

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO SUBLETAL DO DIPEL EM *Helicoverpa armigera*
(HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Helvio Campoy Costa Junior

Engenheiro Agrônomo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITO SUBLETAL DO DIPEL EM *Helicoverpa armigera*
(HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Helvio Campoy Costa Junior

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Dissertação apresentada à faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

2017

C837e Costa Junior, Helvio Campoy
Efeito subletal do Dipel em *Helicoverpa armigera* (Hübner)
(Lepidoptera: Noctuidae) / Helvio Campoy Costa Junior. --
Jaboticabal, 2017
x, 78 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientadora: Maria Aparecida Pessoa da Cruz Centurion
Banca examinadora: Paulo Henrique Caramori, Pedro Luís da
Costa Aguiar Alves
Bibliografia

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. Controle biológico. 3. Efeito subletal. 4.
Helicoverpa armigera. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.78:632.937

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO SUBLETAL DO DIPEL EM *Helicoverpa armigera* (HÜBNER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

AUTOR: HELVIO CAMPOY COSTA JUNIOR

ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

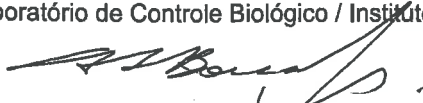
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pesquisador Dr. LUIS GARRIGÓS LEITE
Laboratório de Controle Biológico / Instituto Biológico de São Paulo / Campinas/SP



Prof. Dr. ARLINDO LEAL BOIÇA JUNIOR
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 30 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HELVIO CAMPOY COSTA JUNIOR – Nascido em 07 de março de 1984, na cidade de Bauru, São Paulo, Brasil. Engenheiro Agrônomo graduado pela Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP/Campus Bandeirantes – PR, em dezembro de 2009. As atividades de pesquisa em entomologia, com ênfase em controle de pragas e experimentação agrícola, iniciaram-se durante estágios realizados em instituições e empresas de destaque na atividade, desde novembro de 2005. Participante no desenvolvimento de projetos de tecnologias que se destacaram no controle de pragas em culturas como Cana-de-açúcar e Cereais, desde dezembro de 2009. Atualmente é o Pesquisador responsáveis pelas ações destinadas a pesquisa e desenvolvimento de inseticidas na empresa Ourofino Agrociência, desde maio de 2011. Iniciou, em março de 2015, o Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Campus Jaboticabal – SP.

“Todos os seus sonhos podem
se tornar realidade se você tiver
coragem de persegui-los.”

Walt Disney

A minha esposa, Cintia pelo apoio e incentivo. Aos meus pais, Helvio e Neici, que me proporcionaram a oportunidade de alcançar meus sonhos, e as minhas irmãs, Karina e Kamila, por participarem de todas as minhas conquistas. Por todo amor, carinho e confiança!

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal e ao Departamento de Fitossanidade, pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação.

À empresa Ourofino Agrociência pelo incentivo e apoio para realização do curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pela orientação, disponibilidade, paciência e ensinamentos, durante estes anos de boa convivência e na realização deste trabalho.

Ao Giovani Smaniotto, doutorando do laboratório de controle microbiano, pelo apoio, companheirismo e auxílio nas etapas importantes deste trabalho.

À Alessandra Marieli Vacari, pós-doutoranda do Laboratório de Biologia e Criação de Insetos, pela paciência e auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Fitossanidade, pela convivência e auxílio sempre que necessário.

E a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 <i>Helicoverpa armigera</i>	2
2.1.1 Classificação taxonômica	2
2.1.2 Distribuição geográfica	3
2.1.3 Hábito alimentar e potencial de danos	3
2.1.4 Controle químico e resistência a inseticidas	4
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	5
2.2.1 Histórico, nomenclatura e taxonomia	5
2.2.2 Utilização de <i>Bacillus thuringiensis</i> no manejo de pragas	7
2.2.3 Utilização de Plantas <i>Bt</i> no manejo de pragas.	11
2.2.5 Efeito subletal de <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
3. Material e métodos	18
3.1 Criação de insetos e condições do experimento.....	18
3.2 Contagem de esporos	18
3.3 Bioensaio para determinação das concentrações subletais	20
3.4 Avaliação dos parâmetros biológicos	22
3.5 Análise estatísticas	23
4. Resultados e discussão	23
4.1 Estimativa das concentrações subletais	23
4.2 Efeito subletais das concentrações empregadas no bioensaio	25
5. Conclusões	33
6. Referências	33

**EFEITO SUBLETAL DO DIPEL EM *Helicoverpa armigera* (HÜBNER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito subletal causado pelo bioinseticida Dipel em lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Bacillus thuringiensis* (Bt) é um entomopatógeno amplamente utilizado no controle de pragas, porém pouco se sabe sobre seus efeitos em concentrações subletais, que podem ocorrer em campo devido à diferença na distribuição da calda de aplicação ao longo do dossel das culturas ou diferenças na concentração da expressão de toxinas Bt em tecidos de plantas geneticamente modificada. Neste estudo foi utilizado o bioinseticida Dipel na formulação SC, nas concentrações de $3,67 \times 10^6$; $6,85 \times 10^6$; $6,85 \times 10^7$; $1,37 \times 10^8$ e $6,85 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹, além do tratamento controle, no qual recebeu aplicação de apenas água deionizada para instalação do bioensaio para estimativa das concentrações subletais. Para cada concentração foram utilizadas dezesseis lagartas e três repetições. A análise de Probit, foi utilizada para estimar as concentrações letais; CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅, que são consideradas concentrações subletais por apresentarem mortalidade abaixo de 25%. Posteriormente, foi instalado outro bioensaio para avaliar alguns parâmetros biológicos, tais como: período de duração da fase larval, peso de indivíduos na fase larval, peso de indivíduos na fase de pupa e razão sexual. Em todas as concentrações foi observado um aumento significativo no período larval, com destaque para CL₂₅ que apresentou o maior período, chegando a mais de 36 dias. Também foram observadas diferenças significativas no peso de lagartas, peso de pupas. Apenas a concentração CL₁₀ não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento controle no parâmetro peso de pupas. Concentrações subletais de Bt são capazes de interferir no desenvolvimento de indivíduos de *H. armigera*, podendo contribuir para reduzir os prejuízos causados por essa praga.

Palavras chaves: *Bacillus thuringiensis*, controle biológico, efeito subletal, *Helicoverpa armigera*

**SUBLETHAL EFFECT OF DIPEL IN *Helicoverpa armigera* (HÜBNER)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the sublethal effect caused by Dipel bioinsecticide on *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) caterpillars. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is an entomopathogen widely used in pest control, but little is known about its effects on sublethal concentrations, which may occur in the field due to the difference in distribution of the application along the canopy of the crops or differences in concentration expression of Bt toxins in genetically modified plant tissues. In this study, the Dipel bioinsecticide was used in the SC formulation, at concentrations of 3.67×10^6 ; 6.85×10^6 ; 6.85×10^7 ; 1.37×10^8 and 6.85×10^8 spores.mL⁻¹, in addition to the control treatment, in which it received application of only deionized water to install the bioassay to estimate the sublethal concentrations. Sixteen caterpillars and three replicates were used for each concentration. Probit analysis was used to estimate lethal concentrations; LC₁₀, LC₁₅, LC₂₀ and LC₂₅, which are considered sublethal concentrations because they present a mortality below 25%. Later, another bioassay was installed to evaluate some biological parameters, such as: duration period of the larval phase, weight of individuals in the larval stage, weight of individuals in the pupal phase and sexual ratio. All the concentrations showed a significant increase in the larval period, with highlight to LC₂₅ that presented the longest period, reaching more than 36 days. There were also significant differences in the weight of caterpillars and pupal weight. Only LC₁₀ concentration showed no significant difference in relation to the control treatment in the pupae weight parameter. Sublethal Bt concentrations are capable of interfering in the development of *H. armigera* individuals, and may contribute to reduce the damage caused by this pest.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, biological control, *Helicoverpa armigera*, sublethal effect

LISTA DE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Bacillus thuringiensis</i> mostrando o esporo Fonte: Allende et al. (2016, p. 33).....	5
Figura 2. Cristais de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bacillales: Bacillaceae) (VALICENTE; SOUZA, 2004)	6
Figura 3. Esquema explicativo sobre o modo de ação de <i>Bacillus thuringiensis</i> . Fonte: Jurat-Fuentes ([2016?]).....	15
Figura 4. Ilustração explicativa do modo como foram realizadas as diluições do produto Dipel, para a posterior contagem da quantidade de esporos.....	19
Figura 5. Descrição do microscópio utilizado para a contagem dos esporos de <i>Bt</i> na formulação do produto comercial Dipel.....	19
Figura 6. Momento da contagem dos esporos, onde os mesmos podem ser observados sobre a câmara de Neubauer.....	20
Figura 7. Bandejas utilizadas para a condução dos bioensaios.....	21
Figura 8. Ilustração da curva de dose-resposta de <i>Helicoverpa armigera</i> a <i>Bacillus thuringiensis</i> (Dipel).....	27
Figura 9. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre o peso lagartas de primeiro instar de <i>H. armigera</i>	28
Figura 10. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre o peso de pupas de <i>H. armigera</i>	29
Figura 11. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre a duração do período de <i>H. armigera</i>	30
Figura 12. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre a razão sexual de <i>H. armigera</i>	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores estimados das concentrações sub-letais do Dipel lagartas de primeiro ínstar de <i>Helicoverpa armigera</i>	26
Tabela 2. Parâmetros biológicos de lagartas de primeiro instar de <i>Helicoverpa armigera</i> submetidas a concentrações subletais do bioinseticida Dipel.....	32

1. INTRODUÇÃO

A praga *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) pode se alimentar de folhas e hastes, mas tem preferência pelas estruturas reprodutivas, como espigas e inflorescências, causando deformações ou podridões que acarretam na queda das mesmas (CZEPAK et al., 2013). A ausência de medidas de controle adequadas a *H. armigera* torna seu manejo no campo difícil de ser realizado de forma satisfatória (CHOUGULE et al., 2005). O uso intenso de inseticidas tem proporcionado o desenvolvimento de populações resistentes dessa praga, principalmente aos inseticidas do grupo químico dos piretróides, além de outros ingredientes ativos pertencentes a outros grupos químicos, como fipronil, clorfenapir, indoxacarbe e spinosad (AHMAD et al., 2003; WU, 2007). Em complemento aos inseticidas químicos, o uso de plantas geneticamente modificadas que expressam as toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) estão sendo amplamente adotadas, principalmente em culturas como algodão, milho e soja.

Com o crescente risco de contaminação ambiental e os insucessos no controle de pragas com inseticidas químicos, é real a necessidade da utilização de entomopatógenos como agentes alternativos de controle. Essa necessidade estimulou consideravelmente o interesse da utilização de bioinseticidas, tornando-se então, de fundamental importância para proteção de culturas e florestas (SALAMA, 1984).

A tendência de reduzir a utilização dos inseticidas sintéticos na agricultura, nas florestas e na saúde humana, renovou o interesse em *B. thuringiensis* como uma alternativa ambientalmente desejável (MOLLA et al., 2011).

Formulações comerciais baseadas nesta bactéria, vem sendo utilizadas desde 1970, e tem recebido atenção especial como ferramenta para o manejo de pragas, em uma agricultura que busca a sustentabilidade, preservando o meio ambiente e garantindo aumentos de produção (POLANCZYK; van FRANKENHUYZEN; PAULI, 2017). Além do mais, devido ao aumento do custo de produção alavancados pelos novos inseticidas (GLARE, et. al, 2012) e o aumento do número de registros de resistência (TABASHNIK, et. al, 2014), esses bioinseticidas

são uma importante alternativa para o garantir o crescimento exponencial dos sistemas de manejo integrado de pragas.

Fatores ambientais como chuva, radiação solar e temperatura são os principais determinantes para a diminuição do residual do *Bt* (FRYE et al., 1973). Portanto, existem várias possibilidades que podem gerar efeito subletal que precisam ser consideradas para melhor compreensão da eficácia e do impacto ecológico que podem gerar formulações de inseticidas a base de *Bt* (FRYE et al., 1973).

O efeito subletal pode ser de grande contribuição para o manejo de *H. armigera*, pois, esse efeito é capaz de interferir negativamente na biologia da praga e pode ser passado para as gerações seguintes contribuindo para a prevenção do surgimento de populações resistentes (SEDARATIAN et al., 2012).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito subletal do bioinseticida Dipel® na formulação SC, nas concentrações CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ em lagartas de *H. armigera*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Helicoverpa armigera*

2.1.1 Classificação taxonômica

A espécie *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) pertence a uma das famílias mais abundantes em Lepidoptera (ZAHIRI, 2010, 2011, 2012, 2013) caracterizada, principalmente, pela presença do órgão timpânico localizado na porção posterior do tórax, e a redução ou ausência da veia M2 na asa posterior (FIBIGER; LANFONTAINE, 2004; LANFONTAINE; FIBIGER, 2006). Espécies dessa família são consideradas importantes pragas agrícolas. (MITCHELL et al., 2006).

A subfamília Heliothinae, na qual *H. armigera* faz parte, é considerada cosmopolita e constituída por cerca de 400 espécies, que são igualmente diversificadas quanto a seus hábitos, tamanho, que varia de pequeno a médio e

preferindo habitats de climas secos e quentes (MITTER et al., 1993; MATOV et al., 2008).

O que se conhece sobre a morfologia e fisiologia do grupo se baseia em estudos esparsos e superficiais, como por exemplo, a presença de esporões tibiais nos três pares de pernas, com suposta função de auxiliar o adulto recém-emergido, a cavar o solo e chegar à superfície (HARDWICK, 1958; FIBIGER; LANFONTAINE, 2004).

O gênero *Helicoverpa* foi descrito por Hardwick (1965) para 11 novas espécies: *H. atacammae*, *H. bracteae*, *H. confusa*, *H. fletcheri*, *H. helenae*, *H. minuta*, *H. pacifica*, *H. pallida*, *H. tibetensis*, *H. titicacae* e *H. toddi*; e atualmente com 17 espécies: *H. assulta* (Guenée, 1852), *H. armigera* (Hübner, 1805), *H. gelotopoen* (Dyar, 1921), *H. hawaiiensis* (Quaintance; Brues, 1905), *H. punctigera* (Wallengren, 1860) e *H. zea* (Boddie, 1850).

