

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Bacillus thuringiensis PARA O CONTROLE DE
Thyrinteina arnobia (STOLL, 1782)
(LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE).**

André Ballerini Horta

Engenheiro Agrônomo

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE
Bacillus thuringiensis PARA O CONTROLE DE
Thyrinteina arnobia (STOLL, 1782)
(LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE).**

André Ballerini Horta

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Co-orientador: Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior

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 Microbiologia Agropecuária.

2012

H821s Horta, André Ballerini
Seleção e caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae). / André Ballerini Horta. -- Jaboticabal, 2012
iii, 30 f., 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos
Banca examinadora: Fernando Hercos Valicente, Lucia Maria Carareto Alves
Bibliografia

1. *Thyrinteina arnobia*. 2. controle biológico. 3. eucalipto. 4. proteínas Cry. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937 : 595.78

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: andre.ballerini.horta@gmail.com

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ BALLERINI HORTA - nascido em Guaratinguetá - SP, em 22 de dezembro de 1985. Ingressou em fevereiro de 2005 na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal - onde, em fevereiro de 2010, recebeu o título de Engenheiro Agrônomo. Foi bolsista de Iniciação Científica (CNPq) durante o ano de 2008. Em março de 2010 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na mesma instituição.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a oportunidade de estar aqui hoje.

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, meu orientador, pela paciência e confiança em mim depositadas, além da amizade e dedicação em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Júnior, meu co-orientador, pela confiança, amizade e valiosos conselhos.

À Eliane Cristina da Cunha Alves pela amizade, ensinamentos ao longo do trabalho e ajuda na condução dos experimentos.

À Camila Chiaradia Davolos pela amizade, paciência em todas as conversas, risadas e pela ajuda nos experimentos.

Aos membros da banca de avaliação da qualificação: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza e Prof. Dra. Janete Aparecida Desidério pelas sugestões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste estudo;

À minha mãe Silvia, ao meu pai Gil e a minha irmã Débora, por tudo. Nem tenho palavras pra dizer como é grande o meu amor por vocês.

À Marina Suzuki Cursino e Larissa Zetouni, grandes amigas, sem as quais minhas noites no laboratório seriam bem mais demoradas e a execução dos experimentos bem menos prazerosa, pela amizade, companheirismo, apoio incondicional e enfim, não existem palavras suficientes nesse mundo para expressar o quanto vocês são importantes para mim.

Aos amigos da República Xic Nu Último pela amizade, apoio, conselhos, parceria e toda uma vida feliz repleta de aprendizado dia após dia, sem vocês nada disso teria acontecido.

À equipe do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada pela convivência e por toda ajuda.

À todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias pelo aprendizado pessoal e profissional.

À todos os funcionários dos Departamentos de Biologia e Entomologia pelo auxílio.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A cultura do eucalipto.....	3
2.2 A lagarta parda do eucalipto <i>Thyrintea arnobia</i>.....	4
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Criação de manutenção de <i>T. arnobia</i>.....	8
3.2 Linhagens e isolados bacterianos.....	8
3.3 Preparo das suspensões de esporos/cristal.....	9
3.4 Caracterização molecular.....	9
3.5 Bioensaios.....	11
3.5.1 Bioensaios seletivos.....	11
3.5.2 Bioensaio de dose.....	12
3.6 Análise estatística.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5. CONCLUSÕES.....	24
6. REFERÊNCIAS.....	25

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*
PARA O CONTROLE DE *Thyrinteina arnobia* (STOLL, 1782) (LEPIDOPTERA:
GEOMETRIDAE).**

RESUMO – Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* são utilizados há décadas no controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em plantios de eucalipto no Brasil. No entanto, não há relatos de quais genes *cry* são eficientes para o controle desta praga. Neste sentido, 74 isolados de *B. thuringiensis* foram caracterizados por PCR para a detecção dos genes *cry1*, *cry1Ab* e *cry1Ac* e sua eficiência no controle de *T. arnobia* verificada por bioensaios. Os isolados Br₉, Br₆₉, Br₇₄, Br₈₁ e R₂₆ apresentaram elevada mortalidade e sua CL₅₀ foi determinada. Os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* ocorreram isoladamente em 16% e 45% dos isolados, respectivamente, quando presentes em conjunto o controle das lagartas foi superior a 50%, e os valores de CL₅₀ foram os mais elevados. Ambos os genes ocorreram em 11% dos isolados, os níveis de controle foram superiores a 80% e a CL₅₀ era mais baixa, o que sugere que sua presença em conjunto confere maior toxicidade. É evidente que mais estudos em relação à detecção dos genes presentes em isolados de *B. thuringiensis* e sua contribuição no controle para *T. arnobia* são fundamentais para esclarecer quais genes conferem maior toxicidade e como eles atuam isoladamente ou em conjunto no controle dessas lagartas, visando a construção de plantas geneticamente modificadas, formulação de bioinseticidas ou desenvolvimento de programas de manejo de resistência destes insetos para a cultura do eucalipto no Brasil.

Palavras-chave: *Thyrinteina arnobia*; controle biológico; eucalipto; proteínas Cry.

SELECTION AND CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* STRAINS FOR THE CONTROL OF *Thyrinteina arnobia* (STOLL, 1782) (Lepidoptera: Geometridae).

ABSTRACT – Biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* have been used for decades to control *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) in eucalyptus plantations in Brazil. However, there are no reports of which *cry* genes are efficient to control this insect pest. In this study, 74 strains of *B. thuringiensis* were characterized by PCR for detection of *cry1*, *cry1Ab* and *cry1Ac* genes and its efficiency in controlling *T. arnobia* was verified by bioassays. The strains Br₉, Br₆₉, Br₇₄, Br₈₁ and R₂₆ showed the highest mortality rates and their LC₅₀ was determined. The *cry1Ab* and *cry1Ac* genes occurred separately in 16% and 45% of the isolates, respectively, and when present together the larvae control was above 50%, and the LC₅₀ values were the highest. Both genes occurred in 11% of the isolates, the control levels exceeded 80% and the LC₅₀ was lower, suggesting that their presence together confers higher toxicity. It became evident that further studies regarding the detection of the genes present in isolates of *B. thuringiensis*, and its contribution to control *T. arnobia* are essential to clarify which genes confer higher toxicity and how they act individually or together to control these caterpillars, aiming the construction of genetically modified plants, biopesticides formulation or development of more effective resistance management programs for these insects for the cultivation of eucalyptus in Brazil.

KEYWORDS: *Thyrinteina arnobia*; biological control; eucalyptus; Cry proteins.

1. INTRODUÇÃO

O controle de pragas no cotidiano da atividade agrícola é um dos pontos mais importantes a ser considerado dentro do manejo de qualquer cultura, seja ela destinada à produção de alimentos ou de matéria-prima para a indústria.

No Brasil, a área plantada com árvores do gênero *Eucalyptus* vem crescendo nos últimos anos. A forma como a cultura é conduzida em função das extensas e contínuas áreas com árvores de grande porte dificulta as ações de manejo e controle, criando um ambiente ideal de abrigo e fonte de alimento para diversas espécies de insetos praga. De maneira geral, o manejo realizado para o controle destes insetos é baseado em inseticidas sintéticos, que embora fundamentais para a condução da atividade, apresentam aspectos negativos com relação ao incremento nos custos de produção, problemas de saúde ao homem e ao meio ambiente e ação inespecífica (amplo espectro de ação), afetando também insetos benéficos a cultura como inimigos naturais, predadores e agentes polinizadores e não só àqueles que causam prejuízos a mesma (PFEIFER e GRIGEIATTI, 1996; VILARINHOS et al., 1998).

