

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 31/05/2019.

**ANDRÉ BALLERINI HORTA**

**USO DE VÍRUS E *Bacillus thuringiensis* Berliner NO CONTROLE DE  
*Thyrinteina arnobia* (Stoll) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)**

**Botucatu**

**2017**



**ANDRÉ BALLERINI HORTA**

**USO DE VÍRUS E *Bacillus thuringiensis* Berliner NO CONTROLE DE  
*Thyrinteina arnobia* (Stoll) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Frederico Wilcken

**Botucatu**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

H821u Horta, André Ballerini, 1985-  
Uso de vírus e *Bacillus thuringiensis* Berliner no controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (Lepidoptera: Geometridae) / André Ballerini Horta. - Botucatu: [s.n.], 2017  
89 p.: grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Carlos Frederico Wilcken  
Inclui bibliografia

1. Eucalipto - Doenças e pragas. 2. Lagarta desfolhada. 3. Pragas agrícolas - Controle biológico. 4. *Bacillus thuringiensis*. I. Wilcken, Carlos Frederico. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "USO DE VÍRUS E *Bacillus thuringiensis* Berliner NO CONTROLE DE *Thyrinteina arnobia* (Stoll) (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE)"

AUTOR: ANDRÉ BALLERINI HORTA

ORIENTADOR: CARLOS FREDERICO WILCKEN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CARLOS FREDERICO WILCKEN  
Dep de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas



Prof. Dr. BERGMANN MORAIS RIBEIRO  
Biologia Celular / Universidade de Brasília / Brasília/DF



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. RENATE KRAUSE SAKATE  
Depto de Proteção Vegetal / UNESP - Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu



Profa. Dra. SILVIA RENATA SICILIANO WILCKEN  
Departamento de Produção Vegetal / FCA / UNESP - Botucatu/SP

Botucatu, 31 de maio de 2017.



## AGRADECIMENTOS

Àquele ou àquilo que criou a tudo e a todos (tenha o nome que a crença de cada um escolher) pela oportunidade de viajar por um caminho tão bonito e desafiador e aos meus anjos da guarda, guias e protetores por terem me trazido sã e salvo até aqui.

À minha família, meus pais, Gil e Silvia, e minha irmã Débora, por todo o cuidado, pelos ensinamentos, pelo total apoio e por tantas lutas, me permitindo alcançar mais este sucesso nesta vida.

Aos meus grandes amores Larissa e Thiago, amigos, cúmplices, parceiros e sempre as razões de muita felicidade, enchendo minha vida de momentos maravilhosos. Da mesma forma a todos os meus amigos de Guaratinguetá, Jaboticabal, São Paulo, Brasília, Botucatu e aos perdidos de cada canto neste país maravilhoso.

Aos Professores Dr. Carlos Frederico Wilcken, Dr. Manoel Victor Franco Lemos e Dr. Bergmann Moraes Ribeiro, primeiramente pelo privilégio da orientação. Foi uma honra trabalhar com os senhores. Obrigado pela oportunidade de tão gratificante experiência pessoal e profissional, pelo voto de confiança e paciência a mim concedidos, pela sabedoria compartilhada, pelas cobranças e puxões de orelha que só me fizeram crescer ainda mais.

Às Professoras Dra. Renate Krause Sakate e Dra. Silvia Renata Siciliano Wilcken pelas contribuições generosas feitas em meu exame de defesa de tese e também pelas orientações em geral ao longo do doutorado no Departamento de Proteção de Plantas.

Às técnicas laboratoriais Eliane, Fernanda e Lorena e aos colegas dos Laboratórios de Controle Biológico de Pragas Florestais (FCA – UNESP), Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (FCAV – UNESP) e Virologia e Microscopia Eletrônica (UnB), pela amizade, convívio, pelos ensinamentos pessoais e profissionais e pelo inestimável auxílio nas atividades ao longo deste trabalho.

Aos demais professores, servidores e colegas do Departamento de Proteção de Plantas, pelo convívio, pela amizade, pelos ensinamentos e auxílios, pelas parcerias e orientações em geral.

A todos aqueles que de alguma forma conviveram comigo nos últimos anos, compartilhando momentos ao longo da jornada e contribuindo para o meu crescimento, meu sincero obrigado, por TUDO.