2.1.2 Distribuição geográfica

Helicoverpa armigera é endêmica da África, Europa, Ásia continental, Ceylão, Japão, ilhas Canton e Fiji, Nova Zelândia, Nova Caledônia, Austrália, Nova Guiné, leste da Indonésia, Kiribati e Polinésia (HARDWICK, 1965) e, mais recentemente no Novo Mundo (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013). Em 17 de junho de 2015, três mariposas da praga *H. armigera* foram coletadas no estado da Florida, sendo este o primeiro relato da espécie em solo americano (HAYDEN; BRAMBILA, 2015).

Pelo pouco que se conhece da morfologia do grupo, essa espécie apresenta forte estrutura corporal com tórax amplo (ALI et al., 2009), como característica adaptativa para alcançarem voos mais altos facilitando assim o alto índice de migração em diversos tipos de culturas e em diversas regiões do mundo (FITT, 1989; CUNNINGHAM et al., 1998).

2.1.3 Hábito alimentar e potencial de danos

A fase larval alimenta-se de flores e frutos de plantações economicamente importantes, dentre elas: soja, milho e algodão, trazendo inúmeros prejuízos para as

lavouras (KITCHING; RAWLINS, 1998; BODY et al., 2008; BURKNESS et al., 2010). Czepak et al. (2013) salientam que os danos podem ocorrer tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva da planta.

Fato importante na alimentação desta espécie é a utilização por parte dos adultos e imaturos de flores e frutos das plantações, como recursos que sustentam as populações, o que faz do ambiente agrícola o ideal para esta espécie, atualmente praga com alto grau de impacto (ZALUCKI et al., 1986).

Por apresentar acentuado desempenho devido adaptações a diversos tipos de culturas, um rápido ciclo de vida, diapausa facultativa e alta capacidade migratória fez com que *H. armigera* se dissipasse rapidamente e em escala global, trazendo inúmeros prejuízos agrícolas e econômicos (FITT, 1989; JADHAV et al., 2013), inclusive para o Brasil (SPECHT et al., 2013). A espécie, até então não registrada para a América do Sul, adentrou no Brasil, trazendo uma problemática para os agricultores de diversas culturas economicamente importantes (CPEZAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013; THOMAZONI et al., 2013).

Os representantes destas espécies, além de se alimentarem de variados tipos de plantas, possuem altas taxas de fecundidade e dispersão e, constroem câmaras no solo para pupação (MITTER et al., 1993).

2.1.4 Controle químico e resistência a inseticidas

A ausência de medidas de controle adequadas a *H. armigera* torna seu controle no campo difícil de ser realizado de forma satisfatória (CHOUGULE et al., 2005). O uso intenso de inseticidas tem proporcionado o desenvolvimento de resistência de populações desta praga, principalmente aos inseticidas do grupo químico dos piretróides, além de outros ingredientes ativos pertencentes a outros grupos químicos, como fipronil, clorfenapir, indoxacarbe e spinosad (AHMAD et al., 2003; WU, 2007). Wyckhuys et. al. (2013) destacam que 640 casos de resistência a inseticidas de populações da referida praga foram relatados no mundo. De acordo com “Arthropod pesticide resistance database”, atualmente os relatos de resistência de *H. armigera* a inseticidas biológicos e químicos chegaram a 763 casos de resistência relatados a 49 princípios ativos.

2.2 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

2.2.1 Histórico, nomenclatura e taxonomia

A microflora bacteriana dos insetos, confinada no intestino, é rica, diversa e compreende bactérias Gram positivas e negativas. Muitas delas auxiliam na digestão dos alimentos, porém algumas são patogênicas e recebem grande atenção dos pesquisadores devido ao seu potencial para o controle de pragas agrícolas e urbanas (PRIEST, 2000). Entre estes patógenos destaca-se *B. thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae), bactéria em forma de bastonete, formadora de esporos e capaz de produzir inclusões cristalinas durante a esporulação, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000) (Figuras 1 e 2).

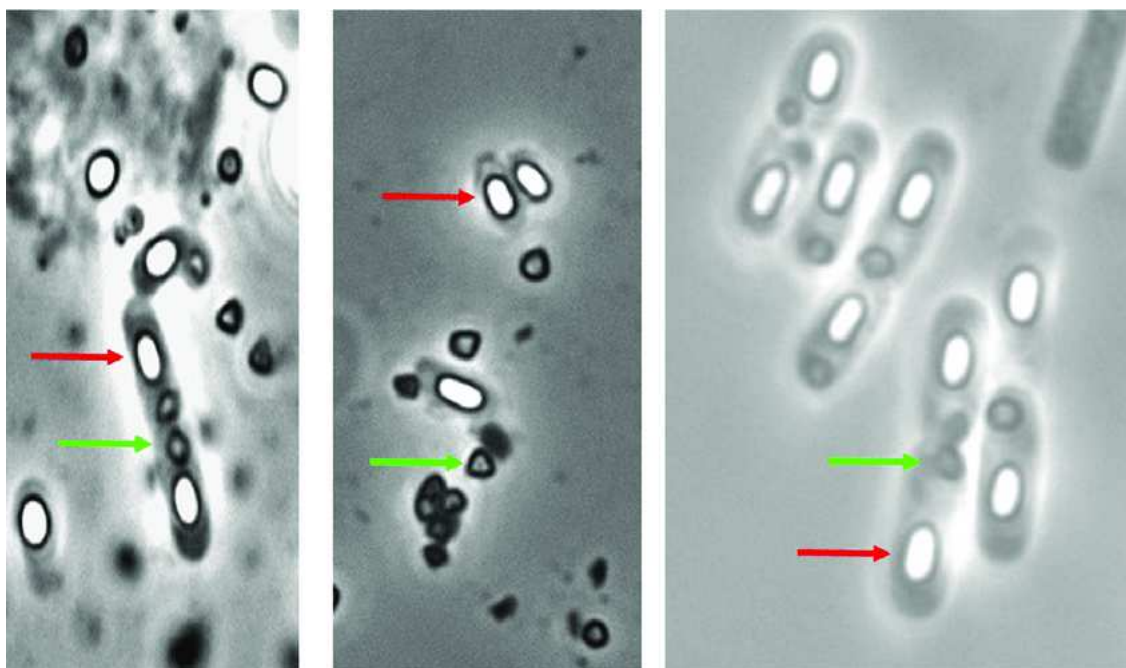


Figura 1. “Células de *Bacillus thuringiensis* mostrando o esporo (Setas vermelhas), de coloração mais clara; e o cristal bipiramidal (Setas verdes), de coloração mais escura”. Allende et al. (2016, p. 33)

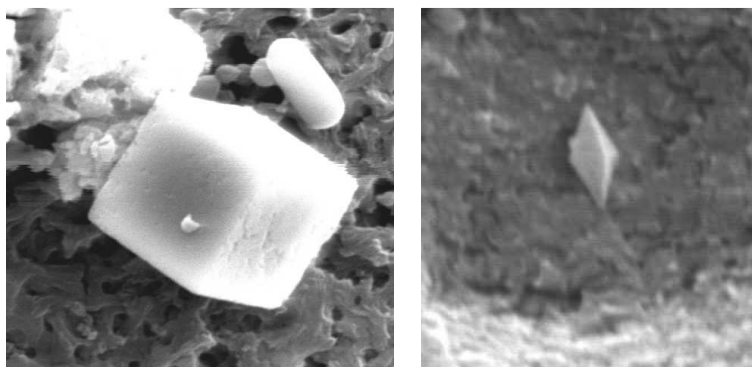


Figura 2. Cristais de *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) (VALICENTE; SOUZA, 2004).

O *Bt* foi pela primeira vez descrito por Berliner em 1911 quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado. Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome de *B. thuringiensis*, não foi o primeiro isolamento deste patógeno. Em 1901, o biólogo S. Ishiwata isolou a bactéria que era agente causal da “sotto-disease”. Em 1908, Iwabuchi a denominou como *B. sotto Ishiwata*, que posteriormente foi considerado nome inválido e o nome mais recente (*B. thuringiensis*) foi mantido (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000).

Embora geralmente o termo *B. thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, na verdade ela pertence a um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *Bt* e *B. weihenstephanensis*) denominado *B. cereus*. *Bt* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (LUTHY; WOLFERSBERGER, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase, embora este seja um critério com pouco valor taxonômico (LYSENKO, 1983). Os métodos moleculares como hibridização do DNA cromossômico, análise de ácidos graxos e fosfolipídeos, comparação da sequência 16S rRNA, entre outros, mostram que estas duas espécies são, na verdade, somente uma. Esta semelhança é devida à transferência de plasmídeos que codificam as δ -endotoxinas de *Bt* para *B. cereus* e, por outro lado, o *Bt* pode perder a capacidade de produzir estas toxinas, “tornando-

se *B. cereus*". Portanto, a distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (SCHNEPF et al., 1998; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; HANSEN; SALAMITOU, 2000).

2.2.2 Utilização de *Bacillus thuringiensis* no manejo de pragas

Bacillus thuringiensis (*Bt*) está presente em amostras de solos de áreas cultivadas com culturas anuais ou perenes, áreas desérticas, ambientes aquáticos, superfície e interior de plantas, restos vegetais, insetos e pequenos mamíferos mortos, teias de aranha, grãos armazenados e locais inabitados (BERNHARD et al., 1997; FORSYTH; LOGAN, 2000; BIZZARRI; BISHOP, 2007; HERNÁNDEZ et al., 2007; KONECKA et al., 2007; THAMMASITTIRONG; ATTATHOM, 2008; AZAMBUJA et al., 2009; ABOUSSAID et al., 2011; ASSAEEDI et al., 2011; PRABHAKAR; BISHOP, 2011; PATEL et al., 2013; SWIECICKA et al., 2013; ARGÔLO-FILHO; LOGUERCIO, 2014).

Devido à sua adaptação a diferentes habitats *Bt* produz uma grande gama de substâncias que podem ser utilizadas para diversos fins, como por exemplo, controle de doenças fúngicas em plantas (CHOI et al., 2007; AKRAM et al., 2013), biorremediação (OZTURK, 2007; OVES et al., 2013; MANDAL et al., 2013; WU et al., 2013) e para tratar células cancerígenas humanas (OHBA et al., 2009; POORNIMA et al., 2010).

Esta bactéria é bem conhecida pela sua habilidade de produzir inclusões cristalinas (cristais), que têm atraído atenção de pesquisadores em todo mundo devido a sua atividade inseticida (SCHNEPF et al., 1998). Desde a clonagem e sequenciamento dos primeiros genes das proteínas Cry (também chamadas de toxinas Cry) na década de 1980, muitos outros foram caracterizados e classificados de acordo com a nomenclatura de Crickmore et al. (2008).

Bioinseticidas à base de *Bt* são utilizados com sucesso no controle de pragas desde a segunda metade do século XX (ROSAS-GARCIA, 2009; SANAHUJA et al., 2011; SANCHIS, 2011; POLANCZYK et al., 2012). Esta bactéria entomopatogênica tem efeito letal e/ou subletal na fase jovem e/ou adulta de diversas ordens de insetos de importância agrícola: Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera

e Orthoptera (PORCAR et al., 2009; Van FRANKENHUYZEN, 2009; ABOUSSAID et al., 2010; BLANCO et al., 2010; OPPERT et al., 2011; BRAVO et al., 2012; BERGAMASCO et al., 2013; PANIZI, 2013; van FRANKENHUYZEN, 2013; ZHANG et al., 2013; SCHÜNEMANN et al., 2014).

A sua atividade biológica também foi relatada para algumas espécies de ácaros praga, nematoides, *Ascaris suum* (Goeze, 1782) (Ascaridida: Ascarididae); *Blatta orientalis* Linnaeus, 1758 (Blattaria: Blattidae); *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 (Trypanosomatida: Trypanosomatida); *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) (Strigeiformes: Schistosomatidae) (GUTIÉRREZ; GONÇALVES, 2006; PORCAR et al., 2006; RADWAN, 2007; AMANCHI; HUSSAIN, 2008; EL-SADAWY et al., 2008; SILVEIRA et al., 2011; BERLITZ et al., 2013; URBAN Jr. et al., 2013).

Embora os produtos comerciais à base de *Bt* sejam utilizados contra lepidópteros, dípteros e coleópteros, mais de 1.000 espécies de insetos, pertencentes a diversas ordens de insetos, são suscetíveis a este patógeno (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). Dos 572 lepidópteros suscetíveis ao *Bt* elencados por estes autores, 83 (14,5%) são noctuídeos. O bioinseticida à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é o Dipel (*Bt kurstaki* HD-1). Este produto, pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente contra mais de 170 lepidópteros-praga (BEEGLE; YAMAMOTO, 1992; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Fiuza et al. (2017) relataram as recentes descobertas que os estudos envolvendo bactérias de *Bt* para controle de pragas que os efeitos dessa bactéria ainda não eram conhecidos, tais como: *Acromyrmex crassispinus* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae), *A. lundii* (Guering) (Hymenoptera: Formicidae), *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) entre outras. Essas descobertas criaram expectativa de utilizar *Bt* como fermenta de controle de diferentes pragas, podendo ser empregado em sistemas de manejo integrado em diferentes culturas.

A eficácia e especificidade das cepas de *Bt* e suas toxinas no controle de insetos praga, favoreceram a formulação de bioinseticidas à base deste patógeno e 322 produtos à base de *Bt* são responsáveis por 53% do mercado mundial de bioinseticidas, gerando um faturamento anual de US\$ 210 milhões. A participação dos

bioinseticidas à base de *Bt* no mercado mundial de bioinseticidas vem diminuindo desde 2000. Naquele ano a participação era de 90%, diminuindo para 60% em 2005 e para 53% em 2010. Esta redução ocorreu devido ao grande incremento no uso de vírus entomopatogênicos (+100%) e fungos entomopatogênicos (+52%) no controle de pragas agrícolas, enquanto que o mercado de produtos à base de *Bt* aumentou apenas 36%. (CAB INTERNACIONAL CENTRE, 2010).