Devido a estes fatores, a busca por alternativas que possam minimizar ou substituir os inseticidas sintéticos foi intensificada nos últimos anos. Na busca por um manejo mais eficiente, avançam as pesquisas visando a otimização de agentes de controle biológico como parasitóides e predadores e os investimentos na construção de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos e no desenvolvimento de bioinseticidas mais eficientes têm sido altos. Estes bioinseticidas não apresentam problemas de toxicidade ao homem e aos animais, nem poluição ambiental, pois possuem alvos de ação específicos. Além disso, permitem que insetos não alvos não sejam repelidos ou afetados (CAROZZI ET AL., 1991).

Nesse contexto destacam-se a lagarta parda do eucalipto, *Thyrinteina arnobia*, tida como principal lepidóptero desfolhador da cultura no país e a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, principal constituinte das formulações comerciais de bioinseticidas utilizados no controle de insetos praga em nossa

agricultura, sendo responsável por 53% do mercado mundial de bioinseticidas (CAB, 2010). Esta bactéria ocupa posição de destaque entre os organismos utilizados no controle biológico por possibilitar o isolamento e expressão de suas proteínas em outros organismos por meio de transgenia (GONÇALVES, 2006) e por apresentar excelente potencial entomopatogênico contra insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera e da subordem Homoptera, além de algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros (WEISER, 1986; EDWARDS ET AL., 1988; FEILTEISON, 1994).

Em vista da recente expansão e ganho de importância da cultura do eucalipto no país, os trabalhos que relacionam o controle de *T. arnobia* com a utilização de *B. thuringiensis* limitaram-se até o momento ao relato da utilização de formulações comerciais no controle desta espécie em condições de campo e laboratório, não havendo até agora estudos mais detalhados no sentido de identificar a contribuição das diferentes proteínas Cry codificadas por esta bactéria na mortalidade de lagartas de *T. arnobia*.

Pesquisas buscando novos isolados de *B. thuringiensis* e sua caracterização são de grande importância, visto que, dentro da enorme diversidade genética desta bactéria, podem ser encontrados isolados bastante promissores que podem ser utilizados no controle de pragas tornando-o mais eficaz.

Dessa maneira, o presente trabalho teve por objetivo identificar a presença de genes *cry1*, *cry1Ab* e *cry1Ac* em isolados brasileiros de *B. thuringiensis* e associá-los com as taxas de mortalidade encontradas para lagartas de *T. arnobia*, selecionando isolados de máxima eficiência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do eucalipto

Eucalyptus é um gênero de plantas da família Mirtaceae com origem na Oceania. A disseminação do eucalipto no mundo começou no início do século XIX, quando sementes e algumas mudas foram levadas para Europa por Antônio Guichenot, jardineiro-botânico do Jardim das Plantas de Paris (ANDRADE, 1961). A partir de então o eucalipto foi levado para outros continentes, chegando ao Brasil na segunda metade do século XIX, sendo hoje a árvore mais plantada no mundo.

No país a eucaliptocultura é intensiva e baseada principalmente em florestas clonais formadas com materiais-elite e de elevada produtividade (MORA E GARCIA, 2000). A cultura vem crescendo nos últimos anos impulsionada por planos de expansão, direcionamento de novos investimentos por parte de empresas de segmentos que utilizam sua madeira como matéria prima em processos industriais, e mais recentemente despertando o interesse do setor privado pelo seu uso para fixação de carbono, visando diminuir a concentração de dióxido de carbono na atmosfera e por esses motivos se consolidando como uma das mais importantes atividades agrícolas do país.

A área plantada com eucalipto e pinus no país teve crescimento acumulado de 27,9% no período de 2005 a 2011, chegando a marca de 6.515.844 hectares, sendo a cultura do eucalipto responsável por 4.873.952 hectares (74,8%) e apresentando crescimento de 2,5% com relação a 2010. O crescimento dos plantios de eucalipto é resultado de um conjunto de fatores que vem favorecendo seu plantio em larga escala. Entre os aspectos mais relevantes estão a fácil adaptação, o rápido crescimento em ciclo de curta rotação, a alta produtividade florestal e as inúmeras aplicações, fazendo parte de roupas, pneus, filmes, tintas, medicamentos, alimentos e servindo também como fonte de energia para siderúrgicas, entre outras. Entretanto, a área plantada correspondente as duas culturas, diferentemente dos anos anteriores, não apresentou crescimento, indicador que confirma a tendência de desaceleração do crescimento da área de plantios apresentada nos últimos dois

anos. Os principais motivos para essa desaceleração estariam relacionados com as restrições impostas pelo governo para compra de terras por grupos de capital estrangeiro, a redução da atividade econômica em países consumidores da União Européia e nos Estados Unidos, redução da competitividade internacional de produtos da nossa cadeia produtiva florestal, excessiva burocratização e os longos prazos requeridos pelos órgãos ambientais nos processos de licenciamento ambiental para novos projetos florestais e industriais no país, além das limitações impostas pela infra-estrutura deficiente no país em vias de acesso e escoamento de produção, como rodovias, ferrovias e portos (ABRAF, 2012).

Devido aos extensos plantios homogêneos e contínuos, considerados monoculturas, as florestas de eucalipto tornam-se um excelente local para abrigo e fonte de alimento para insetos praga (FIRMINO, 2004), cujo ataque pode ser um dos obstáculos ao seu crescimento, desenvolvimento e, principalmente, a sua produção (PANIZZI & PARRA, 1991).

2.2. A lagarta parda do eucalipto *Thyriniteina arnobia*

A lagarta-parda, *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) é considerada o principal lepidóptero desfolhador de eucalipto no Brasil, devido aos prejuízos expressivos em várias partes do país (ANJOS et al., 1986; MENDES et al., 1998).

Esta espécie foi registrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Pernambuco, Maranhão e Amazonas (BERTI FILHO, 1974; BARROS et al., 1993).

As lagartas desta espécie são do tipo mede-palmo e atingem até 50 mm de comprimento e possuem coloração castanho-escuro e confundem-se com os galhos secos. O período larval fica em torno de 25 dias, passando por seis instares, e o período pupal de cerca de 10 dias, sendo que a pupa se localiza nas folhas, dobrando-as para sua proteção. Os adultos apresentam dimorfismo sexual acentuado, as fêmeas apresentam asas brancas com pontuações negras esparsas,

as antenas filiformes e curtas; os machos possuem asas de coloração castanha e antenas pectinadas, além de serem menores que as fêmeas (ANJOS et al., 1986). A longevidade de adultos machos é de aproximadamente 3 dias enquanto que as fêmeas chegam até aos 7 dias. Os ovos são colocados agregados em posturas, sendo o período de incubação próximo dos 10 dias e num total de aproximadamente 1000 ovos por fêmea.

Diversos autores relatam a importância da desfolha de *T. arnobia* em eucalipto. ODA & BERTI FILHO (1978) verificaram que uma desfolha de 100% em povoamentos de *Eucalyptus saligna* SM, com 2,5 a 3,5 anos de idade, reduziu o volume médio de madeira em 40,4% no ano seguinte ao ataque. FREITAS & BERTI FILHO (1994) avaliaram o efeito de diferentes níveis de desfolhamento em árvores de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden com 2 anos de idade. Os autores verificaram que no inverno ocorreu 100% de desfolha, contribuindo para a redução em 59,9% a biomassa da copa e em 49,9% a biomassa do tronco.

