

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

**PERSISTÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911
EM CONDIÇÕES DE CAMPO NA CULTURA DA SOJA
(*Glycine max* (L.) Merrill) E EFEITO NA MORTALIDADE
SOBRE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818)
(Lepidoptera: Erebidae)**

**Joacir do Nascimento
Engenheiro Agrônomo**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS JABOTICABAL**

**PERSISTÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911
EM CONDIÇÕES DE CAMPO NA CULTURA DA SOJA
(*Glycine max* (L.) Merrill) E EFEITO NA MORTALIDADE
SOBRE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818)
(Lepidoptera: Erebidæ)**

Discente: Eng. Agr. Joacir do Nascimento

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).**

N244p Nascimento, Joacir do
Persistência de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 em condições de campo na cultura da Soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e efeito na mortalidade sobre *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae) / Joacir do Nascimento. -- Jaboticabal, 2019
76 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Ricardo Antônio Polanczyk

1. *Glycine max*. 2. Inseto. 3. Microorganismos. 4. Pragas agrícolas.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PERSISTÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911 EM CONDIÇÕES DE CAMPO NA CULTURA DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) E EFEITO NA MORTALIDADE SOBRE *Anticarsia gemmatilis* (HÜBNER, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ)

AUTOR: JOACIR DO NASCIMENTO

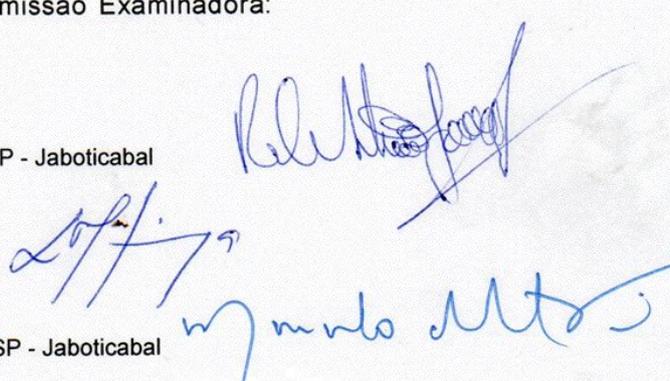
ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

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

Dra. LÍDIA MARIANA FIUZA
ICB Bioagritec Ltda / Navegantes/RS

Prof. Dr. MARCELO DA COSTA FERREIRA
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Jaboticabal, 24 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOACIR DO NASCIMENTO – Natural de Pouso Redondo, SC, nascido em 08 de setembro de 1994, filho de Moacir Nascimento e Iolanda do Nascimento. Formado técnico agrícola pelo Instituto Federal Catarinense- Campus Rio do Sul, no ano de 2011, formado engenheiro agrônomo pela mesma instituição em em 2016, durante a graduação desenvolveu trabalhos com produção e análise de sementes, Sob orientação do Prof. Dr. Oscar Emilio Ludtke Harthmann, durante os 5 anos de graduação realizou 3 estágios de final de curso; Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga FCAV-Unesp, Jaboticabal-SP, Fazenda Gaspar, grupo PSAgro, Lucas do Rio Verde-MT, Fazenda Piratini, grupo SLC Agrícola. Em agosto de 2017 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, desenvolvendo suas pesquisas na área de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk. Na oportunidade foi bolsista da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. No processo de seleção foi aprovado para o curso de Doutorado na mesma instituição, sob a orientação do mesmo docente, com início em agosto de 2019.

Dedico...

**Ao meu pai Moacir do
Nascimento, minha mãe Iolanda
do Nascimento e minha Irmã
Juliana do Nascimento pela
educação exemplar que recebi,
pelo amor incondicional, e por
todo o incentivo para chegar
até aqui.**

Ofereço...

**À minha namorada Sandy
Sousa Fonseca pelo
companheirismo e paciência
nos momentos difíceis.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de inspiração, iluminação e proteção, pelo dom da vida e por estar ao meu lado em todos os momentos e nunca me desamparar.

Aos meus pais Moacir do Nascimento e Iolanda do Nascimento pelo amor, apoio, força, compreensão e zelo.

À minha irmã por ser um exemplo de dedicação aos estudos, e pelos conselhos;

À minha Namorada Sandy Sousa Fonseca pelo companheirismo, paciência, amor, amizade e ajuda nos meus estudos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, pela valiosa orientação, ensinamentos, principalmente pelo seu incentivo, confiança, amizade, disposição em todos os momentos e pelo exemplo de comportamento ético e profissional.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – UNESP/FCAV, pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus orientadores de graduação Dr Oscar Emilio Ludtke Harthmann e Fernando Joly Campos. Pelos ensinamentos e incentivos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Agronomia Entomologia Agrícola pelos conhecimentos transmitidos no decorrer do curso.

Aos Professores Dr. Guilherme Duarte Rossi e Dr. Marcelo da Costa Ferreira pela participação e colaboração no meu Exame Geral de Qualificação.

Aos amigos Kelly Cristina Gonçalves, Stéfane Carolina Quista da Silva , Matheus Henrique Guarita Tozzi Borges, Nathália Deloia Danzi, Cícero Antônio Mariano dos Santos, Emiliano Brandão. Pela amizade e contribuição na execução deste trabalho.

Aos amigos Ana Beatriz Spadoni, Matheus Cardoso, Flavia Fagundes, Avyla Albuquerque, Igor Sena, Giovani Smaniotto, pela amizade, companheirismo e momentos compartilhados.

Ao Sr Marcelo Scatelin, Coordenador da Fazenda da instituição, pelo auxílio na execução dos experimentos de campo.

Ao professor da Universidade de Stirling, na Escócia, Luc Bussiere pelo auxílio na análise dos dados.

Ao Sr. Fernando Hercos Valiciente pelo fornecimento da Cepa e auxílio em algumas etapas do projeto.

Aos colaboradores da Universidade Federal de Santa Maria-RS Adriano Arrué Mello, Lucas Hahn e Manoela Hanich, pelo auxílio no desenvolvimento de parte dos experimentos.

A pós Doutoranda, Naymã Dias pelo auxílio na confecção desse manuscrito.

Ao Técnico do Laboratório Wilson Pazzini pelo incentivo e disponibilidade nos momentos de necessidade.

Aos amigos da república Xapô Kabô, Talisson Albiaseti, Rodrigo Zaganin, Matheus Ubida, Paulo Bonini Boneti, Rodrigo Fortunato, Guilherme Pessoa, Vinicius Trevisan e Gabriel Menezes.

A empresa LABmaq, pelo auxílio no processo de encapsulamento da formulação.

A todos os funcionários e demais estudantes do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola- Unesp Jaboticabal, pela amizade e bom convívio.

O presente trabalho foi realizado com apoio Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da Bolsa.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	4
1 INTRODUÇÃO	4
2 – REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 A cultura da soja (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill).....	6
2.2 - <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae)	7
2.3 – Controle para <i>Anticarsia gemmatalis</i>	8
2.3.1– Controle químico e plantas Bt	8
2.3.2– Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> no manejo de pragas.....	10
2.4 – Limitações do uso de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.5 – Encapsulamento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CÁPITULO 2 - Abordagens para melhorar a adoção de bioinseticidas baseados em <i>Bacillus thuringiensis</i> no controle de pragas agrícolas	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1 Introdução	25
2 Desafios para os Bt bioinseticidas	26
3 Perspectivas da utilização de Bt bioinseticidas.....	28
4 Considerações	32
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
CAPÍTULO 3 – Avaliação da persistência de Formulações de <i>Bacillus thuringiensis</i> em soja e mortalidade DE <i>Anticarsia gemmatalis</i>	44
RESUMO - A ocorrência de.....	44
ABSTRACT.....	45
1 – INTRODUÇÃO.....	46
2 - MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.1 Obtenção e manutenção de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	48
2.2 Preparo dos tratamentos	48
2.3 Aplicação em campo	49

2.4	Bioensaio de mortalidade de <i>A. gemmatalis</i>	50
2.5	Contagens de esporos de Bt	50
2.6	Análise dos dados	51
3	- RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
3.1	Contagem de esporos	51
3.2	Mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	58
3.2.1	Mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> no primeiro ano de experimento	60
3.2.2	Mortalidade de <i>A. gemmatalis</i> no segundo ano	65
4	- CONCLUSÕES	69
5	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
6	CAPÍTULO 4 – Considerações finais	75

**PERSISTÊNCIA DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911 EM SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) E MORTALIDADE DE *Anticarsia gemmatalis* (HÜBNER, 1818)
(Lepidoptera: Erebidae)**

RESUMO - A soja se destaca com um dos principais produtos do agronegócio brasileiro. No entanto, o ataque de insetos desfolhadores como *Anticarsia gemmatalis* comprometem a produtividade. O controle dessa praga é baseado na aplicação de inseticidas químicos e no uso de plantas Bt. Contudo, a seleção de populações resistentes é uma séria limitação para o manejo dessa praga. Em vista disso, torna-se necessário um sistema de manejo que também auxilie a retardar a evolução da resistência. Uma alternativa é o uso de agentes de controle microbiano, com o uso de bioinseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Entretanto, a principal limitação do uso desses bioinseticidas é elevada sensibilidade a fatores climáticos, como radiação UV, temperatura e umidade. A maioria dos estudos disponíveis sobre persistência de Bt são antigos e foram realizados no hemisfério Norte em espécies ornamentais e florestais, onde as condições climáticas diferem do hemisfério Sul. Os bioinseticidas a base de Bt são utilizados em todo o mundo, visando o controle de pragas agrícolas. Dentre as suas principais vantagens em relação aos inseticidas convencionais se destacam a seletividade aos inimigos naturais e risco reduzido ao meio ambiente. Apesar de algumas limitações, esses bioinseticidas foram muito importantes para suprimir surtos recentes de lepidópteros praga no Brasil, onde os inseticidas convencionais falharam. Diante disso, faz-se necessário estudos de persistência em condições de campo. Os ensaios de persistência de Bt em campo foram conduzidos na cultura da soja nas safras 2017 e 2018 na área experimental da FCAV/UNESP, com parcelas de 10m x 5m e 4 repetições. Os tratamentos utilizados foram conduzidos em esquema fatorial [(2x3x3x2)+1], constituídos de cepas de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 (2017) e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (2018) sem e com encapsulamento nos respectivos anos e do bioinseticida Dipel® composto de dois horários de aplicação (8:00 e 16:00 horas), três espectros de gota (fina, média e grossa), duas vazões de aplicação (70 e 100 L.ha⁻¹). Água foi utilizada como controle. E os ensaios de mortalidade de *A. gemmatalis* foram realizados no LCMAP/FCAV. A concentração de Bt na calda para aplicação foi 3 x 10⁸ esporos.mL⁻¹. Doze horas após a aplicação dos tratamentos, foram realizadas oito (primeira safra) e cinco (segunda safra), devido a 55 mm de precipitação a segunda safra foi realizado somente 5 coletas de folhas no terço superior das cinco linhas centrais de cada parcela, com um intervalo de 12 horas entre as coletas, totalizando 30 folhas. Para cada folha foram retirados 2 discos de 3,0 cm de diâmetro; um utilizado no bioensaios de mortalidade de *A. gemmatalis* e outro para avaliar a persistência do Bt através da contagem de esporos. No teste de mortalidade, foram utilizadas 25 lagartas por tratamento, distribuídas em 5 repetições. A avaliação da mortalidade foi realizada 5 dias após a montagem do bioensaio. Na avaliação da persistência, foi realizada a contagem de esporos utilizando câmara de Neubauer e microscópio com contraste de fase (400 x). O bioensaio de mortalidade demonstrou que não houve diferença

estatística quando utilizado gota grossa na aplicação, bem como quando avaliado o horário de aplicação. A formulação encapsulada utilizada não influenciou na persistência do Bt e na mortalidade de *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: Controle microbiano, Bioinseticida, Encapsulamento, lagarta da soja

**PERSISTENCE OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911 IN SOYBEAN
(*Glycine max* (L.) Merrill) AND MORTALITY OF *Anticarsia gemmatalis*
(HÜBNER, 1818) (Lepidoptera: Erebidae)**

ABSTRACT The soybean stands out as one of the main products of Brazilian agribusiness. However the attack of defoliating insects such as *Anticarsia gemmatalis* compromises productivity. Control of this pest is based on the application of chemical insecticides and the use of Bt plants. However, the selection of resistant populations is a serious limitation for the management of this pest. Given this, a management system that also helps to retard the evolution of resistance becomes necessary. An alternative is the use of microbial control agents with the use of *Bacillus thuringiensis* (Bt) -based Biopesticide. However, the main limitation of the use of these bioinsecticides is their high sensitivity to climatic factors such as UV radiation, temperature, and humidity. Most of the available studies on Bt persistence are old and have been carried out in the northern hemisphere on ornamental and forest species, where climatic conditions differ from the southern hemisphere. Bt *B. thuringiensis*-based Bioinsecticides are used worldwide to agricultural pest control. Among its main advantages over conventional insecticides are selectivity to natural enemies and reduced risk to the environment. Despite some limitations, these bioinsecticides have been very important in suppressing recent outbreaks of pest Lepidoptera in Brazil, where conventional insecticides have failed. Therefore, persistence studies under field conditions are necessary. Field Bt persistence tests were conducted on soybean crop in 2017 and 2018 crops in the experimental area of FCAV / UNESP, with plots of 10m x 5m and 4 replications. The treatments were conducted in a factorial scheme [(2x3x3x2) +1], consisting of strains of *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 (2017) and *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (2018) without and with encapsulation in the respective years and the Dipel® bioinsecticide composed of two application times (8:00 and 16:00 hours), three drop spectra (fine, medium and coarse), two application rates (70 and 100 L.ha⁻¹). Water was used as a control. And *A. gemmatalis* mortality assays were performed on the LCMAP / FCAV. The concentration of Bt in the spray solution was 3 x 10⁸ spores.mL⁻¹. Twelve hours after the application of the treatments, eight (first crop) and five (second crop) leaf collections were performed in the upper third of the five central lines of each plot, with an interval of 12 hours between collections, totaling 30 leaves. For each sheet, 2 3.0 cm diameter discs were removed; one used in *A. gemmatalis* mortality bioassays and the other to evaluate the persistence of Bt by spore counting. In the mortality test, 25 caterpillars per treatment were used, distributed in 5 repetitions. Mortality assessment was performed 5 days after bioassay assembly. Spore counting was performed using a Neubauer chamber and phase-contrast microscope (400 x) to evaluate Bt persistence. The mortality bioassay showed that there was no statistical difference when coarse drop was used in the application, as well as when evaluate for application times The encapsulated formulation used did not influence Bt persistence and mortality of *A. gemmatalis*.

Keywords: Microbial Control, Biopesticides, Encapsulation, velvet-bean caterpillar

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro constitui uma importante atividade para a economia do País. O setor agrícola representou em 2017, cerca de 24% do Produto Interno Bruto (PIB) e foi responsável por metade das exportações (BRASIL, 2018). Dentre os produtos exportados, a soja (*Glycine max* (L.)) possui destaque como um dos grãos mais exportados pelo País (Embrapa, 2019). No entanto, um dos entraves na produção de soja são os insetos-pragas, que comprometem a produtividade e rentabilidade ao produtor (Ávila et al., 2013, Savary et al., 2019). Dentre as pragas desfolhadoras, a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* é uma das pragas-chave da cultura no Brasil, com ocorrência desde o Rio Grande do Sul até a região central do País (MOSCARDI et al., 2012).

O manejo da lagarta-da-soja tem sido baseado em aplicações de inseticidas químicos (Guedes et al., 2012) e em plantas Bt (Bernardi et al., 2014). Entretanto, o uso incorreto de inseticidas pode ter efeitos negativos em predadores (Arnó and Gabarra, 2011; Benamú et al., 2010; Fogel, 2012; Schneider et al., 2009), parasitoides (Cheng et al., 2018; D'Ávila et al., 2018; Thubru et al., 2018), e polinizadores (Charreton et al., 2015; Fischer et al., 2014; Stanley and Raine, 2016; Tosi et al., 2017). Desvantagens inerentes ao uso de plantas Bt estão associadas a rápida seleção de indivíduos resistentes (Farias et al., 2014; Monnerat et al., 2015; Omoto et al., 2016). A soja Bt atualmente disponível no mercado e utilizada em grandes extensões, expressa somente uma toxina (Cry1Ac); o que aliado a pouca adoção de áreas de refúgio pode acelerar a seleção de indivíduos resistentes em populações de *A. gemmatalis* (Gould, 1998; Omoto e Bernardi, 2015).

Diante disso, é necessário o uso de técnicas de controle eficientes que possam auxiliar no manejo da resistência. Uma alternativa que merece destaque é o uso de controle microbiano, através de bioinseticidas à base da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Além de eficiente no controle de *A. gemmatalis* (Fiuza et al., 2013), o uso de bioinseticidas a base de Bt tem baixa possibilidade de

resistência cruzada com as toxinas expressas em plantas Bt (Horikoshi et al., 2019; Jakka et al., 2014).

Entretanto, os bioinseticidas a base de Bt; neste trabalho denominados de Bt bioinseticidas, possuem elevada sensibilidade a fatores climáticos. Fatores como radiação ultravioleta (UV), temperatura elevada (Glare et al., 2012), e baixa umidade relativa do ar (Leong et al., 1980) interferem na viabilidade e reduzem a persistência dos Bt bioinseticidas. Os trabalhos que avaliam a persistência de *B thuringiensis* são antigos, e em sua maioria realizados no hemisfério Norte em espécies ornamentais e florestais (Pinnock et al, 1971 Pinnock et al 1974 Pinnock et al., 1975 Brand 1976), onde as condições de cultivo e climáticas diferem do hemisfério Sul.

Uma forma de evitar ou reduzir a inativação de Bt bioinseticidas por fatores climáticos é o encapsulamento do agente microbiano. O encapsulamento pode aumentar a persistência do bioinseticida, devido a proteção do microrganismo, fornecendo um microambiente benéfico ao mesmo (Vemmer and Patel, 2013) e melhorando o “*Shelf-life*” da formulação (Paula et al., 2011).