Polanczyk, van Frankenhuyzen e Pauli (2017), ressaltaram o aumento da adoção de *Bt* em sistemas de manejo integrado de pragas no Brasil, após a entrada e rápida dispersão da praga *H. armigera* e após o aumento significativo da praga que era considerada como secundária, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), em lavouras de soja, devido ao grande potencial de ocasionar danos e pela dificuldade de controle que essas pragas vêm mostrando nas últimas safras. Juntas essas pragas alavancaram consideravelmente o mercado de produtos contendo *Bt* em suas formulações, devido sua grande eficiência comprovada em campo, onde apenas no ano de 2016, foram observadas as entradas de empresas nesse mercado com as marcas comerciais Best[®], Costar[®] e BtControl[®]. A quantidade de produtos a base de *Bt* quase duplicou nos últimos quatro anos, onde atualmente, existem 12 produtos com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e mais de 10 produtos estão atualmente registrados em caráter emergencial para a praga *H. armigera*.

Devido à maioria dos bioinseticidas terem esta bactéria como ingrediente ativo, o uso de *Bt* bioinseticidas marca o início da substituição dos inseticidas convencionais em várias áreas, com a retomada da utilização de agentes entomopatogênicos em grandes áreas agrícolas. Na década de 1980, o surgimento de novas técnicas, especialmente aquelas voltadas para a tecnologia do DNA recombinante, e manifestações públicas a respeito do uso abusivo dos inseticidas convencionais, levaram a um aumento cada vez mais crescente do interesse dos órgãos de pesquisa e indústrias sobre a utilização do *Bt* na agricultura e saúde pública (van FRANKENHUYZEN, 1993).

Na América do Norte, produtos à base de *Bt* são muito utilizados para o controle de pragas florestais, principalmente *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Erebidae), *Choristoneura fumiferana* Lederer, 1859 (Lepidoptera:

Tortricidae) e *Choristoneura occidentalis* Freeman, 1967 (Lepidoptera: Tortricidae). Nos EUA, de 1980 até 1995, cerca de dois milhões de hectares de florestas foram tratados com *Bt kurstaki* (Btk) para o controle de *L. dispar*, em alguns casos resultando na erradicação da praga. A partir da década de 90, a aplicação contra *C. fumiferana* nos EUA e Canadá praticamente cessou, devido ao sucesso obtido na década anterior (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; van FRANKENHUYZEN, 2000). Durante 35 anos, desde sua primeira utilização em 1980, Btk em sido aplicado para suprimir populações de pragas desfolhadoras e na erradicação de pragas florestais invasoras, acumulando um total de 11.3 milhões de hectares tratados no Canada, e 6.2 milhões de hectares nos Estados Unidos (POLANCZYK; van FRANKENHUYZEN; PAULI, 2017).

A América Latina, Cuba e México lideram a utilização dos bioinseticidas à base de *Bt*, especialmente para o controle de pragas em algodão, banana, batata, citros, hortaliças, fumo, milho, pastagens. No Brasil são utilizados produtos à base de *Bt* para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos são aplicados é apenas a terça parte do México e semelhante à de Cuba, ou seja, cerca de 150.000 hectares (POLANCZYK et al., 2012). Recentemente houve um grande incremento no comércio de *Bt* bioinseticidas no Brasil, principalmente devido a surtos de *H. armigera* (dados não publicados).

A China é o maior mercado de bioinseticidas na Ásia, seguido por Índia e Japão. A maioria dos produtos disponíveis para uso nesses países foi desenvolvido e fabricado localmente ainda que, muitas vezes, com assistência de ONGs ou do governo. China, Rússia, Bielorrússia e, em menor intensidade, Índia e Tailândia, também se tornaram produtores importantes de bioinseticidas à base de *Bt*. Em outros países como Israel, Indonésia, Malásia, Índia e países da África Ocidental, a utilização deste entomopatógeno no controle de pragas está em fase inicial de pesquisa (CAB INTERNATIONAL CENTRE, 2010).

Gelernter e Schab (1993) e Navon (2000) afirmam que diversos fatores limitam a utilização dos referidos bioinseticidas: o seu 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. Os autores enfatizam que estão sendo desenvolvidas pesquisas

para minimizar essas desvantagens. As pesquisas estão voltadas principalmente para: identificação de novos genes *cry*, desenvolvimento de novas formulações, plantas expressando genes *cry* e ampliação dos conhecimentos das interações com outros entomopatógenos, predadores, parasitóides e mesmo os inseticidas químicos.

2.2.3 Utilização de Plantas *Bt* no manejo de pragas.

A primeira geração de plantas transgênicas resistentes a insetos desenvolveu-se com o uso de genes codificadores de proteínas Cry de Bt (FISCHHOFF, 1987; VAECK et al., 1987). Os genes Cry de Bt são talvez os exemplos mais conhecidos de genes exógenos para os quais tem sido difícil obter um nível satisfatório de expressão em plantas transgênicas (DIEHN et al., 1996).

Os estudos iniciais se basearam em plantas como tabaco e tomate (BARTON et al., 1987; FISCHHOFF et al., 1987; VAECK et al., 1987) devido às facilidades de transformação, cultivo em casa de vegetação e crescimento rápido. Vários genes quiméricos contendo um gene promotor de origem vegetal; a seqüência completa do gene Cry e uma região de poliadenilação foram introduzidas em tabaco e tomate, porém nenhuma expressão foi detectada em tabaco e níveis muito baixos foram observados em tomate (PERLAK et al., 2001).

A truncagem da seqüência codificadora do gene Cry por eliminação da metade 3' desta seqüência aumentou a expressão para níveis detectáveis de proteína e mRNA (ESTRUCH et al., 1997). Os primeiros testes de campo com versões truncadas do gene Cry foram eficientes no controle de *H. zea* no caso do tomate (PERLAK; FISCHHOFF, 1993), porém sem eficiência no controle de *Heliothis virescens* Fabricius, 1781 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do algodão (JENKINS et al., 1993). Os resultados mais efetivos foram obtidos utilizando genes sintéticos (PERLAK et al., 1990; PERLAK et al., 2001; van der SALM et al., 1994).

Embora em todo mundo 20 genes Cry tenham sido introduzidos para transformar 14 plantas de interesse econômico tornando-as resistentes contra aproximadamente de 40 pragas de importância econômica, os principais alvos são as culturas de milho e algodão (FIUZA; PINTO, 2009/2010; JAMES, 2013). Em 2013

um total de 185,1 milhões de hectares foi cultivado com plantas geneticamente modificadas (“biotech crops”) por aproximadamente 18 milhões de agricultores em 26 países (19 países em desenvolvimento e 7 países industrializados). Os países com maior área plantada são EUA (72,9 milhões de hectares), Brasil (49,1 milhões de hectares) e Argentina (23,8 milhões de hectares). As principais plantas transgênicas cultivadas no mundo são soja, milho, algodão e canola com 50%, 33%, 12% e 5% da área total, respectivamente (JAMES, 2016).

No Brasil, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou até o ano de 2016 a liberação comercial de 3 tecnologias de plantas transgênicas Bt de soja, 35 de milho Bt, 8 de algodão Bt e uma planta de cana-de-açúcar para o controle de pragas (CTNBIO, 2015). O Brasil foi o país que apresentou maior incremento em termos de área plantada com plantas transgênicas entre 2015 e 2016 (4,9 milhões de hectares). O desenvolvimento de plantas expressando mais uma característica, como por exemplo, a soja resistente a insetos e tolerante a herbicida (RI/TH) alavancou o aumento da área com plantas transgênicas no Brasil que no momento é de 32,0 milhões de hectares enquanto que nos EUA a área cultivada com estas plantas foi de 32,1 milhões de hectares, juntos esses países representam 43% da área mundial (JAMES, 2016).

Em 2016, o Brasil apresentou o maior crescimento (11%) em termos de plantio de plantas transgênicas. Do total de 49,3 milhões de hectares; 32,7 milhões de hectares foram cultivados com soja (96,5 % do total das áreas); 15,7 milhões de hectares com milho (aumento de 16,1% em relação a 2015) e 0,79 milhões de hectares com algodão (aumentando 6,3% em relação a 2015). A soja intacta, resistente a insetos e tolerante a herbicida (RI/TH), foi cultivada em aproximadamente 11,9 milhões de hectares no Brasil na safra 15/16 (JAMES, 2016).

Na cultura da soja em 2016, os agricultores brasileiros plantaram 32,87 milhões de hectares de soja transgênica, sendo que deste total 12,43 milhões de hectares foi de soja TH (36,7%) e 20,25 milhões de hectares de soja TH/RI (59,8%). Com relação à cultura do milho, 88,4% da área foi cultivada com transgênicos (15,67 milhões de hectares), sendo 20,7% com milho RI (3,67 milhões de hectares) e 63,9% com milho RI/TH (11,32 milhões de hectares). O algodão transgênico foi cultivado em 790 mil hectares, apresentando uma taxa de adoção de 78,3% de um

total de 1,01 milhões de hectares, sendo destes 12,1% (120 mil hectares) RI e 42,3% (320 mil hectares) RI/TH (JAMES, 2016).

Os genes *Bt* têm fornecido uma contribuição significativa em conferir resistência a uma ampla gama de pragas nas principais culturas agrícolas mundiais, incluindo milho (a principal), algodão e importantes hortaliças, como por exemplo, berinjela. Tanto os países industrializados como EUA e Canadá como os países pobres como Burkina Faso e Bangladesh têm sido beneficiados com os genes *Bt* e o potencial de uso futuro é enorme (JAMES, 2016).

Dr. Anthony M. Shelton da Cornell University ressalta em JAMES (2013): “A comercialização de plantas expressando as proteínas Cry com atividade inseticida revolucionaram a agricultura e tornaram-se a principal estratégia de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (SHELTON et al., 2002; ROMEIS et al., 2008). Em 2011, a plantas *Bt* foram cultivadas em mais de 66 milhões de hectares e reduziram o uso de inseticidas (SHELTON et al., 2002; QAIM et al, 2008; KATHAGE; QAIM, 2012; LU et al., 2012), controlaram populações de pragas em regiões específicas (CARRIERE et al., 2003; WU et al., 2008), preservaram os inimigos naturais (NARANJO, 2009) e promoveram o uso do controle biológico (LU et al., 2012) ”.

2.2.4 Modo de ação de *Bacillus thuringiensis*

Em 1915, Berliner notou presença de inclusões parasporais nas células de *Bt* e em 1953, Hannay sugeriu a associação entre a patogenicidade desta bactéria e presença das inclusões cristalinas (cristais) formadas nas células durante a esporulação. Em 1968, Angus demonstrou que a hipótese de Hannay era válida (GLARE; O’CALLAGHAM, 2000) o que despertou o interesse por estudos sobre o modo de ação desta bactéria.

De acordo com Bravo et al. (2017), *B. thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria Gram-positiva que produz diferentes proteínas inseticidas, denominadas Cry, Vip, e Cyt, durante sua fase de crescimento e esporulação. *Bt* representa a estratégia de controle biológico de insetos mais utilizada atualmente em todo o mundo. As proteínas inseticidas produzidas por *Bt* são tóxicas a diferentes ordens de insetos,

tais como Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera, e Mallophaga, bem como nematoides.

Bt produz diferentes tipos de proteínas inseticidas. Cerca de 950 genes de diferentes toxinas foram clonados e classificados em 74 grupos de proteínas Cry, 3 grupos de proteínas Cyt e 3 grupos de proteínas Vip (CRICKMORE et al., 2016).

No final do século passado, a sequência de eventos da patologia do Bt que causam a morte do inseto após a ingestão das proteínas Cry pareciam ser relativamente simples e bem definidos, pelo menos em termos gerais (RAJAMOHAN et al., 1998; SCHNEPF et al., 1998; VACHON et al., 2012). As proteínas do cristal são inicialmente ingeridas como protoxinas que são solubilizadas e proteoliticamente convertidas em polipeptídeos menores e estáveis no intestino médio do inseto. Estas toxinas ativadas ligam-se a receptores específicos na superfície das células epiteliais do intestino médio, permitindo que as proteínas se insiram na membrana e formem poros que são seletivos a pequenas moléculas como íons inorgânicos, aminoácidos e açúcares (CARROLL; ELLAR, 1993; KIROUAC et al., 2002).

A presença destes poros na membrana plasmática interfere com a fisiologia da célula modificando os gradientes iônicos o que pode causar a lise das células devido a grande entrada de solutos a partir do lúmen do intestino médio (KNOWLES; ELLAR, 1987). Posteriormente, a destruição das células resulta em grandes danos ao tecido epitelial do intestino médio e a morte da lagarta intoxicada. Este pode ser definido como o “modo de ação clássico de Bt”.

O “modelo da ligação sequencial” conforme ilustrado na figura 3, tem sido muito estudado (BRAVO et al., 2007, 2011; SOBERÓN et al., 2007; 2009; 2010; BRAVO; SOBERÓN, 2008; JIMÉNEZ-JUÁREZ et al., 2008; PARDO-LÓPEZ et al., 2013). Este modelo descreve um mecanismo hipotético de formação do poro que é baseado principalmente em pesquisas com a toxina Cry 1Ab e *Manduca sexta* (LINNAEUS, 1763) (Lepidoptera: Sphingidae). As toxinas Cry1Aa e Cry1Ac, Cry1Ab possuem certa semelhança por se ligarem a pelo menos dois receptores específicos na membrana das células epiteliais do intestino médio: uma proteína semelhante à caderina e uma aminopeptidase N GPI (GÓMEZ et al., 2007; PIGOTT; ELLAR, 2007; LIKITVIVATANAVONG et al., 2011).