2.3. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica Gram-positiva da família Bacillaceae, encontrada em todas as partes do mundo e em vários substratos como solo, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO et al., 1998; GLARE & O'CALLAHAM, 2000; VALICENTE et al., 2000; MIRALLES & PÉREZ, 2004). Quando exposta a certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabolitos indesejáveis, entra em processo de esporulação, durante o qual produz cristais de polipeptídeos que possuem ação inseticida e são denominados proteínas Cry (BRAVO et al., 1998; GLARE & O'CALLAHAM, 2000).

As linhagens bacterianas da espécie *B. thuringiensis* possuem patogenicidade e especificidade determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais que as mesmas possuem. Atualmente são descritas mais de 630 sequências de genes que codificam δ -endotoxinas, estando classificadas em 72 diferentes grupos de acordo com a homologia das suas sequências de aminoácidos. Essa classificação é composta por

quatro estágios hierárquicos em função do local que essas seqüências ocupam em uma árvore filogenética (CRICKMORE et al., 2012; DE MAAGD et al., 2001). Na primeira etapa da classificação as seqüências recebem um número e quando a similaridade genética é inferior a 45%, esse número se difere (*cry1*, *cry2*... *cry72*), resultando no agrupamento das proteínas Cry em 72 diferentes grupos. Na etapa seguinte, quando a similaridade é de até 78%, as seqüências recebem uma letra maiúscula (*cry1A*, *cry1B*, *cry1C*...) que representa a classe a qual pertencem. Na terceira etapa, quando a similaridade é superior a 95%, as seqüências recebem uma letra minúscula (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*...) referente a sua subclasse. Na última etapa são atribuídos números de identificação (*cry1Aa1*, *cry1Aa2*... *cry1Aa22*) de acordo com a ordem em que essas seqüências são depositadas no banco de dados (CRICKMORE et al., 2012).

As proteínas Cry possuem duas regiões distintas compostas por protoxinas, a porção amino-terminal (N-terminal) ligada a toxicidade e a porção carboxi-terminal (C-terminal) associada à formação do cristal (BRAVO et al., 2007).

A porção C-terminal é clivada no intestino do inseto e não faz parte da toxina ativa, enquanto que a porção N-terminal é a toxina em si e possui três domínios. O domínio I está associado a inserção da toxina na membrana e a formação de poros. Os domínios II e III são associados à ligação com o receptor e dessa forma definindo o(s) inseto(s) alvo da toxina (BOONSERM et al., 2006).

Os estudos realizados para determinação do modo de ação das proteínas Cry foram realizados principalmente em lagartas de lepidopteros (KNOWLES & DOW, 1993; BRAVO et al., 2007). Estas proteínas são solubilizadas em condições de pH alcalino no intestino dos insetos, originando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas (proteínases) são convertidas em quatro ou mais polipeptídeos tóxicos, que cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical. O aumento da absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino. O inseto pode morrer por inanição, pois pouco tempo após o estabelecimento da infecção o inseto para de se alimentar (COPPING & MENN, 2000). Com o desenvolvimento da infecção, os sintomas

observados além da perda de apetite são: paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e por fim, morte (ARONSON et al., 1986).

De uma forma geral, os estudos realizados levam em consideração o efeito letal das proteínas Cry sobre um inseto alvo em específico, mas é importante lembrar também que o inseto suscetível, quando exposto a toxina e sofrendo os sintomas da infecção, também fica mais exposto ao ataque de inimigos naturais, predadores e parasitóides, os quais também podem sofrer algum tipo de ação da toxina ingerida pelo inseto alvo. Além disso, é muito comum a presença de dois ou mais genes *cry* funcionais em um mesmo isolado ou linhagem bacteriana de *B. thuringiensis* e dessa forma o cristal por ele produzido irá conter duas ou mais proteínas Cry. Logo, a patogenicidade e a virulência conferidas ao isolado são relacionadas diretamente a forma de ação das proteínas nele presentes e a forma como elas interagem. Essa interação entre as toxinas e seus respectivos receptores pode levar a efeitos antagônicos ou sinérgicos. LEE et al. (1996) observou efeito antagônico entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab e efeito sinérgico entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac para *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) (Linnaeus, 1758). Os mesmos efeitos da interação entre as toxinas presente em um isolado podem ser observados para formulações de bioinseticidas. Em estudo conduzido por AMEEN et al. (1998) foi observado efeito aditivo entre Xentari® e Dipel ® para *Heliothis virescens*.

Neste sentido, o estudo da variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* é fundamental na busca por alternativas de controle mais eficientes. As formas mais comuns para se estudar a diversidade genética em *B. thuringiensis* são através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica foi idealizada por MULLIS (1990). A identificação dos genes que codificam as toxinas de *B. thuringiensis* por PCR pode auxiliar na predição, mesmo que parcial, da atividade entomopatogênica de cada isolado bacteriano. Sendo assim, essa ferramenta tem se mostrado um método rápido, fácil e muito utilizado na classificação preliminar de isolados bacterianos desta espécie, que são então posteriormente avaliados por meio de bioensaios mais dirigidos às espécies alvo de cada tipo de proteína Cry ativa produzida (PORCAR & PÉREZ, 2003; DAVOLOS et al., 2009; GONÇALVES et al., 2009; COSTA et al., 2010; VALICENTE et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação de manutenção de *T. arnobia*

Os adultos foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e fotofase (12 h) no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, junto ao Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal-SP. Os mesmos foram mantidos em gaiolas feitas de tubos de PVC de 20 cm de diâmetro por 20 cm de altura, revestidos internamente por papel filtro. A parte superior do tubo foi revestida por uma tela de “nylon” para impedir a fuga dos adultos, e na base foi colocada uma bandeja plástica para servir de suporte.

As massas de ovos de *T. arnobia* obtidas no papel filtro foram recortadas e colocadas em potes plásticos de 145 ml até a eclosão das lagartas. Em seguida, as lagartas foram colocadas em caixas de acrílico onde se encontravam ramos de *Eucalyptus camaldulensis*, devidamente higienizados com solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, imersos em um pote com água para manter a turgescência do ramo. Os ramos eram repostos de acordo com a necessidade de alimentação das lagartas até que todas atingissem a fase de pupa. Todas as pupas eram coletadas e colocadas em caixas de acrílico revestidas com papel filtro até sua emergência, quando então eram cuidadosamente coletadas uma a uma e colocadas aos pares nas gaiolas de PVC anteriormente descritas.

3.2. Linhagens e isolados bacterianos

Foram utilizados 74 isolados de *B. thuringiensis* e 12 linhagens padrão cedidas pelo Instituto Pasteur e pelo Bacillus Genetic Stock Center. As linhagens *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, var. *kurstaki* HD73 e var. *tolworthi* foram utilizadas como controles positivos e a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* como controle negativo. Estas encontram-se estocadas na forma de fitas de papel filtro

impregnadas com uma suspensão de esporos e mantidas a 10°C em câmara B.O.D. localizada no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), junto ao Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária na Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal-SP.

3.3. Preparo das suspensões de esporos/cristal

Para o preparo das suspensões de esporos/cristal, os isolados de *B. thuringiensis* selecionados, incluindo as linhagens padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, var. *kurstaki* HD73, var. *tolworthi* (controles positivos) e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (controle negativo), foram cultivados em Placa de Petri com meio de cultura Nutriente Agar (NA) e incubados a 30°C durante 5 a 7 dias, permitindo assim a completa esporulação e liberação dos cristais. Após este período, todo o conteúdo bacteriano foi transferido, com auxílio de alça de platina, para tubos Falcon contendo 10 ml de água grau Milli-Q autoclavada e 0,005% de Tween-20 (espalhante adesivo). A suspensão obtida foi homogeneizada e, a partir desta, foram feitas duas diluições seriadas, sendo a primeira 10^{-1} e a segunda 10^{-2} . A suspensão 10^{-2} foi utilizada para a contagem de esporos em microscópio óptico com auxílio da Câmara de Neubauer (ALVES & MORAES, 1998) para a padronização à concentração de 3×10^8 esporos-cristal/ml.