*“My friend, I'll say it clear  
I'll state my case, of which I'm certain*

*I've lived a life that's full  
I've traveled each and every highway  
But more, much more than this  
I did it my way*

*Regrets, I've had a few  
But then again, too few to mention  
I did what I had to do  
And saw it through without exemption  
(...)  
Yes, there were times, I'm sure you knew  
When I bit off more than I could chew  
But through it all, when there was doubt  
I ate it up and spit it out  
I faced it all and I stood tall  
And did it my way*

*I've loved, I've laughed and cried  
I've had my fill my share of losing  
And now, as tears subside  
I find it all so amusing  
(...)  
For what is a man, what has he got  
If not himself, then he has naught  
To say the things he truly feels  
And not the words of one who kneels  
The record shows I took the blows  
And did it my way”*

*My Way (Frank Sinatra; Paul Anka, 1969)*



## RESUMO

O Brasil é atualmente líder mundial em produtividade no setor florestal graças ao eucalipto. Os plantios de eucalipto sofrem com severos ataques de insetos-praga, cujos danos comprometem seriamente a produtividade. O controle biológico é a principal estratégia adotada pelas empresas do setor florestal, envolvendo sistemas de monitoramento das populações de insetos-praga. Um dos mais importantes grupos de desfolhadores é o dos lepidópteros desfolhadores. Espécies nativas brasileiras se adaptaram às plantações de eucalipto ao longo dos anos e a mais notável é a lagarta parda do eucalipto, *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Com ampla distribuição no território brasileiro, esta espécie se caracteriza pelos surtos nos períodos secos do ano, quando encontra condições favoráveis para expressar seu elevado potencial reprodutivo, causando severas desfolhas em grandes extensões. Medidas de controle são frequentemente necessárias, sendo realizadas pulverizações aéreas de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) e liberações de inimigos naturais. Entretanto, epizootias virais podem ser observadas como reguladores naturais de tais populações. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivos: (I) a análise da toxicidade de seis diferentes proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* sobre populações de *T. arnobia* e seu efeito na emergência de vírus latentes nestas populações; (II) sequenciamento do genoma completo, análise filogenética e caracterização ultraestrutural de um cypovirus encontrado em lagartas de *T. arnobia*. Os resultados obtidos mostram que doses subletais de proteínas Cry1 podem ter influência na ativação de vírus latentes presentes nas populações de *T. arnobia*, conduzindo a um quadro onde a mortalidade observada em diferentes níveis é ligada às infecções virais associadas à toxicidade das proteínas Cry1. Ainda, as análises do cypovirus encontrado revelaram sua proximidade com outros vírus pertencentes à espécie *cypovirus* 14. Dessa forma, de acordo com as normas definidas pelo Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus, este foi nomeado *Thyriniteina arnobia* cypovirus 14. O gene que codifica a poliedrina, principal proteína na composição dos poliedros observados, foi clonado com sucesso em um baculovirus recombinante, cuja infecção em linhagens celulares de insetos resultou na produção de cristais proteicos no citoplasma das células infectadas. Este dado indica a aptidão dos poliedros deste cypovirus como nanocarreadores para outras proteínas fusionadas à

poliedrina em estudos e aplicações biotecnológicas. Estudos futuros avaliarão ainda o potencial deste cypovirus no controle de populações de *T. arnobia* a campo, podendo se tornar mais uma ferramenta para a proteção dos plantios de eucalipto brasileiros.

**Palavras-chave:** *Eucalyptus*, *Cypovirus*, proteínas Cry.

## ABSTRACT

Brazil is nowadays the global leader in productivity at forest sector due to *Eucalyptus*. *Eucalyptus* plantations suffer severe attacks from insect-pests, whose damages compromise seriously the productivity. Biological control is the main strategy adopted by the forest companies, involving pest population monitoring systems. One of the most important defoliators group is the lepidopterous defoliators. Native Brazilian species had adapted to the eucalyptus plantations over the years and the most remarkable one is the eucalyptus brown looper, *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). Spread all over Brazil's territory, this species is characterized by the outbreaks during the dry periods of the year, when it has good conditions to express its high reproductive potential, causing severe defoliation in large extensions. Control measures are frequently necessary, thus aerial spraying with *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) based bioinsecticides and releases of natural enemies are carried out. However, sometimes viral epizootics can be observed acting as natural regulators for such populations. The interactions between *B. thuringiensis* and native entomopathogenic viruses are unknown to *T. arnobia* in eucalyptus plantations. In this context, the present work had as objectives: (I) the toxicity analysis of six different Cry1 proteins of *B. thuringiensis* on populations of *T. arnobia* and their effect on the emergence of latent viruses in these populations; (II) complete genome sequencing, phylogenetic analysis and ultrastructural characterization of a cypovirus found in *T. arnobia* caterpillars. The results show that sublethal doses of Cry1 proteins may have an influence on the activation of latent viruses present in the *T. arnobia* populations, leading to a context where the mortality observed at different levels is linked to the viral infections associated with the toxicity of Cry1 proteins. In addition, the analysis of the cypovirus found revealed its proximity to other viruses belonging to the cypovirus 14 species. Thus, according to the standards defined by the International Committee on Virus Taxonomy, it was named *Thyriniteina arnobia* cypovirus 14. The gene encoding polyhedrin, the main protein in the composition of the polyhedra observed, was successfully cloned in a recombinant baculovirus, whose infection in insect cell lines resulted in the production of protein crystals in the cytoplasm of the infected cells. This data indicates the suitability of the polyhedra of this cypovirus as nanocarriers for other proteins fused to polyhedrin in studies and biotechnological applications. Future

studies will also evaluate the potential of this cypovirus in the control of *T. arnobia* populations at the field and may become another tool for the protection of Brazilian eucalyptus plantations.

