How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-199.
- de Maagd, R.A., D. Bosch & W. Stiekema. 1999.** *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 9-13.
- de Maagd, R.A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore & H.E. Schnepf. 2003.** Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-433.
- Denolf, P., K. Hendrickx, J. Vandamme, S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele & J. van Rie. 1997.** Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 248: 748 - 761.
- Dequech, S.T.B., R.F.P. Silva & L.M. Fiuza. 2004.** Ocorrência de parasitóides de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lep., Noctuidae) em lavouras de milho em Cachoeirinha, RS. *Cienc. Rural* 34: 1235-1237.
- Dequech, S.T.B., L.M. Fiuza, R.F.P.d. Silva & R.C. Zumba. 2007.** Histopatologia de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae) infectadas por *Bacillus thuringiensis aizawai* e com ovos de *Campoletis flavicincta* (Hym., Ichneumonidae). *Cienc. Rural* 37: 273-276.

- Diez-Rodríguez, G.I. & C. Omoto. 2001.** Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. *Neotrop. Entomol.* 30: 311-316.
- Drobniewski, F.A. 1993.** *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 324-338.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig & M.G. Koziel. 1996.** Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA* 93: 5389-5394.
- Feitelson, J.S., J. Payne & L. Kim. 1992.** *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Nat. Biotechnol.* 10: 271-275.
- Fernandes, O.D., J.R.P. Parra, A.F. Neto, R. Pícoli, A.F. Borgatto & C.G.B. Demétrio. 2003.** Efeito do milho geneticamente modificado MON810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Bras. Milho Sorgo* 2: 25-35.
- Ferreira, L.H.P.L., M.T. Suzuki, E.N. Itano, M.A. Ono & O.M.N. Arantes. 2003.** Ecological aspects of *Bacillus thuringiensis* in an oxisol. *Sci. Agric.* 60: 19-22.
- Fischhoff, D.A., K.S. Bowdish, F.J. Perlak, P.G. Marrone, S.M. McCormick, J.G. Niedermeyer, D.A. Dean, K. Kusano-Kretzmer, E.J. Mayer, D.E. Rochester, S.G. Rogers & R.T. Fraley. 1987.** Insect tolerant transgenic tomato plants. *Nat. Biotechnol.* 5: 807-813.
- Fiúza, L.M. & L.M.N. Pinto. 2009.** Plantas transgênicas que sintetizam toxinas de *Bacillus thuringiensis* e outras. *Rev. Biotecnol. Cienc Desenvol.* 38: 62-67.
- Galitsky, N., V. Cody, A. Wojtczak, D. Ghosh, J.R. Luft, W. Pangborn & L. English. 2001.** Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57: 1101-1109.
- Garczynski, S.F., J.W. Crim & M.J. Adang. 1991.** Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2816-2820.
- Giolo, F.P., A.D. Grutzmcher, M.S. Garcia & G.R. Busato. 2002.** Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. *Rev. Bras. Agric.* 8: 219-224.
- Gobatto, V., S. Giani, M. Camassola, A. Dillon, A. Specht & N. Barros. 2010.** *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Biol.* 70: 1039-1046.
- Golizadeh, A., K. Kamali, Y. Fathipour & H. Abbasipour. 2009.** Life table of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on five cultivated brassicaceous host plants. *J. Agric. Sci. Technol.* 11: 115-124.

- Gómez, I., L. Pardo-López, C. Muñoz-Garay, L.E. Fernandez, C. Pérez, J. Sánchez, M. Soberón & A. Bravo. 2007.** Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* 28: 169-173.
- Gould, F. 1998.** Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 701-726.
- Granero, F., V. Ballester & J. Ferré. 1996.** *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 779-783.
- Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau & M. Cygler. 1995.** *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- Guilloux, T., R. Monnerat, M. Castelo Branco, A. Kirk & D. Bordat. 2003.** Population dynamics of *Plutella xylostella* (L. Yponomeutidae) and its parasitoids in the region of Brasilia. *J. Appl. Entomol.* 127: 288-292.
- Habib, M.E.M. & C.E.S. Andrade. 1998.** Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Hannay, C.L. 1953.** Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature* 172: 1004.
- Hansen, B.M. & S. Salamiou. 2000.** Virulence of *Bacillus thuringiensis*, p. 41-64. In J.F. Charles, A. Delécluse & C. Nielsenle-Roux (eds.), *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Amsterdam, Kluwer Academic Publishers, 529p.
- Hansen, B.M., P.H. Damgaard, J. Eilenberg & J.C. Pedersen. 1998.** Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 106-114.
- Haseeb, M., Y. Kobori, H. Amano & H. Nemoto. 2001.** Population density of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and its parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) on two varieties of cabbage in an urban environment. *Appl. Entomol. Zool.* 36: 353-360.
- Heimpel, A.M. & T.S. Angus. 1960.** Bacterial insecticides. *Bacteriol. Rev.* 29: 266-288.
- Helgason, E., D.A. Caugant, I. Olsen & A.B. Kolsto. 2000.** Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1615-1622.
- Henderson, I., Y. Dongzheng & P.C.B. Turnbull. 1995.** Differentiation of *Bacillus anthracis* and other '*Bacillus cereus* group' bacteria using IS231-derived sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 113-118.

- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. Van Rie, S. Jansens & H. Van Mellaert. 1988.** Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7844-7848.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- Huang, K.X., M. Badger, K. Haney & S.L. Evans. 2007.** Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. Protein Expr. Purif. 53: 325-330.
- Imenes, S.D.L., C.T. B, R.N.S. M & B.E. C. 2002.** Avaliação da atratividade de feromônio sexual sintético da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em cultivo orgânico de repolho. Arq. Inst. Biol. 69: 81-84.
- Iriarte, J., M. Porcar, M. Lecadet & P. Caballero. 2000.** Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. Curr. Microbiol. 40: 402-408.
- Itoua-Apoyolo, C., L. Drif, J. Vassal, H. DeBarjac, J. Bossy, F. Leclant & R. Frutos. 1995.** Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the european sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4343-4347.
- James, C. 2009.** Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2009 the first fourteen years, 1996 to 2009. Disponível em: <http://croplife.intraspain.com/Biotech/global-status-of-commercialized-biotech-gm-crops-2009-the-first-fourteen-years-1996-to-2009/>. Acesso em 16/12/2010.
- Jenkins, J.N., J.C. McCarty Jr., R.E. Buehler, J. Kiser, C. Williams & T. Wofford. 1997.** Resistance of cotton with δ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on selected lepidopteran insects. Agron. J. 89: 768-780.
- Jensen, G.B., B.M. Hansen, J. Eilenberg & J. Mahillon. 2003.** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. Environ. Microbiol. 5: 631-640.
- Johnson, D.E. & W.H. McGaughey. 1996.** Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. Curr. Microbiol. 33: 54-59.
- Jouanin, L., M. Bonadé-Bottino, C. Girard, G. Morrot & M. Giband. 1998.** Transgenic plants for insect resistance. Pl. Sci. 131: 1-11.
- Joung, K.B. & J.C. Côté. 2000.** A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*, 16p. (Technical Bulletin No. 29).
- Kalman, S., K.L. Kiehne, J.L. Libs & T. Yamamoto. 1993.** Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131-1137.

- Kwon, D.H., B.R. Choi, H.M. Park, S.H. Lee, T. Miyata, J.M. Clark & S.H. Lee. 2004.** Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80: 21-30.
- Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert & M. Peferoen. 1992.** Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2536-2542.
- Lecadet, M.M., E. Frachon, V.C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent & I. Thiéry. 1999.** Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 660-672.
- Lee, M.K., F.S. Walters, H. Hart, N. Palekar & J.S. Chen. 2003.** The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4648-4657.
- Li, J., J. Carroll & D.J. Ellar. 1991.** Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353: 815-821.
- Liang, Y., S.S. Patel & D.H. Dean. 1995.** Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. *J. Biol. Chem.* 270: 24719-24724.
- Liu, M., Q. Cai, H. Liu, B. Zhang, J. Yan & Z. Yuan. 2002.** Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J. Appl. Microbiol.* 93: 374-379.
- Liu, Y.-B., B.E. Tabashnik & M. Puzsai-Carey. 1996.** Field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 89: 798-804.
- Liu, Y.-B., B.E. Tabashnik, S.K. Meyer & N. Crickmore. 2001.** Cross-resistance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC in diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3216-3219.
- Loeb, M.J., P.A.W. Martin, R.S. Hakim, S. Goto & M. Takeda. 2001.** Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Insect Physiol.* 47: 599-606.
- Loguercio, Santos, Barreto, Guimaraes & Paiva. 2001.** 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. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 362-367.
- Loguercio, L., M. Barreto, T. Rocha, C. Santos, F. Teixeira & E. Paiva. 2002.** Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. *J. Appl. Microbiol.* 93: 269-277.

- Luo, K., B. Tabashnik & M. Adang. 1997.** Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to aminopeptidase in susceptible and resistant diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1024-1027.
- Luttrell, R.G. & J.S. Mink. 1999.** Damage to cotton fruiting structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Cotton Sci.* 3: 35-44.
- Luttrell, R.G., L. Wan & K. Knighten. 1999.** Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92: 21-32.
- Lynch, R.E., B.R. Wiseman, D. Plaisted & D. Warnick. 1999.** Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing CryIA(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 92: 246-252.
- Ma, G., M. Sarjan, C. Preston, S. Asgari & O. Schmidt. 2005.** Mechanisms of inducible resistance against *Bacillus thuringiensis* endotoxins in invertebrates. *Insect Sci.* 12: 319-330.
- Maeda, M., E. Mizuki, Y. Nakamura, T. Hatano & M. Ohba. 2000.** Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. *Curr. Microbiol.* 40: 418-422.
- Malo, E.A., L. Cruz-lopez, J. Valle-Mora, A. Virgen, J.A. Sanchez & J.C. Rojas. 2001.** Evaluation of commercial pheromone lures and traps for monitoring male fall armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) in the coastal region of Chiapas, Mexico. *Fla. Entomol.* 84: 659-664.
- Martin, P.A.W. & R.S. Travers. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- Martínez, C., J.E. Ibarra & P. Caballero. 2005.** Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. *J. Invertebr. Pathol.* 90: 91-97.
- Meadows, M.P. 1993.** *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment, p. 193-220. In P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey & S. Higgs (eds.), *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester, Wiley-Blackwell, 330p.
- Meadows, M.P., D.J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett & H.D. Burges. 1992.** Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1344-1350.
- Medeiros, F.P.M., M.A.V.M. Santos, L. Regis, E.M. Rios & P.J. Rolim Neto. 2005.** Development of a *Bacillus sphaericus* tablet formulation and its evaluation as a larvicide in the biological control of *Culex quinquefasciatus*. *Mem. Inst. Osw.* 100: 431-434.
- Michereff, M.F.F., E.F. Vilela, M.F. M & A. Mafra-Neto. 2000.** Uso do feromônio sexual sintético para captura de machos da traça-das-crucíferas. *Pesqu. Agropec. Bras.* 35: 1919-1926.

- Milne, R.E., A.S.D. Pang & H. Kaplan. 1995.** A protein complex from *Choristoneura fumiferana* gut-juice involved in the precipitation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 1101-1114.
- Miranda, J.E. & A.C.B. Ferreira. 2005.** Contra-ataque. Cad. Técn. Cultivar 72: 7-10.
- Moar, W.J., L. Masson, R. Brousseau & J.T. Trumble. 1990.** Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2480-2483.
- Monnerat, R. & A. Bravo. 2000.** Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência, p. 163-200. In I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.), Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 388p.
- Monnerat, R., E. Martins, P. Queiroz, S. Orduz, G. Jaramillo, G. Benintende, J. Cozzi, M.D. Real, A. Martínez-Ramirez, C. Rausell, J. Ceron, J.E. Ibarra, M.C. Del Rincon-Castro, A.M. Espinoza, L. Meza-Basso, L. Cabrera, J. Sanchez, M. Soberon & A. Bravo. 2006.** Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. Appl. Environ. Microbiol. 72: 7029-7035.
- Monnerat, R.G., A.C. Batista, P.T. de Medeiros, É.S. Martins, V.M. Melatti, L.B. Praça, V.F. Dumas, C. Morinaga, C. Demo, A.C.M. Gomes, R. Falcão, C.B. Siqueira, J.O. Silva-Werneck & C. Berry. 2007.** Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. Biol. Control 41: 291-295.
- Morillo, F. & A. Notz. 2001.** Resistência de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. Entomotropica 16: 79-87.
- Morse, R.J., T. Yamamoto & R.M. Stroud. 2001.** Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. Structure 9: 409-417.
- Murúa, M.G., M.-O. J & F. P. 2009.** Natural distribution of parasitoids of larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Argentina. J. Insect. Sci. 9: 1-17.
- Myasnik, M., R. Manasherob, E. Ben-Dov, A. Zaritsky, Y. Margalith & Z. Barak. 2001.** Comparative sensitivity to UV-B radiation of two *Bacillus thuringiensis* subspecies and other *Bacillus* sp. Curr. Microbiol. 43: 140-143.
- Navon, A. 2000.** *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection -- reality and prospects. Crop Prot. 19: 669-676.
- Noguera, P.A. & J.E. Ibarra. 2010.** Detection of new *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. Appl. Environ. Microbiol. 76: 6150-6155.
- Ohana, B., J. Margalit & Z. Barak. 1987.** Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. Appl. Environ. Microbiol. 53: 828-831.

- Oppert, B., K.J. Kramer, R.W. Beeman, D. Johnson & W.H. McGaughey. 1997.** Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.
- Park, H.W., D.K. Bideshi & B.A. Federici. 2003.** Recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* producing Cyt1A, Cry11B, and the *Bacillus sphaericus* binary toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1331-1334.
- Pashley, D.P. 1988.** Current status of fall armyworm host strains. *Fla. Entomol.* 71: 227-234.
- Perez, C.J. & A.M. Shelton. 1997.** Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *J. Econ. Entomol.* 90: 87-93.
- Perferoen, M. 1997.** Insect control with transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* crystal proteins, p. 21-48. In W. Carozzi & P. Koziel (eds.), *Advances in insect control: the role of transgenic plants*. Paris, CRC Press, 304p.
- Perlak, F.J., M. Oppenhuizen, K. Gustafson, R. Voth, S. Sivasupramaniam, D. Heering, B. Carey, R.A. Ihrig & J.K. Roberts. 2001.** Development and commercial use of Bollgard[®] cotton in the USA – early promises versus today's reality. *Plant J.* 27: 489-501.
- Pogue, G.M. 2002.** A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). *Mem. Am. Entomol. Soc.* 43: 1-202.
- Polanczyk, R.A. & S. Alves. 2003.** *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociencia* 7: 1-10.
- Polanczyk, R.A., R.F.P. Silva & L.M. Fiuza. 2004.** Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *R. Bras. Agric.* 10: 209-214.
- Ramachandran, S., G.D. Buntin, J.N. All, B.E. Tabashnik, P.L. Raymer, M.J. Adang, D.A. Pulliam & C.N. Stewart. 1998.** Survival, development, and oviposition of resistance diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on transgenic canola producing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Econ. Entomol.* 91: 1239-1244.
- Regev, A., M. Keller, N. Strizhov, B. Sneh, E. Prudovsky, I. Chet, I. Ginzberg, Z. Koncz-Kalman, C. Koncz, J. Schell & A. Zilberstein. 1996.** Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3581-3586.
- Regis, L., C.M.F. Oliveira, M.H. Silva-Filha, S.B. Silva, A. Maciel & A.F. Furtado. 2000.** Efficacy of *Bacillus sphaericus* in control of the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* in an urban area of Olinda, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94:488-492.
- Riesenman, P.J. & W.L. Nicholson. 2000.** Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 620-626.

- Sá, V.G.M.d., B.V.C. Fonseca, K.G.B. Boregas & J.M. Waquil. 2009.** Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotrop. Entomol.* 38: 108-115.
- Santos, K.B.d., P. Neves, A.M. Meneguim, R.B. dos Santos, W.J. dos Santos, G.V. Boas, V. Dumas, E. Martins, L.B. Praça, P. Queiroz, C. Berry & R. Monnerat. 2009.** Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 50: 157-163.
- Sayed, A.H. & D.J. Wright. 2001.** Cross-resistance and inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in diamondback moth (*Plutella xylostella* L) from lowland Malaysia. *Pest Manage. Sci.* 57: 413-421.
- Sayed, A.H., M.N.R. Attique & A. Khaliq. 2005.** Stability of field-selected resistance to insecticides in *Plutella xylostella* (Lep., Plutellidae) from Pakistan. *J. Appl. Entomol.* 129: 542-547.
- Sayed, A.H., R. Haward, S. Herrero, J. Ferre & D.J. Wright. 2000.** Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1509-1516.
- Sayed, A.H., B. Raymond, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche & D.J. Wright. 2004.** Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7010-7017.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Schnepf, H.E. & H.R. Whiteley. 1981.** Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 78: 2893-2897.
- Schuler, T.H., G.M. Poppy, B.R. Kerry & I. Denholm. 1998.** Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 16: 168-175.
- Sekar, V. & B.C. Carlton. 1985.** Molecular cloning of the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Gene* 33: 151-158.
- Sena, J.A.D., C.S. Hernandez-Rodriguez & J. Ferre. 2009.** Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins to *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 2236-2237.
- Shelton, A.M., S.L. Hatch, J.Z. Zhao, M. Chen, E.D. Earle & J. Cao. 2008.** Suppression of diamondback moth using Bt-transgenic plants as a trap crop. *Crop Prot.* 27: 403-409.

- Silva-Torres, C.S.A., I.V.A.F. Pontes, J.B. Torres & R. Barros. 2010.** New records of natural enemies of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) in Pernambuco, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 39: 835-838.
- Silva-Werneck, J.O., J.R.M.V. Abreu Neto, A.N. Tostes, L.O. Faria & J.M.C.S. Dias. 2000.** Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. *Pesq. Agropec. Bras.* 35: 221-227.
- Silva, V.C.A., R. Barros, E.J. Marques & J.B. Torres. 2003.** Suscetibilidade de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) aos fungos *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Neotrop. Entomol.* 32: 653-658.
- Smith, R.A. & G.A. Couche. 1991.** The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 311-315.
- Song, F., J. Zhang, A. Gu, Y. Wu, L. Han, K. He, Z. Chen, J. Yao, Y. Hu, G. Li & D. Huang. 2003.** Identification of cryII-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cryII-type gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5207-5211.
- Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G.M. Garrity, P.A. Grimont, P. Kampfer, M.C. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H.G. Truper, L. Vauterin, A.C. Ward & W.B. Whitman. 2002.** Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.
- Stephenson, G.R. 2003.** Pesticide use and world food production: risks and benefits, p. 261-270. In J.R. Coats & H. Yamamoto (eds.), *Environmental fate and effects of pesticides*. Washington, American Chemical Society, 300p.
- Swadener, C. 1994.** Insecticide fact sheet: *Bacillus thuringiensis* (B.t.). Disponível em: <http://www.mindfully.org/GE/Bacillus-thuringiensis-Bt.htm>. Acesso em 15/06/2008.
- Tabashnik, B.E. 1994.** Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N.I. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tabashnik, B.E., N. Finson, M.W. Johnson & W.J. Moar. 1993.** Resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* causes minimal cross-resistance to *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1332-1335.
- Tabashnik, B.E., N. Finson, M.W. Johnson & D.G. Heckel. 1994.** Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4627-4629.
- Tabashnik, B.E., Y. Liu, T. Malvar, D.G. Heckel, L. Masson & J. Ferré. 1998.** Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: uniform or diverse? *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 353: 1751-1756.