3.4. Caracterização molecular

Os isolados e as linhagens padrão foram caracterizados de acordo com a presença dos genes *cry1*, *cry1Ab* e *cry1Ac*. Para isso, as reações de PCR utilizaram oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* segundo Davolos et al. (2009) e um par de oligonucleotídeos iniciadores geral para genes *cry1* segundo Bravo (1998).

O DNA genômico das linhagens e isolados foi obtido pelo método de fervura descrito por Letowski et al. (2005). As linhagens e os isolados foram previamente

cultivados em placas de Petri contendo meio “Brain Heart Infusion” (BHI) sólido e incubados em estufa a 30°C por 12 h para a coleta de colônias isoladas, que foram transferidas para tubos Falcon contendo 2 ml de meio BHI líquido e submetidas à agitação “overnight” a 30°C em 200 rpm. A cultura bacteriana foi então transferida para tubos de micro centrífuga de 2 ml, e centrifugadas a 13.000 rpm por 3 min a 20°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 400 µl de água grau Milli-Q estéril e agitado vigorosamente em agitador do tipo “vortex”. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 15 min em água fervente (100°C) e resfriadas por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 min a 20°C e 200 µl do sobrenadante foi transferido para outro tubo de micro centrífuga estéril. As amostras de DNA permaneceram a -20°C até serem utilizadas.

As reações de PCR foram realizadas em tubos plásticos e inicialmente conduzidas em um volume de 20 µl contendo: 45 ng de DNA molde, 250 µM de uma solução de dNTPs (10mM); 2,0 mM de MgCl₂; 0,4 µM de cada iniciador; 1,0 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®); solução tampão para a reação de PCR (1X) e água destilada Milli-Q previamente esterilizada (qsp 20 µl). As amostras foram colocadas em termocicladores (PTC-100 Programmable Thermal Controller - MJ Research, inc.) equipados com circuito Hot Bonnet com o seguinte programa: um passo único de desnaturação de 5 min a 95°C e 35 ciclos, consistindo de um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 min, pareamento (*cry1* – 52°C; *cry1Ab* – 40°C; *cry1Ac* – 45°C) por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e um passo final de extensão a 72°C por 5 min. Em função dos resultados obtidos foram realizadas modificações nas concentrações dos reagentes e/ou no programa, para a obtenção das melhores condições de amplificação de cada oligonucleotídeo iniciador a ser utilizado.

Após as amplificações, as amostras foram submetidas a eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%, e estes foram visualizados sob luz UV e documentados em equipamento fotodocumentador (GEL DOC2000 - Bio-Rad). As linhagens *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 (*cry1Ab* e *cry1Ac*), var. *kurstaki* HD73 (*cry1Ac*) e var. *tolworthi* (*cry1Ab*) foram utilizadas como controles positivos e a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (*cry3*) foi utilizada como controle negativo.

3.5. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP.

Foram realizados dois tipos de bioensaio: (I) seletivos - para identificar as linhagens e isolados com maior eficiência de controle; e (II) dose - para determinar, para os isolados mais eficientes, a concentração letal necessária para matar 50% (CL50) dos insetos testados. A condução dos experimentos foi realizada em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade ($70 \pm 10\%$) e fotofase (12 h). Folhas novas de *E. camaldulensis* foram colocadas em potes plásticos de 250 ml e posteriormente, lagartas com dois dias de idade de *T. arnobia* foram cuidadosamente depositadas utilizando-se pincéis.

3.5.1. Bioensaios Seletivos

Foram realizados dois bioensaios seletivos, o primeiro com linhagens padrão de *B. thuringiensis* com diferentes perfis gênicos de acordo com a literatura, o qual teve por objetivo definir um padrão de seleção baseando-se no perfil gênico de cada uma com a finalidade de restringir o número de isolados da coleção a serem testados no segundo bioensaio seletivo, que objetivava a seleção dos isolados mais eficientes no controle de lagartas de *T. arnobia*.

Nos dois bioensaios seletivos foi usado o delineamento inteiramente casualizado, sendo o primeiro experimento composto por 13 tratamentos e o segundo experimento por 79 tratamentos, ambos com 3 repetições cada, cada uma contendo 10 lagartas.

Para realização dos bioensaios, folhas novas de *E. camaldulensis*, plantados em vasos, foram coletadas e conduzidas ao laboratório, onde foram previamente higienizadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 3 min e em seguida, foram lavadas com água destilada para evitar contaminação.

Os bioensaios foram realizados distribuindo-se as suspensões de esporos/cristais de *B. thuringiensis* na concentração de 3×10^8 esporos/ml sobre as folhas e colocadas em fluxo laminar por aproximadamente 10 min para secagem. As folhas tratadas foram colocadas em potes plásticos de 250 ml e posteriormente, lagartas de dois dias de idade de *T. arnobia* foram cuidadosamente depositadas utilizando-se pincéis levemente umedecidos com água destilada. Para cada tratamento foi utilizado um pincel diferente, evitando-se dessa forma que ocorresse contaminação entre os tratamentos.

A condução do experimento foi realizada em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e a avaliação da mortalidade de lagartas foi realizada às 24, 48 e 72 h após a aplicação das suspensões bacterianas, onde foi aferida e determinada quantitativamente a eficácia das soluções de esporos, sendo consideradas mortas as lagartas totalmente inertes.

3.5.2. Bioensaio de Dose

Dentre os 74 isolados testados, foram escolhidos os que apresentaram maior eficiência na máxima concentração levando em consideração a avaliação realizada 24 h após a exposição das lagartas às folhas inoculadas com os tratamentos.

Ainda levou-se em consideração o conjunto de genes identificados na caracterização, dessa forma, foram escolhidos dois isolados com a presença isolada do gene *cry1Ab*, dois isolados com a presença isolada do gene *cry1Ac* e dois isolados com a presença de conjunta de ambos os genes. A linhagem *B. thuringiensis* var. *tolworthi* foi utilizada como controle positivo para os isolados com somente a presença do gene *cry1Ab*, a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 foi utilizada como controle positivo para os isolados com somente a presença do gene *cry1Ac* e a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* KD1 foi utilizada como controle positivo para os isolados com presença de ambos os genes. A linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* foi adotada como controle negativo devido a ausência de genes característicos no controle de lepidópteros.

O bioensaio de dose foi realizado utilizando-se uma solução de esporos/cristal originalmente na concentração 3×10^8 esporos.ml⁻¹ e diluindo-a na proporção 1:10 até uma concentração de 3×10^2 esporos.ml⁻¹, totalizando 7 concentrações testadas para cada tratamento. Foram testados 10 tratamentos (6 isolados bacterianos, 3 linhagens padrão e 1 testemunha) nas diferentes concentrações, cada qual contendo 15 lagartas.

A avaliação da mortalidade de lagartas foi realizada 24 h após a aplicação das suspensões bacterianas, onde foi determinada quantitativamente a eficácia das soluções de esporos, sendo consideradas mortas as lagartas totalmente inertes.

3.6. Análise estatística

Os dados obtidos no bioensaio de seletividade foram submetidos à Análise de Variância pelo Teste de Tukey pelo software Assistat 7.6 beta.