**Keywords:** *Eucalyptus*, *Cypovirus*, Cry proteins

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	15
1. Revisão Bibliográfica .....	21
1.1. O controle microbiano de insetos-praga .....	21
1.2. O setor florestal e o eucalipto .....	24
1.3. A lagarta-parda-do-eucalipto .....	25
1.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> e suas proteínas inseticidas .....	27
1.4.1. Proteínas Cry1 e seus mecanismos de ação.....	30
1.5. Vírus Entomopatogênicos.....	32
1.5.1. O gênero <i>Cypovirus</i> .....	34
CAPÍTULO 1 – Genoma completo e caracterização ultraestrutural de um cypovirus isolado de <i>Thyrinteina arnobia</i> (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) ....	37
Resumo.....	37
Abstract.....	38
1. Introdução.....	40
2. Material e métodos .....	41
2.1. Origem das amostras .....	41
2.2. Purificação e análise ultraestrutural .....	42
2.3. Anticorpos.....	42
2.4. Isolamento do RNA, sequenciamento genômico e análises.....	43
2.5. Análise filogenética.....	43
2.6. Amplificação do gene <i>polh</i> e clonagem .....	43
2.7. Construção de um baculovirus recombinante.....	44
3. Resultados.....	45
3.1. Análises estruturais e ultraestruturais.....	45
3.2. Sequenciamento genômico .....	46
3.3. Análise filogenética e diversidade genômica.....	50
3.4. Baculovirus recombinante com gene <i>polh</i> .....	52
4. Discussão .....	53
5. Conclusões.....	59
Referências .....	59



CAPÍTULO 2 – Proteínas Cry1 de <i>Bacillus thuringiensis</i> e seu efeito na emergência de vírus latentes em populações de <i>Thyrntina arnobia</i> (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) .....	64
Resumo .....	64
Abstract .....	65
1.    Introdução .....	67
2.    Material e métodos.....	68
2.1. Proteínas Cry1 .....	68
2.2. Criação de <i>T. arnobia</i> .....	69
2.3. Bioensaios com proteínas Cry1 .....	70
2.4. Postulado de Koch para vírus emergentes .....	71
2.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	72
3.    Resultados .....	72
4.    Discussão .....	78
5.    Conclusões .....	80
Referências .....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
REFERÊNCIAS .....	84

## INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto chegou ao Brasil na segunda metade do século XIX, mas somente a partir de 1966, com a lei de incentivos fiscais a empreendimentos florestais, sua exploração como cultura ganhou impulso (MORA; GARCIA, 2000; CASTRO et al., 2016). Atualmente os cultivos de eucalipto ocupam 5,6 milhões de hectares, o que representa 71% da área total de florestas plantadas no país. Com menor tempo de rotação e maior volume de madeira produzido, o eucalipto é o principal responsável pela manutenção do Brasil como líder mundial em produtividade no setor florestal (IBÁ, 2016). Recentemente, o país se tornou o primeiro a liberar plantios comerciais de um eucalipto geneticamente modificado para aumento de produtividade (ISAAA, 2015; MCTI, 2015). Este evento é o marco histórico do início de uma nova era biotecnológica no setor florestal e coloca o Brasil em vantagem ainda maior frente aos demais produtores. Contudo, os extensos plantios, o cultivo intensivo e a uniformidade dos materiais genéticos criam condições favoráveis para estabelecimento, alimentação e reprodução de insetos-praga em elevados níveis populacionais (HURLEY et al., 2016), cujos danos causados aos plantios afetam diretamente a produtividade (ELEK; BAKER, 2017) e colocam em risco a liderança do país no setor.

No cenário florestal brasileiro as estratégias de controle de insetos-praga são bastante diversificadas e baseiam-se principalmente no controle biológico, diferentemente do que acontece no cenário das monoculturas agrícolas, onde o controle com inseticidas sintéticos ainda predomina nos dias atuais (UNSWORTH, 2010; PARRA, 2014). As razões para isto variam entre as diferenças estruturais dos cultivos até as pressões exercidas pela certificação da produção florestal, cuja ênfase na sustentabilidade das florestas plantadas limita o uso de inseticidas sintéticos e prioriza a adoção de estratégias de controle não-químicas (FSC, 2015).