Os primeiros trabalhos com testes de agentes encapsulantes foram publicados no final da década de 1980 (Dunkle and Shasha, 1988). Os estudos que avaliaram a persistência de bioinseticidas com agentes encapsulantes foram realizados até o final da década de 1990; após esse período, a pesquisa diminuiu consideravelmente, devido ao início da comercialização de plantas Bt nos Estados Unidos e na Austrália (Fitt, 2011). A eficiência das plantas Bt não depende das condições climáticas, como ocorre com os Bt bioinseticidas, mas a expressão da toxina Cry, durante todo o ciclo da cultura, proporciona maior exposição de populações de insetos, o que acelera a seleção de populações resistentes (Farias et al., 2014; Monnerat et al., 2015; Omoto et al., 2016; Tabashnik and Carrière, 2017). Devido aos relatos de resistência de populações de insetos à plantas Bt, as pesquisas com Bt bioinseticidas foram reiniciadas, incluindo as pesquisas básicas e aplicadas sobre a sua persistência (Sanahuja et al., 2011).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a persistência de Bt na cultura da soja e relacionar a perda da persistência com a redução da mortalidade de *A. gemmatilis* em laboratório.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill)

A soja é uma planta dicotiledônea que pertence a ordem de plantas Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae (Dong et al., 2004; Sediyaama, 2009) que pode ser utilizada para produção de óleos para o consumo humano, além da produção de rações e concentrados para alimentação animal (Souza et al., 2015).

A planta de soja é herbácea, autógama, anual, de porte ereto, cujo tamanho varia entre 0,60 m e 1,50 m, ciclo entre 90 e 160 dias dependendo das condições ambientais. Pode ser classificada em grupos de maturação: precoces, semiprecoces, médios, semi-tardios e tardios. A planta apresenta dois estágios de desenvolvimento; um vegetativo que engloba a fase inicial de desenvolvimento da planta, e outro reprodutivo que inicia no florescimento até a maturação das vagens (Miranda et al., 2003; Neumaier, 2000; Embrapa, 2006).

No Brasil, os cultivos se estabeleceram a partir de materiais vindos dos EUA, sendo iniciado na Bahia em 1882, porém sem sucesso devido as condições edafoclimáticas (Leal, 1967). Em 1900 e 1901, os cultivos foram realizados nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul através de sementes distribuídas pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Nesses locais a cultura encontrou condições favoráveis ao desenvolvimento e expansão (Embrapa, 2005).

Em meados da década de 1950, o estabelecimento oficial do programa de incentivo a triticultura nacional, onde durante o inverno era cultivado o trigo e durante o verão a soja, favoreceu o avanço da cultura no país, o que melhorou a infraestrutura e a mão de obra investida para o cultivo, pois a mesma área era utilizada para as duas culturas. Em 1970, a soja se tornou a principal cultura do agronegócio brasileiro (Embrapa, 2004).

No período de 1980 a 1990 a cultura passou a ser cultivada no Centro-Oeste do país, devido a incentivos fiscais para novas instalações, investimentos em infraestrutura, além do baixo valor econômico das terras na região, adaptação as condições edafoclimáticas e migração de produtores da região Sul do país (Embrapa 2004, 2005).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, com uma área plantada de 35.882,0 mil hectares, uma produtividade de 3.206 kg/ha e com uma produção de 114.843,3 mil toneladas (Embrapa Soja, 2018; Conab, 2019), com adoção de 52% de cultivivo Bt,(Intacta[®]) (Brookes, 2018).

2.2 - *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae)

A *Anticarsia gemmatalis*, popularmente conhecida como lagarta-da-soja, é uma espécie de clima tropical e subtropical que ocorre desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina (Ford et al., 1975; King e Saunders, 1984). Apesar do seu hábito polífago, lagartas de *A. gemmatalis* tem preferência por plantas da família Fabaceae (Hoffman-Campo et al., 2000; Moscardi et al., 2012).

Essa espécie é uma das principais desfolhadoras na cultura da soja. Seu ataque pode causar perdas de até 100% na colheita a depender de sua incidência e estágio fenológico da planta (Hoffmann-Campo et al., 2000; Moscardi et al., 2012). Os maiores danos são ocasionados por lagartas nos dois últimos instares, porém, essas são encontradas na cultura desde o início de desenvolvimento, permanecendo até o final do enchimento de grão. Durante a fase larval, o consumo foliar pode variar entre 84,0 e 121,2 cm² por lagarta (Boldt et al., 1975; Herzog e Todd, 1980; Lourenção et al. 2010; Savio e Pinoti, 2008).

A lagarta-da-soja apresenta quatro pares de pernas abdominais, dos quais dois são vestigiais, e um par anal. Quando pequenas apresentam coloração esverdeada que muda para coloração verde ou escura com três linhas brancas longitudinais no dorso quando maiores que 1,5 cm (Moscardi et al., 2012 e Sosa-Gómes et al., 2014). A fase larval passa por seis instares com duração média de 12 a 15 dias (Piubelli et al., 2006).

No final da fase larval, a lagarta cessa a alimentação e direciona-se ao solo onde se transforma em pupa. Os insetos permanecem nessa fase durante 9 a 10 dias e as pupas inicialmente são verde-claras e posteriormente tem a coloração marrom-escura (Watson, 1916). Após esse período ocorre a emergência dos adultos, que tem aproximadamente 40 mm de envergadura e coloração marrom-acinzentada. Durante o dia as mariposas são encontradas ao redor das áreas de soja ou em partes baixas e sombreadas das plantas. Durante a noite, os adultos iniciam a busca por parceiros para acasalamento (Moscardi

et al., 2012). O pico do acasalamento é maior durante as primeiras 48 horas após a emergência (Leppla, 1976).

Após a fecundação, as fêmeas depositam seus ovos, agrupados ou de forma isolada, na face abaxial das folhas, caule, ramos e pecíolos, de preferência nos terços médio e inferior das plantas (Wisch et al., 2012; Praça et al., 2006). Em condições laboratoriais uma fêmea pode depositar aproximadamente 400 ovos (Pietrowski, 2000).

2.3 – Controle para *Anticarsia gemmatalis*

As principais táticas utilizadas para o controle de *A. gemmatalis* em soja incluem o uso de inseticidas químicos (Guedes et al., 2012) e de cultivares de soja Bt, que expressam toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bernardi et al., 2014 James, 2017).

2.3.1 – Controle químico e plantas Bt

O controle químico possui uma ampla adoção por parte dos agricultores, devido a facilidade de uso e eficiência. Devido ao Brasil apresentar variadas condições de cultivo, diferentes ingredientes ativos são utilizados para o controle da lagarta-da-soja, destacando-se os inseticidas reguladores de crescimento, pela sua eficiência e seletividade a inimigos naturais (Guedes et al., 2012). No entanto, existem pesquisas com inseticidas mais persistentes, pertencentes ao grupo químico dos organofosforados, que se caracterizam por apresentar amplo espectro de ação, menor custo e podem ser utilizados em estádios mais avançados de desenvolvimento da praga. Entretanto, quando aplicados na fase inicial podem favorecer surtos ou ressurgência de insetos-praga devido ao efeito em predadores e parasitoides (Ávila et al., 2013).

A utilização de plantas Bt, para o controle de *A. gemmatalis* teve uma rápida adoção no seu primeiro ano de comercialização no Brasil (Bernardi et al., 2014). A tecnologia possui um gene que expressa a proteína Cry1Ac, com nome comercial INTACTA RR2 PRO™ foi aprovada comercialmente em 2010. No entanto, o seu plantio iniciou na safra 2013/2014 (Bernardi et al., 2014) devido à espera da aprovação do Governo Chinês para importar a soja com a tecnologia.

Além da resistência a insetos, a tecnologia confere tolerância ao glifosato para manejo de ervas daninhas, e também, apresenta um controle contra as principais lagartas, sendo elas a lagarta-da-soja, lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*), (Walker, [1858]) lagarta-das-maçãs [*Chloridea (Heliothis) virescens*] (Fabricius, [1781]) e a broca-das-axilas (*Crociosema aporema*) (Walsingham, [1914]), além de supressão às lagartas do tipo elasmó, (*Elasmopalpus lignosellus*) (Zeller, [1848]) e *Helicoverpa (Helicoverpa zea* (Boddie, [1850]) e *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805)) (Bernardi et al., 2012).

O sucesso na adoção das plantas Bt no controle; devido à facilidade de uso e independência das condições climáticas, causou a falsa impressão de que o Manejo Integrado de Pragas (MIP) poderia ser descartado pelo agricultor, e que o cultivo dessas plantas, de forma única seria suficiente para o controle de pragas (Passini, 2015). Todavia, em poucos anos, os problemas relacionados à resistência de insetos às plantas Bt começaram a surgir (Farias et al., 2014; Luis et al., 2013; Monnerat et al., 2015; Omoto et al., Tabashnik e Carrière, 2017), além do risco de evolução da resistência em plantas que expressam mais de uma toxina. As plantas Bt, exercem uma maior pressão de seleção sobre populações de insetos, pois a planta expressa a toxina durante todo o ciclo, o que acelera a seleção de populações resistentes (Silva, 2016).

Com a introdução da tecnologia Bt na soja, a evolução de resistência de populações é uma das grandes preocupações para os agricultores, pesquisadores e empresas agrícolas, visto os casos recentes com outras culturas no Brasil e no mundo (Silva, 2016, Tabashnik 2019). Uma das práticas mais utilizadas para o controle de praga resistentes a cultivos Bt, envolve a utilização dos inseticidas, pois eles reduzem a população da praga e representam uma das ferramentas do MIP (Martins et al., 2015). Todavia, o uso inadequado pode originar sérios problemas, como desenvolvimento de resistência a esses inseticidas. Assim, inseticidas seletivos com baixo impacto sobre inimigos naturais devem ser priorizados (Glare et al., 2012).

A utilização de produtos seletivos é de extrema importância para o manejo racional de insetos-praga. Dentre esses, destaca-se o uso dos bioinseticidas à base de entomopatógenos, como *B. thuringiensis*.

2.3.2 – Uso de *Bacillus thuringiensis* no manejo de pragas.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é gram-positiva, aeróbica facultativa, 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 et al., 2012; Lacey et al., 2015). Produz várias toxinas durante as fases vegetativa e de esporulação (Palma et al., 2014; Crickmore, 2017), que são tóxicas para diversas ordens de insetos e para alguns nematoides, protozoários e ácaros (Van Frankenhuyzen, 2017).

Bioinseticidas à base de Bt, ou Bt bioinseticidas, são utilizados com sucesso no controle de pragas desde a segunda metade do século 20 (Rosas-Garcia, 2009; Sanchis, 2011). Essa 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; Blanco et al., 2010; 2011; Bravo et al., 2012; Bergamasco et al., 2013; Van Frankenhuyzen, 2013; Zhang et al., 2013; Schünemann et al., 2014). O bioinseticida à base de Bt com maior alcance no mercado mundial é o Dipel® (*Bt kurstaki* HD-1). Apesar de apresentar baixa toxicidade para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros, tem eficiência no controle de lepidópteros, reportada em mais de 170 espécies pragas da ordem (Glare; O'Callaghan 2000).

Polanczyk, van Frankenhuyzen e Pauli (2017) ressaltaram o aumento da adoção de Bt bioinseticidas em sistemas de MIP no Brasil após a entrada e rápida dispersão da praga *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e após o aumento significativo da ocorrência de *C. includens* em lavouras de soja. Devido ao grande potencial de ocasionar danos e pela dificuldade de controle que essas pragas vêm mostrando nas últimas safras, especialmente na safra 2013/2014. Essas duas pragas alavancaram consideravelmente o mercado de Bt bioinseticidas, devido sua grande eficiência comprovada em campo, enquanto que a maioria dos inseticidas químicos disponíveis apresentaram baixa eficiência.

Na América do Norte, Bt bioinseticidas foram 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) (Frankenhuyzen, 2009). 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 1990, a aplicação contra *C. fumiferana* nos EUA e Canadá praticamente cessou, devido ao sucesso obtido na década anterior (Glare; O'Callaghan 2000. Frankenhuyzen, 2000).

Durante 35 anos, desde sua primeira utilização em 1980, Bt *kurstaki* tem 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 Canadá, e 6,2 milhões de hectares nos Estados Unidos (Polanczyk; Van Frankenhuyzen; Pauli, 2017). Na América Latina, Cuba e México lideram a utilização dos Bt bioinseticidas, especialmente para o controle de pragas em algodão, banana, batata, citros, hortaliças, tabaco, milho e pastagens. Atualmente no Brasil, são registradas 24 formulações à base de *B. thuringiensis* para o controle de cerca de 33 pragas de importância agrícola (Agrofit, 2019).

2.4 – Limitações do uso de *Bacillus thuringiensis*

Apesar das vantagens dos Bt bioinseticidas, como por exemplo seletividade a inimigos naturais e organismos não alvo e ausência de intoxicação humana (Raymond and Federici., 2018), estes produtos apresentam grande sensibilidade a fatores como radiação UV, temperaturas elevadas e baixa umidade.

Os estudos que demonstram a sensibilidade de *B. thuringiensis* a fatores climáticos, iniciaram em 1966, com a avaliação do efeito da luz solar sobre a viabilidade de Bt bioinseticida. Cantwell & Franklin (1966) mostraram que esporos de *B. thuringiensis* perderam rapidamente a viabilidade pela exposição a luz solar após a aplicação, no entanto, os primeiros estudos avaliando a persistência em plantas, iniciaram em espécies ornamentais e florestais na década de 1970, no hemisfério Norte (Pinnock et al. 1971; Pinnock et al. 1974; Pinnock et al. 1975; Brand et al. 1976). Através desses estudos, os autores observaram que inúmeros fatores interferem na persistência dos Bt

bioinseticidas; diferentes formulações (Pinnock et al 1971, Lynch et al 1980), concentrações (Brand et al 1976) e características inerentes ao produto. A persistência também sofre grande influência de fatores inerentes ao ambiente, diante disso uma formulação pode apresentar diferentes valores de persistência, quando aplicados em climas distintos (Pinnock et al 1971).

A espécie da planta é uma variável importante na persistência do produto. Neste sentido, a como arquitetura de planta pode interferir na deposição inicial da formulação (Pinnock et al., 1975). Os mesmos autores encontraram diferença na persistência, sobre espécies florestais, *Quercus agrifolia*, *Cercis occidentalis*, *Eucalyptus globulus* e *Juglans regia*, e foi observado uma variação de 100% na persistência.

Apesar de fatores inerentes a formulação influenciarem na persistência, os fatores ambientais influenciam de maneira significativa. Em estudo realizado por Frye et al (1972), a chuva causou redução significativa dos esporos viáveis de Bt, devido a lavagem da formulação do limbo foliar da planta (Leong et al., 1980).

As limitações acima descritas levaram a adição de adjuvantes à formulação de bioinseticidas e a utilização de técnicas de encapsulamento.

2.5 – Encapsulamento de *Bacillus thuringiensis*

Inicialmente para aumentar a persistência de Bt bioinseticidas, foram utilizados aditivos, incluindo substâncias umectantes, adesivas, protetores solares e fitoestimulantes (Rodríguez et al., 2015). No entanto, formulações com maior persistência em campo e econômicas foram desenvolvidas com base na tecnologia de encapsulamento (Bok et al., 1993). O encapsulamento é uma tecnologia que permite envolver um ingrediente ativo (agente de controle), com o auxílio de materiais para proteção contra a radiação solar, altas temperaturas e baixa umidade relativa (Vemmer and Patel, 2013). Exemplos desses materiais são biopolímeros, polímeros químicos e microrganismos.

Os primeiros materiais utilizados foram os biopolímeros, como amido ou misturas de farinhas de cereais (Mcguire et al., 1996). Eram de fácil aquisição e de baixo custo, características importantes para a utilização desses materiais como agentes encapsulantes. Diante disso, os primeiros trabalhos usaram o

amido, um polímero que possuía ambas características, além de ser encontrado facilmente, o custo para a sua aquisição era baixo (Dunkle and Shasha, 1988). Outra opção de biopolímero é o uso de amidos hidrolisados e modificados. Esses materiais podem assegurar a estabilidade do encapsulado e fornecer uma boa proteção contra fatores externos, além de melhorar a qualidade da formulação, quando comparado a amido não hidrolisado (Bao et al., 2003).

Após o uso de polímeros, iniciou o uso de microrganismos para o encapsulamento. Esta tecnologia fazia o uso de células recombinantes da bactéria *Pseudomonas fluorescens* para expressar a δ -endotoxina (toxina Cry) depois morta. A tecnologia CellCap[®] é capaz de aumentar a capacidade de persistência em campo, o que permite aumentar a eficácia dos bioinseticidas. O emprego dessa tecnologia proporcionou que a Mycogen (empresa detentora da patente) comercializasse 4 produtos (MVP[®], M-Trak[®], M-Peril[®] e Maatch[®]) (Gaertner et al 1993).

Os polímeros químicos iniciaram seu uso mais tarde, com o encapsulamento da protoxina Cry1Ac utilizando ácido acrílico e estireno sulfonato. Esse produto mostrou resultados promissores, visto que a atividade inseticida não foi afetada quando utilizada a protoxina encapsulada da forma livre. Estes resultados sugeriram que formulação fornece uma metodologia promissora, que protege as protoxinas do ambiente e as libera especificamente no intestino médio dos insetos-alvo (Yang et al., 2012).

3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT (2019) – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso:21 jun 2019.

Arnó J, Gabarra R (2011) Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). **Journal of Pest Science** 84:513–520.

Ávila CJ, Vivian LM, Tomquelski GV (2013) **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas.** Dourados/MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 12p. (Embrapa Agropecuária, Circular Técnica 23)

Bangs WE, Reineccius GA (1988) Corn starch derivatives: possible wall material for spray-dried flavor manufacture. In.: Risch SJ, Reineccius GA (Eds.) **Flavor Encapsulation: ACS Symposium Series 370.** Washington: American Chemical Society Washington DC, p. 12-28.

Bao J, Xing J, Phillips DL, Corke H (2003) Physical properties of octenyl succinic anhydride modified rice, wheat, and potato starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51:2283–2287.

Benamú MA, Schneider MI, Sánchez NE (2010) Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. **Chemosphere** 78:871–876.

Bergamasco VB, Mendes DRP, Fernandes OA, Desidério JA, Lemos MVF (2013) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera spp.* (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology** 112:152-158.

Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2014) High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 70:588–594.

Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68:1083–1091.