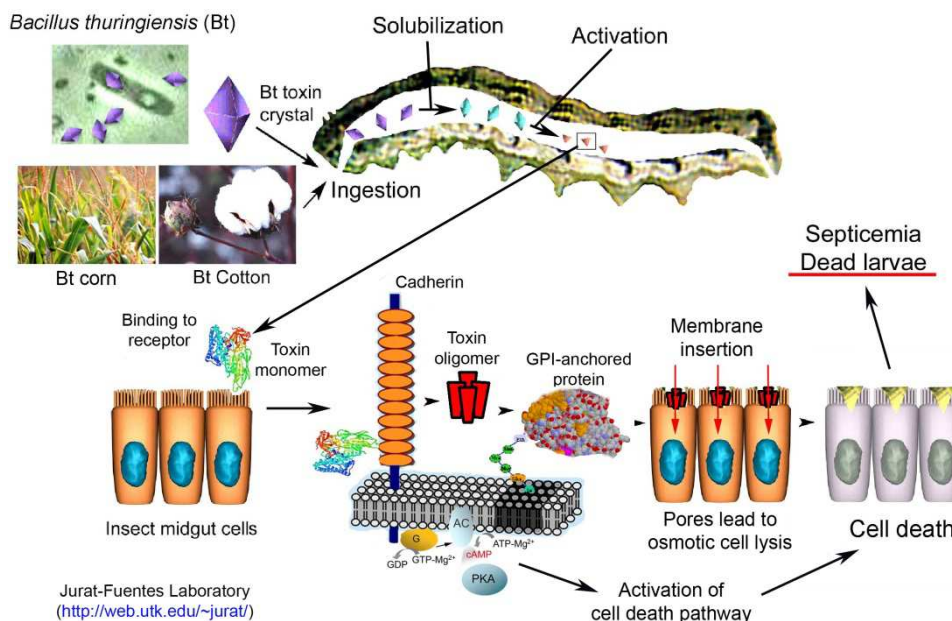


Figura 3. Esquema explicativo sobre o modo de ação de *Bacillus thuringiensis*. Jurat-Fuentes ([2016?]).

Uma vez ativada pelas proteases intestinais, as toxinas se ligam a uma caderina. Isto por sua vez causa uma alteração conformacional que favorece a clivagem proteolítica ao nível do resíduo F50, localizado dentro da alça que liga as hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$, as primeiras hélices da região terminal N do domínio formador do poro da molécula da toxina. Posteriormente, a remoção da hélice $\alpha 1$ permite que o restante da toxina oligomerize e forme uma estrutura denominada “estrutura pré poro” (GÓMEZ et al., 2002). Este oligômero se liga a um receptor aminopeptidase que possui uma afinidade muito maior por esta proteína do que a toxina monomérica (BRAVO et al., 2004). Finalmente, a ligação a uma aminopeptidase favorece a inserção do pré poro na membrana que fica mais permeável em função do poro resultante.

Em uma modificação deste modelo Pacheco et al. (2009) propuseram uma etapa adicional em que a toxina monomérica primeiramente se liga a uma aminopeptidase, com baixa afinidade, porém elevada capacidade, antes de interagir com a caderina, que está presente em pequenas quantidades na membrana, como foi salientado por Pigott e Ellar (2007), mas se liga a toxina com elevada afinidade.

Porém, o modelo de ligação sequencial simplesmente ignora mais de duas décadas de pesquisas sobre as toxinas Cry de *Bt* (VACHON et al., 2012). Como discutido anteriormente por Schwartz e Laprade (2000), a formação do poro foi demonstrada inequivocamente e várias vezes usando uma série de modelos experimentais, incluindo a condutância em membranas lipídicas planas de duas camadas, bioensaios de permeabilidade baseados em medições de difusão ótica ou fluorescência nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio, na medição de potencial da membrana em intestino médio isolado, e em bioensaios de turgescência osmótica em células de insetos.

No entanto, Vachon et al. (2012) ressaltaram que o mérito deste modo de ação reside no fato de que a interação das toxinas com células sensíveis, sem dúvida, tem consequências importantes no metabolismo celular e sua regulação. Como demonstrado anteriormente em estudos que foram totalmente ignorados; o grande efeito de toxinas Cry inseticidas sobre os níveis de cálcio intracelular (MONETTE et al., 1994, 1997).

O intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui um pH elevado, o que evita a germinação dos esporos ingeridos do patógeno. Porém as δ -endotoxinas causam a paralisia do intestino, retraindo os esporos e destruindo a parede do intestino. O conteúdo do intestino mistura-se ao da hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes para iniciar a germinação dos esporos. O inseto morto serve então como fonte de alimento para o crescimento vegetativo da bactéria (KNOWLES, 1994). Devido à importância do esporo na patogenicidade desta bactéria, a maioria dos produtos comercializados possui os esporos e as toxinas, visando aumentar sua atividade tóxica (COPPING; MENN, 2000).

Uma cepa de *Bt* pode produzir um ou mais cristais e estes, por sua vez, podem conter uma ou mais toxinas com peso molecular variado. A forma do cristal é determinada pelo número de δ -endotoxinas presentes, e uma relação parcial entre composição da proteína e sua estrutura molecular foi estabelecida por Glare e O'Callaghan (2000) e Lereclus et al. (1993). A inclusão cristalina pode ser responsável por mais de 25% do peso seco das células. A quantidade de toxina produzida em laboratório (aproximadamente 0,5 mg de proteína/mL de meio de cultura) e o tamanho dos cristais indicam que cada célula tem que sintetizar de 10^6 a

2×10^6 moléculas de δ -endotoxina para formar o cristal (AGAISSE; LERECLUS, 1995).

2.2.5 Efeito subletal de *Bacillus thuringiensis*

Os efeitos da intoxicação subletal de *Bt* e o custo adaptativo de pragas alvo é uma área pouco estudada. Moreau e Bauce (2003) mostraram que as concentrações subletais de *Bt kurstaki* (Btk) aumentou significativamente o período de larvas e diminuição do peso de pupa de *C. fumiferana*. Além disso, os efeitos subletais de Btk em *L. dispar* e o parasitóide Tachinidae *Compsilura concinnata* (Meigen) (Dip.: Tachinidae) foram relatados por Erb et al. (2001). Os efeitos subletais de Btk no desenvolvimento larval de *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) foram investigados por Eizaguirre et al. (2005). Além disso, a interação sinérgica entre doses subletais de Btk e *Campoletis chlorideae* Uchida (Hymenoptera.: Ichneumonidae) no manejo *H. armigera* foi investigado por Mohan et al. (2008).

Segundo Sedaratian et al. (2013), o efeito subletal pode ser de grande contribuição para o manejo de *H. armigera*, pois, esse efeito é capaz de interferir negativamente na biologia da praga e pode ser passado para as gerações seguintes contribuindo para a prevenção do surgimento de populações resistentes. Porém o conhecimento do efeito subletal como prevenção do surgimento de populações resistentes não descartam a adoção das estratégias de manejo de resistência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criação de insetos e condições do experimento

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Fitossanidade, no Laboratório de Controle Microbiano em Jaboticabal, SP, e na Empresa Ourofino Agrociência, Laboratório de Entomologia em Guataporã, SP, onde foram mantidos em condições de laboratório com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e a 16 horas de fotofase : 8 horas de escotofase. As lagartas de *H. armigera* foram provenientes da criação da empresa Pragas.com, coletadas em algodão a três gerações, as mesmas foram fornecidas ainda na fase de ovos para o laboratório de controle microbiano, onde foram acondicionados em recipientes contendo redes de tecido com ovos e ao fundo do recipiente continha dieta artificial descrita por Shorey e Hale (1965), garantindo a sobrevivência dos indivíduos da eclosão até o estágio L1 (aproximadamente 1 dia após a eclosão), posteriormente, essas lagartas foram utilizadas para a instalação dos experimentos. Todos os equipamentos utilizados na condução do experimento foram devidamente descontaminados em solução de hipoclorito de sódio a 5%, álcool 70% e câmara de esterilização com radiação Ultravioleta germicida.

3.2 Contagem de esporos

Para possibilitar a instalação dos bioensaios em laboratório, se fez necessário realizar a contagem dos esporos de Btk presentes no produto comercial Dipel® formulação SC 33,6 g.L⁻¹ (Sumitomo Chemical do Brasil Repres. Ltda.). A contagem foi realizada preparando diluições na ordem de 1:9, ou seja, uma parte do produto comercial para nove partes de água e posteriormente a mesma taxa de diluição foi empregada para cada calda gerada na diluição anterior (Figura 4), onde após o preparo, cada diluição foi submetida a agitação por cerca de um minuto, para garantir homogeneização adequada.

A contagem dos esporos de *Bt* foi realizada com o auxílio de equipamentos específicos, tais como, 4 erlenmeyers graduados com volume de 200 mL, um agitador, uma câmara de Neubauer, uma lamínula de microscópio, uma pisseta e um microscópio trinocular marca Zeiss modelo AXIO IMAGER A2 (Figura 5). Foram utilizadas para a contagem, a terceira e a quarta diluição, devido a quantidade de esporos que possibilitaram a contagem.

Após a visualização dos esporos sobre os quadrantes da câmara de Neubauer, os mesmos foram contabilizados e submetidos ao cálculo de determinação da concentração conforme descrito por Alves e Moraes (1998), onde foram obtidos os valores de $1,3 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹ na terceira diluição e $3,67 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹ na quarta diluição (Figura 6).

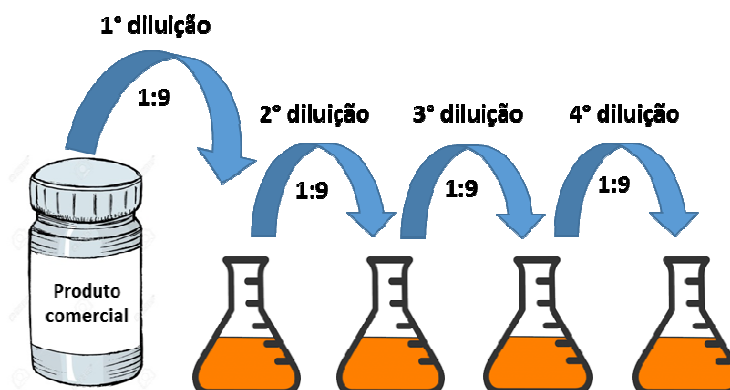


Figura 4. Ilustração explicativa do modo como foram realizadas as diluições do produto Dipel, para a posterior contagem da quantidade de esporos.



Figura 5. Microscópio da marca Zeiss modelo AXIO IMAGER A2, utilizado para a realização da contagem dos esporos de *Bt* na formulação do produto comercial Dipel.

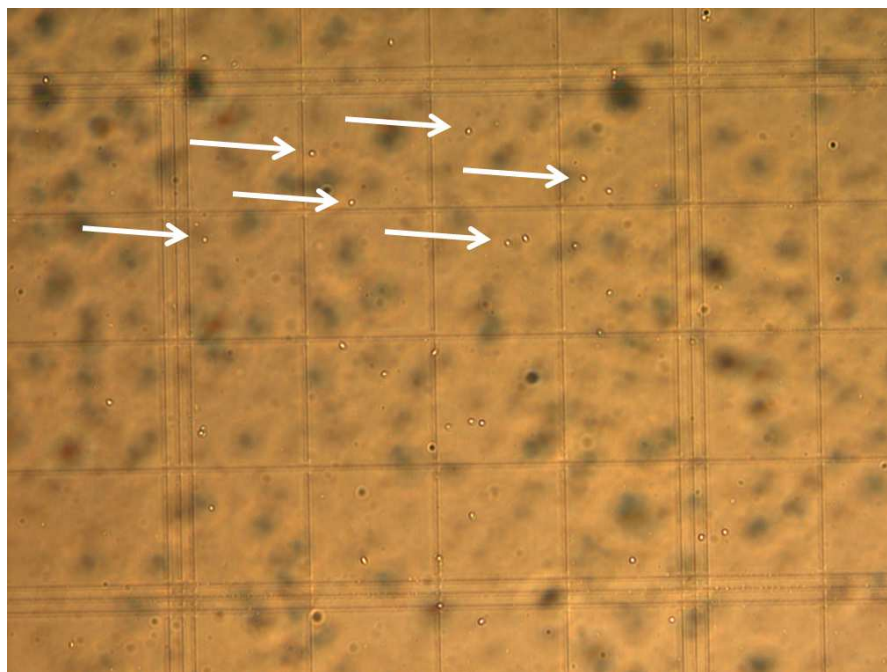


Figura 6. Imagem capturada no momento da contagem, onde os esporos podem ser observados sobre a câmara de Neubauer. Setas brancas indicam os esporos na imagem.

3.3 Bioensaio para determinação das concentrações subletais

As concentrações utilizadas no experimento que possibilitou a estimativa das concentrações subletais, foram obtidas através de bioensaios previamente realizados, empregando concentrações conhecidas a partir de diluições realizadas, tendo como referência as concentrações determinadas na etapa de contagem dos esporos. Com a instalação de quatro bioensaios realizados previamente foi possível determinar com melhor precisão as concentrações que foram utilizadas no bioensaio para determinação das concentrações subletais, que foram as seguintes: T1 = Controle, T2 = $3,67 \times 10^6$, T3 = $6,85 \times 10^6$, T4 = $6,85 \times 10^7$, T5 = $1,37 \times 10^8$ e T6 = $6,85 \times 10^8$ esporos.mL⁻¹. O bioensaio para estimativa das concentrações subletais foi instalado no dia 13 de abril de 2017, com delineamento experimental inteiramente ao acaso, contendo três repetições e seis tratamentos, que foram dispostos da seguinte maneira: as unidades experimentais foram células individualizadas de uma bandeja

fabricada pela empresa Advento do Brasil, que continha 16 células ao todo (Figura 7), onde cada célula media 3,5 cm largura por 5,5 comprimento, posteriormente foram adicionados 5,0 mL de dieta descrita por Shorey e Hale (1965) em cada uma das células. Após o preparo da dieta as bandejas foram acondicionadas em câmara contendo radiação UV para esterilização de possíveis contaminantes por 1 hora. Após a descontaminação da dieta, foi realizada a aplicação das concentrações com o auxílio de uma micropipeta, onde foi aplicado 300 μ L da suspensão em cada célula sobre a superfície da dieta. Após a aplicação, a suspensão foi espalhada cuidadosamente realizando agitação nas referidas bandejas, de maneira a garantir cobertura em toda a superfície aplicada. Cada tratamento constituiu de três bandejas, sendo considerada uma bandeja por repetição. Para o tratamento controle, foi aplicada somente água deionizada. Após a completa secagem da calda aplicada sobre a dieta, as lagartas de *Helicoverpa armigera*, no estágio L1, foram transferidas para as células das bandejas com o auxílio de um pincel macio, como movimentos cuidadosos, de maneira a não causar nenhum tipo de injúria nas mesmas, onde cada célula da bandeja recebeu apenas uma lagarta.