O complexo de insetos-praga do eucalipto compreende dezenas de espécies, as quais se distribuem basicamente entre insetos desfolhadores (formigas cortadeiras, lagartas e besouros), sugadores (percevejos e psílídeos), rizófagos (cupins), galhadores (vespas) e broqueadores (besouros). Com relação à área

atacada, o grupo mais importante são as formigas cortadeiras, seguidas pelas pragas exóticas e depois pelo complexo de lepidópteros desfolhadores (IPEF<sup>1</sup>).

As estratégias de controle para formigas cortadeiras a partir de opções biológicas são escassas. Por isso os trabalhos neste grupo geram grandes desafios frente às entidades de certificação florestal, que cada vez mais restringem as permissões para uso de inseticidas sintéticos (ZANUNCIO et al., 2016). Quanto às pragas exóticas, de origem australiana, existem fortes opções no controle biológico clássico, mas a importação e a liberação de inimigos naturais exóticos encontram seus maiores obstáculos na adaptação dos mesmos às condições climáticas brasileiras e também na burocracia junto aos órgãos competentes do governo para se obter as autorizações necessárias para tais iniciativas (SCHÜHLI et al., 2016). Já o complexo de lepidópteros desfolhadores tem como principal estratégia de controle o uso de bioinseticidas a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) (ZANUNCIO et al., 1992; MAPA, 2017), ocasionalmente associado com liberações de inimigos naturais (parasitoides de pupa e percevejos predadores), auxiliando no controle dos indivíduos sobreviventes às pulverizações (BARBOSA et al., 2016; HOLTZ et al., 2006), constituindo, portanto, um manejo integrado que se alinha às premissas da certificação florestal e dessa maneira não enfrenta maiores questionamentos por parte de tais entidades.

Mais de vinte espécies de lepidópteros desfolhadores se adaptaram ao eucalipto com a expansão da cultura pelo Brasil ao longo dos anos (ZANUNCIO et al., 1993). A grande maioria é observada nos plantios em baixos níveis populacionais, não sendo necessário controle. Outras espécies chegam a ocasionar surtos, mas de forma regional e esporádica, necessitando de controle apenas em casos específicos. Contudo, determinadas espécies frequentemente desenvolvem elevados níveis populacionais necessitando que medidas de controle sejam tomadas com maior frequência, como é o caso da lagarta-parda-do-eucalipto, *Thyrintina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae), considerada o principal lepidóptero desfolhador da cultura do eucalipto no Brasil (ZANUNCIO et al., 1993; GALLO et al., 2002; JESUS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2016).

Em geral estas populações não causam preocupação durante os períodos úmidos do ano, os quais apresentam condições adversas ao desenvolvimento das

---

<sup>1</sup> Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

mesmas, como o favorecimento de doenças microbianas, que suprimem estas populações naturalmente. A coexistência entre insetos e seus patógenos é a base do controle microbiano natural, um processo importantíssimo para a autorregulação dos níveis populacionais destas espécies, o qual é observado no campo na forma de enzootias (doenças microbianas que ocorrem com sazonalidade e predomínio de infecções crônicas) e epizootias (doenças microbianas que ocorrem esporadicamente e com predomínio de infecções letais). Nestas ocasiões a identificação destes entomopatógenos é oportunidade única de convertê-los em programas de controle microbiano aplicado, com seu desenvolvimento na forma de bioinseticidas (ALVES, 1998).

No Brasil, os surtos de lepidópteros desfolhadores em eucalipto ocorrem geralmente nos períodos secos do ano e em regiões com regimes pluviométricos menos intensos, cujas condições favorecem a reprodução e sobrevivência destes insetos em altos níveis populacionais. Nestas ocasiões, epizootias causadas por vírus entomopatogênicos já foram observadas algumas vezes, entretanto, os agentes causais não foram completamente caracterizados e com isso as pesquisas neste sentido não evoluíram (NASCIMENTO, 2001).

Bioinseticidas virais direcionados à proteção florestal são estudados e utilizados há décadas em países como Canadá, Estados Unidos e Japão (KUNIMI, 2007; LACEY et al., 2015; VAN FRANKENHUYZEN; LUCAROTTI; LAVALLÉE, 2015). Entretanto, esta é uma área de pesquisa muito recente no Brasil e possui apenas um caso de sucesso, no qual se utiliza um vírus de poliedrose nuclear para o controle da lagarta-do-álamo, *Condylorrhiza vestigialis* (Gueneé, 1854) (Lepidoptera: Pyralidae). Após sua descoberta e devida caracterização, as pesquisas com este vírus evoluíram até seu desenvolvimento como bioinseticida, sendo registrado junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, permitindo sua aplicação comercial em plantios de álamo no sul do país (CASTRO et al., 2009). Para o eucalipto, apesar das epizootias observadas a campo, até o momento não há grande avanço neste sentido, considerando a ausência de isolados virais devidamente caracterizados. Recentemente, durante os experimentos prévios deste estudo (HORTA, 2012), um cypovirus foi encontrado em lagartas de *T. arnobia* mantidas em criação de laboratório (Figura 1), tornando sua identificação e completa caracterização molecular parte dos objetivos deste trabalho.