Blanco CA, Gould F, Groot AT, Abel CA, Hernandez G, Perera OP, Teran-Vargas AP (2010) Offspring from sequential matings between *Bacillus thuringiensis*-resistant and *Bacillus thuringiensis*-susceptible *Heliothis virescens* Moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 103:861-868.

Bok SH, Hang WL, Son KH, Sung UK, Jee WL, Do YK, Kwon KK (1993) Process for preparing coated microbial pesticides and pesticides produces there from. **US Patent** 5,273,749.

Boldt PE, Biever R, Ignoffo CM (1975) Lepidopteran pests of soybean: consumption of soybean foliage and pods and development. **Journal of Economic Entomology** 68:480-482.

Brand RJ, Pinnock DE, Jackson KL, Milstead JE (1976) Viable spore count as an index of effective dose of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 27:141-148.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agropecuária puxa o PIB de 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/agropecuaria-puxa-o-pib-de-2017>>. Acesso em: 01 Jul 2019

Bravo A, Gómez I, Porta H, García-Gómez BI, Almazan CR, Pardo L, Soberón M (2012) Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microbial Biotechnology** 6:17–26.

Brookes, G., 2018. The farm level economic and environmental contribution of Intacta soybeans in South America: the first five years. *GM Crops and Food* 9, 140–151. <https://doi.org/10.1080/21645698.2018.1479560>

Cantwell GE, Franklin BA (1966) Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **Journal of invertebrate pathology** 8:256-258.

Charreton M, Decourtye A, Henry M, Rodet G, Sandoz JC, Charnet P, Collet C (2015) A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. **PLoS ONE** 10:1–14.

Cheng S, Lin R, Wang L, Qiu Q, Qu M, Ren X, Zong F, Jiang H, Yu C (2018) Comparative susceptibility of thirteen selected pesticides to three different insect egg parasitoid *Trichogramma* species. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 166:86–91.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB (2019). Acompanhamento de safra brasileira de grãos, Safra 2018/19: nono levantamento. Brasília: Conab, 49p.

Crickmore N (2017) *Bacillus thuringiensis* Toxin Classification. In: Fiuza L, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol**. Berlin: Springer International Publishing, p. 41-52.

D'Ávila VA, Barbosa WF, Guedes RNC, Christopher CG (2018) Effects of spinosad, imidacloprid, and lambda-cyhalothrin on survival, parasitism, and

reproduction of the aphid parasitoid *aphidius colemani*. **Journal of Economic Entomology** 111:1096–1103.

Dong YS, Zhuang BC, Zhao LM, He M (2004) The genetic diversity of cultivated soybean grown in China. **Theoretical and Applied Genetics** 108:931-936.

Dunkle RL, Shasha BS (1988) Starch-Encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A Potential New Method for Increasing Environmental Stability of Entomopathogens. **Environmental Entomology** 17:120–126.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema de produção 11: Tecnologias de produção de soja da região central do Brasil** (2006) Londrina: Embrapa Soja, 225p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números** (2018) Londrina: Embrapa Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 02 jul 2019

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil** (2005) Londrina: Embrapa Soja, 179p. (Embrapa Soja. Sistemas de produção, 9).

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil** (2004) Londrina: Embrapa Soja, 237 p.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection** 64:150–158.

Fischer J, Müller T, Spatz AK, Greggers U, Grünewald B, Menzel R (2014) Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLoS ONE** 9:1–10.

Fitt GP (2003) Deployment and Impact of Transgenic Bt Cotton in Australia. In.: Kalaitzandonakes N (Ed.) **The Economic and Environmental Impacts of Agbiotech**. Boston: Springer, MA, p. 141-164.

Fiuza, L.M., Knaak, N., da Silva, R.F.P., Henriques, J.A.P., 2013. Receptors and Lethal Effect of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to the *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera, Noctuidae). **ISRN Microbiology** 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/940284>

Fogel MN (2012) **Selectividad de insecticidas utilizados en cultivos hortícolas del Cinturón Hortícola Platense sobre el depredador *Eriopsis connexa* en el marco del Manejo Integrado de Plagas**. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas) - Facultad de Ciencias Exactas, La Plata/Buenos Aires.

Ford BJ, Strayer JR, Reid J, Godfrey GL (1975) **The literature of arthropods associated with soybeans**. Illinois: Natural History Survival, 15p. (Biology Notes, 92).

Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101:1–16.

Frye RD, Scholl CG, Scholz EW, Funke BR (1973). Efeito do clima em um inseticida microbiano. **Journal of Invertebrate Pathology** 22:50-54.

Gaertner FH, Quick TC, Thompson MA (1993) CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. In.: Kim L (Ed.) **Advanced engineered pesticides**. New York: Marcel Dekker, p. 73-83.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology** 30:250–258.

Glare TR, O'Callaghan M (2000) *Bacillus thuringiensis* Biology, Ecology and Safety. Chichester: John Wiley & Sons, 368p.

Gould F (1998) Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. **Annual Review of Entomology** 43:701–726.

Guedes JVC, Fiorin RA, Stürmer GR, Prá ED, Perini CR, Bigolin M (2012) Application systems and insecticides to control *Anticarsia gemmatalis* in soybean. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** 16:910–914.

Herzog DC, Todd JW (1980) Sampling velvetbean caterpillar on soybean. In.: Kogan M, Herzog DC (Eds.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, p. 107-140.

Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Oliveira LJ, Sosa-Gómez DR, Panizzi AR, Corso IC, Gazzoni DL, Oliveira EB (2000) **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 70 p. (Embrapa Soja, Circular Técnica, 30).

Horikoshi RJ, Bernardi O, Amaral FSA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistant to Bt maize. **Journal of Invertebrate Pathology** 161:1–6.

Ignoffo, C. M., Hostetter, D. L., & Pinnell, R. E., 1974. Stability of *Bacillus thuringiensis* and *Baculovirus heliothis* on soybean foliage. **Environ. Entomol** 3, 117-119.

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL (2014) *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology** 122:52–54.

James, C. 2017. **Global status of commercialized biotech/GM crops, 2017** (Vol. 44). Ithaca, NY: ISAAA.)

King ABS, Saunders JL (1984) **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. London: Overseas Development Administration, 166 p.

Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS (2015) Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology** 132:1–41.

Leal JC (1967) Plantas da lavoura sul rio-grandense. Porto Alegre: UFRGS, 1967. 274 p.

Leong KLH, Cano RJ, Kubinski AM (1980) Factors Affecting *Bacillus thuringiensis* Total Field Persistence. **Environmental Entomology** 9:593–599.

Leppla NC (1976) Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, 69:45-48.

Lourenção AL, Reco PC, Braga NR, Valle GE, Pinheiro JB (2010) Produtividade de genótipos de soja sob infestação da lagarta-da-soja e de percevejos. **Neotropical Entomology**, 39:275-281.

Luis A, Lourenção F, Fernandes MG (2013) Avaliação do Milho Bt Cry1Ab e Cry1F no controle de *Spodoptera frugiperda* (J . E . Smith , 1797) (Lepidoptera : Noctuidae) em condições de campo. **Científica** 41:164–188.

Lynch RE, Lewis LC, Berry EC (1980) Application efficacy and field persistence of *Bacillus thuringiensis* when applied to corn for European corn borer control. **Journal of Economic Entomology** 73:4-7.

Martins GL, Tomquelski GV (2015) Eficiência de inseticidas sobre *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja. **Revista de Agricultura Neotropical** 4:25-31.

Mcguire MR, Shasha BS, Eastman CE, Oloumi-Sadeghi H (1996) Starch- and flour-based sprayable formulations: Effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology** 89:863–869.

Miranda MAC, Braga NR, Lourenção AL, Miranda FTS, Unêda SH, Ito MF (2003) Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-24, resistente a insetos. **Bragantia** 62:29-37.

Monnerat R, Martins E, Macedo C, Queiroz P, Praça L, Soares CM, Moreira H, Grisi I, Silva J, Soberon M, Bravo A (2015) Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS ONE** 10:1–12.

Moscardi BS, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: Hoffmann-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F (Eds.) **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. Brasília: EMBRAPA, p. 213-334.

Neumaier N, Nepomuceno AL, Farias JRB (2000) Estádios de desenvolvimento da cultura de soja. In: Bonato ER (Ed.) **Estresses em soja**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, p. 19-44.

Omoto C, Bernardi O (2015) Estratégias de manejo podem prolongar vida útil das tecnologias de milho Bt. **Visão agrícola** 13:107–109.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science** 72:1727–1736.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P, Caballero P (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins** 6:3296–3325.

Passini FB (2015) Manejo da Resistência de Insetos à Tecnologia Bt. Disponível em: <<http://www.pioneersementes.com.br/blog/14/manejo-da-resistencia-de-insetos-a-tecnologia-bt>>. Acesso em: 27 jun. 2019.

Paula AR, Carolino AT, Paula CO, Samuels RI (2011) The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasit Vectors** 4:8.

Pietrowski V (2000) **Avaliação dos mecanismos genéticos da resistência de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu vírus de poliedrose nuclear**. 110 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Pinnock D, Brand RJ, Jackson KLE, Milstead JE (1974) The Field Persistence of *Bacillus thuringiensis* Spores on *Cercis occidentalis* Leaves. **Journal of Invertebrate Pathology** 23:341-346.

Pinnock DE, Brand RJ, Milstead JE (1971) The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology** 18:405-411.

Pinnock DE, Brand RJ, Milstead JE, Jackson KL (1975) Effect of tree species on the coverage and field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology** 25:209–214.

Piubelli C, Hoffmann B, Moscardi F, Miyakubo H (2006). *Anticarsia gemmatilis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 1818:53–60.

Polanczyk RA, van Frankenhuyzen K, Pauli G (2017) The American *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of control**. Switzerland: Gewerbestrasse, p.173 – 184.

Porcar M, Grenier AM, Federici B, Rahbe Y (2009) Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and Environmental Microbiology** 75:4897–490.

Praça LB, Silva Neto SP, Monnerat RG (2006) ***Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae): biologia, amostragem e métodos de controle**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 18 p.(Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 196).

Raymond B, Federici BA, (2018) Reply to the article “In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity-a response to EFSA.” **FEMS microbiology ecology** 94:1–8.

Rodríguez APG, Martínez MG, Barrera-Cortés J, Ibarra JE, Bustos FM (2015) Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: Studies on the propagation “in vitro.” **Bioprocess and Biosystems Engineering** 38:329–339.

Rosas-Garcia NM (2009) Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. **Recent Patents on Biotechnology** 3:28-36.

Salama HS, Foda MS, Zaki FN, Khalafallah A (1983) Persistence of *Bacillus thuringiensis* Berliner spores in cotton cultivations. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie** 95:321-326.

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T., Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal** 9, 283–300. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>

Sanchis V (2011) De sprays microbianos a plantas transgênicas resistentes a insetos: história do bio-pesticida *Bacillus thuringiensis*. Uma revisão. **Agronomia para o desenvolvimento sustentável** 31:217-231.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., & Nelson, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, 3(3), 430.

Savio GM, Pinotti EB (2008) Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *Baculovirus anticarsia*. In: **Anais do XI Simpósio de Ciências Aplicadas da FAEF**. Garça/SP. p. 95-100.

Schneider MI, Sanchez N, Pineda S, Chi H, Ronco A (2009) Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. **Chemosphere** 76:1451–1455.

Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM (2014) Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology** 2014:1-12.

Sediyama T (2009) Tecnologias de produção e usos da soja. Londrina: Editora Mecenaz, 419 p.

Silva MG (2016) **Avaliação da formulação concentrado emulsionável de indoxacarbe no controle de *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja.** 69 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.

Sosa-Gómez DR, Corrêa-Ferreira BS, Hoffmann-Campo CB, Corso IC, Oliveira LJ, Moscardi F, Panizzi AR, Bueno AF, Hirose E, Roggia S (2014) **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja.** Londrina/PR: Embrapa Soja, 100p. (Embrapa Soja. Documentos, 269)

Souza LCF, Pedroso FF, Piletti LMMS, Secretti ML (2015) Desempenho agrônômico da soja em sucessão de culturas com espécies de oleaginosas. **Journal of Agronomic Sciences** 4:112-126.

Stanley DA, Raine NE (2016) Chronic exposure to a neonicotinoid pesticide alters the interactions between bumblebees and wild plants. **Functional Ecology** 30:1132–1139.

Tabashnik, B. E., & Carrière, Y. (2019). Global Patterns of Resistance to Bt Crops Highlighting Pink Bollworm in the United States, China, and India. **Journal of economic entomology.**

Tabashnik BE, Carrière Y (2017) Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 35:926–935.

Thubru DP, Firake DM, Behere GT (2018) Assessing risks of pesticides targeting lepidopteran pests in cruciferous ecosystems to eggs parasitoid, *Trichogramma brassicae* (Bezdenko). **Saudi Journal of Biological Sciences** 25:680–688.

Tosi S, Burgio G, Nieh JC (2017) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports** 7:1–8.

Van Frankenhuyzen K (2000) Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In.: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Le Roux C (Eds.) **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field applications.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 371-381.

Van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101:1-16.

Van Frankenhuyzen K (2013) Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 114:76-85.

Van Frankenhuyzen K (2017) Specificity and cross-order activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol**. New York: Springer International Publisher, p. 127-172

Vemmer M, Patel AV (2013) Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control** 67:380–389.

Watson JR (1916) Life-history of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hubner. **Journal of Economic Entomology**, 9:521-528.

Wisch L, Ruthes E, Oliveira MCN, Sosa-Gómez DR (2012) Distribuição vertical de ovos e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: noctuidae) na cultura da soja. In.: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Brasília, DF: Embrapa, p. 4.

Yang W, He K, Zhang J, Guo S (2012) pH-Controlled *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protoxin Loading and Release from Polyelectrolyte Microcapsules. **PLoS ONE** 7:1–7.

Zhang Y, Ma Y, Wan PJ, Mu LL, Li GQ (2013) *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. **Journal of Economic Entomology** 106:614- 621.

CÁPITULO 2 - ABORDAGENS PARA MELHORAR A ADOÇÃO DE BIOINSETICIDAS BASEADOS EM *BACILLUS THURINGIENSIS* NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS

RESUMO: Bioinseticidas a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* são utilizados em todo o mundo, visando ao controle de pragas agrícolas. Dentre as suas principais vantagens em relação aos inseticidas convencionais se destacam a seletividade aos inimigos naturais e risco reduzido ao meio ambiente. Apesar das melhorias nas formulações nos últimos 50 anos, fatores abióticos como temperatura, radiação ultravioleta, chuva e, as práticas adotadas pelos agricultores ainda são os principais obstáculos para ampliar a sua adoção. Apesar dessas limitações, esses bioinseticidas foram muito importantes para suprimir surtos recentes de lepidópteros praga no Brasil, onde os inseticidas convencionais falharam. Esta revisão descreve a pesquisa realizada para superar essas limitações e abordagens para reforçar a importância desses bioinseticidas no controle de pragas agrícolas.

Palavra-chave: Inseticidas, meio ambiente, controle microbiano, seletividade, especificidade.

CHAPTER 2 - APPROACHES TO IMPROVE THE ADOPTION OF BACILLUS THURINGIENSIS-BASED BIOINSECTICIDES IN AGRICULTURAL PEST CONTROL

ABSTRACT – Bioinsecticides based on the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* are used worldwide for the control of agricultural pests and among its main advantages about conventional insecticides are the selectivity to natural enemies and a low risk to the environment. Despite improvements in formulations over the past 50 years, abiotic factors such as temperature, ultraviolet radiation, rainfall, and biotic factors such as practices adopted by farmers are still the main obstacles to broadening their adoption. Despite these limitations, these biopesticides were very important to suppress recent lepidopteran pest outbreaks in Brazil, where conventional insecticides have failed. This review describes the research undertaken to overcome these limitations and approaches to reinforce the importance of these biopesticides in agricultural pest control.

Keywords: insecticides, environment, microbial control, selectivity, specificity

1 INTRODUÇÃO

Bioinseticidas à base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) são uma importante ferramenta no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (Arthurs e Dara, 2018; Bravo et al., 2011; Glare e O'Callaghan, 2000; Huang et al., 2007; Kumar et al., 2018; Lacey et al., 2015; Polanczyk et al. 2017). A seletividade aos inimigos naturais, inocuidade aos organismos não alvo e seres humanos são consideradas as principais vantagens dos Bt bioinseticidas (Glare e O'Callaghan, 2000; Heimpel, 1967; Lacey et al., 2015; Lacey, 2017; Pinto et al., 2019; Raymond e Federici, 2018; Schnepf et al., 1998) em relação aos problemas ambientais relatados com inseticidas convencionais de amplo espectro (Aktar et al., 2009; Berry-Cabán, 2011; Carson, 1962; Casida e Quistad, 1998; Guida et al., 2018; Nicolopoulou-Stamati et al., 2016), efeito em inimigos naturais e polinizadores (Arnó and Gabarra, 2011; Benamú et al., 2010; Cheng et al., 2018; D'Ávila et al., 2018; Fogel et al., 2013; Johansen, 1977; Schneider et al., 2009) e do marcante e crescente relato de resistência de artrópodes-praga (Brevik et al., 2018; Forgash, 1984; Melander, 1914; Tabashnik et al., 2014).

Apesar da primeira tentativa de utilizar um Bt bioinseticida, denominado Sporeine[®], havia quase 100 anos (Angus, 1984; Lacey, 2017), somente com a constatação da relação entre a presença do cristal e a toxicidade dessa bactéria para insetos, descrita por Hannay (1953); a descoberta do Bt *kurstaki* HD-1, com alta virulência para *Chloridea virescens*, *Pectinophora gossypiella* e *Trichoplusia ni* (Dulmage, 1970) e a padronização da potência dos produtos, baseada em Unidades Internacionais (UI) (Dulmage et al., 1971) foi possível melhorar as formulações dos Bt bioinseticidas, tornando-os mais competitivos que os inseticidas convencionais (Beegle e Yamamoto, 1992; Sanahuja et al., 2011).