Figura 7. Bandeja de 16 células utilizadas para a condução dos bioensaios.

Após a instalação do bioensaio, os tratamentos foram submetidos a avaliação de mortalidade no dia 18 de abril de 2017, aos cinco dias após a aplicação das concentrações, após feito isso, os dados foram submetidos a análise de Probit segundo (Haddad 1998), com auxílio do programa SAS 9,0, para a estimativa das concentrações letais CL_{10} , CL_{15} , CL_{20} e CL_{25} .

3.4 Avaliação dos parâmetros biológicos

Os parâmetros biológicos, peso de lagartas, período larval (que compreende o período de eclosão das lagartas até a fase de pupa de cada tratamento), peso de pupas e razão sexual, foram avaliados em outro bioensaio, instalado utilizando as concentrações subletais CL₁₀ ($5,3 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹), CL₁₅ ($9,7 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹), CL₂₀ ($1,5 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹) e CL₂₅ ($2,3 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹), onde essas concentrações e o tratamento controle foram aplicadas no dia 06 de julho de 2017 e mantidos sob as condições de laboratório com temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 5\%$ e a 16 horas de fotofase : 8 horas de escotofase. Para a realização dos bioensaios foi adotado o mesmo procedimento do item 3.3.

Para a avaliação do peso de lagartas foram avaliadas quatro bandejas, empregando então o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. Para a avaliação dos demais parâmetros biológicos, foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos (T1 = Controle; T2 = CL₁₀; T3 = CL₁₅; T4 = CL₂₀ e T5 = CL₂₅) com seis repetições.

Para a realização das avaliações de peso de lagartas de *H. armigera*, as mesmas foram submetidas a pesagem em balança analítica marca Adventurer Ohaus modelo AR1530, de acordo com seus respectivos tratamentos, na data do dia 18 de julho de 2017, ou seja, 12 dias após a instalação do experimento e posteriormente os dados foram submetidos a análise estatística. As avaliações do peso de pupas, foram realizadas com auxílio de balança analítica, 24 horas após a formação completa das mesmas, nessa mesma data, foram realizadas também a determinação do sexo de cada indivíduo, logo após sua pesagem. Essas avaliações possibilitaram a coleta dos dados para posterior análise estatística do peso de pupas e razão sexual observados em cada tratamento.

As avaliações do período larval em cada tratamento foram realizadas contabilizando o período, em dias, que compreenderam entre a eclosão dos ovos e

a formação de pupas de cada indivíduo avaliado, onde posteriormente foram submetidos a análise estatística.

3.5 Análise estatísticas

Para todas as análises estatísticas dos dados, foi utilizado o software SAS 9,0 para a obtenção das análises de variância e testes de comparação de médias segundo Tukey a 5 % de probabilidade. A determinação de Probit também foi realizada utilizando o mesmo programa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estimativa das concentrações subletais

Os resultados obtidos com as concentrações subletais do bioinseticida Dipel® aplicado sobre a dieta artificial para as lagartas de primeiro ínstar de *H. armígera*, onde a mortalidade dos indivíduos foi avaliada aos cinco dias após a aplicação, estão apresentados na Tabela 1. As concentrações letais estimadas, abaixo de 25%, consideradas concentrações subletais, foram: CL₁₀ ($5,3 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹), CL₁₅ ($9,7 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹), CL₂₀ ($1,5 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹) e CL₂₅ ($2,3 \times 10^6$ esporos.mL⁻¹).

Podemos notar que o teste apresentou valores significativos pois o valor de (P = 0,0604) foi superior ao limite de 0,05 que determina a validade da análise com as concentrações empregadas e resultados obtidos. Ainda podemos notar que o coeficiente angular foi de CA = 0,96 e graus de liberdade GL = 7,3927. O coeficiente angular nos permite interpretar a potencia inseticida que o produto comercial Dipel exerceu sobre as lagartas nas condições do bioensaio realizado.

Tabela 1. Valores estimados das concentrações sub-letais do Dipel lagartas de primeiro ínstar de *Helicoverpa armigera*.

Concentrações sub-letais (Esporos.mL ⁻¹)				(CA ± EP) ^a	χ ² (GL) ^c	P
LC ₁₀	LC ₁₅	LC ₂₀	LC ₂₅			
5,39 X 10 ⁵ (2,91 X 10 ² - 3,54 X 10 ⁶) ^b	9,68 X 10 ⁵ (1,40 X 10 ³ - 5,28 X 10 ⁶)	1,54 X 10 ⁶ (4,85 X 10 ³ - 7,33 X 10 ⁶)	2,30 X 10 ⁶ (1,40 X 10 ⁴ - 9,81 X 10 ⁶)	0,96 ± 0,19	7,3927 (3)	0,0604

^a Coeficiente angular ± erro padrão^b 95% erro padrão^c Graus de liberdade

Com a posse dos dados após a análise de probit foi possível a construção de um gráfico de dose-resposta que está representado na Figura 8, pode-se observar a probabilidade das mortalidades de acordo com as concentrações de Dipel e os respectivos valores de Probit.

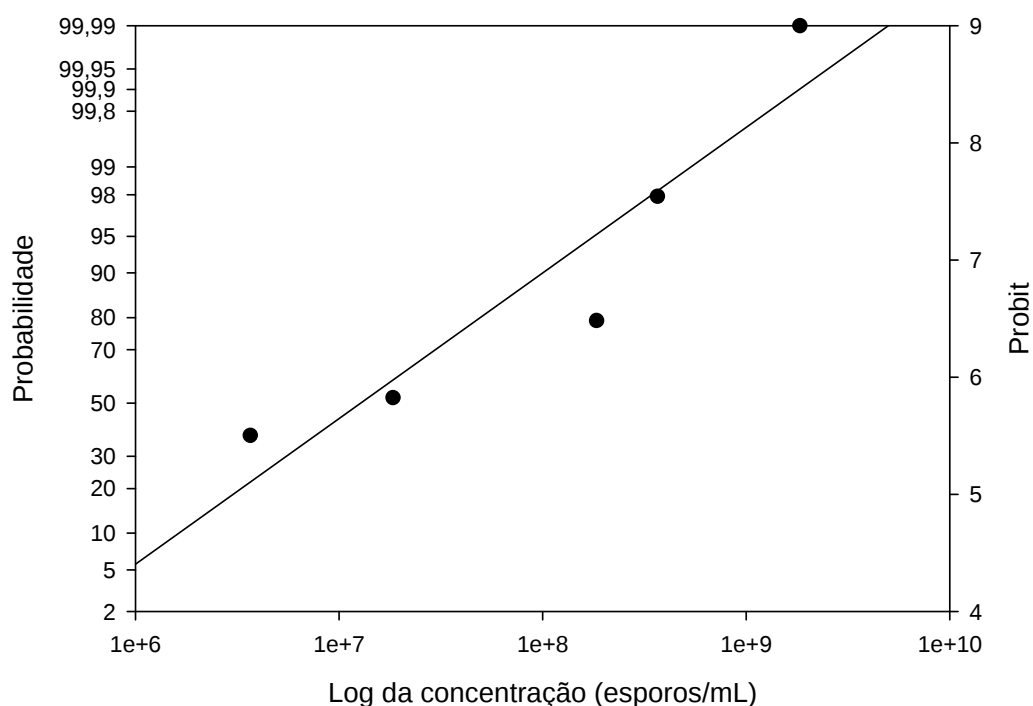


Figura 8. Curva de dose-resposta de *Helicoverpa armigera* a *Bacillus thuringiensis* (Dipel).

4.2 Efeito subletais das concentrações empregadas no bioensaio

As concentrações testadas afetaram o peso de lagartas ($F=77,84$; $GL=4, 16$; $P<0,0001$), onde, com base no teste de separação de médias, notamos que todos os tratamentos se diferenciaram do tratamento controle e o tratamento CL_{25} foi o que apresentou maior diferença em comparação ao tratamento controle, não atingindo a média de peso de 10 gramas contra 222,5 gramas no tratamento controle, evidenciando o efeito dessa concentração subletal. Ainda para esse tratamento, foi possível observar diferença significativa em comparação ao tratamento CL_{10} , porém

não foram observadas diferenças entre os tratamentos CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅; e CL₁₀, CL₁₅ e CL₂₀, como podemos observar na Tabela 2 e Figura 9.

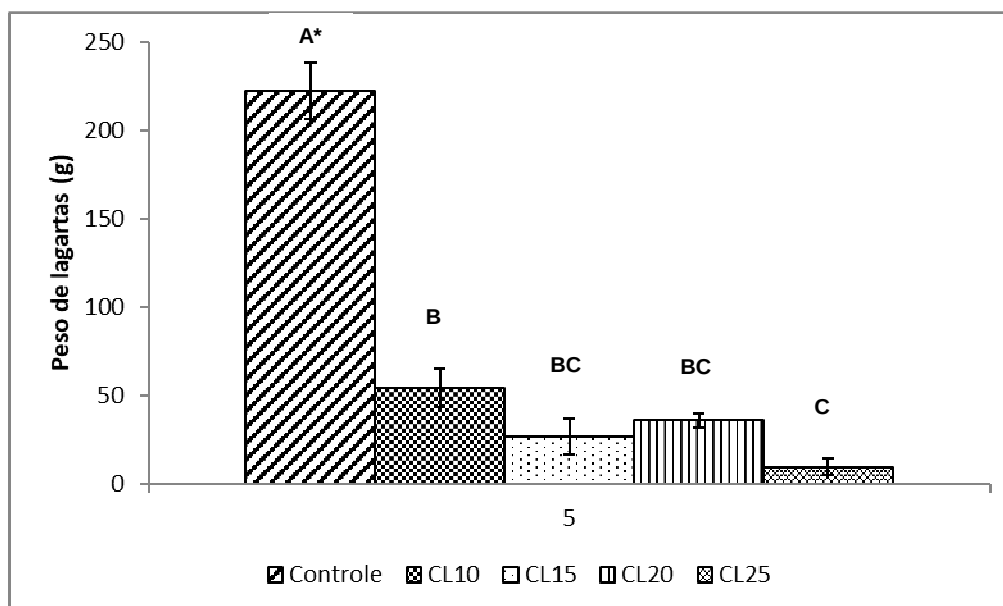


Figura 9. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre o peso lagartas de primeiro instar de *H. armigera*. Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Nas avaliações do peso de pupas, podemos observar que as concentrações apresentaram efeitos significativos ($F=19,7$; $GL=4, 16$; $P<0,0001$), onde com base no teste de separação de médias, notamos que apenas o tratamento CL₁₀, não apresentou diferenças significativas em relação ao tratamento controle, porém, os tratamentos CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ apresentaram diferenças em relação aos tratamentos controle e CL₁₀. Os tratamentos CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ não apresentaram diferenças entre si, porém o menor peso obtido foi observado para CL₂₅ que apresentou valor de 229,42 gramas.

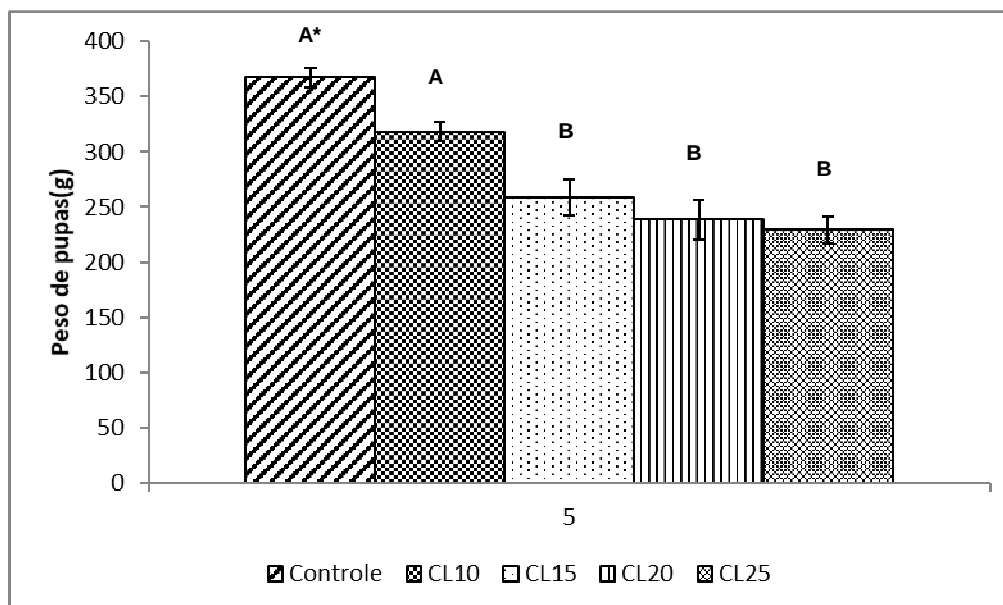


Figura 10. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre o peso de pupas de *H. armigera*. Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Para as avaliações do período larval, podemos observar que as concentrações apresentaram efeitos significativos ($F=97,58$; $GL=4, 16$; $P<0,0001$), com destaque para o tratamento CL_{25} que apresentou valor médio de 33,6 dias contra um valor médio de 22,8 dias no tratamento controle. Os tratamentos CL_{15} e CL_{20} não apresentaram diferenças significativas entre si, onde os valores médios em dias obtidos foram 32,4 e 32,2 respectivamente, como podemos observar na Tabela 2 e Figura 11.