**Figura 1 – Gaiola de criação de *T. arnobia* com lagartas mortas pelo cypovirus encontrado. Em detalhe, lagarta morta pendurada à folha com bolo fecal ligado ao ânus, sintoma característico observado neste tipo de infecção.**



Nos anos de 2015 e 2016 o clima mais seco com poucas chuvas favoreceu a ocorrência de surtos populacionais da lagarta-parda-do-eucalipto (Figura 2) nos estados da Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo (IPEF<sup>2</sup>).

**Figura 2 – Aspecto do desfolhamento causado por surto populacional de *T. arnobia* em plantio comercial de eucalipto (Agudos – SP, 2015).**



<sup>2</sup> Informações do Programa de Proteção Florestal (PROTEF) do IPEF. Dados não publicados. Comunicação pessoal, 2016.

Nestas ocasiões a principal estratégia de controle adotada foi a pulverização aérea de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* (ZANUNCIO et al., 1992; MAPA, 2017). Formulações comerciais desta bactéria possuem como ingrediente ativo esporos e cristais proteicos produzidos pelas células bacterianas durante seu processo de esporulação. Estes cristais apresentam proteínas com atividade inseticida (toxinas) em sua composição, as quais sendo ingeridas pelas lagartas, encontram condições de pH alcalino no intestino médio das mesmas, sendo solubilizadas. A partir de então, sua interação com receptores específicos, presentes nas microvilosidades das células do epitélio intestinal, leva à formação de poros que alteram o equilíbrio osmótico das mesmas, culminando na ruptura de suas membranas e morte celular (MILNER, 1994; BRAVO et al., 2011).

O conhecimento a respeito do modo de ação destas toxinas sobre lepidópteros desfolhadores foi obtido ao longo de décadas de estudos dentro do cenário das monoculturas agrícolas. Diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo desenvolveram tais trabalhos, cada qual com foco nas mais importantes espécies de insetos-praga de suas localidades. Analisando o comportamento de diferentes populações expostas as toxinas desta bactéria foi possível chegar ao conhecimento hoje existente sobre *B. thuringiensis*. No início foram as formulações de bioinseticidas que mostraram o potencial da bactéria na supressão de populações a campo. A medida que a tecnologia do DNA recombinante se desenvolveu, seus genes foram clonados em plantas, de forma individual, nascendo assim a primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos. Com o avanço da tecnologia e o melhor entendimento sobre os casos de populações de insetos resistentes às toxinas de *B. thuringiensis*, surgiram as plantas piramidadas, já na segunda geração de plantas transgênicas. Nestas plantas, dois ou mais genes codificadores de toxinas com diferentes mecanismos de ação foram introduzidos a fim de garantir ao menos duas vias distintas de combate aos insetos-alvo. Ainda, em alguns casos, estes genes foram associados a outros que conferiam às plantas resistência a herbicidas, favorecendo o manejo de plantas daninhas na condução da cultura. Mais recentemente, as plantas piramidadas passaram a ter outra tecnologia incorporada em sua engenharia genética. A tecnologia de RNA de interferência (RNAi), um mecanismo de silenciamento gênico que atua sobre importantes vias metabólicas nos insetos-alvo, foi incorporada em conjunto com as toxinas de *B. thuringiensis*, marcando a terceira geração de plantas transgênicas resistentes a

insetos (GORDON; WATERHOUSE, 2007; PRICE; GATEHOUSE, 2008; BURAND; HUNTER, 2013; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013; TABASHNIK et al., 2015).

Enquanto no cenário agrícola mundial o controle de insetos-praga através desta bactéria possui atualmente o mais alto nível de conhecimento disponível, no cenário florestal brasileiro a situação é oposta. Especificamente para o caso dos lepidópteros desfolhadores de eucalipto não existem estudos que abordem diretamente as toxinas presentes nos bioinseticidas, que são utilizados há décadas no controle destas populações a campo. Diferentes toxinas Cry estão presentes em suas formulações, entretanto, não está determinada a eficiência de controle de cada uma delas, a interação com os receptores presentes no intestino médio dos insetos, a existência de potencial de resistência cruzada entre as mesmas, entre outros tantos aspectos fundamentais da ciência que envolve esta bactéria.

A eficiência dos bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* na proteção dos plantios de eucalipto brasileiros é comprovada e até o momento se mantém estável. Contudo, exemplos da utilização desta tecnologia no cenário agrícola, em um passado não tão distante, nos mostram que a ausência deste tipo de conhecimento, quando combinada ao uso intensivo destes produtos, levou à evolução de populações resistentes a esta tecnologia (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Dessa maneira fica evidente a importância que tais pesquisas representam para a manutenção da eficiência de *B. thuringiensis* no controle de *T. arnobia* e o impacto que o enfraquecimento desta estratégia de controle poderia representar na proteção dos cultivos e conseqüentemente para a liderança brasileira no setor florestal.