Entretanto, até o início da década de 1990 somente três produtos comerciais estavam disponíveis no mercado brasileiro, todos à base de Bt *kurstaki* (Dipel, Thuricide e Bactospeine) (Habib e Andrade, 1991). Sua introdução sofreu com problemas relacionados com estratégias de uso, marketing, e pela propaganda negativa feita pelos vendedores de inseticidas químicos, os quais difundiam a concepção de que os insetos deveriam ser rapidamente controlados (Alves et al., 1998). Na metade da década de 2000, embora o número de produtos disponíveis no mercado não tenha sofrido grande

incremento, seis Bt bioinseticidas eram recomendados para o controle de pragas, em florestas, hortaliças e grandes culturas (Polanczyk et al. 2008). Em 2019, 24 Bt bioinseticidas estão registrados no Brasil para o controle de pragas de importância agrícola, o que representa um aumento de 400% em cerca de 10 anos (Agrofit, 2019).

Grande parte deste aumento foi devido aos primeiros surtos de *Helicoverpa armigera* no Brasil, com perdas expressivas em soja e algodão na safra 2012/2013 (Pomari-Fernandes et al., 2015). Bt bioinseticidas, especialmente o Dipel[®], foram fundamentais para controlar essa praga, devido a ineficiência dos inseticidas disponíveis. Esse fato é um marco do controle microbiano de pragas, pois tornou o Brasil o maior usuário mundial desses bioinseticidas, com área pulverizada em torno de 9 milhões de hectares (Polanczyk et al. 2017), representando um de 6.000% em relação ao início da década de 2000 (Souza, 2001).

Um fator importante para o aumento da utilização de bioinseticidas, é o alto custo para o desenvolvimento de novas moléculas para inseticidas convencionais, associado ao tempo longo de desenvolvimento de moléculas. Para o lançamento de novos inseticidas químicos são necessários aproximadamente 10 anos, com um investimento superior a US\$ 250 milhões, gastos muito superiores aos empregados para o lançamento de novos bioinseticidas, entre US\$ 3-5 milhões e 3 anos para o lançamento comercial nos Estados Unidos. (Glare et al 2012).

2 DESAFIOS PARA OS BT BIOINSETICIDAS

O efeito de choque dos inseticidas químicos e uma das principais vantagens em relação aos Bt bioinseticidas. Essa característica proporciona uma supressão mais rápida da praga alvo (Wickham et al., 1974; Aktar et al., 2009). O Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos, representando cerca de 20% do diferentes, com 381 ingredientes ativos autorizados para uso agrícola (Albuquerque, 2016). As dimensões continentais do País e a possibilidade de colheita de duas ou três safras consecutivas, contribuem para o uso expressivo de agrotóxicos (Santos et al., 2014). Além disso, temperaturas mais elevadas

podem aumentar o número de gerações dos insetos-praga em com paração à regiões de clima temperado (Ricalde et al., 2012; De Bortoli, 2017).

Apesar da crescente conscientização quanto à questão ambiental, os agricultores necessitam garantir uma ou duas colheitas por ano para viabilizar a sua atividade agrícola, e para isso o agricultor ainda considera o controle químico a melhor opção, sendo comum a mistura em tanque para a economia de água e tempo necessário para as operações agrícolas (Grazziero et al., 2015). O uso de Bt bioinseticidas em mistura com outros agrotóxicos pode implicar na perda da sua seletividade e especificidade, características altamente desejáveis em agentes de controle microbiano de pragas (Glare et al., 2012).

Além das incertezas em relação a mistura em tanque, os Bt bioinseticidas apresentam sensibilidade à condições ambientais adversas, principalmente radiação ultravioleta (UV) e temperatura elevadas (Fuxa, 1987; Glare et al., 2012; Heimpel, 1967; Navon, 2000; Sanahuja et al., 2011). A redução da persistência resulta em menor controle da praga, o que implica na necessidade de reaplicações do bioinseticida e conseqüente aumento do custo de produção para os agricultores (Lacey, 2017).

Pozsgay et al. (1987) utilizaram a espectroscopia Raman para elucidar o mecanismo de fotodegradação do cristal do Bt *kurstaki*. Essa espectroscopia foi capaz de demonstrar a quebra de 30% das cadeias do triptofano e 20% de histidina resultantes da radiação solar contínua por 48 horas. Cohen et al. (1991) enfatizaram que a destruição do triptofano pode resultar em profundas alterações na configuração tridimensional da proteína Cry e conseqüente perda de sua atividade biológica.

Cantwell e Franklin (1966) ressaltou que apesar da UV reduzir a viabilidade dos esporos de Bt, a chuva não influenciou a viabilidade do Bt, porém provocou a lavagem do produto. Neste caso, a chuva potencializou o efeito da UV sobre os esporos de Bt (Frye et al., 1972; Svestka, 1976). Além disso, Leong et al. (1980) observaram que além da UV, a temperatura da folha e a umidade relativa do ar também interferem na viabilidade do microrganismo.

Trabalhos clássicos sobre persistência de Bt em florestas datam da década de 1970. A persistência de formulações líquidas de Bt foi maior em *Cercis occidentalis* do que as formulações em pó, afetadas pela temperatura e umidade elevadas (Pinnock et al., 1971). Além da formulação e condições

climáticas, Pinnock et al. (1975) constataram que as características morfológicas de três espécies florestais, *Quercus agrifolia*, *C. occidentalis* e *Eucalyptus globulus* influenciaram a persistência, devido a redução da aderência do Bt na folha.

Ignoffo et al. (1974) observaram redução de 65% da atividade inseticida de Thuricide® na lagarta-da-maçã (*Chloridea virescens*), devido à redução de 90% na viabilidade dos esporos. Em relação à persistência, os autores verificaram somente 4,2% da dose inicial depositada em folhas de soja três dias após a aplicação. Beegle (1981) constatou persistência de 1,5 e 2 dias de Thuricide-HPC® em folhas de algodão, com alta mortalidade de lagartas neonatas de *C. virescens*. Salama et al. (1983) constatou que a meia vida de bioinseticidas Bt foi alterada em função das condições de temperatura e radiação.

3 PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE BT BIOINSETICIDAS

A mistura de agrotóxicos no tanque do pulverizador passou a ser permitida pelo governo brasileiro a partir de 2017, conforme publicado na Portaria nº 148, de 26/12/2017. A partir dessa data as recomendações de mistura em tanque devem ser feitas por instituição públicas ou privadas de ensino, de pesquisa ou extensão rural, associação de produtores, cooperativas de agricultores, empresa responsável pelo registro de agrotóxicos e afins (BRASIL, 2017).

As empresas produtoras de agrotóxicos e bioinseticidas, a academia e os serviços de extensão rural têm o grande desafio de tornar esse método de controle de pragas viável para o agricultor. Estudos de compatibilidade *in vitro* e *in vivo* são essenciais, porém ainda não existe consenso quanto a melhor metodologia a ser empregada para esta avaliação (Anhalt et al., 2017; Da Costa et al., 2018; Pérez-González e Sánchez-Peña, 2017; Santos Díaz et al., 2014).

A pesquisa relacionada ao uso de mistura de produtos para o controle de pragas agrícolas está direcionada principalmente para a compatibilidade de bioinseticidas à base de fungos e bactérias com inseticidas químicos e adjuvantes. Com o crescimento do mercado de bioinseticidas na última década (Glare et al., 2012; Parra, 2014) é necessário estudar a compatibilidade desses produtos, visto que a utilização conjunta pode potencializar o efeito de ambos,

além de produzir informações que possam auxiliar na tomada de decisão no momento de realizar uma mistura em tanque.

A compatibilidade entre Bt bioinseticidas e agrotóxicos depende da linhagem do microrganismo, da natureza química dos produtos e da dose utilizada. O uso de inseticidas pode inibir o crescimento vegetativo e a esporulação de bactérias ou causar mutações genéticas com redução na virulência. Além disso, a presença de emulsificantes e outros aditivos concentrados, utilizados nas formulações, podem reduzir a viabilidade do Bt (Batista Filho et al., 2001).

Os fabricantes de agrotóxicos fornecem informações técnicas aos agricultores sobre a compatibilidade com agentes de controle microbiano de pragas, mas geralmente não fornecem detalhes dos métodos usados em testes de compatibilidade (Lacey, 2017). A compatibilidade entre Bt bioinseticidas e outros produtos fitossanitários é inicialmente avaliada em laboratório levando em conta o crescimento microbiano ou sobrevivência e posteriormente ensaios em casa de vegetação e campo devem ser realizados para corroborar os resultados obtidos *in vitro* (Ribeiro et al., 2015; Schumacher e Poehling, 2012).

Até o momento não foi realizado nenhum estudo sobre a influência da mistura em tanque na persistência e seletividade dos Bt bioinseticidas. É importante ressaltar a influência de vários fatores abióticos e bióticos na persistência desses bioinseticidas; como por exemplo: formulação, umidade, temperatura, UV, arquitetura da planta e da folha. Isso faz com que os resultados dos estudos sejam variáveis e a sua grande maioria realizados em laboratório com lâmpadas ultravioletas ou quando em campo em regiões de clima temperado, com clima bem diferente das regiões agrícolas do hemisfério sul. Além de determinar a persistência dos Bt bioinseticidas é necessário relacionar a perda da persistência com a redução do controle da praga, ou seja, se existe uma correlação linear entre esses dois fatores ou uma manutenção da atividade tóxica até um limite da perda da persistência.

A tecnologia de aplicação dos Bt bioinseticidas precisa evoluir. Em alguns casos perdas de até 80% do volume aplicado pode ocorrer com produtos químicos (Chaim et al., 1999), mas frequentemente tem sido observadas perdas do volume aplicado até 90% com Bt bioinseticidas. A preferência do agricultor por equipamentos auto propelidos em grandes áreas devido a facilidade de

logística e baixo volume de calda pode ter impacto negativo sobre a persistência e eficiência do Bt bioinseticidas especialmente para pragas que tem preferência pelo terço médio/inferior das plantas, como por exemplo, *C. includens*, importante lagarta desfolhadora da cultura da soja.

O isolamento de Bt em áreas áridas pode ser uma forma de obter isolados mais resistentes a condições climáticas adversas. (Paulino-Lima et al., 2013) obtiveram um isolado de *Bacillus* denominado S3.300-2 com alta resistência à UV no deserto do Atacama (Chile). No entanto, testes posteriores ainda devem ser realizados para constatar o potencial inseticida deste isolado, bem como o melhor tipo de formulação em função do alvo biológico.

A adição de substâncias umectantes, adesivas, protetores solares e fitoestimulantes também é uma alternativa para aumentar a persistência dos Bt bioinseticidas em campo (Rodríguez et al., 2015). Entretanto, formulações encapsuladas apresentam maior eficiência e menor custo (Bok et al., 1993).

Os primeiros materiais utilizados para testes de encapsulamento foram os biopolímeros não hidrolisados, devido ao baixo custo e fácil acesso (McGuire, 1996). Posteriormente, o uso de amidos hidrolisados foram propostos como agentes encapsulantes, buscando assegurar a estabilidade do encapsulado e fornecer proteção à fatores ambientais (Bao et al., 2003). Além disso, os grânulos de amido têm a propriedade de aderir a superfícies secas e úmidas, o que pode contribuir na persistência do produto formulado (Bangs e Reineccius, 1988).

Na década de 1990, a tecnologia CellCap[®] foi desenvolvida como uma alternativa para aumentar a persistência de Bt bioinseticidas em campo (Gaertner et al. 1993). Essa tecnologia é baseada em células recombinantes de *Pseudomonas fluorescens* que expressavam toxinas Cry de Bt. Além de aumentar a capacidade de persistência em campo, esta tecnologia aumentou também a eficácia dos bioinseticidas. Naquela oportunidade quatro produtos foram lançados no mercado com essa tecnologia.

Soares-Junior (1996) avaliou o efeito de três bioinseticidas, MVP[®] (tecnologia CellCap[®]), Dipel[®] e Javelin[®] em *Plutella xylostella*. Os autores constataram redução da mortalidade da praga ao longo do período de avaliação de apenas 10% para o MVP[®] e de 40% e 90 % para Dipel[®] e Javelin[®], respectivamente. Além disso, o Bacilex[®] (não-encapsulado) apresentou uma CL₅₀ 36 vezes superior ao MVP[®] para *P. xylostella*. Glare et al. (2012)

ressaltaram que esses produtos não são mais utilizados na agricultura pela falta de interesse das empresas em registrar bioinseticidas geneticamente modificados principalmente devido à dificuldade de aceitação desta tecnologia pelas agências regulatórias e pelo público em geral.

Além de *P. fluorescens*, outros microrganismos como *Escherichia coli*, *B. subtilis* e *B. megaterium* foram estudados visando aumentar a persistência do Bt em campo (Schnepf et al., 1998). Tamez-Guerra et al. (2000) demonstraram a eficácia de formulações encapsuladas e microencapsuladas com aumento da persistência do Bt e consequente incremento na mortalidade dos insetos alvo.

Nos últimos anos, a utilização de polímeros químicos foi empregada para melhorar a persistência de Bt bioinseticidas. Yang et al. (2012) encapsularam a protoxina Cry1Ac utilizando ácido acrílico e estireno sulfonato e verificaram que a atividade inseticida não foi alterada em campo. Esta formulação mostrou proteção às condições ambientais, permitindo a liberação da toxina no intestino médio dos insetos-alvo.

Apesar do avanço nas tecnologias de encapsulamento, a redução do mercado de Bt bioinseticidas de 90% para 53% do mercado global de bioinseticidas (CAB International Center, 2010) impactou negativamente a pesquisa relacionada à avaliação da persistência e técnicas de encapsulamento de Bt. Esta redução do mercado ocorreu principalmente devido a ampla adoção de plantas Bt no controle de pragas e o senso comum que a solução definitiva do controle de pragas havia chegado.

Uma grande preocupação das últimas safras no mundo são os frequentes e crescentes relatos de resistência de pragas a plantas Bt (Blanco et al., 2016; Siegfried e Jurat-Fuentes, 2016). No Brasil as primeiras variedades resistentes à insetos rapidamente selecionaram populações resistentes de *Spodoptera frugiperda* a Cry1Ab (Luis et al., 2013; Omoto et al., 2016) e Cry1F (Farias et al., 2014). Em termos globais existem 19 casos de resistência de pragas as plantas Bt (Tabashnik e Carriere, 2019) e há probabilidade de rápida evolução da resistência inclusive para em plantas que expressam mais de uma toxina (Zu et al., 2019). Entretanto, para os Bt bioinseticidas há apenas um caso de resistência relatado em campo (De Bortoli e Jurat-Fuentes, 2019).

Alguns trabalhos foram realizados para avaliar a possibilidade de utilizar os Bt bioinseticidas como ferramenta do manejo da resistência em áreas com

plantas Bt. (Jakka et al., 2014) não encontram resistência cruzada significativa de *S. frugiperda* a toxina Cry1Fa (TC1507[®]) e os bioinseticidas Xentari[®] e Dipel[®]. Resultados semelhantes foram encontrados (Horikoshi et al., 2019) para as plantas Bt YieldGard VT Pro[®], PowerCore Agrisure[®], Vipitera[®], Agrisure Vipitera 3[®] e Herculex[®] em relação ao bioinseticida Xentari[®]. Souza et al. (2019) constataram 100% de mortalidade de *S. frugiperda* resistente quando tratada com bioinseticidas a base de Bt *aizawai* (Agrise[®] e Xentari[®]) e alguma sobrevivência das lagartas ao bioinseticidas a base de Bt *kurstaki* (Dipel[®] e Thuricide[®]).

A especificidade inseticida dos Bt bioinseticidas varia de acordo com a tipo e quantidade de toxinas Cry das cepas utilizadas na produção do Bt (Mohan e Gujar, 2001) e populações de *S. frugiperda* podem variar quanto a suscetibilidade ao Bt (Monnerat et al., 2006), o que poderia explicar a variação de resultados acima descrita. Entretanto, Jakka et al. (2014) ressaltaram que o efeito do Dipel[®] em *S. frugiperda*, pode ser devido a toxicidade do esporo do Bt. Esse fato demonstra a necessidade de melhor avaliar o potencial inseticida dos esporos de Bt. Embora as toxinas Cry presentes no cristal proteico sejam o principal fator de virulência dessa bactéria, o potencial efeito tóxico dos esporos e, seu sinergismo com toxinas Cry na toxicidade para espécies praga sempre despertou o interesse dos pesquisadores (Angus, 1964; Burges et al. 1976; Somerville e Pockett, 1975; Tretteau, 2018).

Em meados do século 20, muitos patologistas de insetos estavam interessados em separar os cristais e esporos de Bt para estudos de toxicidade. Angus (1954) relatou que os esporos de Bt *sotto*, não eram patogênicos, mas causavam septicemia em bicho da seda *Bombyx mori*. Burges et al. (1976) mostraram que os esporos desempenham um papel muito importante, juntamente com os cristais na morte da traça da cera (*Galleria mellonella*). Resultados semelhantes foram relatados posteriormente por Mohd-Salleh et al. (1980) para *Ostrinia nubilalis*.

4 CONSIDERAÇÕES

Bt bioinseticidas são uma opção eficiente e ambientalmente segura para o controle de surtos de pragas como descrito para *H. armigera* e *C. includens*.

Recentemente, a presença de *S. frugiperda* foi relatada na África e Ásia (Goergen, 2016; Ganiger et al., 2018). Essa praga devido a sua alta polifagia, resistência a inseticidas e plantas Bt será um desafio para os agricultores e os Bt bioinseticidas podem ser uma estratégia interessante para o seu controle.

Diante das abordagens apresentadas, os estudos com bioinseticidas Bt, estão voltados para o aperfeiçoamento em novas formulações, aumentar a persistência desses produtos em campo, além de estudos de compatibilidade com inseticidas químicos, tanto com inseticidas de amplo espectro como, piretroides e neonicotinoides, como produtos de grupos mais seletivos como diamidas e reguladores de crescimento. Ainda, pode-se explorar a seletividade dos bioinseticidas Bt, para o uso em conjunto com parasitoides e predadores em sistemas de produção orgânica.