- Tabashnik, B.E., Y.B. Liu, T. Malvar, D.G. Heckel, L. Masson, V. Ballester, F. Granero, J.L. Ménsua & J. Ferré. 1997.** Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 94: 12780-12785.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology, and management of the diamondback moth. Annu. Rev. Entomol. 38: 275-301.
- Tamez-Guerra, P., M.R. McGuire, R.W. Behle, B.S. Shasha & L.J. Wong. 2000.** Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 93: 219-225.
- Tamez-Guerra, P., L.J. Galán-Wong, H. Medrano-Roldán, C. García-Gutiérrez, C. Rodríguez-Padilla, R.A. Gómez-Flores & R.S. Tamez-Guerra. 2001.** Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL 4: 143-152.
- Tanada, Y. & H.K. Kaya. 1993.** Bacterial infection: Bacillaceae, p. 81-122. In Y. Tanada & H.K. Kaya (eds.), Insect pathology. California, Academic Press, 666p.
- Tang, J., A. Shelton, J. Van Rie, S. De Roeck, W. Moar, R. Roush & M. Peferoen. 1996.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 62: 564-569.
- Thomas, D.J.I., J.A.W. Morgan, J.M. Whipps & J.R. Saunders. 2000.** Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 66: 118-124.
- Torres, A.L., R. Barros & J.V. Oliveira. 2001.** Efeito de extratos aquosos de plantas no desenvolvimento de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). Neotrop. Entomol. 30: 151-156.
- Travers, R.S., P.A. Martin & C.F. Reichelderfer. 1987.** Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1263-1266.
- Valicente, F.H. & M.R. Barreto. 2003.** *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 32: 639-644.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele & H. Van Mellaert. 1989.** Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. Eur. J. Biochem. 186: 239-247.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele & H. Van Mellaert. 1990.** Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1378-1385.
- Vilas-Bôas, G.T. & M.V.F. Lemos. 2004.** Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. Can. J. Microbiol. 50: 605-613.

- Vilas-Bôas, L.A., G.F. Vilas-Bôas, H.O. Saridakis, M.V.F. Lemos, D. Lereclus & O.M. Arantes. 2000.** Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. FEMS Microbiol. Ecol. 31: 255-259.
- Walker, D.R., J.N. All, R.M. McPherson, H.R. Boerma & W.A. Parrott. 2000.** Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 93: 613-622.
- Wang, G., J. Zhang, F. Song, J. Wu, S. Feng & D. Huang. 2006.** Engineered *Bacillus thuringiensis* GO33A with broad insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 924-930.
- Wayne, L.G. 1988.** International committee on systematic bacteriology: announcement of the report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Zentralbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene Abteilung A. 268: 433-434.
- Whalon, M.E., D. Mota-Sanchez & R.M. Hollingworth. 2008.** Global pesticide resistance in arthropods. Cambridge, CABI International, 169p.
- Whiteley, H.R. & H.E. Schnepf. 1986.** The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Microbiol. 40: 549-576.
- Wie, S.I., R.E. Andrews, Jr., B.D. Hammock, R.M. Faust & L.A. Bulla, Jr. 1982.** Enzyme-linked immunosorbent assays for detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of *Bacillus thuringiensis* subspp. *kurstaki* and *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol. 43: 891-894.
- Williams, W.P., J.B. Sagers, J.A. Hanten, F.M. Davis & P.M. Buckley. 1997.** Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. Crop Sci. 37: 957-962.
- Wu, D., X.L. Cao, Y.Y. Bai & A.I. Aronson. 1991.** Sequence of an operon containing a novel delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiol. Lett. 81: 31-35.
- Yang, J.C., Y.I. Chu & N. Talekar. 1994.** Studies on the characteristics of parasitism of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae) by a larval parasite *Diadegma semiclausum* (Hym.: Ichneumonidae). BioControl 39: 397-406.
- Ye, G.Y., Q.Y. Shu, H.W. Yao, H.R. Cui, X.Y. Cheng, C. Hu, Y.W. Xia, M.W. Gao & I. Altosaar. 2001.** Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. J. Econ. Entomol. 94: 271-276.
- Yu, C., M. Mullins, G. Warren, M. Koziel & J. Estruch. 1997.** The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 532-536.

- Yu, S.J. 2006.** Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.* 84: 135-142.
- Zago, H.B. 2008.** Manejo de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): Parasitismo por *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera.: Trichogrammatidae) e susceptibilidade de populações a *Bacillus thuringiensis* Berliner. Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 88p.
- Zhao, J.Z., G.R. Zhu, Z.L. Zhu & W.Z. Wang. 1993.** Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in China. *Resist. Pest. Manage.* 5: 11-12.
- Zhao, J.Z., Y.X. Li, H.L. Collins, J. Cao, E.D. Earle & A.M. Shelton. 2001.** Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C. *J. Econ. Entomol.* 94: 1547-1552.

CAPÍTULO 2

ISOLAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DO NORDESTE
BRASILEIRO E SUA ATIVIDADE A *Plutella xylostella* (L. 1758) E *Spodoptera frugiperda*
(J.E. SMITH 1797)¹

MARIA C. SILVA², HERBERT A. A. SIQUEIRA², EDMILSON J. MARQUES², REGINALDO BARROS²,
LILIANE M. SILVA², JOSÉ V. M. LIMA FILHO³ & SUZANA M. F. A. SILVA²

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois
Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

³Departamento de Biologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900
Recife, PE, Brasil.

¹Silva, M.C., H.A.A. Siqueira, E.J. Marques, R. Barros, L.M. Silva, J.V.M. Lima Filho, S.M.F.A Silva. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) do Nordeste brasileiro e sua atividade a *Plutella xylostella* (L. 1758) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797). Submetido a Biological Control.

RESUMO – *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) são consideradas as principais pragas das culturas brássicas e milho (*Zea mays* L.). A região Nordeste tem sido pouco explorada na busca de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) para o controle dessas pragas. Dessa forma, esta pesquisa objetivou isolar *B. thuringiensis* a partir de amostras de solo de insetos coletadas em estados do Nordeste e avaliar a atividade tóxica e de inibição larval destes isolados em larvas neonatas de *P. xylostella* e de *S. frugiperda*. Cento e quatro isolados foram utilizados nos bioensaios e visibilizados quanto à presença de cristais. O cristal bipiramidal predominou em 31% dos isolados, seguido de esférico e cubóide. Nos testes de patogenicidade, 13 e 20 isolados causaram respectivamente mortalidade e inibição do crescimento larval >30% a *P. xylostella*, enquanto que 20 e 52 isolados causaram respectivamente mortalidade e inibição do crescimento larval >30% a *S. frugiperda*. A razão da toxicidade do isolado LIIT-4311 para *P. xylostella* foi de 0,60 e 1,30 vezes quando comparada com *Btk* e *Bta*, respectivamente. Para *S. frugiperda*, os isolados LIIT-4311, LIIT-4306 e LIIT-4406 foram mais ativos do que o *Bta*. Os isolados LIIT-4311 e LIIT-4306 causaram altas taxas de inibição de crescimento larval a *P. xylostella* e *S. frugiperda*. Os resultados sugerem que ambientes nordestinos apresentam grande potencial para bioprospecção de bactérias como *B. thuringiensis*, promissoras para o desenvolvimento de produtos com uso em programas de manejo de pragas.

PALAVRAS-CHAVE: Bioprospecção, bactéria entomopatogênica, traça-das-crucíferas, lagarta-do-cartucho

ISOLATION OF *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) FROM NORTHEAST BRAZIL AND ITS ACTIVITY TO *Plutella xylostella* (L. 1758) AND *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH 1797)

ABSTRACT - *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) are respectively the major pests of brassica and maize (*Zea mays* L.) crops in Brazil. The Northeast has been little explored in the search for *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) for controlling these pests. Thus, this research aimed to isolate *B. thuringiensis* from soil and insects samples collected in northeastern states and to assess the toxic activity and larval growth inhibition from these isolates against *P. xylostella* and *S. frugiperda*. One hundred and four isolates were used in bioassays and visualized for the presence of crystals. The bipyramidal crystal prevailed in 31% of the isolates, followed by spherical and cuboid. In pathogenicity tests, 13 and 20 isolates caused respectively > 30% mortality and larval growth inhibition to *P. xylostella*, while 20 and 52 isolates caused respectively > 30% mortality and larval growth inhibition to *S. frugiperda*. The toxicity ratio of the LIIT-4311 isolate for *P. xylostella* was 0.60 and 1.30 times when compared with *Btk* and *Bta*, respectively. For *S. frugiperda*, the LIIT-4311, LIIT-4306, and LIIT -4406 isolates were more active than the *Bta*. The LIIT-4311 and LIIT-4306 Isolates caused high rates of larval growth inhibition to *P. xylostella* and *S. frugiperda*. Results suggest that northeastern environments have great potential for bacteria bioprospection, such as *B. thuringiensis*, to develop products for use in pest management programs.

KEY WORDS: Bioprospection, entomopathogenic bacteria, diamondback moth, fall armyworm, pathogenicity

Introdução

Entre os principais problemas que interferem na produtividade de culturas de importância econômica como brássicas e milho (*Zea mays* L.), destaca-se o ataque de insetos-pragas. A *Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), mais conhecida como a traça-das-crucíferas, ocasiona prejuízo de 42,2 milhões de toneladas às culturas de brássicas em todo mundo, com custo médio anual de controle acima de um bilhão de dólares (Talekar & Shelton 1993). A *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como a lagarta-do-cartucho, tem acarretado perdas significativas à cultura de milho, seu principal hospedeiro, com até 60% de perdas na produção de grão e grau de infestação variando de 25 até 100%, devido a sua grande ocorrência em áreas de produção (ANDEF 2009).

No Brasil, a *P. xylostella* ocorre ao longo do ano, causando prejuízos, particularmente em repolho, que variam de 58 a 100% na qualidade final do produto, e seu controle pode atingir até 30% dos custos totais da produção (Barros *et al.* 1993, Castelo Branco *et al.* 2001), inviabilizando a produção dessa hortaliça, que tem seu cultivo tanto de subsistência como em escala comercial. A *S. frugiperda*, além de causar prejuízos na cultura do milho, tem ocasionado perda nas culturas do arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (Busato *et al.* 2002, Sá *et al.* 2009, Barros *et al.* 2010b). Além disso, vem se tornando uma praga preocupante para a cultura da soja, devido à crescente exposição da cultura à pressão populacional desse inseto (Sá *et al.* 2009, Barros *et al.* 2010a).

Além do uso de inseticidas sintéticos, os biológicos à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) têm sido utilizados como uma alternativa para redução populacional de *P. xylostella* e *S. frugiperda*. No entanto, o uso contínuo desse microrganismo tem selecionado populações resistentes de *P. xylostella* em

várias regiões do mundo (Tabashnik *et al.* 1990, Syed 1992, Zhao *et al.* 1993, Perez & Shelton 1997). Wright *et al.* (1997) relataram pela primeira vez, altos níveis de resistência tanto para *B. thuringiensis* var. *kurstaki* quanto para *B. thuringiensis* var. *aizawai* em população de campo de *P. xylostella* na Malásia. No Brasil, casos de resistência de populações de *P. xylostella* a formulações comerciais de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®] WP) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari[®] WDG) foram recentemente relatados (Zago 2008).

Populações de *S. frugiperda* apresentam tolerância natural a alguns produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* (Lambert *et al.* 1996, Luttrell *et al.* 1999), resultando em baixa eficiência de controle (Martínez *et al.* 2004, Santos *et al.* 2009). No entanto, algumas toxinas de *B. thuringiensis* que apresentam boa atividade a *S. frugiperda* têm sido usadas na transformação de plantas transgênicas para o controle desta praga como a toxina Cry1F (Buntin 2008). Contudo, em algumas áreas, populações de *S. frugiperda* mostraram baixa suscetibilidade ao milho transgênico transformado com essa toxina (Storer *et al.* 2010), o que sugere resistência ou ineficácia da toxina expressada. O algodão transgênico, que expressa a toxina Cry1Ac, não é efetivo contra a *S. frugiperda* (Jouanin *et al.* 1998, Schuler *et al.* 1998), pois a proteína é considerada pouco tóxica para esta praga (Garczynski *et al.* 1991, Luttrell *et al.* 1999, Santos *et al.* 2009). E, a toxina Cry1Ab expressa em plantas de milho exerce apenas controle parcial à *S. frugiperda* (Adamczyk Jr. & Mahaffey 2008). Em ambos os casos, o uso de outras toxinas que não apresentem resistência cruzada no mesmo evento é de particular interesse para se alcançar uma eficácia maior, processo conhecido como piramidação de proteínas (Milach & Cruz 1997).

Este panorama revela a importância de continuar buscando por novos isolados que contenham toxinas que apresentem alta atividade a pragas como *P. xylostella* e *S. frugiperda* particularmente no Nordeste brasileiro onde a maioria dos agricultores não tem acesso a

tecnologias mais eficientes e baratas. Além disso, a descoberta de novas toxinas podem ainda representar novas fontes de recursos genéticos para o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas em engenharia genética com os genes de toxinas de *B. thuringiensis*, através da inserção destes em plantas de interesse agrícola. No Brasil, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter isolados de *B. thuringiensis* (Valicente & Barreto 2003, Polanczyk *et al.* 2004, Gobatto *et al.* 2010). No Nordeste, porém, os levantamentos têm sido restritos aos *Bacillus* com atividade ao grupo dos insetos vetores de doenças ou amostras pouco representativas têm sido testadas a pragas agrícolas (Silva-Werneck *et al.* 2000, Vilas-Bôas & Lemos 2004, Gobatto *et al.* 2010). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo o isolamento de *B. thuringiensis*, oriundos de amostras de solos não cultivados e de insetos naturalmente infectados, obtidos em áreas de estados do Nordeste Brasileiro, para aplicação em programas de controle de *P. xylostella* e *S. frugiperda*. Adicionalmente, a manutenção de um banco de *B. thuringiensis* no Laboratório de Interação Inseto-Tóxico (LIIT) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) irá permitir prospecção posterior de novos genes com potencial para controle de outros insetos, seja através de formulações ou de inserção em plantas através de engenharia genética.

Material e Métodos

Coleta das Amostras de Solo e Insetos. Quarenta e cinco amostras foram obtidas em diversas áreas dos Estados Nordestinos, sendo 42 amostras de solo (Alagoas 02, Bahia 04, Ceará 02, Maranhão 03, Paraíba 06, Pernambuco 11, Piauí 03, Rio Grande do Norte 09 e Sergipe 02) e 03 amostras de insetos (todas em Pernambuco) (Fig. 1). As amostras de solo foram coletadas entre 2-5 cm abaixo da superfície, com auxílio de uma espátula estéril, colocadas diretamente para saco plástico estéril e armazenadas em refrigerador a 4°C até o processamento. Insetos que apresentavam sintomas de ataque por microorganismos (corpo

amolecido e coloração escura) foram coletados em recipiente estéril e armazenados em freezer a -20°C até o processamento. Cada amostra foi devidamente identificada quanto à localidade da coleta e o local georeferenciado. Todas as coletas foram realizadas preferencialmente em áreas nativas, onde jamais houve plantios comerciais, assegurando que as bactérias isoladas não tenham sido provenientes de produtos comerciais à base de *B. thuringiensis*.

Isolamento de *B. thuringiensis*. O processamento das amostras de solo e insetos para obtenção de *B. thuringiensis* foi realizado no Laboratório de Patologia de Insetos da UFRPE. O isolamento das bactérias a partir das amostras de solo foi feito seguindo a metodologia de Travers *et al.* (1987), com modificações, onde 1 g de cada solo, após secagem em temperatura ambiente por 1 h, foi colocado em tubos esterilizados de 125 mL, com 10 mL do meio Luria Bertani (LB) (bacto-triptona - 5 g, extrato de levedura - 2,5 g, NaCl - 2,5 g, água ultrapura - 0,5 L), tamponado com 0,25 M de acetato de sódio (CH₃COONa). O isolamento das bactérias a partir de insetos foi inicialmente feito de acordo com a metodologia descrita por Alves *et al.* (1998). Os insetos foram lavados com hipoclorito de sódio a 10% e água ultrapura, imergindo alguns segundos em cada um dos líquidos e repetindo o procedimento três vezes. As larvas foram trituradas em meio LB tamponado com 0,25 M de acetato de sódio.

Posteriormente, as amostras oriundas de solos e de insetos foram agitadas a 250 rpm por 4 h a 30°C e submetidas a 80°C por 12 min e, em seguida, colocadas no gelo durante 5 min para eliminação de células vegetativas. As amostras foram diluídas 10 e 100 vezes e uma alíquota de 100 µL da última diluição foi distribuída em placa de Petri contendo meio ágar nutriente (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubada a 30°C por 24 h. Após incubação as colônias de bactérias foram selecionadas, levando-se em consideração caracteres morfológicos, típicos de *B. thuringiensis*, como a ausência de pigmentação, bordos ondulados e forma circular (WHO 1985). Os isolados foram denominados com a sigla do Laboratório de Interação

Inseto-Tóxico (LIIT), os dois primeiros números referem-se ao local de coleta e os dois últimos ao número da colônia da amostra.

Caracterização Parcial de *B. thuringiensis*. As colônias selecionadas no item anterior foram inicialmente submetidas ao teste de Gram (Newprov – Biolife, Porto Alegre, RS) e, em seguida, plaqueadas em meio LB acrescido de penicilina G, na concentração de 100 mg/L, meio seletivo para *B. thuringiensis* e *B. cereus* (Sosa-Gómez *et al.* 1998). As colônias que cresceram durante a noite a 30°C foram transferidas para placas contendo meio T3-ágar (bacto-triptona - 1,5 g, bacto-triptose - 1 g, extrato de levedura - 0,75 g, MnCl₂ - 0,0025 g, ágar - 3,5 g e tampão de fosfato - 0,5 L 50 mM pH 6,8) para permitir a esporulação por 72 h a 30°C (Travers *et al.* 1987, Martin & Travers 1989).

Manutenção dos Isolados de *B. thuringiensis*. A preservação dos isolados de *B. thuringiensis* foi inicialmente feita em meio ágar nutriente com repicagem a cada três meses (Braun 2000). Atualmente, os isolados são preservados em glicerol a 15% e SDS a 0,01% (Braun 2000) e mantidos em triplicatas em freezer de ultra baixa temperatura (-80°C) no LIIT.