Considerando-se o exposto sobre o contexto do controle microbiano de *T. arnobia* nos plantios brasileiros de eucalipto, o presente estudo foi realizado em duas frentes de trabalho paralelas, cujos objetivos foram:

- Sequenciamento do genoma completo, análise filogenética e caracterização ultraestrutural do cypovirus encontrado em lagartas de *T. arnobia*.
- Análise da toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa sobre lagartas de *T. arnobia* e observação de seu efeito na ativação de vírus latentes presentes em *T. arnobia*.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho abrem novas possibilidades dentro das pesquisas sobre o controle microbiano de *T. arnobia* e também dos demais lepidópteros desfolhadores que ocorrem nos plantios de eucalipto brasileiros.

Em uma das vertentes deste estudo, o TharCPV-14 foi o primeiro vírus patogênico à principal lagarta desfolhadora de eucalipto no Brasil a ter seu genoma completamente sequenciado. O isolamento de um vírus que apresenta suas partículas virais oclusas em poliedros pode ser o começo de todo um plano de pesquisa, cujo resultado final seria o desenvolvimento de um bioinseticida viral.

Em outra vertente deste estudo, os testes com diferentes toxinas de *B. thuringiensis* encontraram um grande obstáculo inesperado, a presença de vírus de partículas livres nas populações testadas. A avaliação da toxicidade de cada uma das toxinas separadamente não foi conclusiva, mas as observações realizadas durante os experimentos forneceram indícios talvez ainda mais interessantes. *B. thuringiensis* e suas toxinas talvez tenham influência na indução de doenças letais a partir da ativação de vírus latentes nas populações destes insetos. A confirmação desta hipótese evidenciaria a ação sinérgica existente entre vírus e *B. thuringiensis* já comprovada em outros estudos, mas ainda não exibida no contexto da cultura do eucalipto no Brasil.

Sendo uma linha de pesquisa muito recente no país, a exploração de vírus patogênicos a lepidópteros desfolhadores em florestas plantadas possui apenas um caso de sucesso, aplicado em cultivos de Álamo no sul do Brasil em uma área com algumas dezenas de milhares de hectares. Em contraste, países como Canadá, Estados Unidos e Japão utilizam bioinseticidas virais há décadas em áreas de florestas com centenas de milhares a milhões de hectares de extensão.

Neste contexto, o entendimento dos mecanismos envolvidos na interação destes vírus com a bactéria *B. thuringiensis* pode levar a melhorias nas estratégias de controle atualmente empregadas no campo, incrementando ou prolongando a eficiência das mesmas na supressão de surtos populacionais. Entretanto, um longo caminho precisa ser percorrido, visto que esta é uma área de pesquisa com pouca evolução no setor florestal brasileiro. Viroses em diferentes populações de lepidópteros desfolhadores de eucalipto têm ocorrências observadas de longa data,



mas até o momento outros vírus patogênicos a estas espécies não foram devidamente caracterizados.

Os estudos com toxinas de *B. thuringiensis* dependem do desenvolvimento de metodologias de criação que eliminem ou reduzam o inóculo deste tipo de entomopatógeno ou da seleção de linhagens destes insetos que sejam livres destes contaminantes ou ainda resistentes aos mesmos. Dessa forma, os experimentos para determinação das toxicidades destas toxinas e demais efeitos de suas interações sobre as lagartas, poderiam fornecer respostas sem interferências externas tão agravantes. Caso contrário, os efeitos observados nunca serão resultado direto da estratégia em teste, mas sim resultado da combinação da estratégia em teste com o entomopatógeno “contaminante”, levando a insegurança quanto aos resultados encontrados.

Somente a partir da redução significativa dos efeitos externos provocados por “contaminantes” inseridos nestas populações será possível determinar os verdadeiros potenciais de exploração do TharCPV – 14 e das proteínas de *B. thuringiensis* no controle de *T. arnobia*. Estas definições são importantes para o futuro do setor florestal brasileiro, que diante dos novos desafios que se anunciam com as projeções de expansão das áreas e do emprego da biotecnologia a campo, certamente enfrentará problemas no cenário do controle de insetos-praga, necessitando cada vez mais conhecer a fundo os mecanismos de ação de seus principais agentes de controle utilizados.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS - ABRAF. **Anuário Estatístico da ABRAF 2006**. [s.l.], 2006. Disponível em: <<http://www.ipef.br/estatisticas/relatorios/anuario-ABRAF-2006.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998.