Deve-se ressaltar que a simples troca do controle químico pelo controle microbiano está fadada ao fracasso. Para otimizar o uso de agentes de controle microbiano de pragas deve-se conhecer a praga, desde a sua identificação até o seu hábito. Por exemplo, a lagarta-falsa-medideira da soja tem preferência pelo terço inferior das plantas, sendo necessário utilizar volume de calda superior ao normalmente utilizado. Além disso, lagartas de primeiros instares são mais sensíveis aos entomopatógenos, portanto faz-se necessário conhecer a faixa etária da praga. Portanto, os Bt bioinseticidas devem ser empregados dentro de uma estratégia de manejo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrofit. 2019 http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (acesso em 02 de junho de 2019)

Aktar, W. Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. **Interdiscip. Toxicol.** 2: 1-12.

Albuquerque, A. F., Ribeiro, J. S., Kummrow, F., Nogueira, A. J. A., Montagner, C. C., Umbuzeiro, G. A., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci. Process. Impacts**, 18, 779-787.

Alves, S.B., Moino Jr., A., Almeida, J.E.M., 1998. Desenvolvimento, potencial de uso e comercialização de produtos microbianos. In: S.B. Alves (Ed.), Controle microbiano de insetos, **FEALQ**, Piracicaba. pp.1143-1163.

Angus, T.A., 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. **Nature**, 173: 545.

Angus, T. A., 1964. The biochemistry and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Berliner and its varieties. **Entomophaga** 7, 165-173.

Angus T.A., 1984. Inspiration, sweat, and serendipity: The proof of *Bacillus thuringiensis* in biological control. In: Cheng T.C. (Ed.), Pathogens of Invertebrates. Comparative Pathobiology. **Springer**, Boston. pp. 35-46.

Anhalt, F., Azevedo, J., Sugayama, R., Specht, A., Barros, N., 2017. Potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes, hypocreales) in the control of *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera, Tortricidae) and its compatibility with chemical insecticides. **Braz. J. Biol.** 70, 931–936. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000500003>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/> (Acesso 06 maio 2019).

Arnó, J., Gabarra, R., 2011. Side effects of selected insecticides on the *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) predators *Macrolophus pygmaeus* and *Nesidiocoris tenuis* (Hemiptera: Miridae). **J. Pest Sci.** 84, 513-520. <https://doi.org/10.1007/s10340-011-0384-z>

Arthurs, S., Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States **Journal of Invertebrate Pathology** (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.01.008>

Bangs, W. E., Reineccius, G. A., 1988. Corn starch derivatives: possible wall materials for spray-dried flavor manufacture. In: **ACS Symposium series American Chemical Society**.

Bao, J., Xing, J., Phillips, D.L., Corke, H., 2003. Physical properties of octenyl succinic anhydride modified rice, wheat, and potato starches. **J. Agric. Food Chem.** 51, 2283-2287. <https://doi.org/10.1021/jf020371u>

Batista Filho, A., Almeida, J.E.M., Lamas, C., 2001. Effect of Thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. **Neotrop. Entomol.** 30, 437–447. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2001000300017>

Beegle, C. C., Dulmage, H. T., Wolfenbarger, D. A., & Martinez, E., 1981. Persistence of *Bacillus thuringiensis* Berliner insecticidal activity on cotton foliage. **Environ. Entomol.** 10, 400-401.

Beegle, C.C.; Yamamoto, T. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can. Entomol.** 124, 587-616.

Benamú, M.A., Schneider, M.I., Sánchez, N.E., 2010. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. **Chemosphere** 78, 871-876. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.027>

Berry-Cabán, C.S., 2011. DDT and Silent Spring: fifty years after. **J. Milit. Vet. Health** 19, 19-24.

Blanco, C.A., Chiaravalle, W., Dalla-Rizza, M., Farias, J.R., García-Degano, M.F., Gastaminza, G., Mota-Sánchez, D., Murúa, M.G., Omoto, C., Peralisi, B.K., Rodríguez, J., Rodríguez-Maciel, J.C., Terán-Santofimio, H., Terán-Vargas, A.P., Valencia, S.J., Willink, E., 2016. Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Curr. Op. Insect Sci.** v.15, p.131-138.

Bok, S. H., Hang W. L., Son K. H, Sung U. K., Jee W.L., Do Y.K., Kwon K. K., 1993 Process for preparing coated microbial pesticides and pesticides produces there from. **US Patent # 5,273,749**,

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 41, 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

Brasil. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 148, de 26 de Dezembro de 2017. Estabelece critérios e procedimentos a serem adotados para recomendação de mistura em tanque de agrotóxicos e afins, e sua prescrição em receituário agrônômico. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil.** Brasília, 28 de dez 2017.

Brevik, K., Schoville, S.D., Mota-Sanchez, D. Chen, Y.H., 2018. Pesticide durability and the evolution of resistance: A novel application of survival analysis. **Pest Manag. Sci.** 74: 1953-1963. DOI 10.1002/ps.4899.

Burges, H. D., Thomson, E. M., Latchford, R. A., 1976. Importância de esporos e cristais de proteína δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* em *Galleria mellonella*. **J. Invertebr. Pathol.** 27, 87-94.

CAB International Centre, 2010. The 2010 worldwide biopesticides market summary. **CAB Internation Centre**, Wallingford. 40p

Cantwell, G. E., Franklin, B. A., 1966. Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.** 8, 256-258.

Carson, R., 1962. Silent Spring. Boston, **Houghton Mifflin Company**. 400p.

Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: Past, Present, or Future? **Annu. Rev. Entomol.** 43:1–16.

Chaim, A., Salgado De Castro, V.L.S., Corrales, F.M., Abrahaão Haddad Galvão, J., Machado Rodrigues Cabral, O., Nicolella, G., 1999. Método para monitorar perdas na aplicação de agrotóxicos na cultura de tomate. **Pesq. Agropec. Bras.** 34, 741–747.

Cheng, S., Lin, R., Wang, L., Qiu, Q., Qu, M., Ren, X., Zong, F., Jiang, H., Yu, C., 2018. Comparative susceptibility of thirteen selected pesticides to three different insect egg parasitoid *Trichogramma* species. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 166, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.050>

Cohen, E., Rozen, H., Joseph, T., Braun, S., Margulies, L., 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis kurstaki* from ultraviolet irradiation. **J. Invertr. Pathol.** 57, 343-351.

D'Ávila, V.A., Barbosa, W.F., Guedes, R.N.C., Christopher Cutler, G., 2018. Effects of spinosad, imidacloprid, and lambda-cyhalothrin on survival, parasitism, and reproduction of the aphid parasitoid *Aphidius colemani*. **J. Econ. Entomol.** 111, 1096–1103. <https://doi.org/10.1093/jee/toy055>

Da Costa, M.A., Loureiro, E.D.S., Pessoa, L.G.A., Dias, P.M., 2018. Compatibilidade de inseticidas utilizados na cultura do eucalipto com *Metarhizium rileyi* (Farlow) (= *Nomuraea rileyi*). **J. Neotrop. Agric.** 5, 44–48. <https://doi.org/10.32404/rean.v5i3.2149>

De Bortoli, C.P.; Jurat-Fuentes, J.L., 2019. Mechanisms of resistance to commercially relevant entomopathogenic bacteria. **Curr. Op. Insect Sci.** 33, 56-62.

De Bortoli, S. A., Polanczyk, R. A., Vacari, A. M., De Bortoli, C. P., Duarte, R. T., 2017. Efeito do aquecimento global sobre as pragas da cana-de-açúcar. In: Bettiol, W.; Hamada, E.; Angelotti, F.; Auad, A.M.; Ghini, R. (Org.), Aquecimento global e problemas fitossanitarios. **EMBRAPA**, Brasília, pp. 348-379.

De Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, J.C., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). **Chemosphere** 93, 1043–1050. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.075>

Dulmage, H.T., 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **J. Invertebr. Pathol.** 15, 232–239. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(70\)90240-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90240-5)

Dulmage, H.T., Boening, O.P., Rehnberg, C.S., Hansen, G.D., 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. **J. Invertebr. Pathol.** 18, 240–245. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90151-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90151-0)

Farias, J.R., Andow, D.A., Horikoshi, R.J., Sorgatto, R.J., Fresia, P., dos Santos, A.C., Omoto, C., 2014. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protect.** 64, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>

Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, 10: 271-275.

Fogel, M.N., Schneider, M.I., Desneux, N., González, B., Ronco, A.E., 2013. Impact of the neonicotinoid acetamiprid on immature stages of the predator *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Ecotoxicology** 22, 1063–1071. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1094-5>

Forgash, A.J., 1984. History, evolution, and consequences of insecticide resistance. **Pestic. Biochem. Physiol.** 22, 178-186.

Frye, R. D., Scholl, C. G., Scholz, E. W., & Funke, B. R., 1973. Effect of weather on a microbial insecticide. **J. Invertebr. Pathol.** 22, 50-54.

Fuxa, J.R., 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens. **Ann. Rev. Entomol.** 32, 225-251

Gaertner, F. H., Quick, T. C., Thompson, M. A., 1993. CellCap: an encapsulation system for insecticidal biotoxin proteins. **Adv. Eng. Pest.** 73-83.

Ganiger, P. C., Yeshwanth H. M., Muralimohan K., Vinay N., Kumar, A. R. V., Chandrashekara K., 2018. Occurrence of the new invasive pest, fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), in the maize fields of Karnataka, India. **Curr. Sci.** 115, 621-623.

Glare, T. R.; O'Callaghan, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: **John Wiley**, 2000. 350

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A., 2012. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnol.** 30, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.003>

Glare, Microbial biopesticides for control of invertebrates: Progress from New Zealand T.R., **Journal of Invertebrate Pathology** (2017), <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.11.014>

Goergen, G., Kumar, P.L., Sankung, S.B., Togola, A., Tamo, M., 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS one**, 11.10: e0165632.

Grazziero, D. L. P., 2015. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta daninha**, 33, 83-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582015000100010>.

Guida, Y. de S., Meire, R.O., Torres, J.P.M., Malm, O., 2018. Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: An overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. **Environ. Pollut.** 242, 19e30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.061>

Habib, M.E.M., Andrade, C.F.S. de., 1991. Controle microbiano de insetos com o uso de bactérias. **Inf. Agropecu.** 15, 21-26.

Hannay, C. L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. **Nature**, 172, 4387.

He, Y., Zhao, J., Zheng, Y., Desneux, N., Wu, K., 2012. Lethal effect of imidacloprid on the coccinellid predator *Serangium japonicum* and sublethal effects on predator voracity and on functional response to the whitefly *Bemisia tabaci*. **Ecotoxicology** 21, 1291–1300. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0883-6>

Heimpel, A.M., 1967. A critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. **Annu. Rev. Entomol.** 12: 287-322.

Hill, M.P., Macfadyen, S., Nash, M.A., 2017. Broad spectrum pesticide application alters natural enemy communities and may facilitate secondary pest outbreaks. **PeerJ** 5, e4179. <https://doi.org/10.7717/peerj.4179>

Horikoshi, R.J., Bernardi, O., Amaral, F.S. D. A. E., Miraldo, L.L., Durigan, M.R., Bernardi, D., Silva, S.S., Omoto, C., 2019. Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistant to Bt maize. **J. Invertebr. Pathol.** 161, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.12.008>

Huang, D.F., Zhang, J., Song, F.P., Lang, Z.H., 2007. Microbial control and biotechnology research on *Bacillus thuringiensis* in China. **J. Invertebr. Pathol.** 95, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.016>

Ignoffo, C. M., Hostetter, D. L., & Pinnell, R. E., 1974. Stability of *Bacillus thuringiensis* and *Baculovirus heliothis* on soybean foliage. **Environ. Entomol** 3, 117-119.

Jakka, S.R.K., Knight, V.R., Jurat-Fuentes, J.L., 2014. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **J. Invertebr. Pathol.** 122, 52–54. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.08.009>

Johansen, C.A., 1977. Pesticides and pollinators. **Ann. Rev. Entomol.** 22,177-92.

Kogan, M., 1988. Integrated pest management theory and practice. **Entomol Exp. Appl.** 49, 59–70. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1988.tb02477.x>

Kumar, K.K., Microbial biopesticides for insect pest management in India: Current status and future prospects. **Journal of Invertebrate Pathology**, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2018.10.008>

Lacey, L. A., 2017. Entomopathogens used as microbial control agents. In: Lacey (Ed.), *Microbial control of insect and mite pests*. London, **Academic Press**. pp. 3-12

Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M.S., 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **J. Invertebr. Pathol.** 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>

Leong, K. L. H., Cano, R. J., Kubinski, A. M., 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. **Environ. Entomol.** 9, 593-599.

Li, Z., Alves, S.B., Roberts, D.W., Fan, M., Delalibera, I., Tang, J., Lopes, R.B., Faria, M., Rangel, D.E.N., 2009. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. **Biocontrol Sci. Technol.** 20, 117–136. <https://doi.org/10.1080/09583150903431665>

Luis, A., Lourenção, F., Fernandes, M.G., 2013. Avaliação do Milho Bt Cry1Ab e Cry1F no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera : Noctuidae) em condições de campo. **Científica** 41,164–188.

Melander, L.A., 1914. Can insects become resistant to sprays? **J. Econ. Entomol.** 2, 167-173. <https://doi.org/10.1093/jee/7.2.167>

McGuire, M. R., Shasha, B. S., Eastman, C. E., & Oloumi-Sadeghi, H., 1996. Starch-and flour-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ. Entomol.**, 89(4), 863-869.

Mohan, M., Gujar, J.T., 2001. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L). **Crop Prot.** 30, 306–311.

Mohd-Salleh, M. B., Beegle, C. C., Lewis, L. C., 1980. Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.** 35, 75-83.

Monnerat, R. G., Queiroz, P., Orduz, S., Benitende, G., Cozzi, J., Real, M.D., Ibarra, J., Bravo, A., 2006. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 7029-7035. <http://dx.10.1128/AEM.01454-06>

Mota, L.H.C., Silva, W.D., Sermarini, R.A., Demétrio, C.G.B., Bento, J.M.S., Delalibera, I., 2017. Autoinoculation trap for management of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) with *Beauveria bassiana* (Bals.) in coffee crops. **Biol. Control** 111, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.007>

Navon, A., 2000. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - Reality and prospects. **Crop Protect.** 19, 669–676. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00089-2](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00089-2)

Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L., 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in Public Health** 4, 148. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>

Omoto, C., Bernardi, O., Salmeron, E., Sorgatto, R.J., Dourado, P.M., Crivellari, A., Carvalho, R.A., Willse, A., Martinelli, S., Head, G.P., 2016. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Manag. Sci.** 72, 1727–1736. <https://doi.org/10.1002/ps.4201>

Parra, J. R. P., 2014. Biological Control in Brazil: An overview. **Sci. Agric.** 71, 345–355. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0167>

Paulino-Lima, I.G., Azua-Bustos, A., Vicuña, R., González-Silva, C., Salas, L., Teixeira, L., Rosado, A., da Costa Leitao, A.A., Lage, C., 2013. Isolation of UVC-tolerant bacteria from the hyperarid Atacama desert, Chile. **Microbial Ecol.** 65, 325–335. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0121-z>

Pedro Guidotti Pinto, C., Brandão de Azevedo, E., Letícia Zéro dos Santos, A., Pires Cardoso, C., Oliveira Fernandes, F., Duarte Rossi, G., Antônio Polanczyk, R., Immune response and susceptibility to *Cotesia flavipes* parasitizing *Diatraea saccharalis* larvae exposed to and surviving an LC₂₅ dosage of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.** (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107209>

Pérez-González, O., Sánchez-Peña, S.R., 2017. Compatibility *in vitro* and *in vivo* of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Hirsutella citriformis* with selected insecticides. **Sout. Entomol.** 42, 707–718. <https://doi.org/10.3958/059.042.0309>

Pinnock, D. E., Brand, R. J., & Milstead, J. E., 1971. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **J. Invertebr. Pathol.** 18, 405-411.

Pinnock, D.E., Brand, R.J., Milstead, J.E., Jackson, K.L., 1975. Effect of tree species on the coverage and field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **J. Invertebr. Pathol.** 25, 209–214. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(75\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(75)90070-1)

Polanczyk, R. A.; Valicente, F. H.; Barreto, M. R., 2008. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina. In: Alves, S.B.; Lopes, R.B. (Org.), Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. **FEALQ**, Piracicaba: pp. 111-136.

Polanczyk, R. A., Van Frankenhuyzen, K., Pauli, G., 2017. 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.

Pozsgay, M., Fast, P., Kaplan, H., Carey, P. R., 1987. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HDI and NRD12: A Raman Spectroscopic Study. **J. Invertr. Pathol**, 50, 246-253.

Pomari-Fernandes, A., De Freitas Bueno, A., Sosa-Gómez, D. R., 2015. *Helicoverpa armigera*: current status and future perspectives in Brazil. **Curr. Agric. Sci. Technol**. 21, 1-7.

Raymond, B., Federici, B.A., Raymond, B., 2018. Reply to the article “In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity-a response to EFSA.” **FEMS Microbiol. Ecol**. 94, 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix171>

Ribeiro, L.D.P., Mota, L.H.C., D'alessandro, C.P., Vendramim, J.D., Júnior, I.D., 2015. *In vitro* compatibility of an acetogenin-based bioinsecticide with three species of entomopathogenic fungi. **Fla. Entomol**. 97, 1395–1403. <https://doi.org/10.1653/024.097.0414>

Ricalde, M. P., Nava, D. E., Loeck, A. E., Coutinho, E. F., Bisognin, A., Garcia, F. R. M., 2015. Insects related to olive culture in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ciênc Rural** 45, 2125-2130.

Rodríguez, A.P.G., Martínez, M.G., Barrera-Cortés, J., Ibarra, J.E., Bustos, F.M., 2015. Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: Studies on the propagation “in vitro.” **Bioprocess Biosyst. Eng**. 38, 329–339. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1273-7>

Salama, H. S., Foda, M. S., Zaki, F. N., & Khalafallah, A., 1983. Persistence of *Bacillus thuringiensis* Berliner spores in cotton cultivations. **Z. Angewan. Entomol**, 95, 321-326.

Sanahuja, G.; Banakar, R.; Twyman, R. M.; Capell, T.; Christou, P., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnol. J**. 9, 283–300.