Criação e Manutenção dos Insetos. A criação dos insetos foi feita no Laboratório de Biologia de Insetos da UFRPE. A criação de *P. xylostella* foi estabelecida a partir de pupas obtidas junto à criação-estoque mantidas no LIIT, onde as larvas foram alimentadas com folhas de couve, *Brassica oleracea* var. *acephala*, provenientes de produção orgânica, seguindo procedimentos recomendados por Barros & Vendramim (1999) e os adultos mantidos com solução de mel a 10%. A criação de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de pupas obtidas junto à criação-estoque mantida no Laboratório de Ecologia de Insetos da UFRPE, onde as larvas foram alimentadas em dieta artificial adaptada de Greene *et al.* (1976) e os adultos mantidos com solução de mel a 10%. Os adultos foram colocados em gaiolas, constituídas de tubos PVC (25 x10 cm), revestidas internamente com papel contínuo para

coleta dos ovos diariamente. Dos ovos coletados de *P. xylostella* e *S. frugiperda*, cerca de 10% foram utilizados para a manutenção da criação e o restante para a realização dos bioensaios.

Condições de Cultivo e Formulação dos Esporos e Cristais. Cento e quatro isolados de *B. thuringiensis* foram selecionados com base nos caracteres morfológicos (isolados com colônias típicas de *B. thuringiensis*), teste de Gram (positivo) e crescimento positivo em penicilina G, para serem empregados nos bioensaios com *P. xylostella* e *S. frugiperda*. Esses isolados foram cultivados em 100 mL de meio T3-líquido em tubos de Erlenmeyer de 250 mL. Esse material foi agitado por 4 dias a 250 rpm a 30°C e em seguida centrifugado a 1700×g por 15 min a 4°C para coleta de esporos e/ou cristais. Após descartar o sobrenadante, o *pellet* foi lavado com 5 mL de água destilada e esterilizada, centrifugado novamente e o processo repetido mais duas vezes. Ao final, adicionou-se 5 mL de solução de NaCl a 0,9% ao *pellet* de cada isolado, que posteriormente foi guardado a 4°C até os bioensaios. Para a quantificação dos isolados foram preparadas suspensões de 10^{-1} e 10^{-2} em solução de NaCl a 0,9%, determinando-se o número de esporos+cristais conforme metodologia descrita por Alves *et al.* (1998).

Caracterização dos Cristais. A morfologia dos cristais dos isolados foi feita paralelamente aos bioensaios, onde lâminas dos 104 isolados foram preparadas utilizando a coloração azul de coomassie, e quando necessário, foi utilizada a coloração verde malaquita a 5% através do método de Wirtz-Conklin, para caracterização dos isolados quanto à presença e formato dos cristais protéicos, que podem ser classificados como bipiramidais, esféricos, esféricos irregulares, rombóides, pontiagudos irregulares e retangulares, além de formas compostas (Schnepf *et al.* 1998, WHO 1999). A observação foi feita sob microscopia de campo claro usando objetiva de óleo de imersão com magnificação de 2000×.

Avaliação da Patogenicidade dos Isolados. Para os bioensaios de patogenicidade a *P. xylostella*, suspensões de *B. thuringiensis* na concentração de 1×10^8 esporos+cristais/mL, obtida com o auxílio de uma câmara de Neubauer, foram feitas em um volume final de 30 mL de NaCl a 0,9% com Triton X-100 a 0,01% como espalhante. Discos de folhas de couve com 5 cm de diâmetro foram imersos nas suspensões por 10 segundos e secos posteriormente à temperatura ambiente. Após a secagem, os discos foram transferidos individualmente para placas de Petri de 6 cm de diâmetro, contendo no fundo, disco de papel filtro umedecido com água destilada. Dez larvas neonatas de *P. xylostella* foram transferidas para cada placa de Petri usando pincel número 0 (zero) e 5 replicações utilizadas por isolado. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada (tipo B.O.D.), sob temperatura de $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h.

Para os bioensaios de patogenicidade a *S. frugiperda*, uma alíquota de 30 μL de suspensões de *B. thuringiensis* na concentração de 1×10^8 esporos+cristais/mL com Triton X-100 a 0,01% foi aplicada na superfície da dieta artificial em bandejas de bioensaio de 128 células (Bio-Serv, Frenchtown, NJ). Após a secagem da suspensão sobre a dieta, neonatas foram individualmente transferidas para cada célula e as bandejas foram cobertas com tampas transparentes e ventiladas (Bio-Serv, Frenchtown, NJ), sendo feitas 48 replicações por isolado. As bandejas de bioensaio contendo as larvas foram acondicionadas em câmara climatizada, regulada para $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa $65 \pm 10\%$ e 12 h de fotofase. A solução de NaCl a 0,9% + Triton X-100 a 0,01% foi utilizada nos bioensaios como controle negativo e os padrões *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®]WP) (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari[®]WDG) (*Bta*) como controle positivo.

Os isolados que proporcionaram mortalidade acima de 30% foram reisolados a partir das larvas mortas nos bioensaios (utilizando o procedimento anterior do isolamento para insetos) e novos bioensaios foram feitos para confirmar a atividade da bactéria sobre ambas as

espécies. Todos os tratamentos foram avaliados no 3º e 5º dia, depois de estabelecidos os bioensaios, para ambas as espécies. O critério de mortalidade larval foi baseado na ausência de resposta da larva depois de estimulada com um pincel número 0 (zero). Na última avaliação, as larvas sobreviventes foram pesadas em grupo por isolado para análise de inibição do crescimento.

Toxicidade de Isolados de *B. thuringiensis* a *P. xylostella* e *S. frugiperda*. A toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* contra neonatas de *P. xylostella* e de *S. frugiperda* foi avaliada com aqueles que apresentaram taxas de mortalidade acima de 30% nos bioensaios de patogenicidade. Seis a sete concentrações de suspensões de cristais+esporos/mL de cada isolado foram determinadas a partir de ensaios preliminares (utilizando concentrações de fator 10) para os bioensaios de toxicidade. Os bioensaios foram feitos similarmente àqueles de patogenicidade, exceto pelo número de concentrações e repetições. Foi utilizada a solução de NaCl a 0,9% + Triton X-100 a 0,01%, como controle negativo. As placas de Petri contendo as larvas de *P. xylostella* foram armazenadas câmara climatizada a temperatura de $27 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12h e as bandejas de bioensaio contendo as larvas *S. frugiperda* foram acondicionadas em câmara incubadora (BOD), regulada para $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, umidade relativa $65 \pm 10\%$ e 12h de fotofase. Todos os tratamentos foram avaliados no 3º e 5º dia para *P. xylostella* e no 3º, 5º e 7º dia para *S. frugiperda*, após a aplicação dos tratamentos. Na última avaliação, as larvas sobreviventes foram pesadas em grupo por concentração para determinação da concentração efetiva que inibem 50% (CE_{50}) do peso das larvas. Os bioensaios com *P. xylostella* foram feitos em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes, com no mínimo 120 indivíduos por bioensaio, e os bioensaios com *S. frugiperda* foram repetidos pelo menos três vezes, com no mínimo 112 larvas por bioensaio. Os critérios de avaliação foram os mesmos utilizados na avaliação dos ensaios de patogenicidade. As $\text{CL}_{50\text{s}}$ e

CE_{50s} dos padrões *Btk* e *Bta* foram estimadas para *P. xylostella* e *S. frugiperda* para comparações com os parâmetros estimados com os isolados.

Análises Estatísticas. Os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios de patogenicidade foram corrigidos pela mortalidade do controle (Abbott 1925) e determinado à percentagem de mortalidade das larvas de ambas as espécies. Para os isolados que proporcionaram mortalidade superior a 30%, os dados de mortalidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA), após serem testados para normalidade e homogeneidade (testes de Kolmogorov e Bartlett), respectivamente. Os dados de mortalidade, que não assumiram normalidade, foram transformados em arco-seno da raiz quadrada de M/100, onde M é a porcentagem de mortalidade obtida pela relação entre o número de larvas mortas e o número total de larvas utilizadas no bioensaio. As médias de mortalidade dos isolados foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS Versão 8.0 (SAS Institute Inc. 1999). Os dados de toxicidade obtidos dos bioensaios de concentração-mortalidade após correção Abbott (1925) foram submetidos à análise de Probit a $P > 0,05$ (Finney 1971) através do programa estatístico POLO-PC (LeOra Software 1987). As respostas dos isolados de *B. thuringiensis* testados nos bioensaios de concentração-mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas e estimativas das CL_{50s} e CL_{90s} para *P. xylostella* e *S. frugiperda*. As razões de toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* foram calculadas com relação aos padrões de suscetibilidade *Btk* e *Bta* pelo teste de razão letal e consideradas significativas quando o intervalo de confiança (IC) a 95% não incluiu o valor um, como proposto por (Robertson & Preisler 1992). Os dados de percentagem de inibição de crescimento obtidos nos bioensaios de patogenicidade e toxicidade foram corrigidos pelo peso do controle e a concentração efetiva capaz de inibir 50% da população (CE₅₀) analisada por regressão não linear (PROC NLIN) SAS Versão 8.0 (SAS Institute Inc. 1999) de acordo com Marçon *et al.* (1999). As razões de toxicidades foram

calculadas utilizando a CE_{50} do *Btk* e *Bta* em relação às CE_{50} dos isolados de *B. thuringiensis* para *P. xylostella* e apenas a CE_{50} do *Btk* para comparações com *S. frugiperda*, uma vez que este parâmetro não foi estimado para *Bta*.

Resultados

Isolamento de *B. thuringiensis*. Setecentos e doze colônias bacterianas foram obtidas em meio LB com o processamento das 45 amostras coletadas em diferentes regiões do Nordeste (Fig. 1), das quais 372 colônias (aproximadamente 52%) cresceram em meio seletivo contendo penicilina, constituindo o banco de *B. thuringiensis* do LIIT. Das 42 amostras de solo, apenas as 16 e 17 provenientes do Rio Grande do Norte (Santo Antônio e Várzea), a 20 do Piauí (Teresina) e a 32 de Pernambuco (Petrolina) não apresentaram crescimento bacteriano em meio seletivo. Todas as amostras de inseto apresentaram crescimento bacteriano em meio seletivo. Das 372 colônias, 104 colônias foram utilizadas para os testes de patogenicidade e visualização do cristal. Em 81 isolados (77,88%) dos 104 isolados avaliados verificou-se a presença de cristais, onde a forma bipiramidal predominou em 30,77% dos isolados, seguida de 18,27% dos isolados que apresentaram as formas bipiramidais e esféricas simultaneamente (Fig. 2).

Avaliação da Patogenicidade dos Isolados. Dos 104 isolados testados com *P. xylostella*, 91 isolados (87,50%) não ocasionaram mortalidade $< 30\%$, 11 isolados (10,58%) proporcionaram mortalidade $\geq 30\%$ e $< 50\%$ a esta espécie (LIIT-0302, LIIT-2109, LIIT-2112, LIIT-2310, LIIT-2403, LIIT-2601, LIIT-2707, LIIT-2718, LIIT-3303, LIIT-4108 e LIIT-4501) e 02 isolados (1,92%) proporcionaram mortalidade $\geq 50\%$ (LIIT-4306 e LIIT-4311) (Fig. 3 e Tabela 1). Com *S. frugiperda*, 84 isolados (80,77%), dos 104 isolados testados, proporcionaram mortalidade $< 30\%$, 11 isolados (10,58%) demonstraram mortalidade $\geq 30\%$ e $< 50\%$ (LIIT-0106, LIIT-0107, LIIT-0526, LIIT-1202, LIIT-1301, LIIT-

1801, LIIT-1803, LIIT-2109, LIIT-2601 LIIT-4211e LIIT-4405) e 09 isolados (8,65%) causaram mortalidade $\geq 50\%$ (LIIT-0105, LIIT-1411, LIIT-2204, LIIT-3303, LIIT-3509, LIIT-3818, LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406) (Fig. 3 e Tabela 1).

Os isolados que causaram mortalidade $\geq 30\%$ para as duas espécies foram reisolados e novos bioensaios feitos para confirmar a atividade do patógeno. Para *P. xylostella* verificou-se que todos os isolados continuaram ativos com mortalidade $\geq 30\%$, com os isolados LIIT-0302, LIIT-2310 e 2707 proporcionando mortalidade $> 50\%$, com destaque aos isolados LIIT-4306 e LIIT-4311, os quais ocasionaram 100% de mortalidade (Tabela 1). Para *S. frugiperda*, apenas o isolado LIIT-1301 não confirmou mortalidade $> 30\%$. Os isolados LIIT-0105, LIIT-1411, LIIT-2204, LIIT-3303, LIIT-3509, LIIT-3818, LIIT-4311 e LIIT-4406 proporcionaram mortalidade $> 50\%$, e somente o isolado LIIT-4311 apresentou 100% de mortalidade (Tabela 1). Os isolados LIIT-2109, LIIT-2601, LIIT-3303, LIIT-4306 e LIIT-4311 apresentaram-se ativos tanto para *P. xylostella* como para *S. frugiperda* (Tabela 1).

Toxicidade de Isolados de *B. thuringiensis* a *P. xylostella* e *S. frugiperda*. Treze isolados que proporcionaram mortalidade $> 30\%$ a *P. xylostella* (Tabela 1) foram selecionados para testes de toxicidade. Com exceção do isolado LIIT-4501, os dados de concentração-mortalidade dos demais isolados ajustaram o modelo de probit (χ^2 não significativo, $P > 0,05$) (Tabela 2). A concentração requerida entre os isolados para ocasionar a mortalidade de 50% da população de *P. xylostella* variou de 0,02 (LIIT-4311) a $48,49 \times 10^8$ (LIIT-2112) esporos+cristais/mL de *B. thuringiensis* (Tabela 2). O isolado LIIT-4311 foi de 1,5 vezes mais tóxico do que *Btk*. Já o *Bta* apresentou à menor CL_{50} $0,01 \times 10^8$ esporos+cristais/mL, duas e três vezes mais tóxico do que o isolado LIIT-4311 e *Btk*, respectivamente (Tabela 2). A CL_{50} do isolado LIIT-4306 não diferiu estatisticamente daquela do padrão *Btk*. As razões de toxicidade dos isolados a *P. xylostella* variaram de 0,60 (LIIT-4311) a 1485,20 (LIIT-2112) vezes quando comparados com *Btk* e de 1,30 (LIIT-4311) a 3295,70 (LIIT-2112) vezes

quando comparados com *Bta*. Os isolados LIIT-0302, LIIT-2109, LIIT-2112, LIIT-2310, LIIT-2403, LIIT-2601, LIIT-2707, LIIT-2718, LIIT-3303 e LIIT-4108 apresentaram razões de toxicidade (RT) significativas (Tabela 2).

Os dados de mortalidade dos isolados LIIT-0106, LIIT-0107, LIIT-1202, LIIT-1301, LIIT-1803, LIIT-1804, LIIT-2601 e LIIT-4405 de *B. thuringiensis*, que proporcionaram mortalidade > 30% nos testes de patogenicidade com as larvas de *S. frugiperda*, não se ajustaram ao modelo de probit (χ^2 significativo, $p < 0,05$), e portanto, estimativas de CL_{50} foram obtidas para 12 isolados que variaram de 0,001 (LIIT-4311) a $15,84 \times 10^8$ (LIIT-2109) esporos+cristais/mL (Tabela 3). O *Bta* foi utilizado como padrão de susceptibilidade, apesar de não ter apresentado a menor CL_{50} e o *Btk* não foi possível estimar a CL_{50} . Os isolados LIIT-4311, LIIT-4306 e LIIT-4406 foram mais ativos do que o *Bta*, sendo cerca de 50, 50, e 5 vezes mais tóxicos, respectivamente. Quanto à toxicidade dos demais isolados de *B. thuringiensis* testados, as razões de toxicidade à *S. frugiperda* variaram de 0,02 (LIIT-4311) a 309,50 (LIIT-2109) vezes quando comparados com *Bta*, sendo consideradas significativas com exceção dos isolados LIIT-2204 e LIIT-3303 (Tabela 3).

Inibição do Crescimento Larval de *P. xylostella* e *S. frugiperda* Frente a Isolados de *B. thuringiensis* Obtidos nos Testes de Patogenicidade. De 63 isolados avaliados com larvas de *P. xylostella*, aproximadamente 39 isolados (61,9%) causaram inibição em média > 30% do peso das larvas, 13 isolados (20,6%) causaram inibição $\geq 30\%$ e < 50% e 11 isolados (17,5%) causaram inibição de crescimento > 50% (Fig. 4). Para as larvas de *S. frugiperda*, de 104 isolados, 52 isolados (50,0%) apresentaram inibição de crescimento < 30%, 15 isolados (14,4%) inibiram o crescimento das larvas $\geq 30\%$ e < 50% e 37 isolados (35,6%) causaram inibição de crescimento > 50% (Fig. 4). O número de isolados que causou inibição de crescimento > 50% em *P. xylostella* foi maior do que os que ocasionaram mortalidade > 50%. O mesmo resultado foi observado para *S. frugiperda* que dos 104 isolados utilizados nos

testes de patogenicidade 09 isolados causaram mortalidade > 50%, enquanto 37 isolados ocasionaram inibição de crescimento > 50%.

Inibição do Crescimento Larval de *P. xylostella* e *S. frugiperda* Frente a Isolados de *B. thuringiensis* Obtidos nos Testes de Toxicidade. Os dados de inibição de crescimento larval de *P. xylostella* e *S. frugiperda* estão respectivamente apresentados nas tabelas 4 e 5. Os valores de concentração efetiva para inibir 50% da população de *P. xylostella* (CE₅₀) variaram de 0,0001 (LIIT-4306 e LIIT-4311) a $2,23 \times 10^8$ (LIIT-2112) esporos+cristais/mL. Os valores de concentração efetiva para inibir 50% da população *S. frugiperda* (CE₅₀) variaram de 0,00006 (LIIT-4306) a $3,01 \times 10^8$ (LIIT-2109) esporos+cristais/mL. Os padrões *Btk* e *Bta* foram utilizados como comparação para *P. xylostella*, apesar de não apresentarem à menor CE₅₀. Desta forma, as razões de toxicidade para *P. xylostella* variaram de 0,03 (LIIT-4311) a 796,43 (LIIT-2112) quando comparadas com *Btk* e de 0,04 (LIIT-4311) a 857,69 (LIIT-2112) vezes quando comparada com *Bta*. Apenas para *Btk* pode ser estimada a CE₅₀, desta forma as razões de toxicidade para *S. frugiperda* variaram de 0,01 (LIIT-4306) a 501,67 (LIIT-2109) vezes quando comparadas com *Btk*.

Discussão

Um banco de isolados de *B. thuringiensis* provenientes de amostras de solos do Nordeste brasileiro e de insetos apresentando características de infecção por bactérias foi constituído após este trabalho. Cento e quatro isolados (41 amostras) crescidos em meio com penicilina foram avaliados quanto às suas toxicidades às espécies *P. xylostella* e *S. frugiperda*. Destes, 78% apresentaram alguma forma de cristal e cada amostra conteve pelo menos uma colônia apresentando cristal, sugerindo uma grande abundância de *B. thuringiensis* em solos do Nordeste brasileiro. Vários outros autores têm relatado a ampla distribuição desse patógeno em vários estados brasileiros (Marquez *et al.* 2000, Valicente & Barreto 2003,

Vilas-Bôas & Lemos 2004, Gobatto *et al.* 2010) e regiões do mundo, sendo encontrado naturalmente em solos e em criatórios de insetos (Martin & Travers 1989, Kaelin *et al.* 1994, Ejiofor & Johnson 2002, Berón & Salerno 2006).