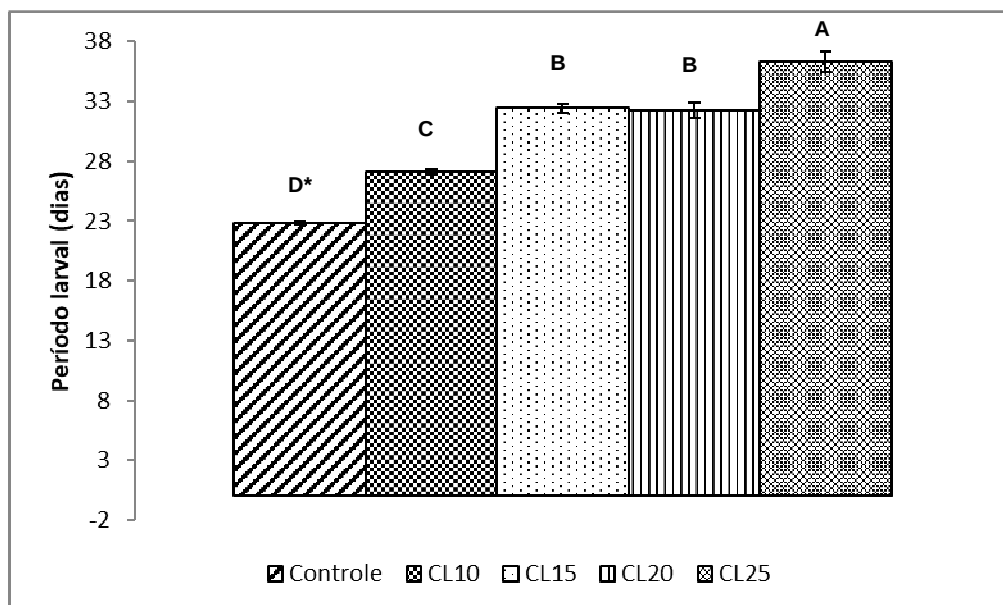


Figura 11. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre a duração do período larval de *H. armigera*. Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

A razão sexual não foi afetada pelos tratamentos ($F=1,56$; $GL=4, 16$; $P>0,05$), conforme Tabela 2 e Figura 12.

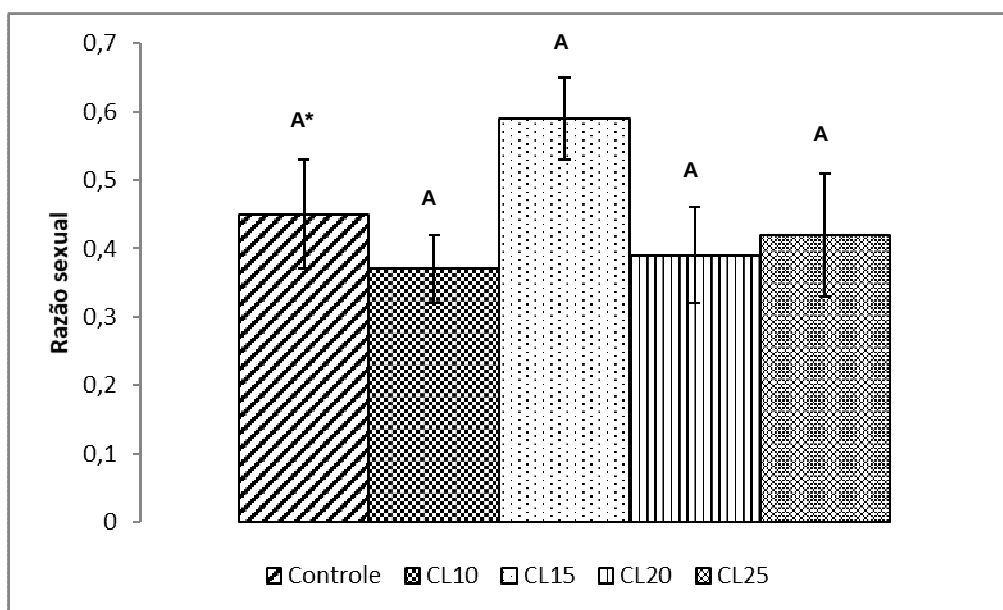


Figura 12. Efeito subletal do bioinseticida Dipel sobre a razão sexual de *H. armigera*. Médias seguidas da mesma letra não se diferenciam pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 2. Parâmetros biológicos de lagartas de primeiro instar de *Helicoverpa armigera* submetidas a concentrações subletais do bioinseticida Dipel.

Características	Controle	CL ₁₀	CL ₁₅	CL ₂₀	CL ₂₅
Peso lagartas (mg)	222,5 ± 15,66 a ¹	54,6 ± 10,08 b	26,6 ± 10,16 bc	35,9 ± 3,84 bc	9,7 ± 4,42 c
Peso pupas (mg)	367,2 ± 8,63 a	318,3 ± 8,24 a	258,3 ± 16,43 b	238,6 ± 17,83 b	229,42 ± 12,05 b
Período larval (dias)	22,8 ± 0,10 d	27,1 ± 0,19 c	32,4 ± 0,41 b	32,2 ± 0,64 b	36,3 ± 0,88 a
Razão sexual	0,45 ± 0,08 a	0,37 ± 0,05 a	0,59 ± 0,06 a	0,39 ± 0,07 a	0,42 ± 0,09 a

¹Médias ± erro padrão seguidas de mesma letra na linha não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).

De acordo com a hipótese de que concentrações subletais de um bioinseticida a base de *B. thuringiensis* poderia causar interferências negativas no desenvolvimento biológico de *H. armigera*, foi instalado o presente trabalho fornecendo as concentrações subletais em dieta artificial onde foram aplicadas as concentrações correspondentes as concentrações letais CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅, do bioinseticida Dipel®. Baseado nos resultados obtidos, três parâmetros avaliados apresentaram resultados significativos com relação a interferência dos tratamentos contendo as concentrações subletais, sendo eles, peso de lagartas, peso de pupas e período larval.

Segundo Sedaratian et al. (2012), considerar a mortalidade como único parâmetro para mensurar o efeito de um bioinseticida pode subestimar os efeitos reais observados no inseto alvo, pois é evidente que o efeito subletal, afeta o desenvolvimento biológico do inseto e esse efeito precisa ser levado em consideração.

O mesmo autor observou consequências severas no desenvolvimento biológico de *H. armigera*, após o fornecimento de concentrações subletais de *B. thuringiensis*, em lagartas neonatas, onde a exposição a essas concentrações prolongou significativamente o período larval. Além disso, sugeriu que, embora especulativo, estes relatos de atraso no desenvolvimento larval após intoxicação Bt, podem refletir em alterações fisiológicas resultantes de complexas interações entre toxinas Btk e o epitélio intestinal.

Retnakaran et al. (1983) descreveu que a morte dos enterócitos pela ação de toxinas Cry ativa mecanismos de cicatrização do intestino médio, que podem ser regulados por proteínas, e estas são capazes de controlar o desenvolvimento larval. Além disso, a redução da capacidade de utilizar alimentos digeridos, devido aos níveis de alteração das proteases, também podem interferir no desenvolvimento larval de *H. armigera* após exposição a Bt, portanto esse efeito foi proposto para a explicação do prolongamento do período larval (MARTINEZ-RAMIREZ et al., 1999; GUJAR et al., 2001). Sendo assim, larvas expostas precocemente em seu desenvolvimento pode ter um período de crescimento mais longo para compensar os custos associados com a recuperação da exposição subletal, tais como aumento

na atividade de alimentação, que podem contribuir para a reversão da resistência dos indivíduos (SEDARATIAN et al., 2012). O prolongamento do período larval pode causar consequências biológicas em campo, incluindo a o aumento da probabilidade de predação ou parasitismo (WESELOH, 1984). Além do mais, o prolongamento do período larval pode reduzir a sobrevivência e fecundidade por forçar as lagartas a completarem seu desenvolvimento em folhagens mais envelhecidas, portanto não contendo a qualidade dos nutrientes necessárias para um desenvolvimento normal (ERB et al. 2001).

Os resultados do presente do estudo corroboram com os resultados que foram obtidos em publicações com a mesma espécie, realizados por Salama et al. (1981) e Zhang et al. (2000). Outras espécies de Lepidoptera, tais como *C. includens*, *Spodoptera exigua* (Hübner) e *L. dispar*, também apresentaram atrasos no desenvolvimento larval (NYOUKU et al. 1996; STAPEL et al. 1998; GILES et al. 2000; ERB et al. 2001). Eizaguirre et al. (2005), também obtiveram resultados semelhantes, onde o atraso no período larval foi observado ao avaliarem o efeito subletal em condições de laboratório, de *B. thuringiensis* sobre o desenvolvimento larval de *Sesamia nonagrioides* (Lefèbre) (Lepidoptera: Noctuidae).

No presente estudo observa-se uma diminuição significativa do peso de pupas de *H. armigera*, expostas as concentrações subletais. Tais resultados também foram encontrados em muitos estudos envolvendo espécies de insetos pragas, provando o efeito adverso do Dipel no peso de pupas (ALFORD; HOLMES, 1986; VAN FRANKENHUYZEN; NYSTROM, 1987; PEDERSEN et al., 1997; ERB et al., 2001). Resultados publicados por Khalique e Ahmed (2002) e Aly et al. (2011), relataram a diminuição do peso de pupas de *H. armigera* e *Sesamia cretica* (Lerderer, 1857), respectivamente, após a exposição ao Dipel.

Polanczyk e Alves (2005), descreveram os efeitos subletais de Bt em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Os autores constataram efeitos negativos, no peso de lagartas e pupas fêmeas, além disso as interferências negativas foram observadas ao longo de todo o ciclo de vida da espécie estudada, afetando a capacidade de oviposição e fecundidade dos ovos.

Mascarenhas e Luttrell (1997), observaram redução no peso de lagartas de *H. zea* alimentadas com algodão Bt, o qual expressa a endotoxina Cry1A, em comparação aos insetos alimentados com uma cultivar convencional de algodão. Pedersen *et al.* (1997) e Moreau e Bauce (2003) verificaram que doses subletais de Bt afetaram o desenvolvimento de *Choristoneura fumiferana* (Clemens, 1865) (Lepidoptera: Tortricidae), reduzindo o peso das pupas. Efeitos subletais de Bt causando a redução do peso de lagartas e pupas de *H. zea*, também foram relatados por Santos Júnior *et al.* (2009). Sedaratian *et al.* (2012), reportou o efeito subletal de do bioinseticida Bt Biolep® WP no comprimento de lagartas, pré-pupa e pupas em *H. armigera*.

Apesar de ser comprovado o efeito subletal em espécies de pragas de importância agrícola, é importante ressaltar que doses recomendadas para o controle de tais espécies precisam ser respeitadas e que o emprego da técnicas de aplicação adequadas devem garantir o contato do produto com o alvo que se deseja controlar. Este aspecto é fundamental para o sistema de manejo integrado de pragas, e o efeito subletal deve ser considerado secundário, tanto para as estratégias de manejo de resistência de insetos quanto para estratégias de controle.

Porem o efeito subletal pode ocorrer afetando populações de *H. armigera* em campo e o aumento no período larval pode expor a praga a outros agentes de controle (parasitoides e predadores), visto que as lagartas que sofrem o efeito subletal apresentam uma menor mobilidade, ficando desprotegidas do ataque desses agentes de controle. Para um melhor entendimento dos efeitos subletais em populações de campo são necessários estudos sobre o custo adaptativo de *H. armigera*, pois o conhecimento desses efeitos subletais podem auxiliar no emprego de táticas de manejo de resistência. Outro fator importante é um melhor conhecimento desses efeitos subletais utilizando plantas contendo tecnologias Bt.

Estudos demográficos de populações são requeridos como uma medida desejável para avaliar a toxicidade total causada pelo efeito subletal nessas populações. A toxicidade total causada pelo efeito subletal poderá ser de extrema importância, causando impacto na população total da praga em uma determinada região, portanto esse entendimento pode ser útil e capaz de suportar

recomendações de manejo em sistemas de intensa sucessão de culturas, capazes de hospedar a mesma população da praga na região, fato que pode acarretar na manutenção de altos níveis populacionais.

5. CONCLUSÕES

O bioinseticida Dipel apresentou efeito subletal em *Helicoverpa armigera*, afetando o período larval e peso de lagartas e pupas.

6. REFERÊNCIAS

ABOUSSAID, H.; EL-AOUAME, L.; EL-MESSOUSSI, S.; OUFDU, K. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera:Tephritidae). **Journal of Environmental Protection**, Irvine, v. 1, p. 337-345, 2010. Disponível em: <<http://www.SciRP.org/journal/jep>> DOI:10.4236/jep.2010.14040.

ABOUSSAID, H.; VIDAL-QUIST, J.C.; OUFDU, K.; EL MESSOUSSI, S.; CASTAÑERA, P.; GONZÁLEZ-CABRERA, J. Occurrence, characterization and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from argan fields in Morocco. **Environmental Technology**, v. 32, p. 1383-1391, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2010.536789>>.

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? **Journal of Bacteriology**, v. 177, n .21, p. 6027-6032, 1995.

AKRAM, W.; MAHBOOB, A.; JAVED, A.A. *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against fusarium wilt. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 34, p. 275–280, 2013. Disponível em: DOI: 10.1556/EuJMI.3.2013.4.7.

ALFORD, A. R.; HOLMES, J. A. Sublethal effects of carbaryl, aminocarb, fenitrothion, and *Bacillus thuringiensis* on the development and fecundity of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **J. Econ. Entomol.** v. 79, p. 31–34, 1986.

ALLENDE, A.; BOLTON, D.; CHEMALY, M.; DAVIES, R.; SALVADOR, F.; ANDEZ E.; AMEZ, P.; GIRON, R.; HERMAN, L.; KOUTSOUMANIS, K.; LINDQVIST, R.; NORRUNG, B.; RICCI, A.; ROBERTSON, L.; RU, G.; SANAA, M.; SIMMONS, M.; SKANDAMIS, P.; SNARY, E.; SPEYBROECK, N.; TER KUILE, B.; SANCHIS, V. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. **EFSA Journal**, Chichester, v. 14, n. 7, p. 33, 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/314836294_SCIENTIFIC_OPINION_Risks_for_public_health_related_to_the_presence_of_Bacillus_cereus_and_other_Bacillus_spp_including_Bacillus_thuringiensis_in_foodstuffs_EFSA_Panel_on_Biological_Hazards_BIOHAZ_Pane>. Acesso em: 27 out. 2017.

ALI, A.; CHOUDHURY, R.A.; AHMAD, Z.; RAHMAN, F.; KHAN, F.R.; AHMAD, S.K. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**. v.4, p. 99-106, 2009.

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

ALY, M. Z. Y.; SOLIMAN, M. M. M.; MOHAMED, E. E. E.; DAHI, H. F.; SALEM, S. A. R. Assessments the toxic effects of entomopathogenic bacterium, *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, and methomyl insecticide on larval instars of the greater sugarcane borer; *Sesamia cretica* (Lederer). **Egypt Acad. J. Biolog. Sci.** v. 3, p. 1–9, 2011.

ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777.

AMANCHI, N. R.; HUSSAIN, M. M. Cytotoxic effects of delfin insecticide (*Bacillus thuringiensis*) on cell behaviour, phagocytosis, contractile vacuole activity and macronucleus in a protozoan ciliate *Paramecium caudatum*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 15, p. 2637-2643, 2008.

AMEEN, A.O.; FUXA, J.R.; RITCHER, A.R. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v. 33, n. 2, p. 129-135, 1998.

ARGÔLO-FILHO, R. C.; LOGUERCIO, L. L. *Bacillus thuringiensis* is an environmental pathogen and host-specificity has developed as an adaptation to human-generated ecological niches. **Insects**. v. 5, p. 62-91, 2014. doi:10.3390/insects5010062.

ASSAEEDI, A. S. A.; OSMAN, G. E. H.; ABULREESH, H. H. The occurrence and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* in the arid environments. **Australian Journal of Crop Science**. v. 5, p. 1185-1190, 2011.

AZAMBUJA, A. O.; ALLES, G. C.; FRITZ, L. L.; RECHE, M. H. L. R.; FIUZA, L. M. Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 38, p. 14-23, 2009.

BARTON, K. A.; WHITELEY, R. H.; YANG, N. S. *Bacillus thuringiensis* δ -entodoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant Physiology**. v. 85, p. 1103-1109, 1987. DOI:10.1104/pp.85.4.110.

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**. v. 124, n. 3, p. 587-616, 1992. DOI: <http://dx.doi.org/10.4039/Ent124587-4>.

BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 112, p. 152-158, 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2012.11.011.

BERLINER, E. Eber die schlafsucht der Mehlmotenraupe. (*Ephesia kuehniella* Zell.) undihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. **Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie**. v. 2, p. 29-56, 1911.

BERLITZ, D. L.; SAUL, D. A.; MACHADO, V.; SANTIN, R. C.; GUIMARÃES, A. M.; MATSUMURA, A. T. S.; RIBEIRO, B. M.; FIUZA, L. M. *Bacillus thuringiensis*: molecular characterization, ultrastructural and nematotoxicity to *Meloidogyne* sp. **Journal of Biopesticides**, v. 6, p. 120-128, 2013.

BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insects pests. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 70, n. 1, p. 59-68, 1997.

BIZZARRI, M. F.; BISHOP, A. H. Recovery of *Bacillus thuringiensis* in vegetative form from phylloplane of clover (*Trifolium hybridum*) during a growing season. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 94, p. 38-47, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.007>.

BLANCO, C. A.; GOULD, F.; GROOT, A. T.; ABEL, C. A.; HERNANDEZ, G.; PERERA, O. P.; TERAN-VARGAS, A. P. Offspring from sequential matings between *Bacillus thuringiensis*- resistant and *Bacillus thuringiensis*-susceptible *Heliothis virescens* Moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 103, p. 861-868, 2010. <http://dx.doi.org/10.1603/EC09232>.

BODY, B.M.; DANIELS, J.C.; AUSTIN, G.T. Predaceous behavior by *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). **Journal of Insect Behavior**. v. 21, p. 143-146, 2008.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1667, p. 38-46, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>.

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

BRAVO, A., SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**. v. 26, p. 573–579, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.06.005>.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 41, p. 423-431, 2011. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B. I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology**. v. 6, 17–26, 2012. doi:10.1111/j.1751-7915.2012.00342.x.

BRAVO, A.; PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GARCIA-GÓMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERÓN, M. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. In: FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***: Characterization and use in the field of control. Switzerland: Gewerbestrasse, 2017. p. 53 – 66.

BURKNRESS, E.C.; DVELY, G.; PATTON, T.; MOREY, A.C.; HUTCHISON, W.D. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. **GM Crops**. v. 1, n. 5, p. 1-7, 2010.

CAB INTERNATIONAL CENTRE. The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary. Wallingford: CAB Internation Centre, 2010. 40p.

CARRIERE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; SISTERSON, M.; ANTILLA, L.; WHITLOW, M.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. E. 2003. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. **Procedings of the National Academy of Science USA**. v. 100, p. 1519-1523, 2003. DOI: 10.1073/pnas.0436708100.

CARROLL, J.; ELLAR, D. J. An analysis of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin action on insect midgut membrane permeability using a light-scattering assay. **European Journal of Biochemistry**. v. 214, p. 771–778, 1993. DOI: /10.1111/j.1432-1033.1993.tb17979.x.

CHOI, J. G.; KIM, J. C.; JANG, K. S.; LEE, D. H. Antifungal activities of *Bacillus thuringiensis* isolates on barley and cucumber powdery mildews. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 12, p. 2071-2075, 2007. <http://science.naturalnews.com/pubmed/18167458.html>.

CHOUGULE, N. P.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 35, p. 355–367, 2005.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**. v. 56, n. 5, p. 651-676, 2000. DOI: 10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 62, p. 807-813, 2008.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. (2016) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature <http://www.btnomenclature.info/>

CTNBIO (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. [Liberações comerciais: plantas]. Brasília, DF, jun. 2015. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial#/liberacao-comercial/consultar-processo>>. Acesso em: 27 out. 2017.

CUNNINGHAM, J.P.; JALLOW, M.F.A.; WRIGHT, D.J.; ZALUCKI, M.P. Learning in host selection in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Animal Behaviour**. v. 55, n. 1, p. 227-234, 1998.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 43, p. 110-113, 2013.

DIEHN, S. H.; DE ROCHER, E. J.; GREEN, P. G. Problems that can limit the expression of foreign genes in plants: lessons to learned from *Bt* toxin genes. In: Setlow, J.K. (Ed.). **Genetic Engineering: Principles and Methods**, v. 18, New York: Plenum Press, p. 83-89. 1996.

EIZAGUIRRE, M.; TORT, S.; LOPEZ, C.; ALBAJES, R. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. **Journal fo Economic Entomology**. v. 98, p. 464–470, 2005.

EL-SADAWY, H. A.; EL-HAG, H. A.; GEORGY, J. M.; EL HOSSARY, S.; KASSEM, H. A. *In vitro* activity of *Bacillus thuringiensis* (H14) 43 kDa crystal protein against *Leishmania major*. **American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science**. v. 3, n. 4, p. 583-589, 2008.

ERB, S. L.; BOURCHIER, R. S.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; SMITH, S. M. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the Tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). **Environmental Entomology**. v. 30, p. 1174–1181, 2001.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997. DOI:10.1038/nbt0297-137.

FIBIGER, M.; LAFONTAINE, J.D. A review of the higher classification of the Noctuoidea (Lepidoptera) with special reference to the Holarctic fauna. **Esperiana, Buchreihe zur Entomologie**. v. 11, p. 1-124, 2004.

FISCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; MCCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KATZMER, K.; MAYER, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G. E FINLEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **BioTechnology**. v. 5, p. 807-813, 1987. DOI:10.1038/nbt0887-807.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**. v. 34, p. 17- 52, 1989.

FIUZA, L. M.; PINTO, L. M. N. Plantas transgênicas que sintetizam toxinas de *Bacillus thuringiensis* e outras. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 38, p. 62-67, 2009/2010.

FIUZA, L. M.; BERLITZ, D. L.; de OLIVEIRA, J. V.; KNAACK, N. *Bacillus thuringiensis*: Different targets and Interactios. In: FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of control**. Gewerbestrasse, 2017. p. 111 – 126.

FORSYTH, G.; LOGAN, N. A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. **Letters in Applied Microbiology**. v. 30, p. 263-266, 2000. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2000.00706.x.

FRYE, R. D.; SCHOLL, C. G.; SCHOLZ, E. W.; FUNKE, B. R. Effect of weather on a microbial insecticide. **Journal Invertebrate Pathology**. v. 22, p. 50–54, 1973.

GELERNTER, W.; SCHWAB, G. E. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Wiley, 1993. cap. 4, p. 89-104.

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

GLARE, T. R.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KOHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. (2012) Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnol.** v. 30, p. 250–258, 2012.

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters.** v. 513, p. 242–246, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02321-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02321-9).

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides.** v. 28, p. 169 - 173, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2006.06.013>.

GUJAR, G. T.; KALIA, V.; KUMARI, A. Effect of sublethal concentration of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on food and developmental needs of the american bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Indian J. Exp. Biol.** v. 39, p. 1130–1135, 2001.

GUTIÉRREZ, M. E. M.; GONÇALVES, E. F. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematocida. **Manejo Integrado de Plagas Y Agroecología.** n. 78, p.63-66, 2006.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.41-64.

HARDWICK, D.F. Taxonomy, life history and habits of the Elliptoid-eyed species of *Schinea* (Lepidoptera: Noctuidae), with notes on the *Heliothidinae*. **The Canadian Entomologist.** v. 6, p. 1-116, 1958.

HARDWICK, D.F. The corn earworm complex. **Memoirs of the Entomological Society of Canada.** v. 40, p. 1-246, 1965.

HAYDEN, J. E.; BRAMBILA, J. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), the Old World Bollworm. Pest Alert, **Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry**; 2015 Junho. Report No.: FDACS-02039

HERNÁNDEZ, C. S.; ANDREW, R.; BEL, Y.; FERRE, J. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 94, p. 56-63, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2004.10.006>.

ISHIWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease). **Danihon Sanshi Kaiho**. v. 114, p. 1-5, 1901.

JADHAV, D.R.; ARMES, N.J.; BHATNAGAR, V.S. Incidence of Winter and Summer Diapause in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Andhra Pradesh, India. **Asian Journal of Agricultural Sciences**. v. 5, n. 3, p. 40-51, 2013.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. Ithaca: ISAAA, 2013. 37p.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016**. Ithaca: ISAAA, 2016. n. 52, 135p.

JENKINS, J. N.; PARROT, W. L.; MCCARTY, J. C.; JR, CALLAHAN, F. E.; BERBERICH, S. A.; DEATON, W. R. Growth and survival of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton containing a truncated form of the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology**. v. 86, p. 181-185, 1993.

JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; MUÑOZ-GARAY, C.; GÓMEZ, I.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. The pre-pore from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is necessary to induce insect death in *Manduca sexta*. **Peptides**. v. 29, p. 318–323, 2008. DOI: 10.1016/j.peptides.2007.09.026.

JURAT-FUENTES, J. L. **Characterization of cry toxin mode of action**. [Altura: 500 pixels. Largura: 680 pixels. 1,4 mb]. Formato JPEG 1. Knoxville: Institute of Agriculture, University of Tennessee, [mar. 2016?]. Disponível em: <<http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>>. Acesso em: 27 out. 2017.

KATHAGE, J.; QAIM, M. Economic impacts and impact dynamics of *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) cotton in India. **Proceeding of the National Academic of Science of United States of America**. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1203647109, 2012.

KHALIQUE, F.; AHMED, K. Retarding effect of spore-dendotoxin complex of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on the development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 5, p. 853–857, 2002.

KIROUAC, M.; VACHON, V.; NOËL, J.-F.; GIRARD, F.; SCHWARTZ, J. L.; LAPRADE, R. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. **Biochemistry and Biophysics Acta**. v. 1561, p. 171-179, 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00342-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00342-5).

KITCHING, I.J.; RAWLINS, J.E. The Noctuoidea. In: Kristensen, N.P. (Ed.). **Lepidoptera, Moths and Butterflies**. p. 355-401, In: Fischer, M. (Ed.) **Handbook of Zoology IV, Arthropoda 2, Insecta 35**. Berlin: Walter de Gruyter, 1998, v. 1, p. 491.

KNOWLES, B. H., ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. **Biochemistry and Biophysics Acta**. v. 924, p. 509-518, 1987.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**. v. 24, n. 2, p. 275-308, 1994.

KONECKA, E.; KAZNOWSKI, A.; ZIEMNICKA, J.; ZIEMNICKI, K. Molecular and phenotypic characterisation of *Bacillus thuringiensis* isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 94, p. 56-63, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.08.008>.

LAFONTAINE, J.D.; FIBIGER, M. Revised higher classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **The Canadian Entomologist**. v. 138, p. 610-635, 2006.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.; HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, 1993. p. 37-70.

LIKITVIVATANAVONG, S.; CHEN, J. W.; EVANS, A. M.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; GILL, S. S. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. **Journal of Agriculture & Food Chemistry**. v. 59, p. 2829-2838, 2011. DOI: 10.1021/jf1036189.

LU, Y; WU, K.; JIANG, Y.; GUO, Y.; DESNEUX, N. Widespread adoption of *Bt* cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. **Nature**. doi:10.1038/nature11153, 2012.

LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.167-180, 2000.

LYSENKO, O. *Bacillus thuringiensis*: evolution of a taxonomic conception. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, n. 2, p. 295-298, 1983.

MANDAL, K.; SINGH, B.; JARIYAL, M.; GUPTA, V. K. Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 93, p. 87-92, 2013. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.001.

MARTINEZ-RAMIREZ, A. C.; GOULD, F.; FERRE, J. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science and Technology**. v. 9, p. 239–246, 1999.

MASCARENHAS, V. J.; LUTTRELL, R. G. Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Environmental Entomology**, v. 26, p. 939-945, 1997.

MATOV, A.; ZAHIRI, R.; HOLLOWAY, J.D. The Heliothinae of Iran (Lepidoptera: Noctuidae). **Zootaxa**. v. 1763, p. 1-37, 2008.

MCDONALD, D. Biopesticides-pesticides with a bright future? **International Pest Control**. v. 33, p. 33 – 35, 1991.

MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J.C. Systematics and evolution of the cutworm moths (Lepidoptera: Noctuidae): evidence from two protein-coding nuclear genes. **Systematic Entomology**. v. 31, p. 21-46, 2006.

MITTER, C.; POOLE, R.W.; Matthews, M. Biosystematics of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). **Annual Review of Entomology**. v. 38, p. 207-225, 1993.

MOHAN, M.; GUJAR, G. T. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Crop Protection**. v. 20, p. 311-316, 2001. DOI:10.1016/S0261-2194(00)00157-5.

MOLLA, O.; LEZ-CABRERA, G. L.; URBANEJA, A. The combined use of *Bacillus thuringiensis* and *Nesidiocoris tenuis* against the tomato borer *Tuta absoluta*. **Biocontrol**. v. 56, p. 883–891, 2011.