Santos Díaz, A.M., Grijalba, E., Victoria Zuluaga, M., Gómez, M., Villamizar, L., 2014. Compatibilidad in vitro de un bioplaguicida a base de *Lecanicillium lecanii* (Hypocreales: Clavicipitaceae) con agroquímicos empleados en los cultivos de algodón y berenjena. **Rev. Col. Biotecnol**. 15, 132. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.38025>

Santos, A.E., Mendes, S.M., Carvalho, S.S.S., Silva, L.O., Carvalho, E.A.R., Batista, C.S., Nascimento, T.A., 2014. Aspectos biológicos de *Helicoverpa* sp em folhas de algodão e soja. In: Seminário de Iniciação Científica. Sete Lagoas, **EMBRAPA Milho e Sorgo**. pp. 1-6.

Schneider, C.W., Tautz, J., Grünewald, B., Fuchs, S., 2012. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PLoS one** 7, e30023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030023>

- Schneider, M.I., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H., Ronco, A., 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. **Chemosphere** 76, 1451–1455. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.029>
- 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. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62, 775–806.
- Schumacher, V., Poehling, H.M., 2012. *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth, and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. **Fungal Biol.** 116, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.10.007>
- Shapiro-Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W., Kaya, H.K., 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **J. Invertebr. Pathol.** 88, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.10.003>
- Siegfried, B., Jurat-Fuentes, J.L., 2016. Editorial overview: Pests and resistance: Resistance to Bt toxins in transgenic crops. **Curr. Op. Insect Sci.** 15. <http://doi.org/10.1016/j.cois.2016.05.001>
- Soares Júnior., G.G. 1996 New products and uses arising from Mycogen's CellCap® biological encapsulation technology. **V Simpósio De Controle Biológico**, Foz do Iguaçu, p. 178-191
- Somerville, H. J., Pockett, H. V., 1975. An insect toxin from spores of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Microbiology**, 87, 359-369.
- Souza, M.L. de., 2001. Utilização de microrganismos na agricultura. **Biotecnol. Ciência e Desenvol.** 21, 28-31.
- Steinhaus, E.A., 1956. Living insecticides. **Sci. Am.**, 195, 96- 103.
- Svestka, M., Vankova, J. 1976. The effect of artificial rain on the persistence of *Bacillus thuringiensis* Berl. spores [oak]. Lesnictvi UVTIZ.
- Tabashnik, B.E., Mota-Sanchez, D., Whalon, M.E., Hollingworth, R.M., Carrière, Y., 2014. Defining terms for proactive management of resistance to bt crops and pesticides. **J. Econ. Entomol.** 107, 496–507. <https://doi.org/10.1603/ec13458>
- Tabashnik, B.E.; Carriere, Y., 2019. Global patterns of resistance to Bt crops highlighting pink bollworm in the United States, China and India. **J. Econ Entomol**, 2019. <http://doi.org/10.1093/jee/toz173>
- Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., Behle, R. W., Shasha, B. S., e Galn Wong, L. J., 2000. Avaliação de formulações microencapsuladas para melhoria da atividade residual de *Bacillus thuringiensis*. **J. Econ Entomol** , 93 (2), 219-225.
- Treteau, G., 2018. Interaction between insects, toxins, and bacteria: Have we been wrong so far? **Toxins**, 10, 281; doi:10.3390/toxins10070281

Van Frankenhuyzen, K., 2000. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: Charles, J-F.; Delécluse. A.; Nielsen-Le Roux, C. (Eds.), Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. **Springer**, Dordrecht. pp. 371-382

WHO., 2017. Agrochemicals, health and environment: directory of resources. Available at <http://www.who.int/heli/risks/toxics/chemicalsdirectory/en/index1.html>.

Wickham, J.C., Chadwick, P.R., Stewart, D.S., 1974. Factors which influence the knockdown effect of insecticide products. **Pest Manag. Sci.** 5, 657-664 <https://doi.org/10.1002/ps.2780050518>

Yang, W., He, K., Zhang, J., Guo, S., 2012. pH-Controlled *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin loading and release from polyelectrolyte microcapsules. **PLoS ONE** 7, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045233>

Zhu, C., Niu, Y., Zhou, Y., Guo, J., Head, G.P., Price, P.A., Wen, X., Huang, F., 2019. Survival and effective dominance level of a Cry1A.105/Cry2Ab2-dual gene resistant population of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) on common pyramided Bt corn traits. **Crop Protect.** 115, 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.09.008>

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA PERSISTÊNCIA DE FORMULAÇÕES DE BACILLUS THURINGIENSIS EM SOJA E MORTALIDADE DE ANTICARSIA GEMMATALIS

RESUMO - A ocorrência de *Anticarsia gemmatalis* é um dos principais limitantes na produção da soja no Brasil, uma das *commodities* brasileiras mais importantes. O controle da praga é baseado na aplicação de inseticidas químicos e no uso de plantas Bt. Contudo, a rápida seleção de populações resistentes dificulta o manejo dessa praga. O uso de bioinseticidas à base *Bacillus thuringiensis* (Bt) figuram como uma alternativa promissora para assegurar a produtividade de forma ecológica e economicamente sustentável. Porém devido a sensibilidade desses bioinseticidas a fatores climáticos, faz-se necessário avaliar a persistência de formulações de bioinseticidas e possíveis estratégias que aumentem a persistência. Os ensaios de persistência de Bt foram conduzidos na cultura da soja nas safras 2017 e 2018 na área experimental da FCAV/UNESP, com parcelas de 10m x 5m e 4 repetições. Os tratamentos utilizados foram conduzidos em esquema fatorial [(2x3x3x2)+1], constituídos de cepas de *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 (2017) e *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (2018) sem e com encapsulamento nos respectivos anos e do bioinseticida Dipel® composto de dois horários de aplicação (8:00 e 16:00 horas), três espectros de gota (fina, média e grossa), duas vazões de aplicação (70 e 100 L.ha⁻¹). Água foi utilizada como controle. E os ensaios de mortalidade de *A. gemmatalis* foram realizados no LCMAP/FCAV. A concentração de Bt na calda para aplicação foi 3 x 10⁸ esporos.mL⁻¹. Doze horas após a aplicação dos tratamentos, foram realizadas oito (primeira safra) e cinco (segunda safra) coletas de folhas no terço superior das cinco linhas centrais de cada parcela, com um intervalo de 12 horas entre as coletas, totalizando 30 folhas. Para cada folha foram retirados 2 discos de 3,0 cm de diâmetro; um utilizado no bioensaio de mortalidade de *A. gemmatalis* e outro para avaliar a persistência do Bt através da contagem de esporos. No teste de mortalidade, foram utilizadas 25 lagartas por tratamento, distribuídas em 5 repetições. A avaliação da mortalidade foi realizada 5 dias após a montagem do bioensaio. Na avaliação da persistência, foi realizada a contagem de esporos, utilizando câmara de Neubauer e microscópio com contraste de fase (400 x). O bioensaio mortalidade demonstrou que não houve diferença estatística quando utilizado gota grossa na aplicação, bem como para o ensaio com diferentes horários de aplicação. A formulação encapsulada utilizada não influenciou na persistência do Bt e na mortalidade de *A. gemmatalis*.

Palavras-chave: Encapsulamento, Controle microbiano, lagarta da soja,

CHAPTER 3 - EVALUATION OF THE PERSISTENCE OF *Bacillus thuringiensis* FORMULATIONS IN SOYBEAN AND EFFECT OF MORTALITY IN *Anticarsia gemmatalis*

ABSTRACT – The occurrence of *Anticarsia gemmatalis* is one of the main limiting factors in soybean production in Brazil, one of the most important Brazilian commodities. Pest control is based on the application of chemical insecticides and the use of Bt plants. However, the rapid selection of resistant populations makes it difficult to manage this pest. The use of *Bacillus thuringiensis* (Bt) -based bioinsecticides is a promising alternative to ensure ecologically and economically sustainable production. However, due to the sensitivity of these bioinsecticides to climatic factors, it is necessary to evaluate the persistence of bioinsecticide formulations and possible strategies that increase the persistence. Bt persistence tests were conducted on soybean crop in 2017 and 2018 crops in the experimental area of FCAV/UNESP, with plots of 10m x 5m and 4 replications. The treatments were conducted in a factorial scheme [(2x3x3x2) +1], consisting of strains of *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* HD-125 (2017) and *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 (2018) without and with encapsulation in the respective years and the Dipel® bioinsecticide composed of two application times (8:00 and 16:00 hours), three drop spectra (fine, medium and coarse), two application rates (70 and 100 L.ha⁻¹). Water was used as a control. And *A. gemmatalis* mortality assays were performed on the LCMAP / FCAV. The concentration of Bt in the spray solution was 3 x 10⁸ spores.mL⁻¹. Twelve hours after the application of the treatments, eight (first crop) and five (second crop) leaf collections were performed in the upper third of the five central lines of each plot, with an interval of 12 hours between collections, totaling 30 leaves. For each sheet, 2 3.0 cm diameter discs were removed; one used in *A. gemmatalis* mortality bioassays and the other to evaluate the persistence of Bt by spore counting. In the mortality test, 25 caterpillars per treatment were used, distributed in 5 repetitions. Mortality assessment was performed five days after bioassay assembly. Spore counting was performed using a Neubauer chamber and phase-contrast microscope (400 x) to evaluate Bt persistence. The mortality bioassay showed that there was no statistical difference when coarse drop was used in the application, as well as application times. The encapsulated formulation used did not influence the persistence of Bt and mortality of *A. gemmatalis*.

Keywords: Encapsulation, Microbial Control, velvet-bean caterpillar

1 – INTRODUÇÃO

No Brasil, a soja, *Glycine max* (L.) Merrill (Fabaceae: Phaseoleae) é cultivada em uma área de aproximadamente 35 milhões de hectares (Embrapa, 2019). Os artrópodes praga são importantes fatores limitantes da produção (Moscardi et al 2012) e entre eles a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae), destaca-se pela elevada capacidade de dano, uma vez que pode consumir completamente a planta (Bernardi et al., 2012; Gómez et al., 2014; Haase et al., 2015; Panizzi, 2013; Sosa-gómez et al., 2004).

O uso de inseticidas químicos é a principal forma de controle de lepidópteros desfolhadores na soja (Baur et al., 2010; Da Silva Altoé et al., 2012; Guedes et al., 2012). No entanto, a eficácia dessa tática pode ser limitada devido a seleção de populações resistentes associada a dificuldade dos inseticidas em alcançar o alvo biológico (Bernardi et al., 2012). Uma ferramenta adicional para o controle de *A gemmatalis* é o uso de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas (Cry) derivadas da bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bernardi et al., 2014; Bravo et al., 2007 James 2017).

A soja Bt que expressa a toxina Cry1Ac foi aprovada para cultivo no Brasil em 2010 e comercializadas pela primeira vez durante a safra 2013-2014 (Bernardi et al., 2014; Yano et al., 2016). Desde então, a soja Bt tem sido considerada uma das principais ferramentas para de manejo de lepidópteros (Azambuja et al., 2015; Bernardi et al., 2014, 2012; Yano et al., 2016). Entretanto como a soja aprovada para comercialização no Brasil (MON 8701x MON 89788) expressa somente toxina Cry1Ac (Huang et al., 2011), a seleção de fenótipos resistentes pode ocorrer rapidamente, quando comparado ao material que expressa mais de uma toxina (Carrière et al., 2016, 2015; Gould, 1998). Além disso, a adoção de áreas de refúgio é extremamente baixa pelos sojicultores de uma forma geral, o que compromete mais ainda a durabilidade da tecnologia (Machado e Fiuza, 2011; Omoto e Bernardi, 2015; Zancanaro et al., 2012).

Com as limitações dos inseticidas e das plantas Bt, a utilização de bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt), ou Bt bioinseticidas, é uma alternativa que pode ser usada para o controle de lepidópteros desfolhadores, devido a sua seletividade, especificidade e inocuidade ao ambiente (Carvalho et al., 2012; Da Silva et al., 2016; Lacey, 2017; Raymond et al., 2018). Outro fator

importante para o uso de bioinseticida Bt, é a possibilidade de auxiliar o controle de populações resistentes em cultivos Bt. Trabalhos recentes mostraram a ausência de resistência cruzada entre Bt bioinseticidas e plantas Bt (Horikoshi et al., 2019; Jakka et al., 2014).

Apesar das vantagens dos Bt bioinseticidas, o seu amplo uso é limitado devido a sua sensibilidade a condições ambientais adversas. Fatores como radiação ultravioleta (UV), temperatura elevada (Glare et al., 2012; Navon, 2000) e baixa umidade relativa (Leong et al., 1980) interferem na viabilidade e reduzem a persistência dos Bt bioinseticidas. Os trabalhos com objetivo de avaliar a persistência desses bioinseticidas em sua maioria são antigos, e em grande parte realizados em cultivos de espécies florestais, soja, milho e algodão (Pinnock; Brand; Milstead 1971 Pinnock et al., 1975 Ignoffo 1974 Lynch 1980) e no hemisfério norte onde as condições climáticas diferem do hemisfério sul.

A redução da persistência resulta em menor controle da praga, o que implica na necessidade de reaplicações do bioinseticida e conseqüente aumento do custo de produção para os agricultores (Lacey, 2017). Uma das alternativas para aumentar a persistência bioinseticidas Bt, é a utilização de técnicas de encapsulamento. Essa técnica possibilita que uma matriz proteja um agente de controle microbiano de estresse biótico e abiótico (contaminações, antagonistas do solo, temperatura, secura, luz UV, estresse mecânico), fornecendo um microambiente benéfico (Vemmer and Patel, 2013). Esse encapsulamento prolonga a atividade inseticida não apenas durante o armazenamento, mas também após a aplicação, resultando em diminuição do número de aplicações (Paula et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a persistência de Bt em campo e relacionar essa persistência com a mortalidade de *A. gemmatalis*. nas condições climáticas do Brasil.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Fitossanidade e no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga, na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho em Jaboticabal, São Paulo.

2.1 Obtenção e manutenção de *Anticarsia gemmatalis*

A população de *A. gemmatalis* foi obtida da EMBRAPA Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, Minas Gerais, Brasil. A criação e manutenção da população foi realizada no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga da FCAV/UNESP. As lagartas foram mantidas em dieta artificial (adaptada Greene; Leppla; Dickerson, 1976) em recipientes plásticos de 70 mL, onde foram individualizadas duas lagartas, que permaneceram até a fase de pupa. As pupas foram retiradas e acondicionadas em recipientes de 1 L contendo papel filtro no fundo. Após a emergência, os adultos foram colocados em gaiolas cilíndricas de PVC (30,0 cm de altura x 28 cm de diâmetro), revestidas internamente com papel sulfite branco. Os adultos foram alimentados com uma solução líquida de mel à 10%, e 2,5% de cerveja. A cada dois dias foram coletados os ovos, e acondicionados em recipientes de 1 L contendo dieta artificial no fundo. Após a eclosão das lagartas, cerca de 95% dos espécimens foram utilizadas para os bioensaios, e o restante utilizado para a manutenção da criação

2.2 Preparo dos tratamentos

As cepas utilizadas foram Btt HD-125 (primeiro ensaio) e Btk HD-1 (segundo ensaio) provenientes da Coleção de Bactérias Entomopatogênicas - CBE do Laboratório de Controle Biológico - Núcleo de Biologia Aplicada - NBA da Embrapa Milho e Sorgo – CNPMS.

Para o crescimento das cepas foi utilizado o meio de cultura Luria Bertani - LB acrescido de sais (líquido), com seguinte composição: glicose (1g), caldo nutritivo (8g), extrato de levedura (5g), triptona (10g), NaCl (5g), MgSO₄ (0,3g), FeSO₄ (0,02g), ZnSO₄ (0,02g) e MnSO₄ (0,02g) (Valicente e Mourão 2008). O material foi agitado em Becker contendo 900 mL de água destilada até a diluição de todos os reagentes. Após a diluição foi utilizado um pHmetro para medir o pH, e utilizou uma base para corrigir o valor de pH até 7,5, para uma solução de 1000 mL. Para a correção utilizou-se uma base (NaOH 1M).

Uma quantidade de 125 mL do meio de cultura Luria Bertani - LB (líquido) foi distribuída em oito erlenmeyers de 250 mL. Posteriormente, cada Erlenmeyer

foi vedado com algodão envolto em tecido e papel alumínio, sendo autoclavado durante 20 minutos. Os erlenmeyers contendo o meio de cultura Luria Bertani - LB (líquido) foram levados à câmara de fluxo laminar, onde foi realizada a inoculação utilizando-se 100 µL de cada cepa da bactéria de *B. thuringiensis*. Após, as amostras inoculadas foram submetidas a um processo de fermentação submersa descontínua (líquida), conduzido em um shaker rotativo a 28°C e 200 rpm por 48 horas para o crescimento da bactéria. Ao fim da fermentação, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada amostra fermentada, e levada ao microscópio óptico com contraste de fase para verificação da presença de esporos e cristais. Após o término do processo, parte das amostras foram armazenadas sob refrigeração até o uso e, parte foram encaminhadas para a empresa Labmaq® para serem encapsuladas. A formulação foi fornecida pela empresa Sumitomo®.

2.3 Aplicação em campo

O primeiro bioensaio foi conduzido em parcela subdividida [(2x3x3x2)+1], composto por dois horários de aplicação (8:00 e 16:00 horas), por duas cepas de Bt [uma cepa Btt HD125 (encapsulado e não encapsulado) e o bioinseticida (Dipel WP®)], com três espectros de gota (fina, média e grossa) e duas vazões (70 L.ha⁻¹ e 100 L.ha⁻¹). Água foi utilizada como controle. Foram utilizadas pontas de pulverização conforme descrito na Tabela 1. No segundo bioensaio a cepa Btt HD-125 foi substituída pela cepa Btk HD-1. A aplicação foi realizada com o auxílio de um pulverizador de parcela, pressurizado com CO₂.

No momento da aplicação a calda apresentava uma concentração de 3 x 10⁸ esporos/mL, determinada com o auxílio da câmara de Neubauer, em microscópio com contraste de fase com 400x de aumento (Carl zeiss- Axio LabA1). As caldas foram preparadas instantes antes da aplicação. Após a aplicação foram realizadas oito (primeira safra) e cinco (segunda safra) coletas de folhas, com um intervalo de 12 horas entre as coletas e a primeira coleta foi realizada 12 horas após a aplicação. As folhas foram levadas para laboratório para os testes de mortalidade de *A. gemmatilis* e avaliação da persistência pela contagem dos esporos e Bt em microscopia de contraste de fase. No segundo ano de cultivo foram realizadas somente cinco coletas devido a precipitação de

55 mm, durante o andamento do experimento, com a chuva ocorreu a lavagem dos produtos.