A morfologia do cristal de uma linhagem de *B. thuringiensis* pode fornecer alguma indicação de sua atividade inseticida (Martin & Travers 1989, Meadows *et al.* 1992, Tailor *et al.* 1992). A forma bipiramidal do cristal foi a mais frequente entre os isolados, como observado em outros estudos (Lopez-Pazos *et al.* 2009, Aramideh *et al.* 2010), sugerindo que a maior atividade destes isolados a estas espécies pode ser devido à presença destes cristais que estão associados às proteínas Cry1, ativas contra lepidópteros (Höfte & Whiteley 1989, Dankocsik *et al.* 1990, Schnepf *et al.* 1998, Zhong *et al.* 2000).

Uma pequena proporção (<10%) dos isolados apresentou atividade inseticida acima de 50% às espécies *P. xylostella* e *S. frugiperda* enquanto que a proporção causando redução do desenvolvimento larval acima de 50% foi maior, particularmente para *S. frugiperda*. Isto sugere que apesar da grande diversidade de *B. thuringiensis* predominante nestas áreas, poucos apresentaram potencial inseticida a estas espécies, talvez pelo fato de que estas espécies não tenham coexistido com os isolados nas áreas onde estes foram coletados. O baixo número de isolados ativos a *P. xylostella* pode ter ocorrido devido a alta plasticidade fenotípica que esse inseto possui (Ferré & VanRie 2002). Ele foi o primeiro inseto a desenvolver resistência a *B. thuringiensis* em campo (Tabashnik *et al.* 1990). Outros estudos têm relatado uma dificuldade em encontrar linhagens de *B. thuringiensis* ativas contra a *S. frugiperda* (Silva-Werneck *et al.* 2000, Polanczyk *et al.* 2004, Monnerat *et al.* 2007, Santos *et al.* 2009) e este fato pode estar associado à tolerância natural que a *S. frugiperda* apresenta à maioria das δ -endotoxinas (Aranda *et al.* 1996, Monnerat *et al.* 2006).

Dos vinte isolados testados quanto a toxicidade a *S. frugiperda*, quatro proporcionaram mortalidades acima de 70% aos cinco dias de avaliação (LIIT-3303, LIIT-3509, LIIT-4306 e

LIIT-4311), sendo que os isolados LIIT-4306 e LIIT-4311 foram 100% eficientes a *P. xylostella* no mesmo período de avaliação, sugerindo que estes isolados podem apresentar toxinas com atividades simultaneamente às duas espécies ou com atividades independentes no mesmo isolado. Monnerat *et al.* (1999) relataram que Cry1C foi eficiente para *P. xylostella* e Loguercio *et al.* (2001) verificaram que isolados de *B. thuringiensis* contendo o gene dessa proteína foram ativos a *S. frugiperda*. Desta forma os isolados LIIT-2109, LIIT-3303, LIIT-4306 e LIIT-4311 podem conter esta toxina que seja ativa a ambas as espécies, ou ainda, os isolados podem conter no genoma as toxinas Cry1C que tem alta atividade a *P. xylostella* (Mohan *et al.* 2009), e Cry1F que apresenta alta atividade a *S. frugiperda* (Siebert *et al.* 2008) e, neste caso, elas estariam atuando independentemente. A caracterização molecular do conteúdo genômico das toxinas poderá esclarecer qual a relação que existe entre as toxinas presentes e as respostas das espécies frente aos isolados aqui avaliados.

A utilização de doses subletais das toxinas *B. thuringiensis* que ocasionam efeitos sobre os parâmetros biológicos de insetos como atraso no desenvolvimento larval e pupal, redução no peso de larva e de pupa, entre outros (Khaliq & Ahmed 2003, Polanczyk & Alves 2005) pode ser um parâmetro importante na avaliação daqueles isolados de respostas lentas ou onde as respostas de mortalidade não são determinadas. Neste estudo, o alto número de isolados que causou inibição de crescimento nos testes de patogenicidade em *P. xylostella* e *S. frugiperda*, mostrou que o parâmetro CE₅₀ é mais sensível do que o de mortalidade (Marçon *et al.* 1999, Huang *et al.* 2007) para a identificação de isolados usualmente subestimados pelos parâmetros de letalidade. Neste caso, os parâmetros baseados em inibição de crescimento podem ainda identificar aqueles isolados que apresentam forte atividade de letalidade, como observado nos testes de toxicidade, onde se verificou que todos os isolados apresentaram alto potencial para inibir o desenvolvimento larval de *P. xylostella* e *S. frugiperda*, principalmente os isolados LIIT-4306 e LIIT-4311.

A inibição do peso larval de insetos pragas ocasionado por *B. thuringiensis* pode ser considerada uma importante ferramenta para o controle desses insetos, uma vez que essa fase é a mais crítica, pois causa grandes prejuízos na produtividade das culturas. Um forte efeito de inibição pode contribuir na redução da quantidade de injúria e conseqüentemente dano econômico a cultura, além de tornar as larvas mais suscetíveis ao ataque de outros agentes de controle biológico (Polanczyk & Alves 2005, Viana *et al.* 2009). Em uma planta transgênica, por exemplo, a expressão constitutiva desta toxina teria um efeito prolongado nestes indivíduos, podendo levá-los à morte por falta de alimentação. Os efeitos subletais sobre os indivíduos sobreviventes podem além de auxiliar na avaliação da toxicidade, pode ser utilizado como indicador da suscetibilidade de toxinas e monitoramento da resistência de *B. thuringiensis* a insetos-pragas (Marçon *et al.* 1999, Marçon *et al.* 2000, Kain *et al.* 2004).

Os isolados LIIT-4306 e LIIT-4311 foram os que mais proporcionaram efeitos de toxicidade e de inibição de crescimento larval tanto das larvas de *P. xylostella* quanto de *S. frugiperda*, podendo estes apresentarem potenciais para o controle desses insetos. A toxicidade e a ação de inibição desses isolados podem estar relacionadas com a quantidade de proteínas produzidas, como também pela combinação de mais de um gene presente, devido esses isolados apresentarem cristais compostos, onde o isolado LIIT-4306 apresentou cristal bipiramidal e esférico e o isolado LIIT-4311 apresentou cristal bipiramidal e cubóide.

Os resultados mostram que pouco se conhece sobre a diversidade de *B. thuringiensis* em ambientes do Nordeste brasileiro e uma avaliação mais abrangente se faz necessário em face do potencial que algumas linhagens apresentam em controlar insetos com eficiência. A constituição do banco de bactérias possibilita a busca e a caracterização de novos genes *cry* que podem resultar em novas alternativas para avaliar a atividade a outros insetos lepidópteros, bem como avaliar a atividade de isolados nordestinos sobre coleópteros e dípteros com nenhuma ou pouca suscetibilidade às proteínas Cry a esses isolados e que

podem auxiliar em programas de manejo na tentativa de evitar ou minimizar o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de campo de insetos-alvos.

Conclusão

Os isolados LIIT- 4306 e LIIT-4311 foram os que mais proporcionaram efeitos de toxicidade e inibição de crescimento larval tanto para *P. xylostella* quanto *S. frugiperda*. A inibição do peso larval pode ser considerada uma importante ferramenta para o controle desses insetos, uma vez que essa fase é a mais crítica, pois causa grandes prejuízos na produtividade das culturas.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal Rural de Pernambuco através do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola pela oportunidade de desenvolver este trabalho. A Universidade Estadual do Maranhão pela concessão da bolsa de estudo. Ao programa PROF/CAPES pelo suporte no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Literatura Citada

- Abbott, W.S.A. 1925.** Method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Adamczyk Jr., J.J. & J.S. Mahaffey. 2008.** Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests. Fla. Entomol. 91: 570-575.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998.** Técnicas de laboratório, p. 637-711. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- ANDEF – Associação Nacional de Defesa Nacional. 2009.** Tecnologia em primeiro lugar: O Brasil a caminho de se tornar o maior produtor mundial de grãos. Rev. Defesa Vegetal 5: 16-17.
- Aramideh, S., M.H. Saferalizadeh, A.A. Pourmirza, M.R. Bari, M. Keshavarzi & M. Mohseniazar. 2010.** Characterization and pathogenic evaluation of *Bacillus thuringiensis* isolates from West Azerbaijan province-Iran. African J. Microbiol. Res. 4: 1224-1229.

- Aranda, E., J.A. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca & A. Bravo. 1996.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212.
- Barros, E.M., J.B. Torres & A.F. Bueno. 2010a.** Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. *Neotrop. Entomol.* 39: 996-1001.
- Barros, E.M., J.B. Torres, J.R. Ruberson & M.D. Oliveira. 2010b.** Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. *Entomol. Exp. Appl.* 137: 237-245.
- Barros, R. & J.D. Vendramim. 1999.** Efeito de cultivares de repolho, utilizadas para criação de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), no desenvolvimento de *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 28: 469-476.
- Barros, R., I.B.J. Alberto, A.J. Oliveira, A.C.F. Souza & V. Lopes. 1993.** Controle químico da traça das crucíferas, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), em repolho. *An. Soc. Entomol. Brasil* 22: 463-469.
- Berón, C. & G. Salerno. 2006.** Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. *BioControl* 51: 779-794.
- Braun, S. 2000.** Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses, p. 49-72. In A. Navon & K.R.S. Ascher (eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. New York, CABI, 336p.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Pena, M.E. Nunez-Valdez, M. Soberon & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Buntin, G.D. 2008.** Corn expressing Cry1Ab or Cry1F endotoxin for fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) management in field corn for grain production. *Fla. Entomol.* 91: 523-530.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, M.S. Garcia, F.P. Giolo & A.F. Martins. 2002.** Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. *Neotrop. Entomol.* 31: 525-529.
- Castelo Branco, M., F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001.** Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. *Hortic. Bras.* 19: 60-63.
- Dankocsik, C., W.P. Donovan & C.S. Jany. 1990.** Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Mol. Microbiol.* 4: 2087-2094.

- Ejiofor, A.O. & T. Johnson. 2002.** Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 284-290.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Ferré, J., M.D. Real, J. Van Rie, S. Jansens & M. Peferoen. 1991.** Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88: 5119-5123.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London, Cambridge University, 333p.
- Garczynski, S.F., J.W. Crim & M.J. Adang. 1991.** Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2816-2820.
- Gobatto, V., S. Giani, M. Camassola, A. Dillon, A. Specht & N. Barros. 2010.** *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Biol.* 70: 1039-1046.
- Greene, G.L., N.C. Leppa & W.A. Dickerson. 1976.** Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- Huang, F., B. Leonard & X. Wu. 2007.** Resistance of sugarcane borer to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Entomol. Exp. Appl.* 124: 117-123.
- Jouanin, L., M. Bonadé-Bottino, C. Girard, G. Morrot & M. Giband. 1998.** Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* 131: 1-11.
- Kaelin, P., P. Morel & F. Gadani. 1994.** Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 19-25.
- Kain, W.C., J.-Z. Zhao, A.F. Janmaat, J. Myers, A.M. Shelton & P. Wang. 2004.** Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in a greenhouse-derived strain of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 97: 2073-2078.
- Khalique, F. & K. Ahmed. 2003.** Impact of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* on biology of *Helicoverpa armigera*. *Pak. J. Biol. Sci.* 6: 615-621.
- Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet & M. Peferoen. 1996.** A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 80-86.

- LeOra Software 1987.** POLO-PC, A user's guide to probit and logit analysis computer program, version By LeOra Software, Berkeley, CA.
- Loguercio, Santos, Barreto, Guimaraes & Paiva. 2001.** 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. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 362-367.
- Lopez-Pazos, S.A., J.W. Martinez, A.X. Castillo & J.A. Ceron Salamanca. 2009.** Presence and significance of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins associated with the Andean weevil *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Biol. Trop.* 57: 1235-1243.
- Luttrell, R.G., L. Wan & K. Knighten. 1999.** Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92: 21-32.
- Marçon, P.C.R.G., L.J. Young, K.L. Steffey & B.D. Siegfried. 1999.** Baseline susceptibility of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 92: 279-285.
- Marçon, P.C.R.G., B.D. Siegfried, T. Spencer & W.D. Hutchison. 2000.** Development of diagnostic concentrations for monitoring *Bacillus thuringiensis* resistance in european corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 925-930.
- Marquez, A.M., J.M. Dias & B.M. Ribeiro. 2000.** Screening and characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Brazil for the presence of coleoptera-specific cry genes. *Microbiol. Res.* 154: 355-362.
- Martin, P.A.W. & R.S. Travers. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2437-2442.
- Martínez, C., M. Porcar, A. López, I.R. De Escudero, F.J. Pérez-Llarena & P. Caballero. 2004.** Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insects. *Entomol. Exp. Appl.* 111: 71-77.
- Meadows, M.P., D.J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett & H.D. Burges. 1992.** Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1344-1350.
- Milach, S.C.K. & R.P. Cruz. 1997.** Piramidação de genes de resistência às ferrugens em cereais. *Cienc. Rural* 27: 685-689.
- Mohan, M., S.N. Sushil, G. Selvakumar, J.C. Bhatt, G.T. Gujar & H.S. Gupta. 2009.** Differential toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and their crystal toxins against high-altitude Himalayan populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Pest Manage. Sci.* 65: 27-33.

- Monnerat, R., L. Masson, R. Brousseau, M. Puzstai-Carey, D. Bordat & R. Frutos. 1999.** Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Curr. Microbiol.* 39: 159-162.
- Monnerat, R., E. Martins, P. Queiroz, S. Orduz, G. Jaramillo, G. Benintende, J. Cozzi, M.D. Real, A. Martinez-Ramirez, C. Rausell, J. Ceron, J.E. Ibarra, M.C. Del Rincon-Castro, A.M. Espinoza, L. Meza-Basso, L. Cabrera, J. Sanchez, M. Soberon & A. Bravo. 2006.** Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7029-7035.
- Monnerat, R.G., A.C. Batista, P.T. de Medeiros, É.S. Martins, V.M. Melatti, L.B. Praça, V.F. Dumas, C. Morinaga, C. Demo, A.C.M. Gomes, R. Falcão, C.B. Siqueira, J.O. Silva-Werneck & C. Berry. 2007.** Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. *Biol. Control* 41: 291-295.
- Perez, C.J. & A.M. Shelton. 1997.** Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *J. Econ. Entomol.* 90: 87-93.
- Polanczyk, R.A. & S.B. Alves. 2005.** Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* berliner. *Sci. Agric.* 62: 464-468.
- Polanczyk, R.A., R.F.P. Silva & L.M. Fiuza. 2004.** Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *R. Bras. Agrociência* 10: 209-214.
- Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton, CRC Press, 224p.
- Sá, V.G.M.d., B.V.C. Fonseca, K.G.B. Boregas & J.M. Waquil. 2009.** Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotrop. Entomol.* 38: 108-115.
- Santos, K.B.d., P. Neves, A.M. Meneguim, R.B. dos Santos, W.J. dos Santos, G.V. Boas, V. Dumas, E. Martins, L.B. Praça, P. Queiroz, C. Berry & R. Monnerat. 2009.** Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 50: 157-163.
- SAS Institute Inc. 1999.** STAT User's guide computer program, version 8.0. By SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.

- Schuler, T.H., G.M. Poppy, B.R. Kerry & I. Denholm. 1998.** Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 16: 168-175.
- Siebert, M.W., J.M. Babock, S. Nolting, A.C. Santos, J.J. Adamczyk Jr., P.A. Neese, J.E. King, J.N. Jenkins, J. Mccarty, G.M. Lorenz, D.D. Fromme & R.B. Lassiter. 2008.** Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomol.* 91: 555-565.
- Silva-Werneck, J.O., J.R.M.V. Abreu Neto, A.N. Tostes, L.O. Faria & J.M.C.S. Dias. 2000.** Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. *Pesqu. Agropec. Bras.* 35: 221-227.
- Sosa-Gómez, D.R., M.S. Tigano & O.M.N. Arantes. 1998.** Caracterização de entomopatógenos, p. 731-763. In S.B. Alves (ed.), *Controle microbiano de insetos*. Piracicaba, Fealq, 1163p.
- Storer, N.P., J.M. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G.D. Thompson, J.W. Bing & R.M. Huckaba. 2010.** Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J. Econ. Entomol.* 103: 1031-1038.
- Syed, A.R. 1992.** Insecticide resistance in diamondback moth in Malaysia, p. 419–426. In N.S. Talekar (ed.), *Diamondback moth and other crucifer pests*. Taiwan, Shanhua, AVRDC, 603p.
- Tabashnik, B.E., N.L. Cushing, N.I. Finson & M.W. Johnson. 1990.** Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.
- Tailor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, L. Jordan & S. Ely. 1992.** Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6: 1211-1217.
- Talekar, N.S. & A.M. Shelton. 1993.** Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.* 38: 275-301.
- Travers, R.S., P.A. Martin & C.F. Reichelderfer. 1987.** Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263-1266.
- Valicente, F.H. & M.R. Barreto. 2003.** *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 32: 639-644.
- Viana, C.L.T.P., S.A. Bortoli, R.T. Thuler, R.M. Goulart, A.M.G. Thuller, M.V.F. Lemos & A.S. Ferraudo. 2009.** Efeito de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae). *Cientifica* 37: 22-31.
- Vilas-Bôas, G.T. & M.V.F. Lemos. 2004.** Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50: 605-613.

- WHO - World Health Organization. 1985.** Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva, 24p.
- WHO - World Health Organization. 1999.** Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*, environmental health criteria 217. International programme on chemical safety, Geneva.
- Wright, D., M. Iqbal, F. Granero & J. Ferre. 1997.** A Change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1814-1819.
- Zago, H.B. 2008.** Manejo de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): Parasitismo por *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera.: Trichogrammatidae) e susceptibilidade de populações a *Bacillus thuringiensis* Berliner. Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 88p.
- Zhao, J.Z., G.R. Zhu, Z.L. Zhu & W.Z. Wang. 1993.** Resistance of diamondback moth to *Bacillus thuringiensis* in China. Resist. Pest. Manage. 5: 11-12.
- Zhong, C., D.J. Ellar, A. Bishop, C. Johnson, S. Lin & E.R. Hart. 2000.** Characterization of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin which is toxic to insects in three orders. J. Invertebr. Pathol. 76: 131-139.