Os dados obtidos no bioensaio de dose foram submetidos à Análise de Probit pelo software Polo Plus 1.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os trabalhos que relatam o controle de *T. arnobia* utilizando *B. thuringiensis* limitam-se, até o momento, à aplicação dos bioinseticidas hoje disponíveis no mercado. Zanuncio (1992) estudou a eficiência de aplicação via aérea de formulações comerciais de *B. thuringiensis* e de deltametrina na eficiência de controle de lagartas de *T. arnobia* em eucaliptais no Pará. Colmenarez (2003) avaliou a influência de diferentes condições de pH e temperatura na eficiência do *Thyrinteina arnobia* Vírus (TaV) e do bioinseticida Dipel® no controle de lagartas de *T. arnobia* de 3º e 5º instar. Estes e outros estudos mostram que bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* podem ser utilizados no controle da lagarta parda do eucalipto de forma eficiente e econômica, entretanto, não demonstram quais os genes que estão relacionados à eficiência de controle observada nestes trabalhos.

Como visto, são poucos os estudos que relatam a utilização de *B. thuringiensis* no controle de *T. arnobia*. Quando comparamos o número de estudos deste tipo realizados com *T. arnobia* com aqueles realizados com outras espécies que causam danos em culturas como Milho, Soja e Algodão, percebemos que para esta espécie, os estudos ainda estão em fase inicial e são pouco avançados. Nos trabalhos com *T. arnobia*, os autores ainda relatam o uso de lagartas de diferentes estádios de desenvolvimento nos experimentos realizados, diferentemente do que ocorre com outras espécies estudadas há mais tempo como *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens* e *Spodoptera frugiperda*, para as quais as pesquisas nessa área são bem mais avançadas e já foi padronizado o uso de lagartas neonatas pelo menos para a maioria dos experimentos. Neste sentido, os primeiros bioensaios realizados neste estudo focaram o estabelecimento de qual o estágio de desenvolvimento das lagartas de *T. arnobia* seria o mais apropriado para montagem dos bioensaios. Foram testadas lagartas de *T. arnobia* com 1, 2, 3 e 4 dias de idade. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Mortalidade média observada para lagartas de 1, 2, 3 e 4 dias de idade expostas as suspensões das linhagens padrão na concentração 3×10^8 esporos.ml⁻¹.

Dias de Idade	Tratamento	Mortalidade (%)	
		24 horas	48 horas
1	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73	30	95
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1	27,5	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	0	0
	Testemunha	0	0
2	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73	75	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1	70	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	0	0
	Testemunha	0	0
3	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73	67,5	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1	80	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	0	0
	Testemunha	0	0
4	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73	70	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1	70	100
	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	0	0
	Testemunha	0	0

Considerando a avaliação realizada após 24 h de exposição, observa-se que as lagartas com 1 dia de idade, apresentaram menor mortalidade que as demais e lagartas de 2, 3 e 4 dias apresentaram suscetibilidade similar. Isso ocorreu porque lagartas de 1 dia de idade ainda não se alimentam das folhas, não ingerindo a suspensão bacteriana aplicada em sua superfície e por isso não apresentando mortalidade elevada, como seria de se esperar quanto mais novas fossem as lagartas. Isso fica mais claro quando avaliamos a mortalidade observada às 48 h, onde podemos notar que agora com um dia a mais de avaliação e já tendo ingerido a folha tratada, as lagartas de 1 dia apresentaram mortalidade quase que total. Dessa forma ficou estabelecido que seriam utilizadas lagartas de *T. arnobia* com 2 dias de idade, pois estas já estariam se alimentando normalmente e ficariam realmente expostas aos tratamentos.

Estabelecido o estágio de desenvolvimento a utilizarmos, a próxima etapa de experimentos teve por objetivo definir quais isolados pertencentes ao banco de bactérias entomopatogênicas do LGBBA seriam testados. O banco conta com mais de 1200 isolados oriundos das mais diferentes fontes de isolamento e regiões do país, tendo sido recebidos de outras universidades e instituições de pesquisa. Todos os isolados já haviam sido previamente testados para detecção e descarte daqueles

portadores de β -exotoxinas e caracterizados molecularmente por PCR para detecção de genes com atividade entomopatogênica para lepidópteros, coleópteros e dípteros, apresentando elevada diversidade gênica.

Estudos envolvendo a utilização de *B. thuringiensis* no controle de lagartas de *T. arnobia* limitaram-se até o momento aos testes de eficiência de formulações comerciais em condições de campo e laboratório.

De acordo com dados disponíveis no sistema AGROFIT (MAPA, 2012), para o controle de *T. arnobia* na cultura do eucalipto temos apenas o registro do bioinseticida Dipel®, o qual é composto pela linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1. Esta linhagem possui descrita na literatura a presença dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa* e *cry2Ab*. Da mesma maneira, a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 é citada apresentando apenas o gene *cry1Ac*, a linhagem *B. thuringiensis* var. *tolworthi* é citada como portadora do gene *cry1Ab* e também de genes *cry3* e *cry9* e a linhagem *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* portadora de genes *cry3* (CRICKMORE, 2012).

Faltam estudos que relacionem o conteúdo gênico encontrado em uma linhagem ou isolado bacteriano diretamente com a mortalidade média observada por meio de bioensaios. De acordo com os casos já relatados, como o uso do produto Dipel® para o controle desta espécie, sabe-se que esta é susceptível a ação de proteínas Cry1, mas devido aos vários genes presentes na cepa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, que compõe esta formulação, não podemos afirmar com certeza qual a contribuição de cada um para a taxa de mortalidade observada.

Com a ausência de informações a respeito de quais genes estariam especificamente relacionados à toxicidade a esta espécie, os bioensaios de seletividade foram realizados em duas etapas.

Na primeira foram utilizadas linhagens padrão com perfis gênicos diferentes para as classes de genes *cry1* que as mesmas possuem conforme descrito na literatura, com a finalidade de direcionar para qual classe de genes *cry* daríamos prioridade na etapa seguinte do estudo.

Foram escolhidas 12 diferentes linhagens padrão de *B. thuringiensis*. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Mortalidade média observada para suspensões de trabalho na concentração 3×10^8 esporos.ml⁻¹ para diferentes linhagens padrão e suas respectivas classes gênicas citadas na literatura.

Linhagens	Mortalidade (%)	Classes de genes <i>cry1</i>											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> HD133 ¹	100	a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>entomocidus</i> HD9 ²	100	a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i> HD29 ³	100	a	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kenyae</i> ⁴	100	a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i> ⁴	100	a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>wuhanensis</i> HD525 ⁵	100	a	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73 ⁶	96,7	a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>darmstadiensis</i> ⁴	93,3	a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i> HD12 ⁷	93,3	a	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1 ⁸	90	a	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>morrisoni</i> ⁴	86,7	a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i> ⁹	0	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Testemunha	0	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade; (+) presença de gene; (-) ausência de gene.

¹Chack & Jen, 1993; ²Nathan et al., 2001; ³Kalman et al., 1993; ⁴Crickmore, 2012; ⁵Kuo & Chak, 1999; ⁶Adang et al., 1985; ⁷Crickmore et al., 2012; ⁸Schnepf et al., 1985; ⁹Sekar et al., 1987.

A expectativa com os resultados neste bioensaio era encontrar uma ou duas classes de genes *cry1* para as quais encontrássemos níveis de mortalidade acima de 75%, possibilitando selecionar dentro do banco de bactérias entomopatogênicas do LGBBA isolados que apresentassem genes pertencentes às classes com elevada mortalidade. Entretanto, como pode ser observado na tabela, diversas classes de genes *cry1* podem estar atuando na toxicidade a lagartas de *T. arnobia*. Em razão da susceptibilidade de *T. arnobia* a diferentes classes de genes *cry*, optamos por estudar os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, por estarem presentes na linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, principal componente da formulação do bioinseticida Dipel® e por fazerem parte da classe de genes mais abundante encontrada na literatura e em nossa coleção de isolados. Dessa forma, as linhagens *B. thuringiensis* var. *tolworthi*, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 foram adotadas como controles positivos nos bioensaios respectivamente para os genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e para ambos em conjunto.