MONETTE, R.; SAVARIA, D.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; SCHWARTZ, J. L. Calcium activated potassium channels in the UCR-SE-1a lepidopteran cell line from the beet armyworm (*Spodoptera exigua*). **Journal of Insect Physiology**. v. 40, p. 273-282, 1994. DOI:10.1016/0022-1910(94)90067-1.

MONETTE, R.; POTVIN, L.; BAINES, D.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Interaction between calcium ions and *Bacillus thuringiensis* toxin activity against Sf9 cells (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 440-447, 1997.

MOREAU, G.; BAUCE, E. Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Journal Economic Entomology**. v. 96, n. 2, p. 280-286, 2003.

NARANJO, S.E. *Bt* crops and invertebrate non-target effects – revisited. **ISB news report**, 2009. 4p.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**. v. 19, n. 8/10, p. 669-676, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00089-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00089-2).

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Research**. v. 29, p. 427-434, 2009.

OPPERT, B.; MORGAN, T. D.; KRAMER, K. J. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. **Pest Management Science**. v. 67, p. 568–573, 2011. DOI: 10.1002/ps.2099.

OVES, M.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 20, p. 121–129, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.11.006>.

OZTURK, A. Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Hazardous Materials**. v. 147, p. 518–523, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.01.047>.

PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. **Peptides**. v. 30, p. 583-588, 2009. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.08.006

PANIZZI, A. R. History and contemporary perspectives of the Integrated Pest Management of soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**. v. 42, p. 119–127, 2013. DOI 10.1007/s13744-013-0111-y.

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal 3-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiological Reviews**. v. 37, p. 3-22, 2013. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x.

PATEL, K. D.; PURANI, S.; INGLE, S. S. Distribution and diversity analysis of *Bacillus thuringiensis* cry genes in different soil types and geographical regions of India. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 112, p. 116–121, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.10.008>.

PEDERSEN, A.; DEDES, J.; GAUTHIER, D.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomol. Exp. Appl.** v. 83, p. 253–262, 1997.

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

PERLAK, F. J., FISCHHOFF, D. A. Insect resistant cotton: from the laboratory to the marketplace. In: KIM, L. (Ed.). **Advanced Engineered Pesticides, New York/Basel/Hong Kong**: Marcel Dekker, p. 199-211, 1993.

PERLAK, F. J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRING, R. A.; ROBERTS, J. K. Development and commercial use of Bollgard® cotton in the USA – early promises versus today's reality. **The Plant Journal**. v. 27, p. 489-501, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2001.01120.x.

PIGOTT, C. R., ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, p. 255-281, 2007. DOI: 10.1128/MMBR.00034-06.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. **Manejo Integrado del Plagas Agroecologia**, Turrialba, v. 74, n. 1, p. 24-33, 2005.

POLANCZYK, R. A.; DE BORTOLI, S. A.; DE BORTOLI, C. P. *Bacillus thuringiensis* - based biopesticides against agricultural pests in Latin America. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Org.). **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**. Rijeka: Intech, 2012, 682p. p. 445-462.

POLANCKYC, R. A.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; PAULI, G. The American *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In: FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of control**. Switzerland: Gewerbestrasse, 2017. p. 173 – 184.

POORNIMA, K.; SELVANAYAGAM, P.; SHENBAGARATHAI, R. Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. **Journal of Applied Microbiology**. v. 109, p. 348-54, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04697.x.

PORCAR, M.; NAVARRO, L.; JIMÉNEZ-PEYDRÓ, R. Pathogenicity of intrathoracically administrated *Bacillus thuringiensis* spores in *Blatta orientalis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 93, p. 63–66, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.05.001>.

PORCAR, M.; GRENIER, A. M.; FEDERICI, B.; RAHBE, Y. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 4897–4900, 2009. DOI:10.1128/AEM.00686-09.

PRABHAKAR, A.; BISHOP, A. H. Invertebrate pathogenicity and toxin-producing potential of strains of *Bacillus thuringiensis* endemic to Antarctica. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 107, p. 132-138, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.03.008>.

PRIEST, F. G. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteris. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 1-22.

QAIM, M.; PRAY, C. E.; ZILBERMAN, D. Economic and social considerations in the adoption of *Bt* crops. In: ROMEIS, et al. (Ed.). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Berlin: Springer. 2008. p.329-356.

RADWAN, M. A. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* integrated with other non-chemical materials to control *Meloidogyne incognita* in tomato. **Nematologia Mediterranea**. v. 35, p. 69-73, 2007.

RAJAMOHAN, F.; LEE, M. K.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. v. 60, p. 1-27, 1998.

RETNAKARAN, A.; LAUZON, H.; FAST, P. G. *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomology Experimental Applied**. v. 34, p. 233–239, 1983.

ROMEIS, J.; BARTSCH, D.; BIGLER, F.; CANDOLFI, M. P.; GIELKENS, M. M. C.; HARTLEY, S. E.; HELLMICH, R. L.; HUESING, J. E.; JEPSON, P. C.; LAYTON, R.; QUEMADA, H.; RAYBOULD, A.; ROSE, R. I.; SCHIEMANN, J.; SEARS, M. K.; SHELTON, A. M.; SWEET J.; VAITUZIS, Z.; WOLT, J. D. Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. **Nature Biotechnology**. v. 26, p. 203–208, 2008. DOI:10.1038/nbt1381.

ROSAS-GARCIA, N. M. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. **Recent Patents on Biotechnology**. v. 3, p. 28-36, 2009. DOI: 10.2174/187220809787172632.

SALAMA, H. S. *Bacillus thuringiensis* Berliner and its role as a biological control agent in Egypt. **Journal of Applied Entomology**. v. 98, p. 206–220, 1984.

SALAMA, H. S.; FODA, M. S.; ZAKI, F. N.; KHALAFALLAH, A. Persistence of *Bacillus thuringiensis* Berliner spores in cotton cultivations. **Journal of Applied Entomology**. v. 95, p. 321–326, 1983.

SALAMA, H. S.; FODA, M. S.; EL-SHARABY, A.; MATTER, M.; KHALLAFALLAH, M. Development of some lepidopterous cotton pests as affected by exposure to sublethal levels of endotoxin of *Bacillus thuringiensis* for different periods. **J. Invertebrate Pathology**. v. 38, p. 220–229, 1981.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**. 2011, v. 9, p. 283–300, 2011. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v. 31, p. 217–231, 2011.

SANTOS JUNIOR, H. J. G.; MARQUES, E. J.; POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D.; RONDELLI, V. M. Suscetibilidade de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae). **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 76, p. 625–631, 2009.

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

SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**. v. 2014, p. 1–12, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/135675>.

SCHWARTZ, J. L.; LAPRADE, R. Membrane permeabilisation by *Bacillus thuringiensis* toxins: protein insertion and pore formation. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Eds.). **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**. Norwell: Kluwer Associate Publishing, pp. 199–218, 2000.

SEDARATIAN, A.; FATHIPOUR, Y.; TALAEI-HASSANLOUI, R.; JURAT-FUENTES, J. L. Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology**. v. 137, p. 540–549, 2012.

SHOREY, H. H.; HALE, R. L. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. **J. Econ. Entomol.** v. 58, p. 522–524, 1965.

SHELTON, A.; ZHAO, J.; ROUSH, R. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of *Bt* transgenic plants. **Annual Review of Entomology**. v. 47, p. 845-881, 2002.

SILVEIRA, L. F. V.; POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D.; FRANCO, C. R. Seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* para *Tetranychus urticae* Koch. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, n. 2, p. 273-278, 2011.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B. E.; BRAVO, A. Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance. **Science**. v. 318, p. 1640- 1642, 2007. DOI:10.1126/science.1146453.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Science**. v. 66, p. 1337-1349, 2009. DOI: 10.1007/s00018-008-8330-9.

SOBERÓN, M.; PARDO, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; BRAVO, A. Pore formation by Cry toxins. In: ANDERLUH, G.; LAKEY, J.H. (Eds.). **Proteins: Membrane Binding and Pore Formation**. New York: Springer, p. 127-138, 2010.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PAULA-MORAES, S.V.; YANO, S.A.C. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) no Brasil: Identificação morfológica e molecular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 48, n. 6, p. 689-692, 2013.

SWIECICKA, I.; BARTOSZEWICZ, M.; KASULYTE-CREASEY, D.; DREWNOWSKA, J. M.; MURAWSKA, E.; YERNAZAROVA, A.; LUKASZUK, E.; MAHILLON, J. Diversity of thermal ecotypes and potential pathotypes of *Bacillus thuringiensis* soil isolates. **Letters in Applied Microbiology**. v. 85, p. 262-272, 2013. DOI: 10.1111/1574-6941.12116.

TABASHNIK, B. E.; DAID MOTA-SANCHEZ, D.; WHALON, M. E.; HOLLINGWORTH, R. M.; CARRIERE, D. Y. Terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**. v. 107, p. 496 – 507, 2014

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 98, n. 2, p. 121-126, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2008.03.001>.

THOMAZONI, D.; SORIA, M.F.; PEREIRA, E.J.G.; DEGRANDE, P.E. *Helicoverpa armigera*: perigo iminente aos cultivos de algodão, soja e milho do estado de Mato Grosso. **Instituto Mato-grossense do algodão -Circular Técnica**. v. 5, p. 1-12, 2013.

URBAN, J. R., J.F.; HU., Y.; MILLER, M. M.; SCHEIB, U.; YIU, Y. Y.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis*-derived Cry5B has potent anthelmintic activity against *Ascaris suum*. **Plos One**. v. 7, e2263, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002263.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 11, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.05.001.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSENS, S.; DEBEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M. E. LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**. v. 327, p. 33-37, 1987. DOI:10.1038/328033a0.

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

VALICENTE, F. H.; SOUZA, R. P. Cultivo e preparo de *Bacillus thuringiensis* para microscopia eletrônica de varredura. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 25.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA-DO-CARTUCHO, *SPODOPTERA FRUGIPERDA*, 1.,2004, Cuiabá. Resumos ... Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo: Embrapa Milho e Sorgo, 2004. p.146.

van Der SALM, T., BOSCH, D., HONEE, G., FENG, L., MUNSTERMAN, E., BAKKER, P., STIEKEMA, W.J., VISSER, B. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis cry1A (b)* and *cry1C* genes: a resistance management strategy. **Plant Molecular Biology**. v. 26, p. 51-59, 1994.

van FRANKENHUYZEN, K.; NYSTROM, C. W. Effect of temperature on mortality and recovery of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **The Canadian Entomologist**. v. 119, p. 941-954, 1987.

van FRANKENHUYZEN, K. The Challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Willey, 1993. cap. 1, p.1-35.

van FRANKENHUYZEN, K. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). ***Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications***. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 371-381.

van FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 101, n. 1, p. 1-16, 2009. DOI: 10.1016/j.jip.2009.02.009.

van FRANKENHUYZEN, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 114, n. 1, p. 76-85, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.05.010>.

WESELOH, R. M. Effects of the feeding inhibitor Plictran and low *Bacillus thuringiensis* Berliner doses on *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera; Lymantriidae): Implications for *Cotesia melanoscelus* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology**. v. 13, p. 1371–1376, 1984.

WYCKHUYS, K. A. G.; LU, Y.; MORALES, H.; VAZQUEZ, L. L.; JESUSA, C. L.; LEGASPI, J. C.; ELIOPOULOS, P. A.; HERNANDEZ, L. M. Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. **Biological Control**, v. 65, p.152-167, 2013.

WU, K. M. Regional management strategy for cotton boll worm *Helicoverpa armigera* in China. **Control of Insect Pests**. v. 7, p. 559-565, 2007.

WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with *Bt* toxin-containing cotton. **Science**. v. 321, p. 1676–1678, 2008. DOI:10.1126/science.1160550.

WU, S.; PENG, Y.; HUANG, Z.; HUANG, Z.; XU, L.; IVAN, G.; GUAN, X.; ZHANG, L.; ZOU, S. Isolation and characterization of a novel native *Bacillus thuringiensis* strain BRC-HZM2 capable of degrading chlorpyrifos. **Journal of Basic Microbiology**. v. 53, p. 1–9, 2013. DOI: 10.1002/jobm.201300501.

ZAHIRI, R.; KITCHING, I.J.; LAFONTAINE, J.D.; MUTANEN, M.; KAILA, L.; HOLLOWAY, J.D.; WAHLBERG, N. A new molecular phylogeny offers hope for a stable family-level classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **Zoologica Scripta**. v. 40, p. 1-16, 2010.

ZAHIRI, R.; KITCHING, I.J.; LAFONTAINE, J.D.; MUTANEN, M.; KAILA, L.; HOLLOWAY, J.D.; WAHLBERG, N. A new molecular phylogeny offers hope for a stable family-level classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **Zoologica Scripta**. v. 40, p. 158-173. 2011.

ZAHIRI, R.; HOLLOWAY, J.D.; KITCHING, I.J.; LAFONTAINE, D.; MUTANEN, M.; WAHLBERG, N. Molecular phylogenetics of Erebidæ (Lepidoptera, Noctuoidea). **Systematic Entomology**. v. 37, p. 102-124, 2012.

ZAHIRI, R.; LAFONTAINE, D.; SCHMIDT, C.; HOLLOWAY, J.D.; KITCHING, I.J.; MUTANEN, M.; WAHLBERG, N. Relationships among the basal lineages of Noctuidæ (Lepidoptera, Noctuoidea) based on eight gene regions. **Zoologica Scripta**. v. 42, p. 488-507, 2013.

ZALUCKI, M.P.; DAGLISH, G.; FIREMPONG, S.; TWINE, P. The biology and ecology of *Heliothis armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: what do we know? **Australian Journal of Zoology**. v. 34, p. 779–814, 1986.

ZHANG, J.; WANG, C.; QIN, J. Effect of feeding stimulant on the feeding behavior and mortality of *Helicoverpa armigera* on diets with *Bacillus thuringiensis*. **Insect Science**. v. 7, p. 155–160, 2000.

ZHANG, Y.; MA, Y.; WAN, P. J.; MU, L.L.; LI, G.Q. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. **Journal of Economic Entomology**, v.106, p.614-621, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/EC12413>.