BARBOSA, R. H. et al. Foraging Activity of *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) at Various Densities on Pupae of the Eucalyptus Defoliator *Thyrintea arnobia* (Lepidoptera). **Florida Entomologist**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.686-690, dez. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1653/024.099.0417>.

BERTOLA, A. **Eucalipto - 100 anos de Brasil**. [s.l.], 2013. Disponível em: <[http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto\\_100 anos de Brasil\\_Alexandre\\_Bertola.pdf](http://www.celso-foelkel.com.br/artigos/outros/Eucalipto_100%20anos%20de%20Brasil_Alexandre_Bertola.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2017.

BRANDT, H. Die Isolierung des Polyeder-Virus und die Natur der Polyeder. **Anzeiger Für Schädlingskunde**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.47-47, jun. 1948. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02340920>.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, [s.l.], v. 49, n. 4, p.423-435, mar. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.423-431, jul. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Key environmental impacts of global genetically modified (GM) crop use 1996–2011. **Gm Crops & Food**, [s.l.], v. 4, n. 2, p.109-119, abr. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/gmcr.24459>.

BURAND, J. P.; HUNTER, W. B. RNAi: Future in insect management. **Journal of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 112, p.568-574, mar. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.07.012>.

CARRIÈRE, Y.; FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.291-302, abr. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.011>.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Portico, 1969.

CASTRO, M. E. B. et al. Identification of a new nucleopolyhedrovirus from naturally-infected *Condylorrhiza vestigialis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) larvae on poplar plantations in South Brazil. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 102, n. 2, p.149-154, out. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.011>.

CASTRO, C. A. O. et al. Brief history of *Eucalyptus* breeding in Brazil under perspective of biometric advances. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 46, n. 9, p.1585-1593, set. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150645>.

CHRISTIAN, P. D; POSSEE, R. D. Insect Viruses. **Encyclopedia of Life Sciences**, [s.l.], p.1-12, 15 jul. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0020712>.

COULIBALY, F. et al. The molecular organization of cypovirus polyhedra. **Nature**, [s.l.], v. 446, n. 7131, p.97-101, 1 mar. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nature05628>.

CRICKMORE, N. et al. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

CRICKMORE, N. **Bt Toxin Nomenclature**: Full list of delta-endotoxins. [s.l.], 2017. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

DAVIDSON, E. W. **Big fleas have little fleas**: how discoveries of invertebrate diseases are advancing modern science. Tucson: University Of Arizona Press, 2006. 198 p.

ELEK, J. A.; BAKER, S. C. Timing and frequency are the critical factors affecting the impact of defoliation on long term growth of plantation eucalypts. **Forest Ecology And Management**, [s.l.], v. 391, p.1-8, maio 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foreco.2017.02.004>.

FOREST STEWARDSHIP COUNCIL - FSC. **FSC Principles and Criteria for Forest Stewardship**. Bonn, 2015. Disponível em: <<https://ic.fsc.org/en/what-is-fsc-certification/principles-criteria>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

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

GORDON, K. H. J.; WATERHOUSE, P. M. RNAi for insect-proof plants. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 11, p.1231-1232, nov. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1107-1231>.

HARRISON, R.; HOOVER, K. Baculoviruses and Other Occluded Insect Viruses. **Insect Pathology**, [s.l.], p.73-131, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384984-7.00004-x>.

HOLTZ, A. M. et al. É possível a associação *Podisus nigrispinus* e espécies de *Trichogramma* em um programa de controle biológico em florestas? **Idesia (arica)**, [s.l.], v. 24, n. 2, p.85-88, ago. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-34292006000200010>.

HORTA, A. B. **Seleção e caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)**. 2012. 30 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária/Biotecnologia Aplicada à Agropecuária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

HURLEY, B. P. et al. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.921-933, 26 fev. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10530-016-1081-x>.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES - IBÁ. **Relatório Anual 2016**. Brasília, 2016. Disponível em: <[http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA\\_RelatorioAnual2016\\_.pdf](http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf)>. Acesso em: 11 jan. 2017.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. **ICTV 9th Report: Virus Taxonomy**. Leiden, 2011. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna\\_viruses/188/reoviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/188/reoviridae)>. Acesso em: 14 mar. 2017.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **GM *Eucalyptus* approved for commercial use in Brazil**. [s.l.], 2015. Disponível em:

<<http://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/article/default.asp?ID=13275>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

ISHIMORI, J. Contribution à l'étude de la grasserie du ver à soie (*Bombyx mori*). **Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie**, v. 116, p.1169, 1934.

JESUS, F. G. et al. Resistance of *Eucalyptus* spp. genotypes to eucalyptus brown looper *Thyrintaina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). **Australian Journal Of Crop Science**, v. 11, n. 9, p.1016-1021, 2015.

KUNIMI, Y. Current status and prospects on microbial control in Japan. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 95, n. 3, p.181-186, jul. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2007.03.007>.