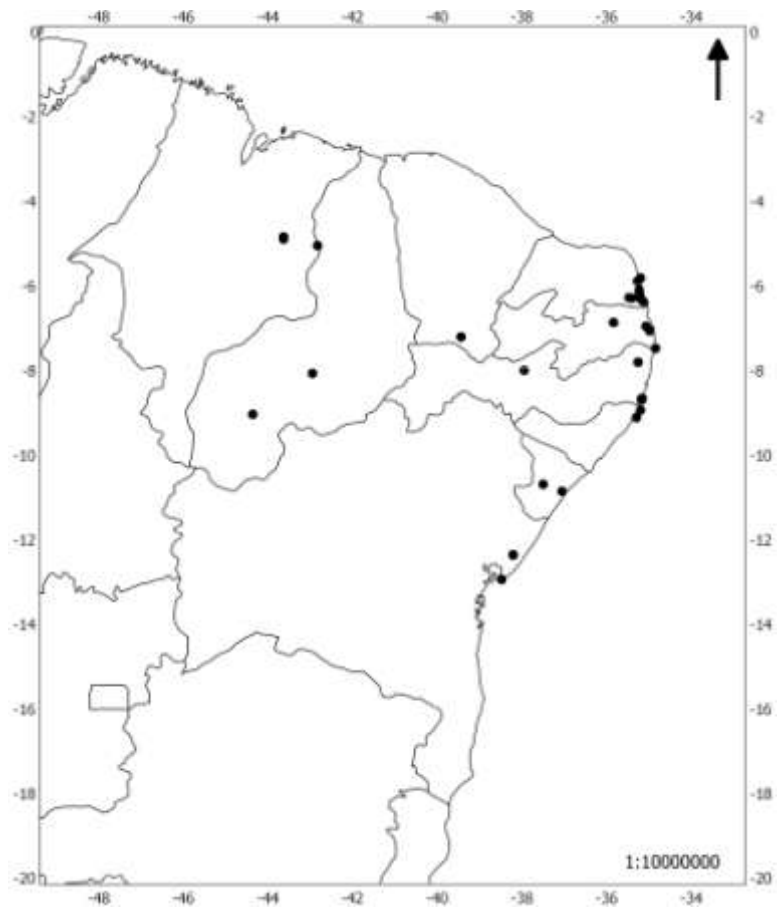


Figura 1. Locais de coletas de amostras de solo e insetos para isolamento de *B. thuringiensis*.

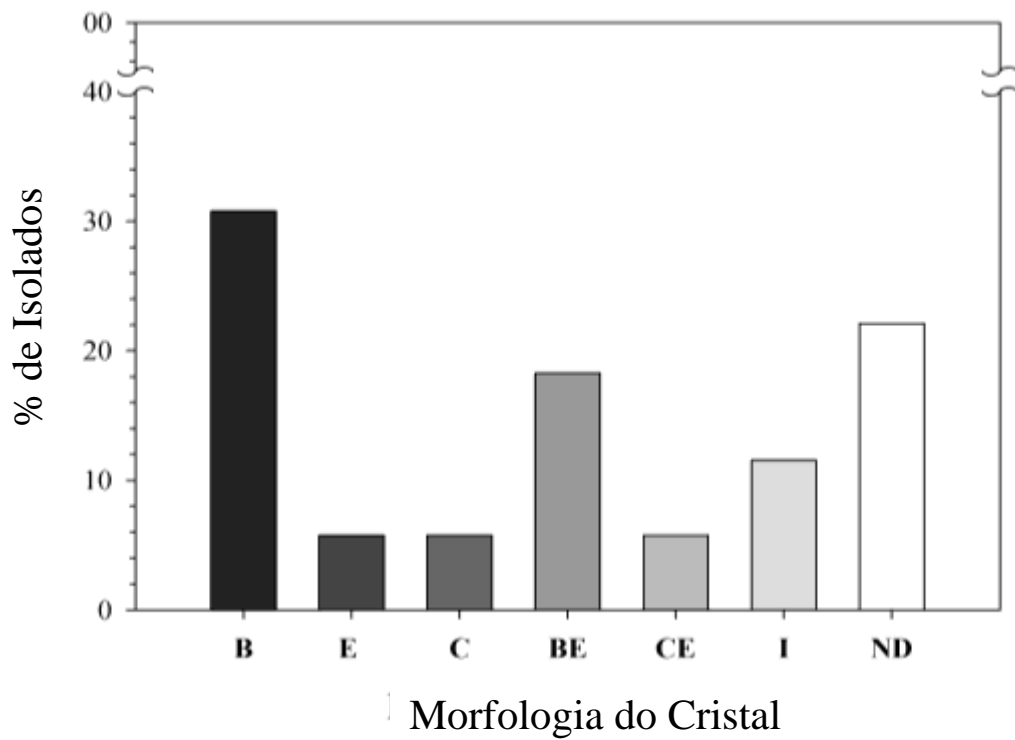


Figura 2. Percentagem de isolados de *Bacillus thuringiensis* apresentando diferentes morfologias de cristais. (B) – bipiramidal, (E) – esférico, (C) – cubóide, (BE) – bipiramidal + esférico, (CE) – cubóide + esférico, (I) – irregular e (ND) – não determinado.

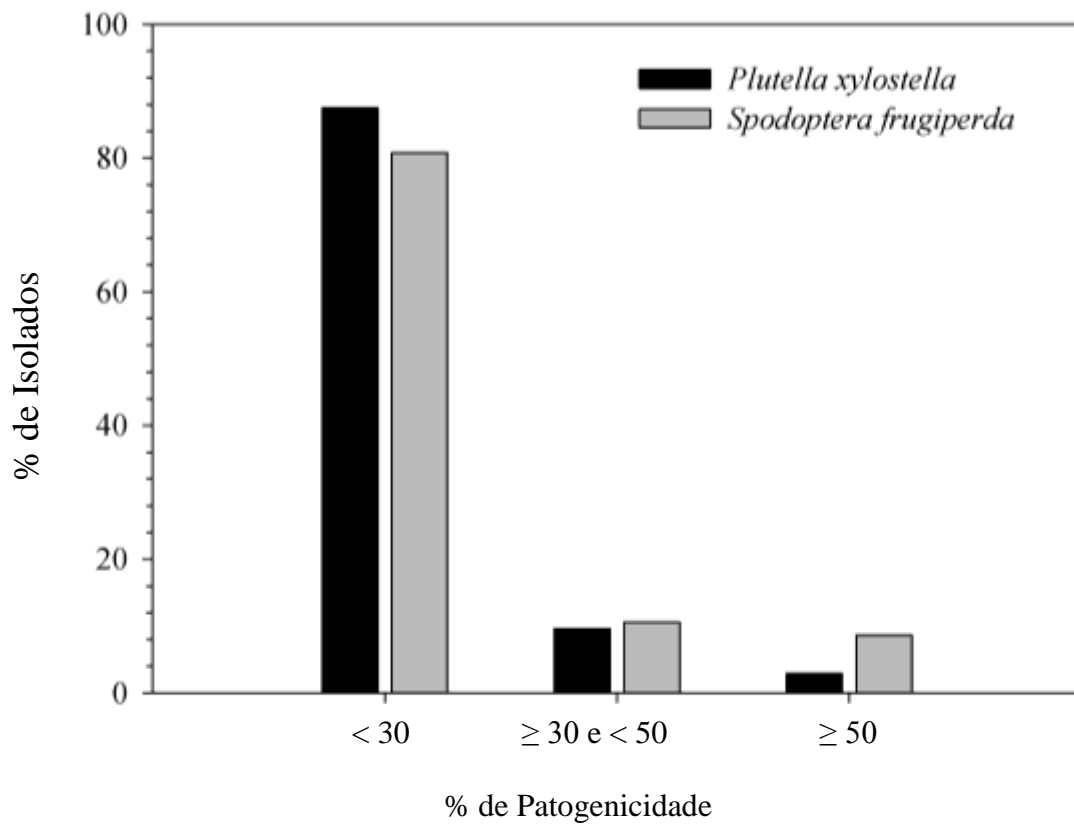


Figura 3. Patogenicidade de isolados de *Bacillus thuringiensis* testados contra neonatas de *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda* aos 3° e 5° dias, respectivamente.

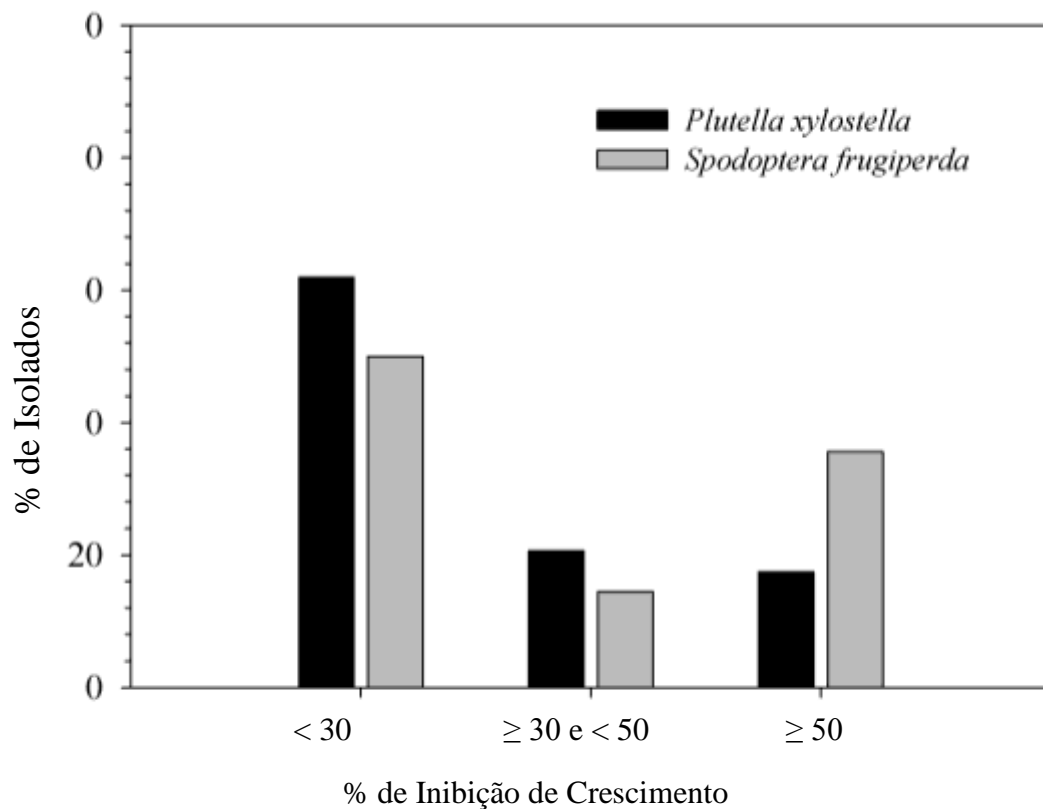


Figura 4. Percentagem de inibição de crescimento de larvas de *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda* frente a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Tabela 1. Médias (\pm EP) do percentual de mortalidade larval de *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda* a isolados de *Bacillus thuringiensis* na concentração 10^8 (esporos+cristais/mL).

Isolado	<i>Plutella xylostella</i>		<i>Spodoptera frugiperda</i>	
	3° dia	5° dia	3° dia	5° dia
LIIT-0105	-----	-----	34,9 \pm 1,52 b ¹	61,2 \pm 9,66 ab
LIIT-0106	-----	-----	12,5 \pm 4,17 b	34,4 \pm 7,29 b
LIIT-0107	-----	-----	37,9 \pm 14,93 b	48,9 \pm 26,04 ab
LIIT-0526	-----	-----	28,1 \pm 11,46 b	44,8 \pm 9,37 ab
LIIT-1202	-----	-----	21,4 \pm 6,81 b	38,6 \pm 17,79 b
LIIT-1301	-----	-----	11,9 \pm 5,63 b	28,9 \pm 6,04 b
LIIT-1411	-----	-----	26,0 \pm 3,13 b	52,1 \pm 12,50 ab
LIIT-1803	-----	-----	22,0 \pm 7,41 b	34,4 \pm 15,63 b
LIIT-1804	-----	-----	20,2 \pm 1,44 b	31,7 \pm 8,81 b
LIIT-2204	-----	-----	36,6 \pm 9,54 b	51,2 \pm 5,05 ab
LIIT-3509	-----	-----	45,0 \pm 7,50 b	74,6 \pm 4,58 ab
LIIT-3818	-----	-----	39,0 \pm 0,56 b	61,5 \pm 5,13 ab
LIIT-4211	-----	-----	27,1 \pm 6,25 b	39,6 \pm 4,17 b
LIIT-4405	-----	-----	16,3 \pm 2,43 b	30,9 \pm 7,99 b
LIIT-4406	-----	-----	35,0 \pm 2,50 b	57,3 \pm 7,29 ab
LIIT-4306	100,0 \pm 0,00 a ¹	100,0 \pm 0,00 a	45,4 \pm 0,42 b	71,7 \pm 11,67 ab
LIIT-4311	100,0 \pm 0,00 a	100,0 \pm 0,00 a	86,4 \pm 5,12 a	100,0 \pm 0,00 a
LIIT-3303	25,6 \pm 2,67 b	44,7 \pm 1,18 b	43,8 \pm 0,08 b	81,2 \pm 4,25 ab
LIIT-2109	30,5 \pm 0,09 b	37,7 \pm 5,12 b	38,1 \pm 5,63 b	43,3 \pm 10,83 ab
LIIT-2601	34,4 \pm 2,37 b	36,4 \pm 0,37 b	14,9 \pm 6,64 b	42,4 \pm 0,79 ab
LIIT-0302	34,1 \pm 13,71 b	51,8 \pm 6,90 b	-----	-----
LIIT-2112	9,5 \pm 2,71 b	39,4 \pm 7,56 b	-----	-----
LIIT-2310	21,5 \pm 13,18 b	50,5 \pm 4,63 b	-----	-----
LIIT-2403	41,4 \pm 2,61 b	42,4 \pm 3,61 b	-----	-----
LIIT-2707	32,0 \pm 2,00 b	52,0 \pm 4,00 b	-----	-----
LIIT-2718	24,8 \pm 4,36 b	47,3 \pm 10,98 b	-----	-----
LIIT-4108	15,8 \pm 10,70 b	42,4 \pm 6,54 b	-----	-----
LIIT-4501	21,8 \pm 4,25 b	39,0 \pm 11,00 b	-----	-----

¹Médias (\pm EP) seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Suscetibilidade da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella*, frente a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	G ¹	N ²	Inclinação±EP ³	CL ₅₀ (IC 95%) ⁴	CL ₉₀ (IC 95%) ⁴	χ ² (GL) ⁵	RT ₅₀ (IC 95%) ⁶	RT ₅₀ (IC 95%) ⁷
<i>Bta</i>	F ₅₆	240	1,27 ± 0,15	0,01 (0,008-0,03)	0,13 (0,07-0,50)	4,02 (4)	0,50 (0,30-0,80)*	---
LIIT-4311	F ₄₈	230	0,61 ± 0,08	0,02 (0,003-0,07)	2,40 (0,45-160,37)	6,45 (4)	0,60 (0,30-1,40)	1,30 (0,60-3,00)
<i>Btk</i>	F ₅₆	240	0,95 ± 0,10	0,03 (0,02-0,05)	0,73 (0,37-1,90)	2,43 (4)	---	2,20 (1,20-4,20)*
LIIT-4306	F ₅₆	239	0,62 ± 0,08	0,03 (0,005-0,11)	3,48 (0,58-432,78)	7,59 (4)	0,90 (0,40-2,00)	2,00 (0,90-4,40)
LIIT-0302	F ₄₈	229	0,55 ± 0,08	0,29 (0,13-0,62)	63,45 (16,81-597,62)	1,50 (4)	9,00 (3,70-22,00)*	20,00 (8,50-47,00)*
LIIT-2310	F ₅₆	223	0,89 ± 0,10	0,96 (0,35-3,19)	26,07 (6,42-577,04)	7,03 (4)	29,40 (14,90-57,90)*	65,20 (33,10-128,40)*
LIIT-2403	F ₅₆	346	0,70 ± 0,10	1,74 (0,86-3,42)	120,00 (41,34-697,41)	0,11 (4)	53,30 (24,10-117,80)*	118,30 (53,50-261,40)*
LIIT-4108	F ₅₅	239	0,53 ± 0,08	3,36 (1,50-10,36)	860,51 (144,09-21233,92)	0,58 (4)	103,00 (37,40-283,80)*	228,50 (82,90-629,80)*
LIIT-2718	F ₅₁	223	2,90 ± 0,91	7,46 (4,97-9,77)	20,62 (13,83-91,78)	3,40 (4)	228,60 (139,80-373,70)*	507,30 (310,30-829,20)*
LIIT-3303	F ₅₁	209	0,76 ± 0,19	9,18 (4,99-32,99)	432,11 (80,47-44332,93)	2,91 (4)	279,30 (114,50-681,20)*	619,80 (254,10-1511,70)*
LIIT-2601	F ₅₆	327	0,98 ± 0,16	9,58 (6,28-19,06)	194,40 (67,46-1465,60)	0,71 (4)	286,40 (148,10-553,90)*	635,60 (328,60-1229,10)*
LIIT-2707	F ₅₂	233	0,87 ± 0,17	11,69 (7,29-25,24)	347,37 (100,30-5357,70)	1,21 (4)	358,40 (177,60-722,80)*	794,90 (394,00-1603,80)*
LIIT-2109	F ₄₈	235	0,76 ± 0,19	13,68 (6,61-71,79)	**	0,41 (4)	419,00(145,90-1204,10)*	930,10 (323,80-2671,90)*
LIIT-2112	F ₅₃	228	0,78 ± 0,24	48,49 (21,42-334,27)	**	1,05 (4)	1485,20 (499,60-4414,90)*	3295,70 (1108,70-9796,70)*

¹ Geração.

² Número total de insetos testados.

³ Inclinação ± Erro padrão.

⁴ Esporos+cristais×10⁸/mL de NaCl a 0,9%.

⁵ Qui-quadrado e Grau de liberdade.

⁶ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®]WP) (*Btk*) e os isolados de *B. thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Plutella xylostella*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992). * Razão de toxicidade significativa para isolados de *B. thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

⁷ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari[®]WDG) (*Bta*) e os isolados de *B. thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *P. xylostella*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992). *Razão de toxicidade significativa para isolados de *B. thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

** Não estimado.

Tabela 3. Suscetibilidade da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, frente a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	G ¹	N ²	Inclinação ± EP ³	CL ₅₀ (IC 95%) ⁴	CL ₉₀ (IC 95%) ⁴	χ ² (GL) ⁵	RT ₅₀ (IC 95%) ⁶
<i>Bta</i>	F ₃₇	336	0,49 ± 0,06	0,051 (0,02-0,11)	21,90 (5,70-171,14)	2,13 (5)	---
LIIT-4311	F ₃₅	336	0,50 ± 0,06	0,001 (0,0003-0,004)	0,49 (0,14-4,31)	5,01 (5)	0,02 (0,008-0,10)*
LIIT-4306	F ₃₇	336	0,71 ± 0,07	0,001 (0,0005-0,004)	0,09 (0,03-0,84)	9,16 (5)	0,03 (0,01-0,10)*
LIIT-4406	F ₃₅	336	0,50 ± 0,06	0,011 (0,005-0,022)	4,05 (1,28-22,66)	3,87 (5)	0,20 (0,10-0,60)*
LIIT-3509	F ₃₆	334	1,04 ± 0,14	0,49 (0,22-0,81)	8,41 (4,17-33,97)	6,27 (5)	9,50 (4,20-21,50)*
LIIT-3303	F ₃₆	336	0,98 ± 0,14	0,58 (0,30-0,89)	11,64 (7,07-25,82)	3,46 (5)	11,40 (0,10-1093,10)
LIIT-3818	F ₃₆	336	0,66 ± 0,13	2,39 (0,77-4,48)	213,39 (83,11-1515,10)	3,09 (5)	46,80 (16,20-135,60)*
LIIT-2204	F ₃₅	336	0,92 ± 0,13	2,81 (1,48-4,32)	69,90 (39,70-177,67)	2,18 (5)	54,90 (0,30-10285,70)
LIIT-4211	F ₃₆	336	0,54 ± 0,12	2,75 (0,72-5,41)	673,81 (174,42-18662,22)	0,86 (5)	53,70 (17,50-165,40)*
LIIT-1411	F ₃₆	336	0,72 ± 0,12	4,83 (2,47-7,67)	286,27 (115,85-1599,00)	1,47 (5)	94,30 (38,90-228,90)*
LIIT-0105	F ₃₇	447	0,59 ± 0,10	6,33 (1,57-13,96)	----	8,12 (5)	123,80 (51,40-297,90)*
LIIT-0526	F ₃₆	336	0,81 ± 0,12	8,46 (5,34-12,62)	323,09 (139,14-1436,50)	4,14 (5)	165,30 (72,80-375,40)*
LIIT-2109	F ₃₅	336	0,61 ± 0,12	15,84 (9,34-28,90)	1925,25 (451,96-44423,95)	2,76 (5)	309,50 (127,80-749,20)*

¹ Geração.