Tabela 1: Pressão de trabalho e ponta de pulverização utilizadas para as diferentes vazões e espectros de gotas.

Tratamentos ¹	Ponta de pulverização ²	Pressão (Bar)
gota fina - vazão 70 L/ha	XR 110 015	2
gota média - vazão 70 L/ha	XR 110 02	1
gota grossa - vazão 70 L/ha	TT 110 02	1
gota fina - vazão 100 L/ha	XR 110 02	2
gota média - vazão 100 L/ha	XR 110 03	1
gota grossa - vazão 100 L/ha	TT 110 02	2

¹ Todos os tratamentos foram aplicados a velocidade de trabalho de 1 m/s (3,6 Km/h).

² Marca TeeJet®

2.4 Bioensaio de mortalidade de *A. gemmatalis*

As folhas de soja coletadas em campo foram levadas para laboratório e cortadas em formato disco, com auxílio de um vazador (3 cm de \varnothing). Foram retirados 25 discos foliares por tratamento/avaliação (20 discos para o teste mortalidade e cinco discos para o teste de persistência). Para o teste de mortalidade, quatro discos foliares foram acondicionados em placa de Petri (6 cm de \varnothing), contendo uma mistura gelificada de ágar-água a 2,5% com papel filtro. Em cada placa de Petri foram colocadas 5 lagartas neonatas de *A. gemmatalis*, e para cada tratamento/avaliação foram utilizadas 5 placas; totalizando 25 lagartas por tratamento, distribuídas em 5 repetições. No total foram utilizados 5.560 discos foliares e 6.950 lagartas no ensaio de 2018 e 2.960 discos foliares e 3.700 lagartas no ensaio de 2019. O bioensaio foi mantido sob condições controladas (UR: 75 % \pm 12 e T: 25 °C \pm 2). A avaliação da mortalidade foi realizada 5 dias após a aplicação dos bioinseticidas.

2.5 Contagens de esporos de Bt

A contagem dos esporos foi realizada utilizando um disco foliar acondicionado em tubo de Falcon (15mL) com 10 mL de água destilada, e dois gramas de areia autoclavada (Collier et al., 2005), constituindo uma repetição. Posteriormente, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex (MOD. AP56 [rpm=2000]), e após foi retirada uma alíquota de 100 μ L. A contagem dos esporos foi realizada em triplicata com o auxílio de câmera de Neubauer (Alves e Moraes, 1998) e microscópio de contraste de fase (Carl zeiss- Axio LabA1) em aumento de 400 x.

2.6 Análise dos dados

Para avaliar a interação dos fatores (número de esporos x espectro de gota, formulação do produto e horário de aplicação) foram aplicados modelos lineares generalizados (GLM). Para isso, os dados de contagem de esporos foram transformados para a escala Log e para geração do modelo foi utilizada a família de distribuição quasipoisson. Os dados de mortalidade foram transformado em Logit. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R[®].

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem de esporos

Não foi observado efeito da safra na contagem dos esporos (GLM: $p>0.776424$), devido à mesma época do ano nas duas safras. A partir, disso podemos inferir que as condições climáticas durante o experimento não afetaram a persistência do Bt. Em fevereiro de 2018, as temperaturas máxima e mínima foram 38,6°C e 18,6°C, respectivamente, enquanto que no mesmo mês de 2019, as temperaturas máxima e mínima foram 33,2°C e 17,9°C, respectivamente. Da mesma forma, Linch et al. (1980) avaliando a persistência de três formulações do bioinseticida Thuricide[®], não observaram diferenças na contagem de esporos em dois anos de amostragem. Entretanto, Dubois et al. (1988) observaram que a persistência foi afetada quando o Bt bioinseticida foi

aplicado em diferentes épocas do ano. Neste estudo, a persistência foi maior em estações mais amenas, como outono em comparação com o inverno.

Não foi observada diferença no tamanho da gota de aplicação do Bt bioinseticida em relação ao número de esporos para o mesmo horário de avaliação (GLM: $p>0.29680$). Sundaram et al. (1996), avaliaram a influência do espectro de gotas de aplicação na persistência do bioinseticida Foray® 76B. Os autores observaram a tendência de gotas maiores afetarem positivamente a persistência, no entanto, enfatizam que existem muitas variáveis que interferem na persistência, principalmente as condições climáticas.

De forma geral, foi observada redução do número de esporos ao longo das avaliações. Foram obtidos 10^6 esporos.mL⁻¹ 12 horas após a aplicação (Figura 1). Este valor corrobora os dados relatados por Valicente (2018)* em campo logo após a aplicação. Noventa e seis horas após a aplicação dos bioinseticidas houve uma considerável redução de esporos para 10^4 esporos.mL⁻¹, valores próximos a testemunha (2×10^4).

A redução do número de esporos no decorrer das avaliações reforça o efeito dos fatores abióticos sobre a persistência dos esporos em condições de campo, segundo descrito por Frye et al. (1972), Ignoffo et al. (1974) e Pinnock (1971). Os autores relataram observaram rápida redução da persistência esporos em condições de campo três dias após aplicação, com redução de 95% da quantidade inicial de esporos. A redução observada no primeiro experimento (2018) foi de 99% após três dias da aplicação. A diferença na redução pode estar associada as diferentes condições climáticas (clima tropical) comparada aos demais estudos publicados (clima temperado). Salama et al., (1983) sugerem que climas mais quentes proporcionam uma maior perda de esporos.

O horário de aplicação não afetou a persistência do produto (GLM: $p>0.586082$), não interferindo no número de esporos para o mesmo horário após a aplicação (Figura 2). Desta forma, a quantidade inicial e final de esporos foi 10^6 esporos.mL⁻¹ e 10^4 esporos.mL⁻¹, respectivamente. Esses valores são próximos a testemunha que apresentou 2×10^4 esporos.mL⁻¹.

As 16:00 horas a temperatura da folha foi mais alta, com temperatura média no período de aplicação de 36°C, enquanto que a temperatura média da aplicação às 08:00 horas foi 27°C. Essa diferença de temperatura pode ter influenciado a taxa de deposição inicial, e interação do Bt com a epiderme da

*Comunicação pessoal com o pesquisador Fernando Hercos Valicente, Congresso Brasileiro de Entomologia – Gramado 2018

folha. O mesmo não foi observado no produto comercial (Dipel®), provavelmente devido ao efeito dos inertes na formulação, que reduzem o efeito da temperatura na taxa de deposição e interação com a superfície da folha (Figuras 2 e 4).

A formulação encapsulada mostrou maior dispersão de dados em relação ao Dipel® e as cepas Btk HD-1 e Btk HD-73 (Figuras 1 a 3). Isso pode ter ocorrido devido a problemas físicos da calda, inerente a formulação, e/ou eficiência de encapsulamento.

Em relação ao Dipel® foi observado que o mesmo apresentava problemas de dispersão em água, com isso rapidamente logo após o preparo da calda o produto decantou no fundo do recipiente de aplicação. Este fato pode ter ocasionado uma superdosagem no início das aplicações e uma subdosagem no final, o que pode explicar a variação dos dados em relação a contagem de esporos.

O tipo de formulação pode afetar a eficiência de encapsulamento. Forim et al. (2014) ressaltaram a importância de uma elevada eficiência de encapsulamento, pois proporciona uma maior estabilidade do material encapsulado. Isso pode implicar em menor dispersão da formulação em condições que degradam as moléculas. Pode-se inferir que é necessário melhorar a técnica de encapsulamento a ser empregada em futuros experimentos de campo.

O volume de calda não interferiu na contagem de esporos para o mesmo horário após a aplicação (GLM: $p > 0.096173$) (Figura 3), com a quantidade inicial e final de esporos semelhante ao anteriormente citada para tamanho de gota. Isso pode ser devido aos volumes de aplicação semelhantes para os tratamentos. Entretanto, pode-se observar uma leve tendência de um número maior de esporos na vazão de 100 L.ha^{-1} , quando comparado a vazão de 70 L.ha^{-1} na primeira avaliação.

A avaliação às 16:00 horas não foi realizada devido a uma precipitação de 23 mm, que causou a lavagem das formulações do dossel da planta (Figuras 2 e 4).

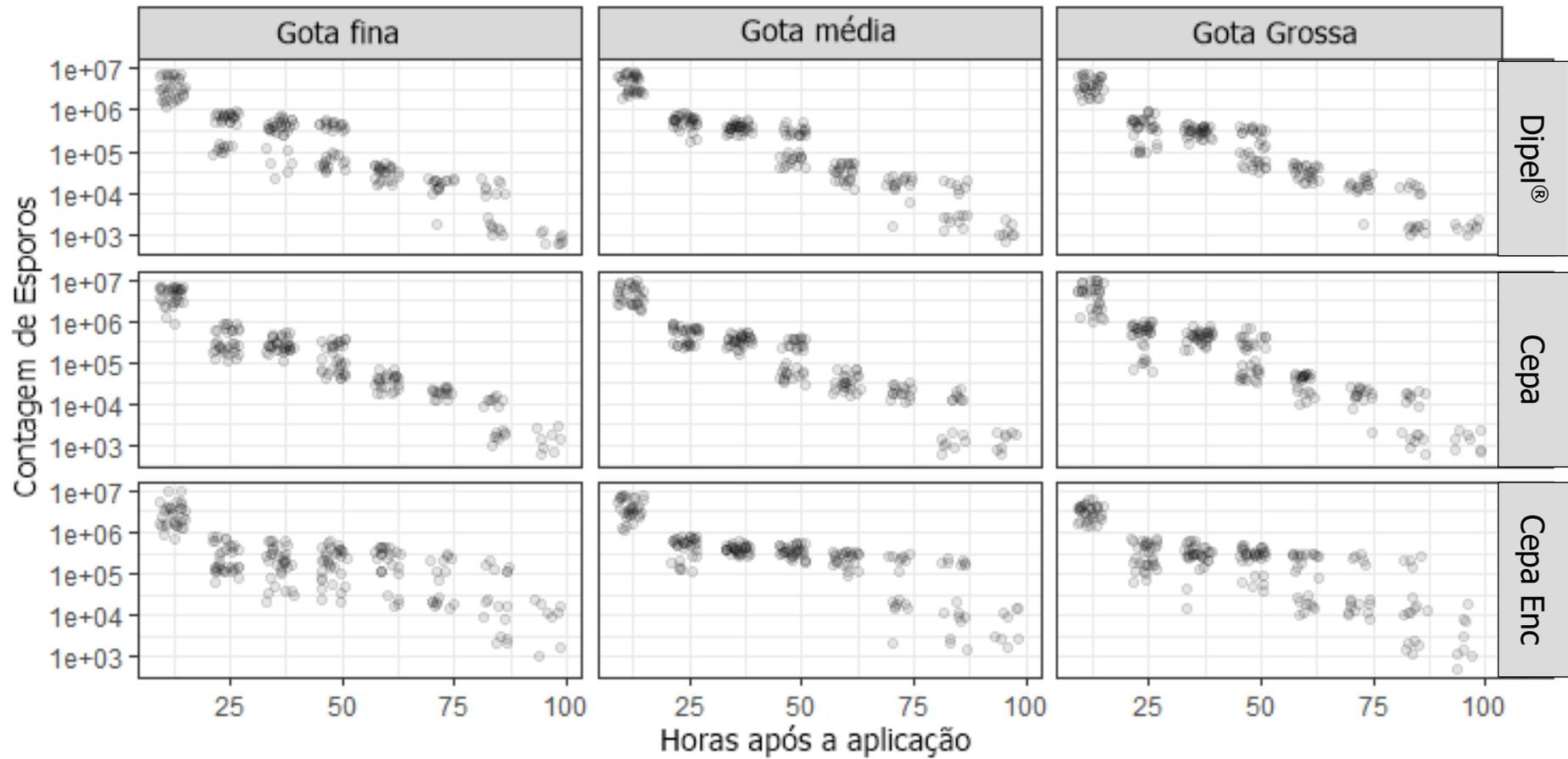


Figura 1. Número de esporos de *Bacillus thuringiensis*, com interação das variáveis espectro de gotas e produto.

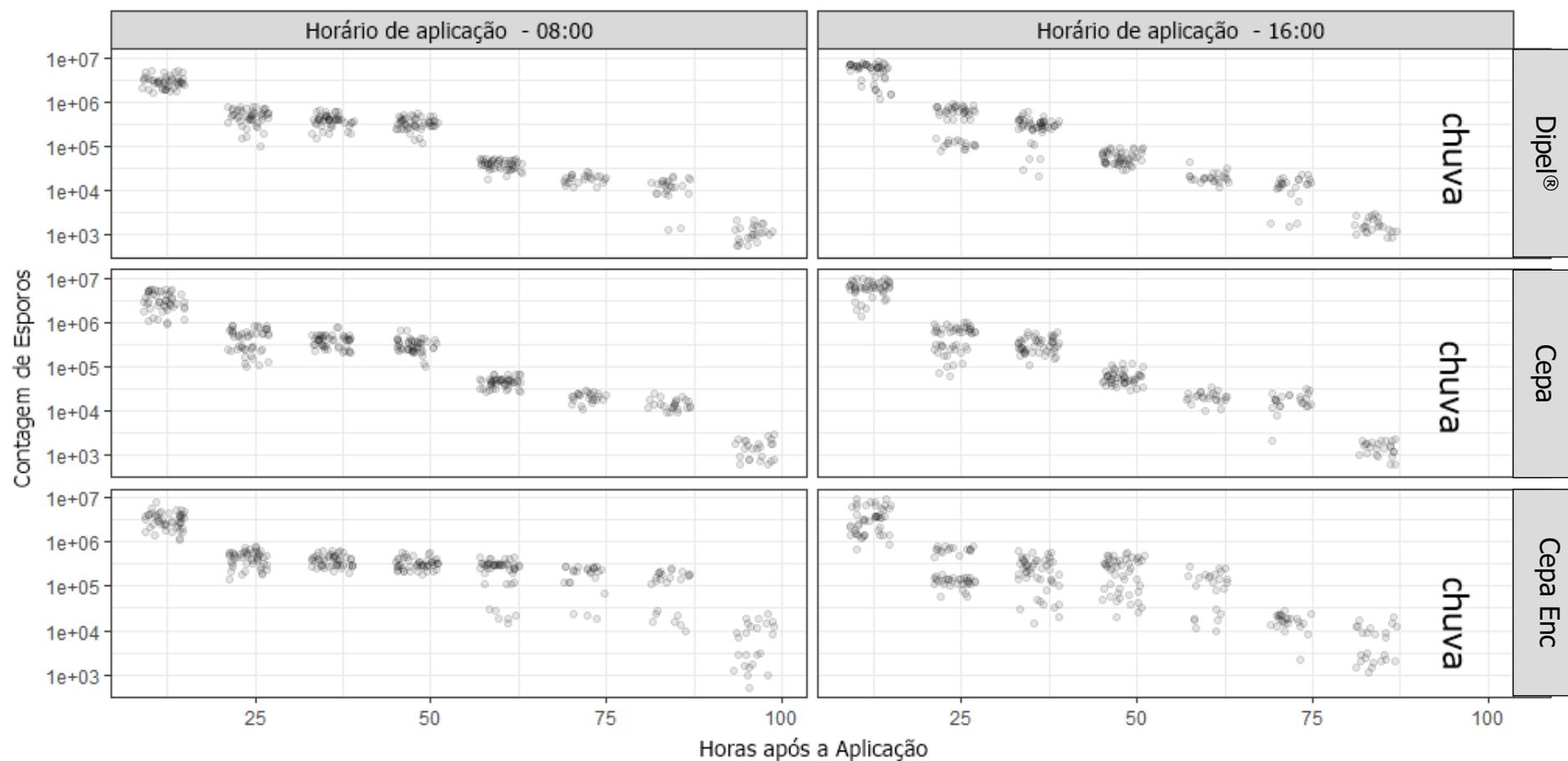


Figura 2: Número de esporos de *Bacillus thuringiensis*, com interação das variáveis horário de aplicação e produto.

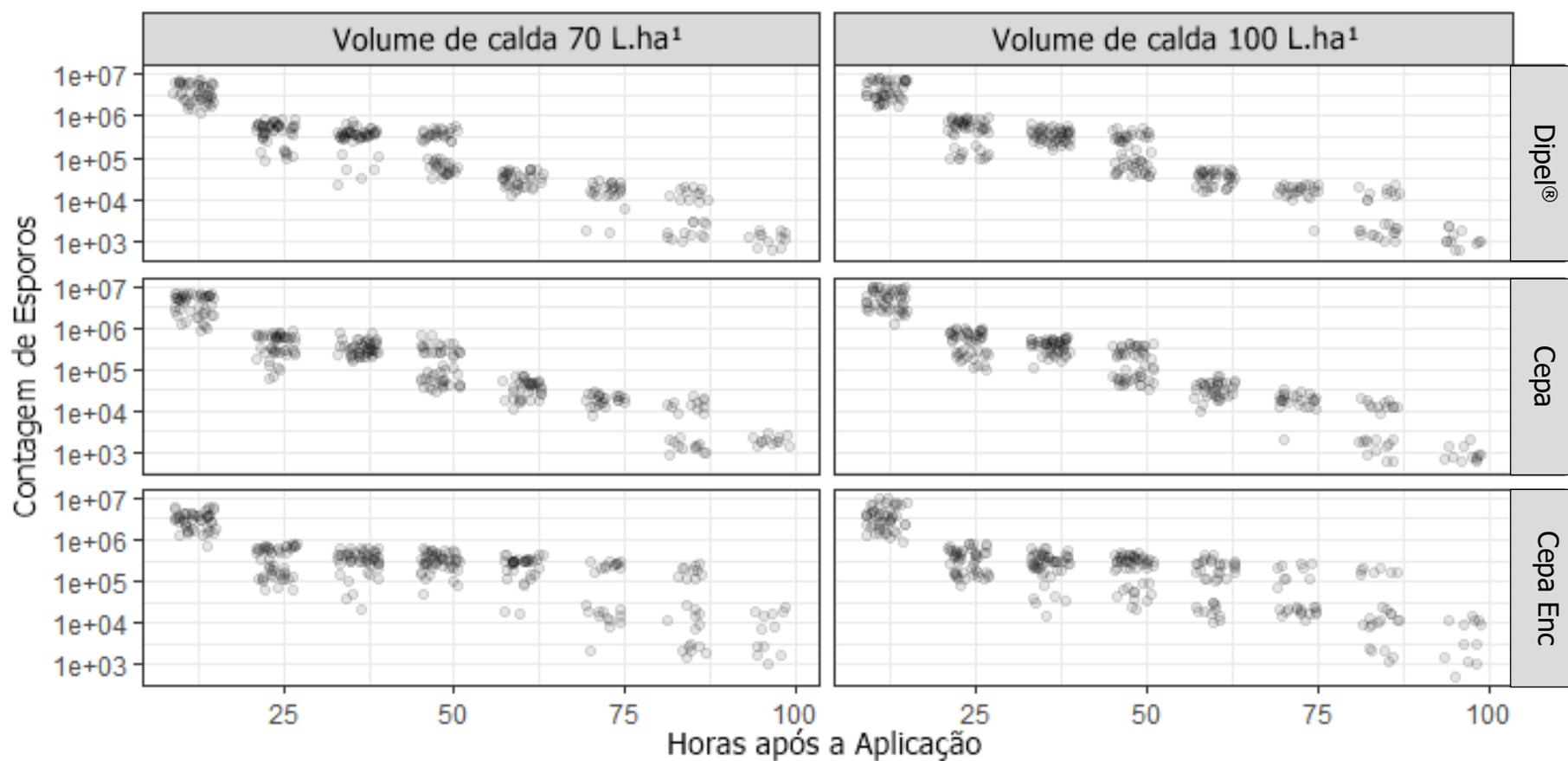


Figura 3: Número de esporos de *Bacillus thuringiensis*, com interação das variáveis volume de calda e produto.