LACEY, L. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal Of Invertebrate Pathology**, [s.l.], v. 132, p.1-41, nov. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>.

LEDFORD, H. Brazil considers transgenic trees. **Nature**, [s.l.], v. 512, n. 7515, p.357-357, 27 ago. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/512357a>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Sistema Agrofit**: Consulta de Praga/Doença. 2017. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons!/ap\\_produto\\_form\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_produto\\_formulado\\_tecnico=5052&p\\_tipo\\_janela=NEW](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons!/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5052&p_tipo_janela=NEW)>. Acesso em: 10 abr. 2017.

MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.9-13, maio 1994. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90014-0](http://dx.doi.org/10.1016/0167-8809(94)90014-0).

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA E INOVAÇÃO - MCTI. **Extrato de Parecer Técnico nº 4408.2015**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/686100/Extrato+de+Parecer+nº+4408.2015.pdf/c6d77d0d-5a38-4030-87a2-9c6fc6d41841>>. Acesso em: 07 jul. 2015.

MOAR, W. et al. Field-evolved resistance to Bt toxins. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.1072-1074, out. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1008-1072>.

MORA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo: SBS, 2000. 114 p.

NASCIMENTO, M. L. **Caracterização parcial e patogenicidade de um vírus isolado de *Thyrintaina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae)**. 2001. 50 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Proteção de Plantas)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal

Activity. **Toxins**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.3296-3325, 11 dez. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6123296>.

PARRA, J. R. P. et al. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola**, [s.l.], v. 71, n. 5, p.420-429, out. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167>.

PERALTA, C.; PALMA, L. Is the Insect World Overcoming the Efficacy of *Bacillus thuringiensis*? **Toxins**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.39-43, 18 jan. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins9010039>.

PRICE, D. R. G.; GATEHOUSE, J. A. RNAi-mediated crop protection against insects. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 7, p.393-400, jul. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.004>.

RIBEIRO, G. T. et al. Constancy, Distribution, and Frequency of Lepidoptera Defoliators of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) in Four Brazilian Regions. **Neotropical Entomology**, [s.l.], v. 45, n. 6, p.629-636, 2 jun. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13744-016-0410-1>.

ROHRMANN, G. F.; BEAUDREAU, G. S.. Characterization of DNA from polyhedral inclusion bodies of the nucleopolyhedrosis single-rod virus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. **Virology**, [s.l.], v. 83, n. 2, p.474-478, dez. 1977. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90198-2](http://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(77)90198-2).

ROHRMANN, G. F. et al. Genetic relatedness of two nucleopolyhedrosis viruses pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. **Virology**, v. 84, p.213-217, 1978.

SCHÜHLI, G. S. et al. A review of the introduced forest pests in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.397-406, maio 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2016000500001>.

SILVEIRA, E. **Mais celulose por centímetro quadrado**. 2013. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2013/02/11/mais-celulose-por-centimetro-quadrado/>. Acesso em: 15 set. 2014.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.510-521, 10 jun. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2597>.

TABASHNIK, B. E. et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.1-10, 12 out. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/srep15107>.

UNSWORTH, J. **History of Pesticide Use**. [s.l.], 2010. Disponível em: [http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com\\_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31](http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31). Acesso em: 10 abr. 2017.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; LUCAROTTI, C.; LAVALLÉE, R. Canadian contributions to forest insect pathology and to the use of pathogens in forest pest management. **The Canadian Entomologist**, [s.l.], v. 148, n. 1, p.210-238, 25 jun. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.4039/tce.2015.20>.

ZANUNCIO, J. C. et al. Eficiência de *Bacillus thuringiensis* e de deltametrina, em aplicação aérea para o controle de *Thyrinteina arnobia* Stoll, 1782 (Lepidoptera: Geometridae) em eucaliptal no Pará. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.485-492, dez. 1992. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-43921992224492>.

ZANUNCIO, J. C. **Manual de pragas em florestas: Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia e controle**. Piracicaba: IPEF/SIF, 1993. 140 p.

ZANUNCIO, J. C. et al. Population Dynamics of Lepidoptera Pests in *Eucalyptus urophylla* Plantations in the Brazilian Amazonia. **Forests**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.72-87, 10 jan. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/f5010072>.

ZANUNCIO, J. C. et al. The impact of the Forest Stewardship Council (FSC) pesticide policy on the management of leaf-cutting ants and termites in certified forests in Brazil. **Annals Of Forest Science**, [s.l.], v. 73, n. 2, p.205-214, 30 mar. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13595-016-0548-3>.

ZEDDAM, J. et al. A cypovirus from the South American oil-palm pest *Norape argyrrhorea* and its potential as a microbial control agent. **Biocontrol**, [s.l.], v. 48, n.1, p.101-112, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1021234700472>.