² Número total de insetos testados.

³ Inclinação ± Erro Padrão.

⁴ Esporos+cristais×10⁸/mL de NaCl a 0,9%.

⁵ Qui-quadrado e Grau de liberdade.

⁶ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari®WDG) (*Bta*) e os isolados de *B. thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992). * Razão de toxicidade significativa para isolados de *B. thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 4. Inibição do crescimento da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella*, frente a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	G ¹	N ²	CE ₅₀ (IC 95%) ³	CE ₉₅ (IC 95%) ³	RT ₅₀ ⁴	RT ₅₀ ⁵
<i>Bta</i>	F ₅₆	240	0,0026 (0,0004-0,007)	0,88 (0,05-11,10)	0,93	----
<i>Btk</i>	F ₅₆	220	0,0028 (0,001-0,005)	0,29 (0,09-0,95)	----	1,08
LIIT-4311	F ₄₈	230	0,0001 (0,0000-0,0001)	4,48 (1,49-14,41)	0,03	0,04
LIIT-4306	F ₅₆	239	0,0001 (0,0001-0,0003)	8,56 (2,93-25,79)	0,03	0,04
LIIT-2403	F ₅₆	346	0,01 (0,008-0,02)	7,01 (2,59-17,81)	3,57	3,84
LIIT- 2310	F ₅₆	223	0,02 (0,01-0,04)	11,66 (1,86-58,27)	7,14	7,69
LIIT-4108	F ₅₅	239	0,03 (0,02-0,03)	22827,33 (7907,70-63704,17)	10,71	11,54
LIIT-3303	F ₅₁	209	0,05 (0,02-0,10)	5577,82 (1139,73-28282,44)	17,86	19,23
LIIT-0302	F ₄₈	229	0,06 (0,04-0,09)	16,22 (4,28-51,21)	21,43	23,08
LIIT-2601	F ₅₆	327	0,17 (0,06-0,29)	168,80 (40,19-738,35)	60,71	65,38
LIIT-2109	F ₄₈	235	0,40 (0,20-0,60)	7,82 (2,68-21,64)	142,86	153,85
LIIT-2718	F ₅₁	223	0,70 (0,24-1,23)	88,14 (11,64-577,09)	250	269,23
LIIT-2707	F ₅₂	233	0,99 (0,44-1,54)	31,06 (8,33-106,22)	353,57	380,77
LIIT-2112	F ₅₃	228	2,23 (1,10-3,41)	260,70 (60,01-1032,35)	796,43	857,69

¹ Geração

² Número total de insetos testados.

³ Esporos+cristais×10⁸/mL de NaCl a 0,9%.

⁴ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CE₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®]WP) (*Btk*) e os isolados de *B. thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Plutella xylostella*.

⁵ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CE₅₀ entre *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari[®]WDG) (*Bta*) e os isolados de *B. thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *P. xylostella*.

Tabela 5. Inibição do crescimento da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, frente a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	G ¹	N ²	CE ₅₀ (IC 95%) ³	CE ₉₅ (IC 95%) ³	RT ₅₀ ⁴
<i>Btk</i>	F ₃₇	336	0,006 (0,005-0,007)	0,29 (0,21-0,40)	----
LIIT-4306	F ₃₇	336	0,00006 (0,00005-0,00007)	0,002 (0,002-0,003)	0,01
LIIT-4311	F ₃₅	336	0,0001 (0,0000-0,0001)	0,07 (0,03-0,16)	0,02
LIIT-4406	F ₃₅	336	0,001 (0,001-0,0001)	0,35 (0,24-0,52)	0,17
LIIT-4211	F ₃₆	336	0,08 (0,03-0,15)	113,27 (61,36-226,73)	13,33
LIIT-3509	F ₃₆	334	0,14 (0,11-0,17)	1,31 (0,87-1,97)	23,33
LIIT-3818	F ₃₆	336	0,18 (0,10-0,29)	31,76 (21,24-49,65)	30,00
LIIT-3303	F ₃₆	336	0,18 (0,14-0,22)	2,51 (1,90-3,36)	30,00
LIIT-0105	F ₃₇	447	0,96 (0,68-1,23)	63,48 (37,95-106,43)	160,00
LIIT-0526	F ₃₆	336	1,25 (0,84-1,66)	66,57 (33,91-129,28)	208,33
LIIT-1411	F ₃₆	336	1,48 (1,20-1,75)	46,42 (30,39-70,13)	246,67
LIIT-2204	F ₃₅	336	1,49 (1,26-1,70)	15,70 (11,06-21,97)	248,33
LIIT-2109	F ₃₅	336	3,01 (2,11-3,96)	365,12 (141,94-878,68)	501,67

¹ Geração

² Número total de insetos testados.

³ Esporos+cristais×10⁸/mL de NaCl a 0,9%.

⁴ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CE₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®]WG) (*Btk*) e os isolados de *B. thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) DO NORDESTE BRASILEIRO ATIVOS A *Plutella xylostella* (L.1758) E *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH 1797)¹

MARIA C. SILVA², HERBERT A. A. SIQUEIRA², EDMILSON J. MARQUES², LILIANE M. SILVA² & REGINALDO BARROS²

²Departamento de Agronomia – Entomologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil.

¹Silva, M.C., H.A.A. Siqueira, E.J. Marques, L.M. Silva, R. Barros. Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) do Nordeste brasileiro ativos a *Plutella xylostella* (L.1758) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797). A ser submetido.

RESUMO - Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) e plantas geneticamente transformadas com genes dessa bactéria têm sido bastante utilizados no controle de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). A pressão de seleção imposta por estas tecnologias pode comprometer a eficiência dessa importante alternativa aos inseticidas sintéticos, devido o aparecimento de populações resistentes. O uso de diferentes toxinas possibilita reverter à resistência e um controle satisfatório desses insetos. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o conteúdo protéico e gênico de vinte isolados de *B. thuringiensis* ativos a *P. xylostella* e *S. frugiperda*, oriundos de amostras de solo e de insetos obtidas em diversas áreas do Nordeste do Brasil. Os isolados de *B. thuringiensis* apresentaram, em sua maioria, cristais bipiramidais e esféricos. O perfil protéico da maioria dos isolados produziu tamanho de bandas de 130 kDa, sugerindo a presença das proteínas Cry1, Cry2, Cry8 e Cry9. O conteúdo genético dos isolados de *B. thuringiensis* revelaram os genes *cry1*, *cry2*, *cry8* e *cry9*, como verificado nos isolados LIIT-4306 e LIIT-4311 que foram os mais tóxicos a esses dois insetos. A grande variabilidade de formato de cristais, de toxicidade, e de conteúdo protéico e gênico encontrado nos isolados de *B. thuringiensis* sugere seus potenciais para serem utilizados no desenvolvimento de novos biopesticidas ou transformação de plantas para o manejo de *P. xylostella* e *S. frugiperda*.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade entomopatogênica, cristais, proteínas Cry, genes *cry*, controle microbiano, traça-das-crucíferas e lagarta-do-cartucho

CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* (BERLINER 1911) ISOLATES FROM
NORTHEAST BRAZIL ACTIVE TO *Plutella xylostella* (L.1758) AND *Spodoptera*
frugiperda (J.E.SMITH 1979)

ABSTRACT – Biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* (Berliner) and genetically modified plants with genes of this bacterium have been extensively used in the control of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). The selection pressure imposed by these technologies may undermine the efficiency of this important alternative to synthetic insecticides, because the evolution of resistant populations. The use of different toxins allows the resistance reversion and a satisfactory control of these insects. Thus, the purpose of this study was to characterize the protein and gene contents of twenty *B. thuringiensis* isolates active against *P. xylostella* and *S. frugiperda*, from soil and insects samples collected in various areas of Northeast Brazil. The majority of the *B. thuringiensis* isolates harbored bipyramidal and spherical crystals. The protein profile of the isolate majority produced band sizes of 130 kDa, suggesting the presence of Cry1, Cry2, Cry8, and Cry9 proteins. The gene content of *B. thuringiensis* isolates revealed the presence of *cry1*, *cry2*, *cry8*, and *cry9* genes, as seen in LIIT-4306 and LIIT-4311 isolates, which were more toxic to both insects. The great variability in crystal shape, toxicity, and gene and protein contents found in these *B. thuringiensis* isolates suggests their potential to be used in the development of new biopesticides and plant transformation to manage both *P. xylostella* and *S. frugiperda*.

KEYWORDS: Entomopathogenic activity, crystals, Cry proteins, *cry* genes, microbial control, diamondback moth, fall armyworm

Introdução

Os inseticidas biológicos são considerados alternativas específicas à utilização indiscriminada de inseticidas sintéticos, principal forma de controle contra o ataque de insetos-pragas como *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), consideradas as principais pragas das culturas de brássicas e milho no Brasil, respectivamente. O intenso cultivo de brássicas com diversos hospedeiros de *P. xylostella*, disponíveis em todas as épocas do ano intensifica o controle, principalmente, o químico com até quatro aplicações por semana (Castelo Branco *et al.* 2001). O mesmo ocorre com a cultura do milho cultivado em vários locais e épocas do ano, hospedeiro favorável a *S. frugiperda* que é responsável por 38,3 milhões de dólares gastos com pulverizações de inseticidas, com prejuízo aproximadamente de 250 milhões de dólares ao ano (Waquil & Vilela 2003).

Dentre os inseticidas biológicos, formulações à base da bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1911) (Eubacteriales: Bacillaceae) têm sido uma alternativa para o controle desses insetos, bem como a utilização de plantas transgênicas expressando proteínas Cry presentes nesta bactéria. As principais vantagens da utilização destas toxinas inseticidas, tanto na forma de formulações bacterianas quanto na forma de plantas transgênicas advêm da sua ação restrita a algumas ordens de insetos como as de lepidópteros, coleópteros e dípteros, não afetando o ser humano e não prejudicando o ambiente, além de diminuir a dependência do controle químico. As plantas transgênicas apresentam ainda vantagens em relação ao uso de formulações à base de *B. thuringiensis*, tais como persistência no meio ambiente e a proteção relacionada à degradação por raios UV (de Maagd *et al.* 1999, Navon 2000).

A ação restrita dessa bactéria aos insetos é decorrente de um complexo modo de ação dessa bactéria. Durante o processo de esporulação essa bactéria produz inclusões cristalinas (Aronson 2002) que, ao serem ingeridas por insetos suscetíveis, são solubilizadas no intestino

médio e processadas por proteinases, liberando proteínas tóxicas chamadas de proteínas Cry ou δ -endotoxinas (Bravo *et al.* 2005). Estas proteínas, na forma ativada, atravessam a membrana peritrófica e interagem com receptores específicos localizados nas microvilosidades das células colunares do intestino dos insetos suscetíveis, com subsequente formação de poros, ocorrendo, assim, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino e conseqüentemente a morte do inseto (de Maagd *et al.* 2001, Bravo *et al.* 2005).

O controle de *P. xylostella* e *S. frugiperda* utilizando esse microrganismo, como bioinseticida ou como planta transformada com genes *cry*, tem sido bastante intensificado em todo mundo. No entanto, relatos de resistência desses insetos as proteínas Cry (Gong *et al.* 2010) ou ineficácia dos produtos tem comprometido a utilização dessas tecnologias (Storer *et al.* 2010). Além disso, apesar de conhecidas mais de 450 toxinas de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.* 2011), o número destas em produtos tecnológicos tem sido restrito, sugerindo um espectro de atividade muito estreito destas toxinas frente a pragas agrícolas. Nesse sentido a busca por novos genes que expressem proteínas tóxicas a insetos e que auxiliem o manejo desses tem sido uma constante entre vários pesquisadores.

Isolados de *B. thuringiensis* coletados em áreas do Nordeste do Brasil e avaliados no estudo anterior apresentaram atividades entomocidas variáveis frente a *P. xylostella* e *S. frugiperda*, com alguns isolados sendo muito ativos a estas pragas. No entanto, nada se sabe sobre o conteúdo genético, em particular do conjunto de genes de toxinas ativas a insetos nestes isolados. Desta forma, o objetivo desse estudo foi caracterizar bioquimicamente e molecularmente os isolados de *B. thuringiensis* oriundos de amostras do Nordeste do Brasil que apresentaram atividade tóxica a *P. xylostella* e *S. frugiperda*, visando sua aplicação em programas de controle desses insetos. A utilização de técnicas moleculares como PCR (Reação em Cadeia Polimerase) tem contribuído na detecção de genes com ação inseticida

específicos em diferentes linhagens de *B. thuringiensis* (Bourque *et al.* 1993, Santos *et al.* 2009) e na detecção de novos genes *cry* (Juarez-Perez *et al.* 1997, Noguera & Ibarra 2010). Estas técnicas foram aqui utilizadas com o propósito de identificar toxinas nos isolados provenientes de áreas do Nordeste do Brasil.

Material e Métodos

Origem e Manutenção dos Isolados de *B. thuringiensis*. Os 20 isolados analisados neste estudo foram provenientes do banco de *Bacillus* do Laboratório de Interação Inseto-Tóxico do Departamento de Agronomia da UFRPE. Esse isolados foram obtidos a partir de amostras de solo e de insetos coletados em Estados Nordestinos, de acordo com o método descrito por Travers *et al.* (1987). Os isolados são mantidos em glicerol a 15% e SDS a 0,01% a -80°C. Como padrão foram utilizados *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel[®] WP) (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari[®]WDG) (*Bta*).

Caracterização dos Cristais. A morfologia dos cristais dos isolados foi feita utilizando a coloração azul de coomassie, e quando necessário foi utilizada a coloração verde malaquita a 5% através do método de Wirtz-Conklin. Estes foram observados sob microscopia de campo claro usando uma objetiva de óleo de imersão com magnificação de 2000×.

Bioensaios. A toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* contra neonatas de *P. xylostella* e de *S. frugiperda* foi avaliada utilizando seis a sete concentrações de suspensões de cristais+esporos/mL de cada isolado. Para *P. xylostella*, discos de folhas de couve com 5 cm de diâmetro foram imersos nas suspensões com Triton X-100 a 0,01% (como espalhante) por 10 segundos e secos posteriormente à temperatura ambiente. Após a secagem, os discos foram transferidos individualmente para placas de Petri de 6 cm de diâmetro, contendo disco de papel filtro umedecido com água destilada. Dez larvas neonatas de *P. xylostella* foram transferidas para cada placa de Petri usando pincel número 0 (zero) e 2 replicações por

concentração para cada isolado. Os bioensaios foram mantidos em câmara climatizada (tipo B.O.D.), sob temperatura de $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $65 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h. Para *S. frugiperda*, uma alíquota de 30 μL de suspensões de *B. thuringiensis* nas diferentes concentrações de esporos+cristais/mL com Triton X-100 a 0,01% foi aplicada na superfície da dieta artificial em bandejas de bioensaio de 128 células (Bio-Serv, Frenchtown, NJ). Após a secagem da suspensão sobre a dieta, neonatas foram individualmente transferidas para cada célula e as bandejas foram cobertas com tampas transparentes e ventiladas (Bio-Serv, Frenchtown, NJ), sendo feitas 16 replicações por concentração para cada isolado. As bandejas de bioensaio contendo as larvas foram acondicionadas em câmara climatizada, regulada para $28 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $65 \pm 10\%$ e 12 h de fotofase. Foi utilizada a solução de NaCl a 0,9% + Triton X-100 a 0,01%, como controle negativo. As CL_{50} s dos padrões *Btk* e *Bta* foram estimadas para *P. xylostella* e *S. frugiperda* para comparações com os parâmetros estimados com os isolados.

Os bioensaios foram repetidos pelo menos mais uma vez e a avaliação de mortalidade das larvas baseou-se na ausência de resposta ao serem estimuladas com leve toque de um pincel número 0 (zero). Os dados de mortalidade, após correção (Abbott 1925) foram submetidos à análise de Probit a $P > 0,05$ (Finney, 1971), através do programa estatístico POLO-PC (LeOra Software 1987). As respostas dos isolados de *B. thuringiensis* testados nos bioensaios de concentração-mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas e estimativas das CL_{50} s para *P. xylostella* e *S. frugiperda*. As razões de toxicidade dos isolados de *B. thuringiensis* foram calculadas com relação aos padrões de suscetibilidade *Btk* e *Bta* pelo teste de razão letal e consideradas significativas quando o intervalo de confiança (IC) a 95% não incluiu o valor um, como proposto por (Robertson & Preisler 1992).

Perfil Protéico dos Isolados de *B. thuringiensis*. A caracterização protéica dos isolados foi feita no Laboratório de Interação Inseto-Tóxico (LIIT), onde os isolados foram submetidos à

eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida desnaturante, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12,5%), o que permitiu conhecer o perfil das proteínas produzidas. Os isolados foram inoculados em tubos falcon de 15 mL contendo 5 mL do meio LB líquido. Esses tubos foram colocados em mesa agitadora por 52 h a 30°C a 250 rpm. As proteínas foram extraídas de acordo com a metodologia proposta por Lecadet *et al.* (1991). Foram transferidos 1,5 mL da cultura bacteriana para tubo criogênico de 2 mL previamente autoclavado, e, em seguida, centrifugado a 12000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 2 mL de 0,5 M NaCl no vórtex e centrifugado 12000xg por 15 min a 4°C. Em seguida, descartou-se o NaCl 0,5 M e ressuscitou-se o *pellet* em 2 mL em solução para inibição da atividade proteolítica (1 mmol.L⁻¹ PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 10 mmol.L⁻¹ EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) no vórtex e centrifugado a 12000xg por 15 min a 4°C, repetindo-se esse procedimento por mais duas vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL da solução de inibidores e estocado a -20°C. Os produtos desse procedimento foram analisados por SDS-PAGE, conforme a metodologia descrita por Laemmli (1970). Os padrões *Btk* e *Bta* foram utilizados como controle positivo. Foram utilizados 35 µL dos produtos para a realização da eletroforese sob voltagem constante de 75 V por 1 h.