A caracterização molecular para os genes *cry1*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, seguida das mortalidades médias observadas às 24, 48 e 72 h de exposição das lagartas às folhas inoculadas com as respectivas suspensões de trabalho encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Resultado da caracterização molecular e mortalidades médias observadas após a exposição das lagartas a folhas tratadas com suspensões de esporos-cristais na concentração 3×10^8 esporos.ml⁻¹.

Isolado	cry1	cry1Ab	cry1Ac	Mortalidade (%)					
				24h		48h		72h	
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1	+	+	+	100	a	100	a	100	a
Br ₇	+	+	+	100	a	100	a	100	a
Br ₈	+	+	+	80	a	100	a	100	a
BR ₉	+	+	+	100	a	100	a	100	a
Br ₁₀	+	+	+	100	a	100	a	100	a
Br ₁₁	+	+	+	95	a	100	a	100	a
Br ₁₂	+	+	+	80	a	100	a	100	a
Br ₁₆	+	+	+	80	a	100	a	100	a
Br ₆₉	+	+	+	95	a	100	a	100	a
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	+	+	-	100	a	100	a	100	a
Br ₂₁	+	+	-	70	a	90	a	100	a
Br ₃₇	+	+	-	50	ab	95	a	100	a
Br ₄₁	+	+	-	85	a	100	a	100	a
Br ₄₈	+	+	-	80	a	100	a	100	a
Br ₅₀	+	+	-	80	a	100	a	100	a
Br ₅₁	+	+	-	55	a	90	a	100	a
Br ₅₃	+	+	-	65	a	95	a	100	a
Br ₇₄	+	+	-	100	a	80	a	100	a
Br ₇₈	+	+	-	80	a	100	a	100	a
Br ₇₉	+	+	-	80	a	100	a	100	a
Br ₈₀	+	+	-	55	a	90	a	100	a
Br ₈₁	+	+	-	100	a	100	a	100	a
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73	+	-	+	95	a	100	a	100	a
Br ₆	+	-	+	100	a	100	a	100	a
Br ₁₇	+	-	+	65	a	100	a	100	a
Br ₁₈	+	-	+	95	a	95	a	100	a
Br ₄₃	+	-	+	80	a	95	a	100	a
Br ₄₅	+	-	+	90	a	95	a	100	a
Br ₄₇	+	-	+	55	a	90	a	100	a
Br ₄₉	+	-	+	55	a	100	a	100	a
Br ₅₅	+	-	+	0	b	0	b	0	b
Br ₆₀	+	-	+	60	a	90	a	100	a
Br ₆₁	+	-	+	85	a	100	a	100	a
Br ₆₂	+	-	+	95	a	100	a	100	a
Br ₆₃	+	-	+	80	a	90	a	100	a
Br ₆₄	+	-	+	80	a	95	a	100	a
Br ₆₅	+	-	+	65	a	95	a	100	a
Br ₆₈	+	-	+	60	a	100	a	100	a

Br ₇₀	+	-	+	80	a	100	a	100	a
Br ₇₁	+	-	+	85	a	95	a	100	a
Br ₈₃	+	-	+	70	a	100	a	100	a
Br ₈₄	+	-	+	100	a	100	a	100	a
Br ₈₇	+	-	+	100	a	100	a	100	a
Br ₈₈	+	-	+	100	a	100	a	100	a
Br ₉₁	+	-	+	100	a	100	a	100	a
Br ₉₄	+	-	+	85	a	95	a	100	a
R ₂₆	+	-	+	95	a	100	a	100	a
R ₁₂₃	+	-	+	95	a	95	a	100	a
R ₁₄₄	+	-	+	75	a	95	a	100	a
R ₁₄₈	+	-	+	75	a	95	a	100	a
R ₁₅₅	+	-	+	50	ab	95	a	100	a
R ₁₅₈	+	-	+	80	a	90	a	100	a
R ₂₃₀	+	-	+	100	a	100	a	100	a
R ₂₄₀	+	-	+	95	a	100	a	100	a
R ₂₄₈	+	-	+	100	a	100	a	100	a
R ₂₇₃	+	-	+	100	a	100	a	100	a
Br ₅	+	-	-	95	a	100	a	100	a
Br ₄₆	+	-	-	70	a	90	a	100	a
Br ₅₄	+	-	-	85	a	95	a	100	a
Br ₅₈	+	-	-	80	a	100	a	100	a
Br ₇₂	+	-	-	55	a	95	a	100	a
Br ₇₃	+	-	-	100	a	100	a	100	a
Br ₇₆	+	-	-	80	a	80	a	100	a
Br ₇₇	+	-	-	85	a	95	a	100	a
Br ₈₂	+	-	-	95	a	100	a	100	a
Br ₈₆	+	-	-	100	a	100	a	100	a
Br ₉₀	+	-	-	100	a	100	a	100	a
Br ₉₃	+	-	-	80	a	100	a	100	a
Br ₉₈	+	-	-	65	a	90	a	85	a
Br ₉₉	+	-	-	5	b	5	b	5	b
Br ₁₀₀	+	-	-	25	ab	25	ab	25	ab
R ₇₄	+	-	-	95	a	95	a	100	a
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>	-	-	-	0	b	0	b	0	b
Br ₇₅	-	-	-	70	a	95	a	100	a
Br ₉₆	-	-	-	85	a	100	a	100	a
Br ₉₇	-	-	-	0	b	0	b	5	b
R ₁₂₅	-	-	-	0	b	0	b	0	b
R ₁₅₆	-	-	-	0	b	0	b	0	b
Testemunha				0	b	0	b	0	b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de probabilidade; (+) presença de gene; (-) ausência de gene.

A caracterização molecular revelou que entre os 74 isolados testados, 93% dos isolados apresentaram o gene *cry1*, 16% o gene *cry1Ab*, 45% o gene *cry1Ac*, 11% ambos os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* e apenas 7% não apresentaram genes *cry1*.

Considerando que é comum a presença de vários genes em um mesmo isolado ou linhagem de *B. thuringiensis*, a detecção destes pela técnica de PCR serve apenas como ferramenta para predição da atividade inseticida para determinada espécie de inseto praga. Relacionar diretamente a toxicidade observada com a presença do gene envolve estudos mais complexos que utilizam de forma isolada e purificada a proteína expressa por aquele gene. Dessa forma, os resultados encontrados neste estudo para os isolados testados não podem ser diretamente relacionados com a presença ou ausência dos genes *cry1*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, pois uma caracterização mais abrangente é necessária para certificar se existem outros genes presentes nesses isolados e um estudo do perfil protéico de cada um deles é fundamental para elucidar quais dos genes presentes estão sendo expressos e com isso podendo atuar ou não na toxicidade apresentada por cada isolado.

É importante observar que os isolados Br₇₅ e Br₉₆ não apresentaram genes *cry1* de acordo com a caracterização realizada, mas mostraram toxicidade às lagartas. Pode-se inferir com isso que outros genes de *B. thuringiensis*, além dos genes *cry1*, podem estar atuando na toxicidade a esta espécie e estudos com uma abordagem mais abrangente do conteúdo gênico destes isolados são necessários. Neste sentido também vale observar que 16 isolados que apresentaram amplificação para o gene *cry1*, não apresentaram os genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, indicando também que outros genes *cry1*, além dos citados, podem ter ação inseticida em diferentes intensidades para lagartas de *T. arnobia*.

Nas avaliações do bioensaio seletivo, 51 isolados (69%) apresentaram elevada eficiência de controle nas primeiras 24 h de exposição das lagartas às folhas tratadas e após 48 h, outros 17 isolados (23%). Apenas 6 isolados (8%) não apresentaram elevada eficiência de controle (acima de 75%) após 72 h de exposição.

Para os conjuntos de isolados que apresentaram os genes *cry1Ab* e *cry1Ac* separadamente, a mortalidade observada variou de 50 a 100% entre os isolados

dentro de cada conjunto na avaliação realizada 24 h após a exposição das lagartas às folhas tratadas. Após as primeiras 48 h, todos os isolados destes conjuntos já haviam controlado mais de 80% das lagartas, atingindo mortalidade máxima em até 72 h após o início do experimento. Para o conjunto de isolados no qual foi detectada a presença de ambos os genes, a eficiência de controle observada logo nas primeiras 24 h de avaliação foi superior aos outros dois conjuntos que apresentaram os genes separadamente. A mortalidade mínima observada nesse caso foi de 80% e todos os isolados já atingiram a máxima eficiência de controle nas primeiras 48 h.

Devido a presença de diversos isolados com máxima eficiência de controle logo na primeira avaliação, aspectos como desenvolvimento das colônias durante o cultivo e a concentração total de esporos obtida e verificada a partir da contagem de esporos realizada inicialmente foram levados em consideração na escolha de quais seriam eleitos afim de terem sua CL_{50} determinada.

Os isolados Br₉, Br₆₉, R₂₆, Br₇₄ e Br₈₁ apresentaram aspectos como crescimento de colônias e esporulação elevados, além de terem apresentado ótimos resultados na mortalidade média, sendo estes escolhidos e submetidos ao bioensaio de dose para determinação de sua CL_{50} , cujos resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de CL_{50} após 24 h de exposição das lagartas às folhas inoculadas com os tratamentos.

Isolado	CL_{50} (10^5 esporos.ml ⁻¹)	Limites (95%)		cry1Ab	cry1Ac
		inferior	superior		
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD1	1,85	0,26	17,4	+	+
Br ₉	23,9	10,6	56,2	+	+
Br ₆₉	3,87	0,98	15,0	+	+
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> HD73	8,22	3,49	19,3	-	+
R ₂₆	47,7	15,6	259,0	-	+
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tolworthi</i>	10,2	1,13	292,0	+	-
Br ₇₄	33,6	13,7	98,7	+	-
Br ₈₁	14,2	2,44	61,0	+	-

(+) presença de gene; (-) ausência de gene.

Os isolados Br₇₄, Br₈₁ (portadores do gene *cry1Ab*) e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *tolworthi*, adotada como controle para este gene, apresentaram máxima eficiência já nas primeiras 24 h e a CL_{50} determinada foi de $3,36 \times 10^6$, $1,42 \times 10^6$ e $1,02 \times 10^6$ esporos.ml⁻¹, respectivamente.

O isolado R₂₆ (portador do gene *cry1Ac*) e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73, adotada como controle para este gene, apresentaram máxima eficiência somente após 48 h de avaliação e a CL₅₀ determinada foi de $4,77 \times 10^6$ e $8,22 \times 10^5$ esporos.ml⁻¹, respectivamente.

Os isolados Br₉, Br₆₉ (portador dos genes *cry1Ab* e *cry1Ac*) e a linhagem padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, adotada com controle para ambos os genes, apresentaram máxima eficiência já nas primeiras 24 h e a CL₅₀ determinada foi de $2,39 \times 10^6$, $3,87 \times 10^5$ e $1,85 \times 10^5$ esporos.ml⁻¹, respectivamente.

Os resultados observados para as linhagens de *B. thuringiensis* utilizadas permitem uma exploração um pouco maior da associação do conteúdo gênico encontrado com a mortalidade observada, pois as mesmas já foram utilizadas em diversos outros estudos, nos quais vários de seus genes já foram testados e os resultados no controle de diversas outras espécies de insetos praga avaliados.

A linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 que possui apenas o gene *cry1Ac* apresentou nas primeiras 24 h eficiência de controle de 95% das lagartas testadas e uma CL₅₀ de $8,22 \times 10^5$ esporos.ml⁻¹, dessa forma, podemos afirmar que o gene *cry1Ac* está diretamente relacionado a elevada toxicidade conferida a *T. arnobia*.

A linhagem *B. thuringiensis* var. *tolworthi* possui o gene *cry1Ab*, o qual já tem sua atividade para diversas outras espécies publicada em diversos trabalhos. Entretanto, esta linhagem também possui genes *cry9*, os quais também possuem atividade para lepidopteros descrita na literatura e dessa forma, não é possível a partir dos resultados encontrados fazer uma relação direta da toxicidade promovida pelo gene *cry1Ab* a *T. arnobia*, pois genes *cry9* podem estar atuando.

Comparando os resultados obtidos para cada linhagem padrão adotada como controle e seu respectivo conjunto de isolados, podemos afirmar apenas que o gene *cry1Ac* confere elevada toxicidade aos isolados bacterianos que o expressam. As mortalidades médias observadas para as linhagens *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e var. *kurstaki* HD1 indicam que o gene *cry1Ab* pode ser associado ao elevado nível de controle de forma isolada ou conjunta ao gene *cry1Ac*. O menor valor de CL₅₀ determinado para a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, sugere que possa existir alguma forma de interação entre as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac para *T.*

arnobia, de forma que uma ação sinérgica potencialize a toxicidade aos seus isolados portadores. Como na literatura são descritos outros genes presentes nestas linhagens, não podemos afirmar com certeza sobre a contribuição individual do gene *cry1Ab* na eficiência de controle observada aos seus isolados portadores.

Para os isolados caracterizados e avaliados neste estudo, de uma forma geral com eficiência de controle variando de 50 a 100%, fica evidente que mais estudos visando uma caracterização molecular mais ampla são necessários e ainda, posteriormente, a identificação e quantificação das proteínas expressas por eles e a contribuição individual ou conjunta na toxicidade de cada isolado, bem como a forma como essas interações entres elas ocorrem e podem influenciar a eficiência de controle destes isolados para lagartas de *T. arnobia*.

5. CONCLUSÕES

- *T. arnobia* é susceptível a diferentes classes de genes *cry1* e possivelmente a outros tipos de genes *cry*;
- O resultado obtido pela linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD73 permite afirmar que o gene *cry1Ac* confere elevada toxicidade à lagartas de *T. arnobia*;
- Os resultados obtidos para a linhagem *B. thuringiensis* var. *tolworthi* e para os isolados que apresentaram somente o gene *cry1Ab* sugerem que este gene confere toxicidade a lagartas de *T. arnobia* em diferentes níveis;
- Os resultados obtidos para a linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 e para os isolados que apresentaram ambos os genes sugerem que, quando presentes em conjunto, possa existir alguma forma de interação sinérgica entre as proteínas codificadas por eles que potencializa sua toxicidade a esta espécie;
- A detecção da presença destes genes nos isolados por meio da PCR pode ser útil na seleção de isolados que venham apresentar elevado potencial de controle a esta espécie e que possam ser utilizados em novas formulações de bioinseticidas e também na seleção de novos genes a serem utilizados na transformação de plantas de eucalipto;

6. REFERÊNCIAS

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico ABRAF**: Ano base 2011, Brasília: ABRAF, 2012.