Identificação de Genes de Toxinas de *B. thuringiensis* Através de PCR. A caracterização molecular dos isolados foi realizada no LIIT e no Laboratório de Biologia Molecular da Fitopatologia, utilizando aneladores gerais a alguns genes, os isolados foram previamente cultivados em placas contendo meio LB sólido, por 12 h a 30°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuscitada em 1 mL de água estéril em tubos de microcentrífuga autoclavados e levados à centrifugação por 1 min a 15,000xg a 20°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µL da Matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 56°C por 20 min, agitado vigorosamente

em vórtex por 10 s e incubado em água fervente (100°C) por 8 min. A amostra foi novamente agitada em vórtex por 10 s e centrifugada a 20°C por 3 min. Finalmente, 200 µl do sobrenadante foram colhidos, transferidos para tubos de microcentrífuga autoclavados, os quais foram estocados em freezer – 20°C até o momento do uso. O DNA dos padrões *Btk* e *Bta* foram utilizados como controle positivo nas reações de amplificação por PCR.

A identificação dos genes *cry*, *cyt* e *vip* para cada isolado foi feita em um volume de 30 µL, contendo: 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (solução tampão para reação de PCR Invitrogen®), 2,5 U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTP's, 10µM de cada iniciador, 2 µL de DNA molde e água ultrapura livre de DNase, previamente esterilizada. Como controle negativo a quantidade de DNA foi substituída por água ultrapura livre de DNase, previamente esterilizada.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient – Eppendorf), onde foram utilizadas as seguintes condições para os iniciadores Geral-cry1, Geral-cry2, Geral-cry3 e Geral-cry4: um passo inicial de desnaturação de 95°C a 2 min e 35 ciclos consistindo de um ciclo de desnaturação a 95 °C a 1 min, anelamento a 52°C a 1 min e extensão a 72°C a 1 min e, ao final dos ciclos, um passo extra de extensão a 72°C a 5 min. Ao fim do programa, foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador. As condições para os outros iniciadores foram as mesma, com diferença na temperatura de anelamento, onde para o Geral-cry8 foi de 49°C, para os iniciadores Geral-cry9, Geral-cry11 e Geral-cyt foi de 51°C e para o iniciador Geral-vip foi de 53°C (Tabela 1).

Após as amplificações, 5 µL das amostras misturados a 3 µL de tampão de amostra (“loading buffer” - 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, contendo Sybr® Safe (0,1 µL/mL) e submetidos à eletroforese horizontal por 2 h, a 70 V, conduzida em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 1 mM com pH 8). Em

todas as eletroforeses foi utilizado DNA Ladder[®] para verificação do tamanho das bandas obtidas nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visibilizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

Resultados

Caracterização dos Cristais. A caracterização dos isolados quanto ao formato do cristal revelou que a maioria dos isolados tóxicos a *P. xylostella* e *S. frugiperda* apresentou formas compostas entre os cristais bipiramidais, esféricos e cubóides, sendo que o formato esférico foi o mais visibilizado, seguido do formato bipiramidal (Tabela 2). Apenas cinco isolados apresentaram cristais de forma cubóide (Tabela 2).

Bioensaios. O isolado LIIT-4311 apresentou a menor concentração requerida para ocasionar a mortalidade de 50% das populações de *P. xylostella* e *S. frugiperda* de $0,02 \times 10^8$ esporos+cristais/mL de *B. thuringiensis* (Tabela 2). Esse isolado foi 1,5 vezes mais tóxico do que o padrão *Btk* para *P. xylostella*, já o padrão *Bta* apresentou o melhor resultado para esse inseto. Para *S. frugiperda*, além do isolado LIIT-4311, os isolados LIIT-4306 e LIIT-4406 apresentaram-se mais ativos, com cerca de 50 (LIIT-4311 e LIIT-4306) e 4,6 (LIIT-4406) vezes mais tóxicos do que o padrão *Bta*. Não foi possível estimar a CL_{50} para o padrão *Btk* (Tabela 2).

Perfil Protéico dos Isolados de *B. thuringiensis*. O perfil protéico dos vinte isolados selecionados no bioensaio de toxicidade foi obtido da mistura de esporo-cristal, mostrado na figura 1. A maioria dos isolados (85%) apresentaram banda próxima a 130 kDa similar aos padrões *Btk* e *Bta*. Foi possível visualizar em 50% dos isolados bandas entre 65 e 70 kDa.

Identificação de Genes de Toxinas de *B. thuringiensis* através de PCR. As análises obtidas por PCR, utilizando-se os pares de oligonucleotídeos iniciadores gerais *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cyt* e *vip* com os 20 isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram atividade

tóxica a larvas de *P. xylostella* e *S. frugiperda* (Tabela 2), permitiram verificar que dos nove iniciadores gerais, quatro (*cry1*, *cry2*, *cry8* e *cry9*) apresentaram amplificação para os isolados de *B. thuringiensis*, com o tamanho da banda esperado (Tabela 2). Apenas o iniciador *cry2* apresentou banda para todos os isolados, seguido do iniciador *cry9* que apresentou banda para 19 (95%) dos isolados. Para os iniciadores *cry1* e *cry8* foi possível visualizar banda em 13 (65%) e cinco (25%) dos isolados, respectivamente.

Para *P. xylostella* os isolados LIIT-0302, LIIT-2109, LIIT-2112, LIIT-2310, LIIT-2403 e LIIT-2707 apresentaram os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, sendo que as CL₅₀s desses isolados variaram de 0,29 a 48,49 x 10⁸ esporos+cristais/mL. Os isolados LIIT-2601, LIIT-4306 e LIIT-4311 apresentaram, além dos genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, o gene *cry8*. Os isolados LIIT-4306 e LIIT-4311 apresentaram respectivamente CL₅₀s de 0,03 e 0,02 x 10⁸ esporos+cristais/mL, portanto os mais ativos, e o isolado LIIT-2601 apresentou CL₅₀ de 9,58 x 10⁸ esporos+cristais/mL. Os isolados LIIT-3303 e LIIT-3818, apesar de ter apresentado somente os genes *cry2* e *cry9* mostraram-se mais tóxico a esse inseto com CL₅₀ de 9,18 e 3,36 x 10⁸ esporos+cristais/mL, respectivamente, do que os isolados LIIT-2109, LIIT-2112, LIIT-2601 e LIIT-2707. O isolado LIIT-2718 apresentou somente o gene *cry2* causando mortalidade superior aos isolados LIIT-2109, LIIT-2112, LIIT-2601, LIIT-2707 e LIIT-3303, com CL₅₀ de 7,46 x 10⁸ esporos+cristais/mL.

Para *S. frugiperda*, os isolados LIIT-0105, LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406 apresentaram *cry1*, *cry2*, *cry9* e *cry8*, mas com uma grande variação na suscetibilidade desse inseto com CL₅₀s variando de 0,001 a 6,33 x 10⁸ esporos+cristais/mL. Já os isolados LIIT-0526, LIIT-2112 e LIIT-2204 apresentaram os genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, também com variação na suscetibilidade desse inseto com CL₅₀ variando de 2,81 a 15,84 x 10⁸ esporos+cristais/mL. Os isolados LIIT-1411, LIIT-3303, LIIT-3509, LIIT-3818 e LIIT-4211, apesar de apresentarem somente os genes *cry2* e *cry9*, mostraram melhores resultados, principalmente

os isolados LIIT-3303 e LIIT-3509 com CL_{50} de 0,58 e 0,49 x 10^8 esporos+cristais/mL, respectivamente, quando comparados com isolados que amplificaram três ou até mesmo os quatro genes. As linhagens padrões *Btk* e *Bta* amplificaram somente os genes *cry1* e *cry2*. Essas linhagens apresentaram toxicidade para *P. xylostella* com CL_{50} de 0,03 e 0,01 x 10^8 esporos+cristais/mL, respectivamente. Já para *S. frugiperda*, somente a linhagem *Bta* foi tóxica com CL_{50} de 0,051 x 10^8 esporos+cristais/mL.

Discussão

Dentre os iniciadores que não amplificaram banda para os isolados de *B. thuringiensis* apenas o gene *vip* codifica proteínas com atividade tóxica contra vários lepidópteros (Yu *et al.* 1997, Bhalla *et al.* 2005). O gene *cry3* é ativo contra coleópteros (Sekar *et al.* 1987, Sato *et al.* 1994) e os genes *cry4*, *cry11* e *cyt* são ativos contra dípteros (Orduz *et al.* 1998, Thiery *et al.* 1998, Berry *et al.* 2002), provável razão de não terem sido identificados nos isolados avaliados, uma vez que esses foram selecionados com base na atividade a lepidópteros.

A presença de bandas do gene *cry8* nos isolados LIIT-0105, LIIT-2601, LIIT-4406, LIIT-4411 e LIIT-4306, pode ter contribuído para a toxicidade dos isolados a *P. xylostella* e *S. frugiperda*. No entanto, o gene *cry8* codifica proteínas tóxicas contra coleópteros como as proteínas Cry8Ba, Cry8Ca, Cry8Da e Cry8Ea1 (Hori *et al.* 1994, Asano *et al.* 2003, Shu *et al.* 2009) e a proteína Cry8Aa que apresenta atividade dupla para coleópteros e hemípteros (Afídeos) (Crickmore *et al.* 2011). Embora o gene *cry8* esteja associado aos isolados mencionados acima, muito provavelmente não participam na resposta toxicológica verificada em *P. xylostella* e *S. frugiperda*.

A relação entre a toxicidade e o conteúdo de genes dos isolados de *B. thuringiensis* estudados sugere que a toxicidade à *P. xylostella* esteja fortemente ligada à proteína Cry2 tóxica a lepidópteros e dípteros, uma vez que o gene *cry2* foi amplificado em 100% dos

isolados testados neste inseto e que o LIIT-2718 amplificou apenas essa banda e mostrou-se mais tóxico do que isolados que apresentaram mais de uma banda.

O perfil protéico também sugere a presença desse gene nos isolados ativos a *P. xylostella* e *S. frugiperda*, uma vez que foram observados isolados produzindo bandas entre 65 e 71 kDa, tamanho da banda da proteína Cry2 (Höfte & Whiteley 1989, Pinto & Fiuza 2003a). Medeiros *et al.* (2005) caracterizaram molecularmente isolados de *B. thuringiensis* que causaram 100% de mortalidade em *P. xylostella* utilizando genes *cry1* e *cry2* e verificaram que um desses isolados (S390) apresentou apenas a banda correspondente ao gene *cry2*. Resultado similar foi obtido por Praça *et al.* (2009). Já Monnerat *et al.* (2007) verificaram que isolados de *B. thuringiensis* que ocasionaram 100% de mortalidade em larvas de *P. xylostella* apresentavam em seu conteúdo genético genes *cry1* e *cry2*. No entanto, Monnerat *et al.* (1999) testaram várias toxinas de *B. thuringiensis* em *P. xylostella* e obtiveram a maior CL₅₀ para a toxina Cry2Aa, verificando assim, a baixa toxicidade dessa proteína a esse inseto.

Como o gene *cry1* amplificou banda para a maioria dos isolados de *B. thuringiensis* tóxicos a *P. xylostella* neste estudo, supõe-se que este gene esteja implementando a ação tóxica dos isolados em combinação com o gene *cry2* amplificados juntos aos isolados LIIT-4306 e LIIT-4311 que foram os mais tóxicos a esse inseto. Vários estudos mostram que o gene *cry1* tem sido encontrado na grande maioria dos isolados de *B. thuringiensis* (Ben-Dov *et al.* 1997, Bravo *et al.* 1998, Wang *et al.* 2003), também observado neste estudo e, portanto, sugerindo que a atividade dos isolados pode estar também associada a estas toxinas. Várias proteínas codificadas por genes *cry1* têm sido relatadas como altamente tóxicas a populações de *P. xylostella* como Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C e Cry1F (Tabashnik *et al.* 1994, Monnerat *et al.* 1999, Sayyed *et al.* 2000, Monnerat *et al.* 2007, Mohan *et al.* 2009).

A variabilidade na suscetibilidade em diferentes populações de *P. xylostella* tem sido relatada em diversas partes do mundo tanto para toxinas, por exemplo, Cry1 (Gonzalez-Cabrera *et al.* 2001, Mohan & Gujar 2002, Sayyed *et al.* 2004), quanto para isolados de *B. thuringiensis* a esta espécie (Monnerat *et al.* 2007, Thaphan *et al.* 2008). É provável que variações genéticas entre populações de um inseto ou de um patógeno possam ditar o grau de interação entre estes organismos. As condições físico-químicas do lúmen intestinal, o tipo de protease do intestino médio, o seu papel na ativação da protoxina, a presença de receptores para as toxinas de diferentes *B. thuringiensis* e sua afinidade de ligação podem determinar a especificidade e toxicidade de um dado isolado de *B. thuringiensis* ou toxina a uma dada população desse inseto (Oppert 1999, Ferré & Van Rie 2002, Mohan & Gujar 2003).

O gene *cry9* codifica proteínas tóxicas contra muitos lepidópteros agronomicamente importantes (Lambert *et al.* 1996, Van Frankenhuyzen *et al.* 1997, Wang *et al.* 2003, Silva-Werneck & Ellar 2008, Patel *et al.* 2009). Apesar disso, essa proteína não tem mostrado excelente atividade tóxica a *S. frugiperda* (Lambert *et al.* 1996, Pinto & Fiuza 2003b). A grande ocorrência desse gene nos isolados tóxicos a *P. xylostella* sugere que esta toxina possa também estar atuando na toxicidade desses isolados, como constatado com a proteína Cry9Ca1 que foi altamente tóxica a duas populações de *P. xylostella*, sendo que uma dessas populações era resistente as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (Lambert *et al.* 1996). Desta forma, isolados que apresentam toxinas Cry9 podem conter formas mais tóxicas, potencialmente substitutas daquelas que já tenham perdido suas eficiências em controlar algumas espécies de insetos. A análise de SDS-PAGE revelou que a maioria dos isolados produziram bandas variando entre 130 e 140 kDa, sendo esses tamanhos de bandas característicos das proteínas Cry1, Cry8 e Cry9 (Höfte & Whiteley 1989, Asano *et al.* 2003, Pinto & Fiuza 2003a, Silva-Werneck & Ellar 2008). Entretanto, a alta variabilidade dos perfis

protéicos observados sugere importantes diferenças entre os isolados de *B. thuringiensis*, que concordam com os diversos conteúdos gênicos encontrados nesse isolados.

Os isolados LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406 que contém os genes *cry1*, 2, 8 e 9, apresentaram alta atividade a *S. frugiperda* e dois isolados (LIIT-3303 e 3509) com relativa toxicidade a esta espécie. Estes dois últimos isolados diferiram dos mais ativos, sugerindo-se que essa relativa toxicidade pode ter ocorrido por não apresentarem toxinas Cry1 e Cry8. Porém, o *B. thuringiensis* var *aizawai*, que é muito ativo a esta espécie, contém genes *cry1* e *cry2*. Assim, pode-se inferir que a atividade dos três isolados mais ativos, observados neste estudo, esteja muito provavelmente relacionada às toxinas codificadas pelos genes *cry1*, *cry2* ou mesmo do sinergismo ou efeito aditivo entre elas. Os genes *cry1* e *cry2* são comumente encontrados em isolados de *B. thuringiensis* tóxico a *S. frugiperda* (da Silva *et al.* 2004, Monnerat *et al.* 2006, Monnerat *et al.* 2007, Santos *et al.* 2009).

Alguns estudos têm demonstrado a ação tóxica de proteínas Cry1 contra *S. frugiperda*, particularmente Cry1C e Cry1F. (Loguercio *et al.* 2001, Siebert *et al.* 2008). No entanto, proteínas como Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac têm sido pouco efetivas (Van Rie *et al.* 1990, Aranda *et al.* 1996, Luttrell *et al.* 1999, Santos *et al.* 2009), mas com grande atividade a outras espécies de insetos.

Estas diferenças observadas entre isolados podem estar relacionadas a vários fatores comentados anteriormente. Diferenças na suscetibilidade em populações de *S. frugiperda* a isolados de *B. thuringiensis* têm sido verificadas com populações de *S. frugiperda* nativas do México, Brasil e Colômbia (Monnerat *et al.* 2006). Segundo esses autores, a variabilidade genética pode ocorrer em decorrência da origem geográfica e planta hospedeira, influenciando na seleção de diferenças genéticas. Como exemplo, estes autores verificaram que algumas populações brasileiras não apresentavam receptores para a toxina Cry1D e a população mexicana não apresentavam receptores para a toxina Cry1B, as quais foram insensíveis a

essas toxinas. Desta forma, a busca por isolados locais mais adaptados as espécies ou biótipos locais seja talvez mais promissora em encontrar toxinas mais efetivas no controle de insetos.

No Brasil a ocorrência de populações de *S. frugiperda* com diferenças fenotípicas e genotípicas associados a plantas hospedeiras tem sido evidenciada (Busato *et al.* 2004). Adamczyk Jr. *et al.* (1997), verificaram que o biótipo arroz foi mais suscetível à toxina Cry1Ac presente no algodão Bt do que o biótipo milho. A detecção e caracterização da diversidade genética entre as populações de insetos é uma questão problemática para a implantação de estratégias de manejo, uma vez que a evolução da resistência a inseticidas em populações de insetos é também dependente da bio-ecologia das espécies.

Conclusão

Os isolados LIIT-4306 e LIIT-4311, que foram os mais ativos a *P. xylostella* e *S. frugiperda*, com as menores CL₅₀s apresentaram cristais bipiramidais e esféricos, simultaneamente. A análise SDS-PAGE revelou que a maioria dos isolados produziu tamanho de banda sugerindo a presença das proteínas Cry1, Cry2, Cry8 e Cry9. O conteúdo genético de isolados Nordestinos de *B. thuringiensis* revelaram a presença dos genes *cry1*, *cry2*, *cry8* e *cry9*.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal Rural de Pernambuco através do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola pela oportunidade de desenvolver este trabalho. A Universidade Estadual do Maranhão pela concessão da bolsa de estudo. Ao programa PROF/CAPES pelo suporte no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Literatura citada

- Abbott, W.S.A. 1925.** Method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Adameczyk Jr., J.J., J.W. Holloway, B.R. Leonard & J.B. Graves. 1997.** Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. *J. Cotton Sci.* 1: 21-28.
- Aranda, E., J.A. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca & A. Bravo. 1996.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 203-212.
- Aronson, A. 2002.** Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 417-425.
- Asano, S.I., C. Yamashita, T. Iizuka, K. Takeuchi, S. Yamanaka, D. Cerf & T. Yamamoto. 2003.** A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel cry8 gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biol. Control* 28: 191-196.
- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khamraev, E. Troitskaya, A. Dubitsky, N. Berezina & Y. Margalith. 1997.** Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field- collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4883-4890.
- Berry, C., S. O'Neil, E. Ben-Dov, A.F. Jones, L. Murphy, M.A. Quail, M.T.G. Holden, D. Harris, A. Zaritsky & J. Parkhill. 2002.** Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5082-5095.
- Bhalla, R., M. Dalal, S.K. Panguluri, B. Jagadish, A.D. Mandaokar, A.K. Singh & P.A. Kumar. 2005.** Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 467-472.
- Bourque, S.N., J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie & R.C. Levesque. 1993.** Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523-527.
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón. 2005.** *Bacillus thuringiensis*: mechanisms and use, p. 175-206. In L.I. Gilbert, S.S. Gill & K. Latrou (eds.), *Comprehensive molecular insect science*, vol. 6. Madrid, Elsevier, 3300p.

- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Pena, M.E. Nunez-Valdez, M. Soberon & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Busato, G.R., A.D. Grützmacher, A.C. Oliveira, E.A. Vieira, P.D. Zimmer, M.M. Kopp, J.M. Bandeira & T.R. Magalhães. 2004.** Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. *Neotrop. Entomol.* 33: 709-716.
- Castelo Branco, M., F.H. França, M.A. Medeiros & J.G.T. Leal. 2001.** Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. *Hortic. Bras.* 19: 60-63.
- Crickmore, N., D. Zeigler, A. Bravo, J. Feitelson, E. Schnepf, D. Lereclus, J. Baum, J. Van Rie & D. Dean. 2011.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Acesso em 18/01/2011.
- da Silva, S.M.B., J.O. Silva-Werneck, R. Falcão, A.C. Gomes, R.R. Fragoso, M.T. Quezado, O.B.O. Neto, J.B. Aguiar, M.F.G. de Sá, A. Bravo & R.G. Monnerat. 2004.** Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. *J. Appl. Entomol.* 128: 102-107.
- de Maagd, R., A. Bravo & N. Crickmore. 2001.** How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-199.
- de Maagd, R.A., D. Bosch & W. Stiekema. 1999.** *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. *Trends Pl. Sci.* 4: 9-13.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 501-533.
- Gong, Y., C. Wang, Y. Yang, S. Wu & Y. Wu. 2010.** Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. *J. Invertebr. Pathol.* 104: 90-96.
- Gonzalez-Cabrera, J., S. Herrero, A.H. Sayyed, B. Escriche, Y.B. Liu, S.K. Meyer, D.J. Wright, B.E. Tabashnik & J. Ferre. 2001.** Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4610-4613.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.

- Hori, H., N. Suzuki, K. Ogiwara, M. Himejima, L.S. Indrasith, M. Minami, S. Asano, R. Sato, M. Ohba & H. Iwahana. 1994.** Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 307-313.
- Juarez-Perez, V.M., M.D. Ferrandis & R. Frutos. 1997.** PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2997-3002.
- Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet & M. Peferoen. 1996.** A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 80-86.
- Loguercio, Santos, Barreto, Guimaraes & Paiva. 2001.** 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. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 362-367.
- Luttrell, R.G., L. Wan & K. Knighten. 1999.** Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 92: 21-32.
- Medeiros, P.T., M.d.N. Ferreira, É.S. Martins, A.C.M.M. Gomes, R. Falcão, J.M.C.S. Dias & R.G. Monnerat. 2005.** Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traça-das-crucíferas *Plutella xylostella*. *Pesqu. Agropec. Bras.* 40: 1145-1148.
- Mohan, M. & G.T. Gujar. 2002.** Geographical variation in larval susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* spore-crystal mixtures and purified crystal proteins and associated resistance development in India. *Bull. Entomol. Res.* 92: 489-498.
- Mohan, M. & G.T. Gujar. 2003.** Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 82: 1-11.
- Mohan, M., S.N. Sushil, G. Selvakumar, J.C. Bhatt, G.T. Gujar & H.S. Gupta. 2009.** Differential toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and their crystal toxins against high-altitude Himalayan populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Pest Manage. Sci.* 65: 27-33.
- Monnerat, R., L. Masson, R. Brousseau, M. Pusztai-Carey, D. Bordat & R. Frutos. 1999.** Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Curr. Microbiol.* 39: 159-162.

- Monnerat, R., E. Martins, P. Queiroz, S. Orduz, G. Jaramillo, G. Benintende, J. Cozzi, M.D. Real, A. Martinez-Ramirez, C. Rausell, J. Ceron, J.E. Ibarra, M.C. Del Rincon-Castro, A.M. Espinoza, L. Meza-Basso, L. Cabrera, J. Sanchez, M. Soberon & A. Bravo. 2006.** Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7029-7035.
- Monnerat, R.G., A.C. Batista, P.T. de Medeiros, É.S. Martins, V.M. Melatti, L.B. Praça, V.F. Dumas, C. Morinaga, C. Demo, A.C.M. Gomes, R. Falcão, C.B. Siqueira, J.O. Silva-Werneck & C. Berry. 2007.** Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biol. Control* 41: 291-295.
- Navon, A. 2000.** *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection -- reality and prospects. *Crop Prot.* 19: 669-676.
- Noguera, P.A. & J.E. Ibarra. 2010.** Detection of new *cry* genes of *Bacillus thuringiensis* by use of a novel PCR primer system. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6150-6155.
- Oppert, B. 1999.** Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42: 1-12.
- Orduz, S., M. Realpe, R. Arango, L.A. Murillo & A. Delécluse. 1998.** Sequence of the *cry11Bb1* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1388: 267-272.
- Patel, H.K., J.J. Jani & H.G. Vyas. 2009.** Isolation and characterization of Lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis*. *Inter. J. Integ. Bio.* 6: 121-126.
- Pinto, L.M.N. & L.M. Fiuza. 2003a.** Distribuição de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* isolados de solos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural* 33: 699-702.
- Pinto, L.M.N. & L.M. Fiuza. 2003b.** PCR and bioassays screening of *Bacillus thuringiensis* isolates from rice-fields of Rio Grande do Sul, specific to lepidopterans and coleopterans. *Braz. J. Microbiol.* 34: 305-310.
- Praça, L.B., C. Morinaga, P.T. Medeiros, V.M. Melatti, E.S. Martins, V.F. Dumas, R. Falcão & R.G. Monnerat. 2009.** Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* coletadas em solos do oeste baiano. *Universitas: Ciências da Saúde* 7: 1-18.
- Santos, K.B.D., P. Neves, A.M. Meneguim, R.B. Santos, W.J. Santos, G.V. Boas, V. Dumas, E. Martins, L.B. Praça, P. Queiroz, C. Berry & R. Monnerat. 2009.** Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania*

(Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Control 50: 157-163.

Sato, R., K. Takeuchi, K. Ogiwara, M. Minami, Y. Kaji, N. Suzuki, H. Hori, S. Asano, M. Ohba & H. Iwahana. 1994. Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain buibui toxic to scarabaeid insects. Curr. Microbiol. 28: 15-19.

Sayed, A.H., R. Haward, S. Herrero, J. Ferre & D.J. Wright. 2000. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1509-1516.

Sayed, A.H., B. Raymond, M.S. Ibiza-Palacios, B. Escriche & D.J. Wright. 2004. Genetic and biochemical characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 7010-7017.

Sekar, V., D.V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland & M.J. Adang. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 84: 7036-7040.

Shu, C., H. Yu, R. Wang, S. Fen, X. Su, D. Huang, J. Zhang & F. Song. 2009. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185. Curr. Microbiol. 58: 389-392.

Siebert, M.W., J.M. Babock, S. Nolting, A.C. Santos, J.J. Adamczyk Jr., P.A. Neese, J.E. King, J.N. Jenkins, J. Mccarty, G.M. Lorenz, D.D. Fromme & R.B. Lassiter. 2008. Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). Fla. Entomol. 91: 555-565.

Silva-Werneck, J.O. & D.J. Ellar. 2008. Characterization of a novel Cry9Bb delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 98: 320-328.

Storer, N.P., J.M. Babcock, M. Schlenz, T. Meade, G.D. Thompson, J.W. Bing & R.M. Huckaba. 2010. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. J. Econ. Entomol. 103: 1031-1038.

Tabashnik, B.E., N. Finson, M.W. Johnson & D.G. Heckel. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 60: 4627-4629.

- Thaphan, P., S. Keawsompong & J. Chanpaisaeng. 2008.** Isolation, toxicity and detection of *cry* gene in *Bacillus thuringiensis* isolates in Krabi province, Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30 597-601.
- Thiery, I., S. Hamon, A. Delecluse & S. Orduz. 1998.** The Introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* *cyt1Ab1* gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3910-3916.
- Travers, R.S., P.A. Martin & C.F. Reichelderfer. 1987.** Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1263-1266.
- Van Frankenhuyzen, K., L. Gringorten & D. Gauthier. 1997.** Cry9Ca1 Toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). Appl. Environ. Microbiol. 63: 4132-4134.
- Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele & H. Van Mellaert. 1990.** Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1378-1385.
- Wang, J., A. Boets, J. Van Rie & G. Ren. 2003.** Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. J. Invertebr. Pathol. 82: 63-71.
- Waquil, J.M. & F.M.F. Vilela. 2003.** Gene bom. Rev. Cultivar 49: 22-26.
- Yu, C., M. Mullins, G. Warren, M. Koziel & J. Estruch. 1997.** The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. Appl. Environ. Microbiol. 63: 532-536.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores gerais para genes *cry*.

Iniciadores	Sequências	Referências	TP(bp) ¹	TA(°C) ²
Geral-cry1	5'-CTGGATTACAGGTGGGGATAT-3'(d) 5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3'(r)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	543-594	52
Geral-cry2	5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'(d) 5'-CGGATAAAATAATCTGGGAAATAGT-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	689-701	52
Geral-cry3	5'-CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC-3'(d) 5'-CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	589-604	52
Geral-cry4	5'-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3'(d) 5'-GCGTGACATACCCATTCCAGGTCC-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	1529-1951	52
Geral-cry8	5'-AAGCAGTGAATGCCTTGTTTAC-3'(d) 5'-CTTCTAAACCTTGACTACTT-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	511-679	49
Geral-cry9	5'-CCAGGWTTYAYAGGAGGRG-3'(d) 5'-ASCAYRACACTAAATTTGCCGC-3'(r)	*	497	51
Geral-cry11	5'-TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC-3'(d) 5'-CATTTGTAAGTTGTAATCCC-3'(r)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	305	51
Geral-cyt	5'-AACCCCTCAATCAACAGCAAGG-3'(d) 5'-GGTACACAATACATAACGCCACC-3'(r)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	522-525	51
Geral-vip	5'-ACNTTYCAYGAYGTNATG-3'(d) 5'-CCNARNGGCRTRTANAY-3'(r)	*	840-905	53

¹Tamanho do produto de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) esperado

²Temperatura de anelamento

*Iniciadores delineados a partir de alinhamentos de sequências dos genes *cry9* e *vip* depositados no GENBANK.

Tabela 2. Conteúdo gênico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e das linhagens padrões, obtido por PCR.

Isolados	Genes							Cristais					CL ₅₀ (IC 95%) ¹	
	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry3</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry9</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt</i>	<i>vip</i>	<i>Bip</i>	<i>Esf</i>	<i>Cb</i>	<i>Plutella xylostella</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>B.t. kurstaki</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	0,03 (0,02-0,05)	-
<i>B.t. azawai</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	0,01 (0,008-0,03)	0,051 (0,02-0,11)
LIIT-0105	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	6,33 (1,57-13,96)
LIIT-0302	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	0,29 (0,13-0,62)	-
LIIT-0526	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	8,46 (5,34-12,62)
LIIT-1411	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	4,83 (2,47-7,67)
LIIT-2109	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	13,68 (6,61-71,79)	-
LIIT-2112	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	48,49 (21,42-334,27)	15,84 (9,34-28,90)
LIIT-2204	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2,81 (1,48-4,32)
LIIT-2310	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	0,96 (0,35-3,19)	-
LIIT-2403	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	1,74 (0,86-3,42)	-
LIIT-2601	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	9,58 (6,28-19,06)	-
LIIT-2707	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	11,69 (7,29-25,24)	-
LIIT-2718	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	7,46 (4,97-9,77)	-
LIIT-3303	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	9,18 (4,99-32,99)	0,58 (0,30-0,89)
LIIT-3509	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	0,49 (0,22-0,81)
LIIT-3818	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	2,39 (0,77-4,48)
LIIT-4108	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	3,36 (1,50-10,36)	-
LIIT-4211	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	2,75 (0,72-5,41)
LIIT-4306	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	0,03 (0,005-0,11)	0,001 (0,0005-0,004)
LIIT-4311	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	0,02 (0,003-0,07)	0,001 (0,0003-0,004)
LIIT-4406	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	0,011 (0,005-0,022)

¹ Esporos+cristais (x10⁸)/ mL de NaCl a 0,9%.

+ presença

- ausência

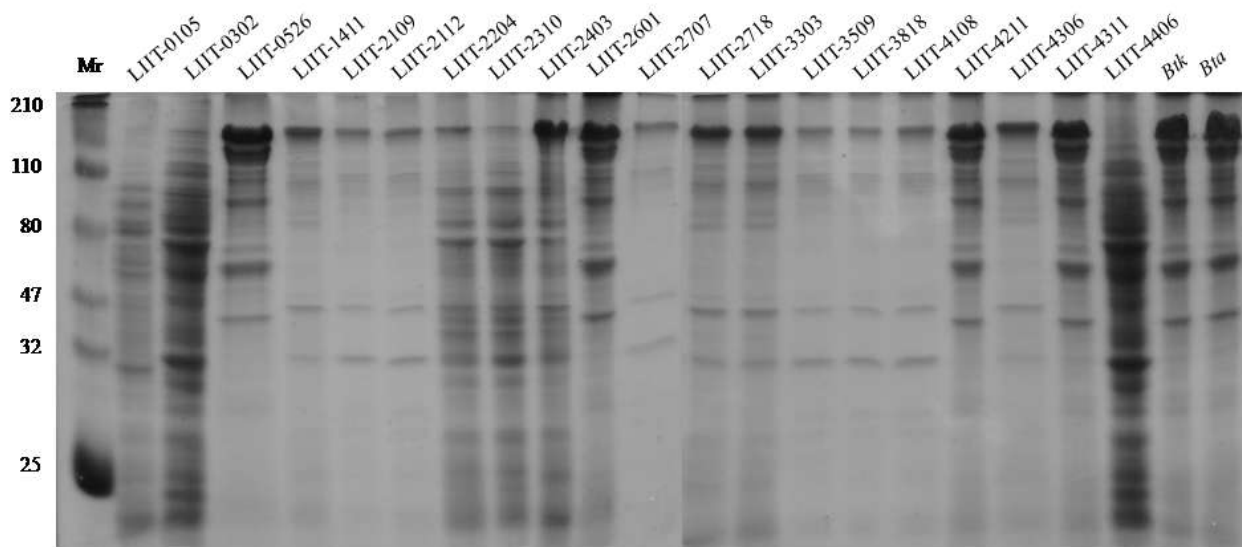


Figura 1. Perfis protéicos obtido com SDS-PAGE de isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos a *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda*. Mr - Marcador protéico (kDa), Btk - (controle positivo - *B. thuringiensis* var. *kurstaki* - Dipel[®]WP) e Bta (controle positivo - *B. thuringiensis* var. *aizawai* - Xentari[®]WDG).

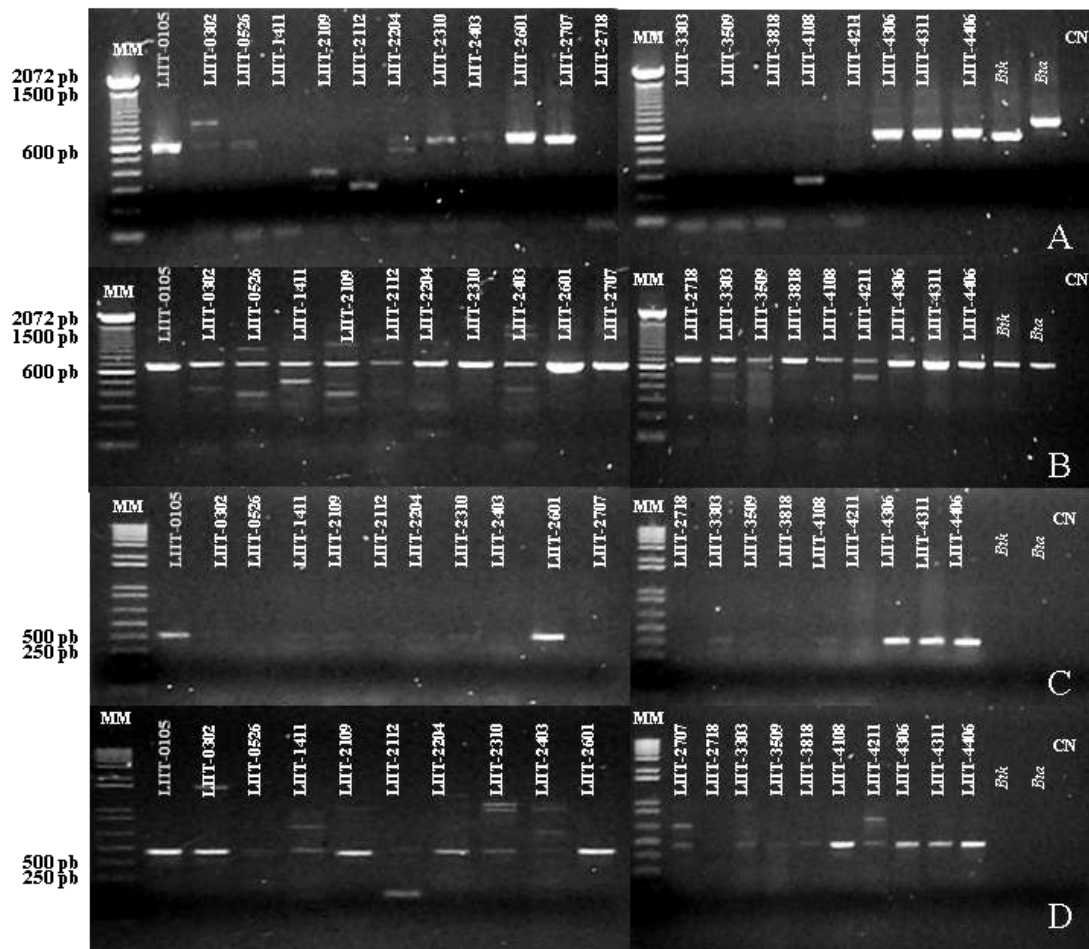


Figura 2. Perfis de PCR gerados pelos iniciadores: Geral-cry1 (A), Geral-cry2 (B), Geral-cry8 (C) e Geral-cry9 (D), com isolados de *Bacillus thuringiensis* ativos a *Plutella xylostella* e *Spodoptera frugiperda*. MM - Marcador molecular, Btk - (controle positivo - *B. thuringiensis* var. *kurstaki* – Dipel®WP) e Bta (controle positivo - *B. thuringiensis* var. *aizawai* - Xentari®WDG).