ADANG, M.J., STAVIER, M.J., ROCHELEAU, T.A., LEIGHTON, J., BARKER, R.F.; THOMPSON, D.V. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. **Gene** 36 (3), 289-300 (1985)

ALVES, S. B.; MORAES, S. B. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-778.

AMEEN, A.O.; FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 33, n.2, p.129-134, 1998

ANDRADE, E. N. de. **O Eucalipto**. 1961.

ANJOS, N., SANTOS, G.P., ZANUNCIO, J.C. A lagarta parda, *Thyrintina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) desfolhadora de eucaliptos. **Boletim Técnico EPAMIG**. n.25, p.1-56, 1987.

ARONSON, A. L.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, Palo Alto, v.50, p.1-24, 1986.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, p. 4965-4972, 1998.

BOONSERM, P.; ANGSUTHANASOMBAT, M.; LESCAR, C. J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.8 angstrom resolution. **Journal Bacteriology**, Washington, v.188, p. 3391-3401, 2006.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Elmsford, v. 49, p. 423-435, 2007.

CAB International. The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary. London: CPL Business Consultant, 2010. 40p.

CARROZZI, N.B., Kramer, V.C., Warren, G. W., Evola, S., Koziel, M. G. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polimerase chain eaction product profiles. **Appl. Environ. Microbiol**, Whasington, v.57, p.3057-3061, 1991.

Chak,K.F. & Jen,J.C. Complete nucleotide sequence and identification of a putative promoter region for the expression in *Escherichia coli* of the *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* HD133. Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B 17 (1), 7-14 (1993).

COLMENAREZ, Y. C. **Virulência de *Thyrinteina arnobia* vírus (TaV) e de *Bacillus thuringiensis* à *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae): efeito da temperatura no desenvolvimento das lagartas e do pH da calda de pulverização.** Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Câmpus de Botucatu, 2003.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

COSTA, J.R.V. ; ROSSI, J.R. ; MARUCCI, S.C. ; ALVES, E. C. C. ; VOLPE, H.X.L. ; FERRAUDO, A.S. ; LEMOS, M. V. F. ; DESIDÉRIO, J. A. . Atividade tóxica de isolados de *Bacillus thuringiensis* a larvas de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology** (Impresso), v. 39, p. 757-766, 2010.

CRICKMORE N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.** http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/. Acessado dia 28 de Outubro de 2012.

DAVOLOS, C. C.; THULER, A. M. G.; ABREU, I. L.; SENA, J. A. D.; LEMOS, M. V. F. *cry1* genes from *Bacillus thuringiensis*: specificity determination and implications for primer design. **Biotechnol Lett** 31, 1891-1897, 2009.

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolves toxins to colonize the insect world. **Trends Genetic**. v.17, n.4, p. 193-1999, 2001.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G.G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application** EP O 303 426 A2, 1988.

FAO. Global forest resources assessment 2000 – Main report. FAO Forestry paper. ISSN 0258-6150, 2000. 479 p. Disponível em: www.fao.org/forestry/fo/fra/main.index.jsp.

FEITELSON, J.S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: Proceedings of XXVII **Annual meeting of the society for invertebrate pathology**, p. 184. Montpellier, France, 1994.

FIRMINO, D.C. **Biologia do psilídeo-de-concha *Glycaspis brimblecombei* Moore (Hemíptera: Psillidae) em diferentes espécies de eucalipto e em *Eucalyptus camaldulensis* sob diferentes temperaturas**, 57f, (Mestrado em proteção de plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias/FCA, Botucatu, 2004.

FREITAS, S. de; BERTI FILHO, E. **Efeito da desfolha parcial e total na produção de biomassa de *Eucalyptus grandis* em Mogi-Guaçu**. IPEF, São Paulo, n. 47, p.29-35, 1994.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BATISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIN, J. 63 D. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2. ed. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

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

GONÇALVES, J. F. **Caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis* utilizando sequências de genes *cry* por meio de PCR multiplex**. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal. 2006.

GONÇALVES, J.S. ; Laia, M. L. ; CORDEIRO, J.X. ; LEMOS, M. V. F. . Identification of new *cry* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates by multiplex PCR and RFLP. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, p. 326-337, 2009.

KALMAN,S., KIEHNE,K.L., LIBS,J.L. AND YAMAMOTO,T. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 (4), 1131-1137 (1993).

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The crystal endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. **BioEssays**, Cambridge, v.15, p. 469-476, 1993.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of *cry1* Gene Contents of *Bacillus thuringiensis* Strains by Use of DNA Microarrays. **Applied And Environmental Microbiology**. 2005, p. 5391–5398.

MAPA. AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado dia 28 de Maio de 2012.

MENDES, J.E.P.; ANJOS, N.; CAMARGO, F.R.A. **Monitoramento do besouro amarelo. Folha Florestal**, Viçosa, n.191, p.8-9, 1998.

MIRALLES, M. P.; PERES, V. J. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. (Ed.). **Bacillus thuringiensis em el control biológico**. Bogotá: [s.n.], 2004. p. 207-232.

MORA, A. L. & GARCIA, C. H. **A cultura do eucalipto no Brasil**. São Paulo, SBS, 2000. 112 p.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, New York. v.262, n.4, p.56-65, 1990.

NATHAN,S.; AZIZ,D.H.; MAHADI,N.M. Phage displayed *Bacillus thuringiensis* Cry1Ba4 toxin is toxic to *Plutella xylostella*. **Curr. Microbiol.** 53 (5), 412-415 (2006).

ODA, S.; BERTI FILHO, E. **Incremento anual volumétrico de *Eucllyptus saligna* Sm, em áreas com diferentes níveis de infestação de lagartas de *Thyriniteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae).** IPEF, São Paulo, n.17.p.27-31, 1978.

PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. **A ecologia nutricional e o manejo integrado de pragas.** São Paulo: Manoli, p. 313-329, 1991.

PFEIFER, T. A.; GRIGEIATTI, T.A. Future perspectives on insect pest management: engineering the pest. **J. Inverteb. Pathol.** v.67, p.109-119, 1996.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR- based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Paris, v.26, p.419-432, 2003.

SCHNEPF,H.E., WONG,H.C. AND WHITELEY,H.R. The amino acid sequence of a crystal protein from *Bacillus thuringiensis* deduced from the DNA base sequence. **J. Biol. Chem.** 260 (10), 6264-6272 (1985).

SEKAR,V., THOMPSON,D.V., MARONEY,M.J., BOOKLAND,R.G. AND ADANG,M.J. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 84 (20), 7036-7040 (1987).

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microorganismos agentes de controle biológico, In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico.** EMBRAPA: Jaguariúna, p. 102-225. 1998.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R.; VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F.; PAIVA, E. Identificação através de PCR dos genes CryI de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidóptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 147-153, mar. 2000.

Valicente, F. H.; Picoli, E. A. T.; de Vasconcelos, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; Carneiro, A. A.; Guimarães, C. T.; Lana, U. G.. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cry1* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, v. 53, p. 360-366, 2010.

VILARINHOS, P. T. R.; DIAS, J. M. C. S.; ANDRADE, C. F. S.; ARAÚJO-COUTINHO, C. J. P. C. Uso de bactérias para o controle de culicídeos e simúlídeos. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 447-480.

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

ZANUNCIO, J. C.; GUEDES, R. N. C.; CRUZ, A. P.; MOREIRA, A. M. Eficiência de *Bacillus thuringiensis* e de Deltametrina, em aplicação aérea, para o controle de *Thyrinteina arnobia* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Geometridae) em Eucaliptal no Pará. **Acta Amazonica**, 22 (4): 485 – 492, 1992.