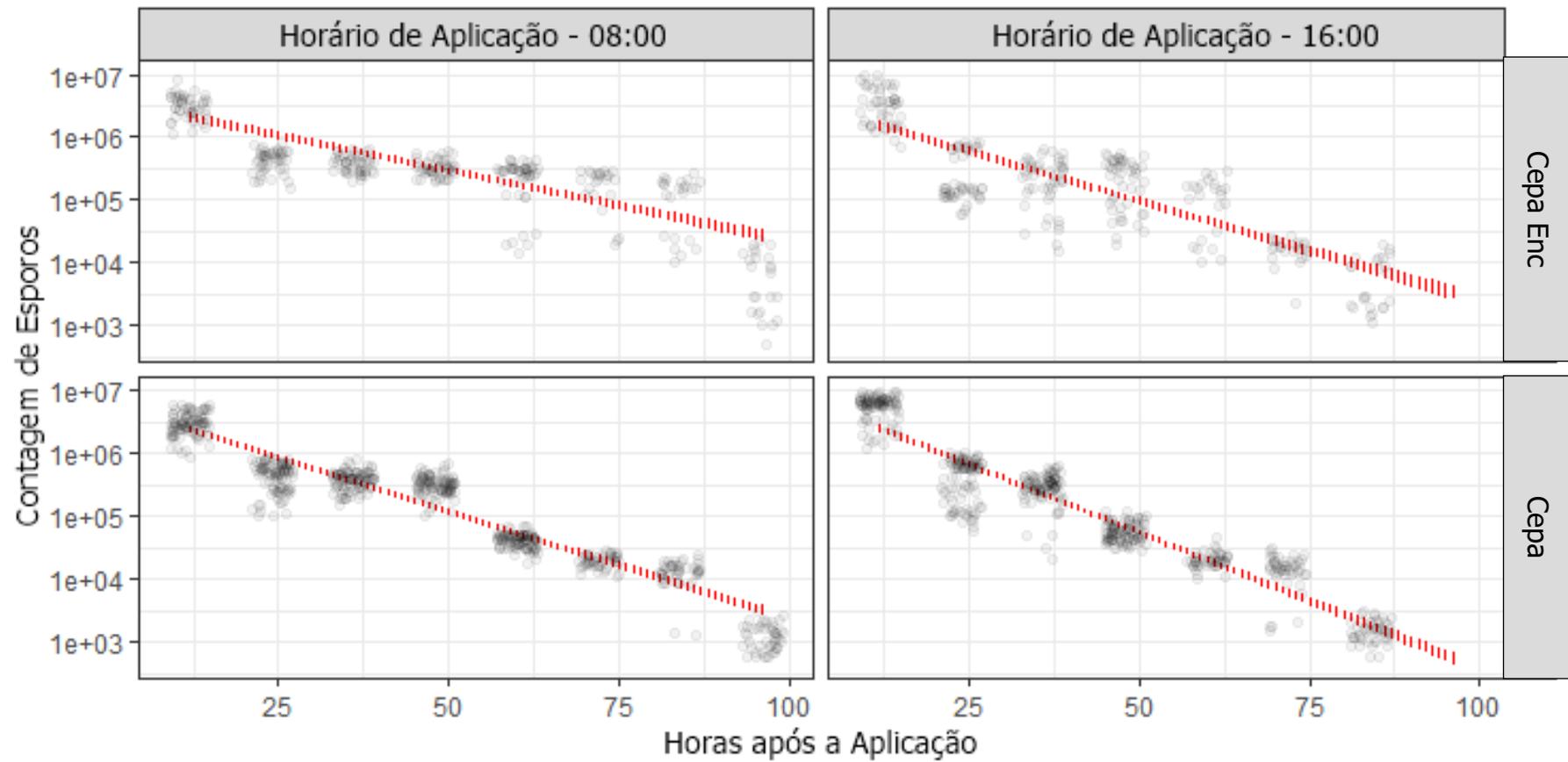


Figura 4 Número de esporos de *Bacillus thuringiensis*, com interação das variáveis horário de aplicação e 2 formulações (encapsulado e isolado).

3.2 Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*

Diferentes dos resultados obtidos para a contagem de esporos, a mortalidade apresentou diferentes valores nos diferentes anos de realização do experimento (GLM: $p < 0.00001$). Isso está relacionado com troca de cepa utilizada de um ano para outro. A cepa Btk HD-1 possui as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A, Cry2B (Mohan and Gujar, 2001) e a cepa Btt HD-125 contém as toxinas Cry1Ab, Cry 1B, Cry 1D e Cry 1E (VALICENTE et al., 2000). Não houve diferença na mortalidade entre a cepa Btt HD-125 e Btt HD-125 encapsulada, além de apresentar uma mortalidade baixa no campo quando comparado a Valicente et al., (2000) que obteve 65% de mortalidade em bioensaio conduzido em laboratório. No entanto, houve diferença quando comparado a cepa Btk HD-1, utilizada no segundo ano de cultivo (Figura 5) e encapsulado (Figura 6). A cepa Btk HD-1 apresentou um incremento 20% na mortalidade de *A. gemmatalis* no segundo ano do ensaio, comparada à cepa Btt HD-125, utilizada no primeiro ano de ensaio. A mortalidade no primeiro ano foi de aproximadamente 40% e no segundo ano aproximadamente 60%.

A partir do modelo linear generalizado aplicado para prever a mortalidade de *A. gemmatalis* em função da persistência, pode-se inferir que a cepa utilizada no segundo ano causou menor mortalidade quando comparado a cepa utilizada no primeiro ano (Figura 5).

A cepa Btk HD-1 encapsulada apresentou controle eficiente da praga no segundo ano quando comparado a cepa Btt HD-125 encapsulada. A partir disso podemos inferir, que a cepa encapsulada poderia ter uma maior persistência e assim um maior controle inicial no segundo ano, quando comparado ao primeiro (Figura 6).

A mortalidade de *A. gemmatalis* foi semelhante para o controle Dipel[®], sem diferença entre os dois anos de aplicação. Através do modelo gerado, pode se observar que o comportamento dos dados seria o mesmo (Figura 7).

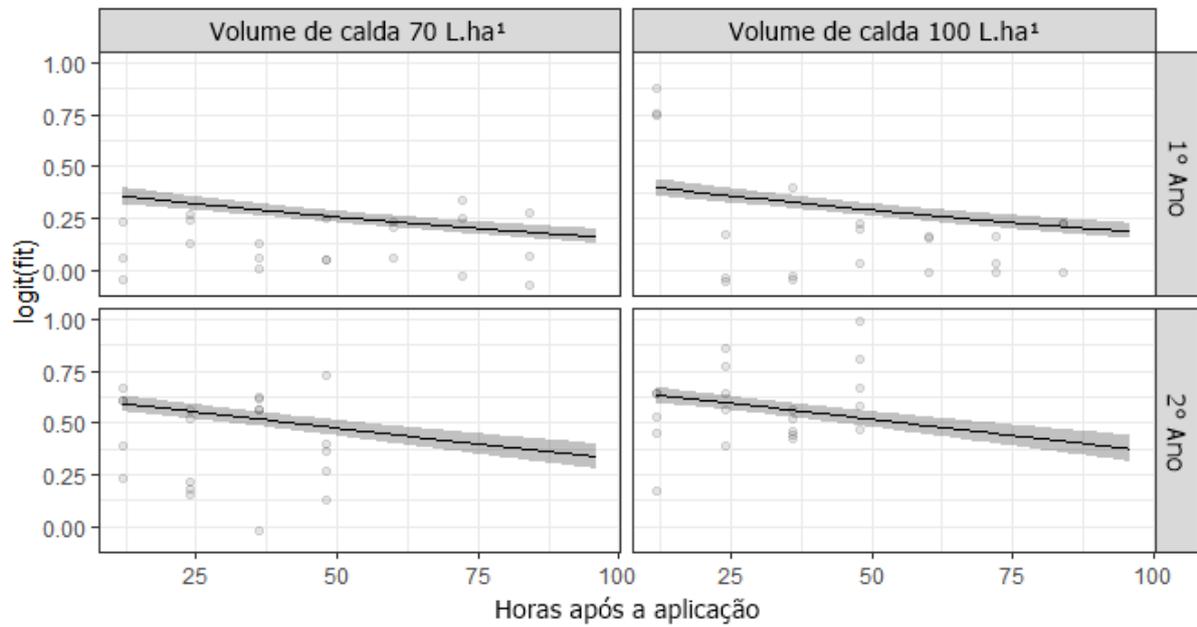


Figura 5- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de volume de calda e ano do experimento, sobre a cepa.

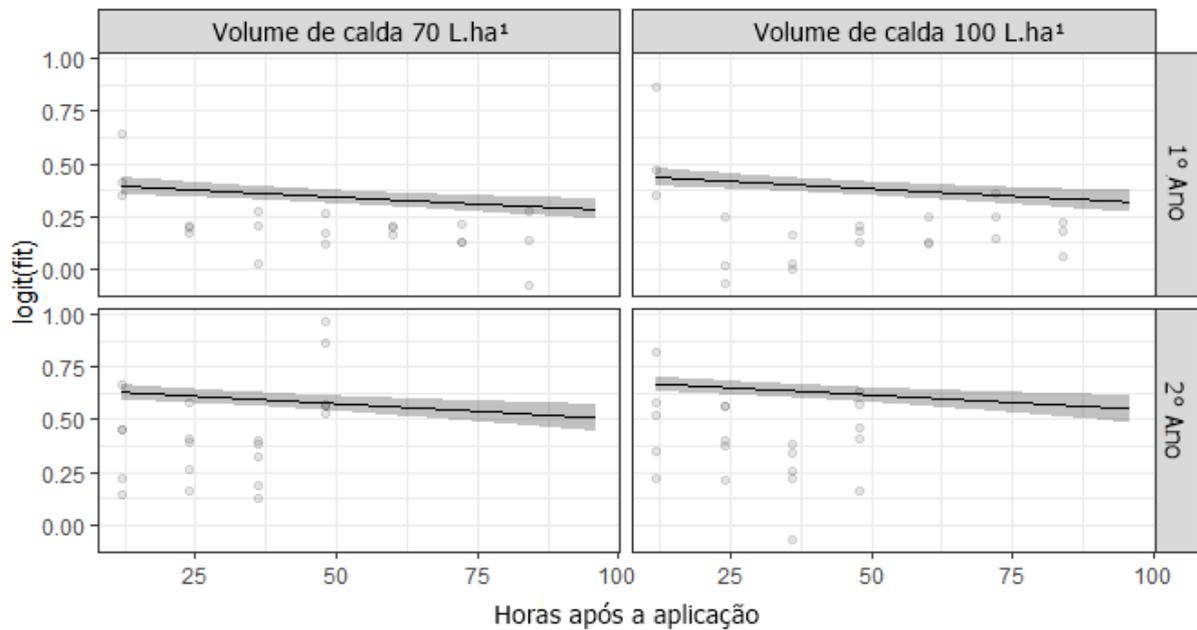


Figura 6- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de volume de calda e ano do experimento, sobre a cepa encapsulada.

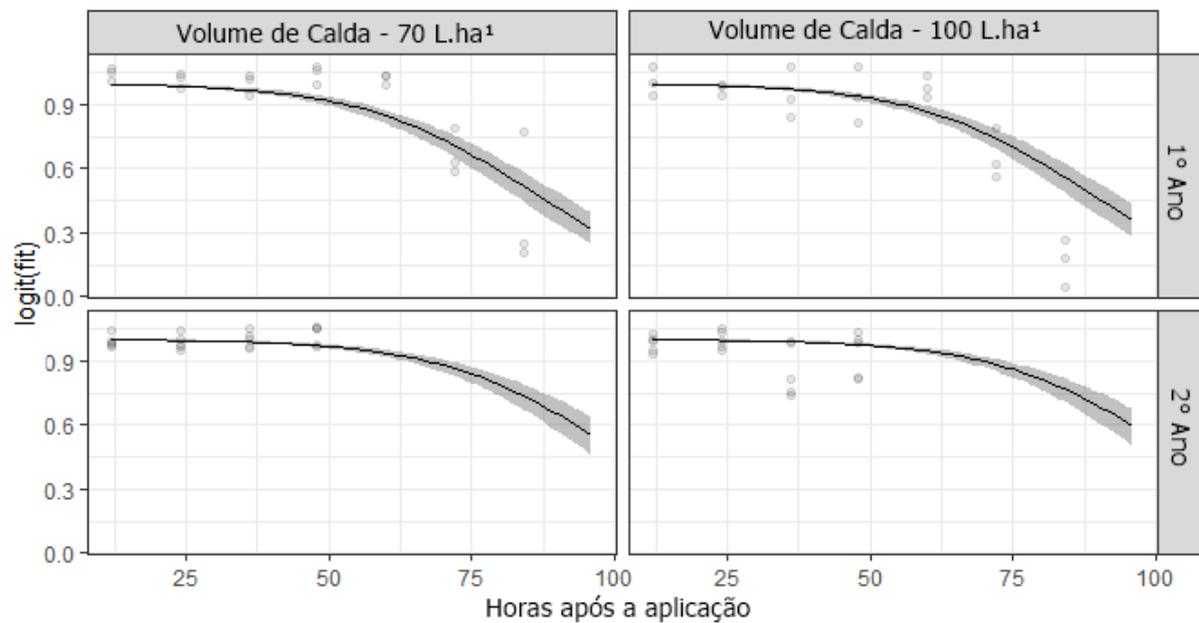


Figura 7- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de volume de calda e ano do experimento, sobre Dipel.

3.2.1 Mortalidade de *A. gemmatalis* no primeiro ano de experimento

A análise dos dados não mostrou diferença na interação entre a vazão e produto (GLM: $p > 0.586082$). Na formulação comercial foi observada uma dispersão de dados nas avaliações de mortalidade de 48h e 60h no volume de calda de 70 L.ha⁻¹, o que não foi observado na volume de 100 L.ha⁻¹. Entretanto, após a avaliação de 60 horas, não foi observada essa diferença. Em relação a controle da formulação comercial, observa-se uma queda considerável na mortalidade de *A. gemmatalis* 72 horas após a aplicação (Figura 8).

A mortalidade de *A. gemmatalis* causada pelas cepas com e sem encapsulamento, não diferiram em relação à volume aplicado. No entanto, na formulação da cepa, foi observado uma tendência de melhor controle para o volume de 100 L.ha⁻¹. Isso pode estar relacionado com uma melhor cobertura da formulação, no volume de 100 L.ha⁻¹. Porém, essa tendência foi observada, somente na primeira avaliação, após a primeira avaliação os dados se comportaram de forma similar, (Figura 8).

A análise de dados mostrou diferença na interação entre o horário de aplicação e produto (GLM: $p < 0.007542$). Neste caso, foi observado diferença entre a Dipel® e a

cepa encapsulada e não encapsulada, entretanto, após 72 horas não houve diferença entre os tratamentos (Figura 9).

O horário de aplicação influenciou de forma mais intensa a mortalidade de *A. gemmatilis* no Dipel®. A aplicação realizada as 16:00 causou maior mortalidade por um período mais longo, com controle próximo a 100% até 60 horas após a aplicação. Ao contrário, no horário de aplicação das 08:00, o controle próximo a 100% foi observado somente até 36 horas da aplicação. Isso mostra que a condição climática no momento da aplicação foi determinante no período residual do produto (Figura 9).

Em relação ao horário de aplicação, relacionando os dados de mortalidade e contagem de esporos, observou-se um maior número de esporos para a aplicação das 08:00 (Figura 2 e Figura 9). Entretanto, a aplicação das 16:00, causou maior mortalidade de *A. gemmatilis* (Figura 9). Esses resultados demonstram que embora o número de esporos seja um indicativo da persistência do Bt em condições de campo o número de esporos não está diretamente relacionado com a mortalidade do inseto-alvo. (Brand, et al 1976). Isso faz sentido, se considerarmos que o principal fator de virulência de Bt são as toxinas Cry, presentes no cristal (Mohn-Salleh et al., 1980) e não os esporos de Bt, embora esses possam contribuir de forma secundária para mortalidade dos insetos (Jakka et al., 2014).

A mortalidade de *A. gemmatilis* causada pela cepa encapsulada e não encapsulada foram semelhantes. A análise de dados não mostrou diferença na interação entre o espectro de gota e Dipel® (GLM: $p>0.8226$), com controle semelhante em ambos os espectros de gota. A cepa encapsulada e não encapsulada apresentaram resultados similares (Figura 10).

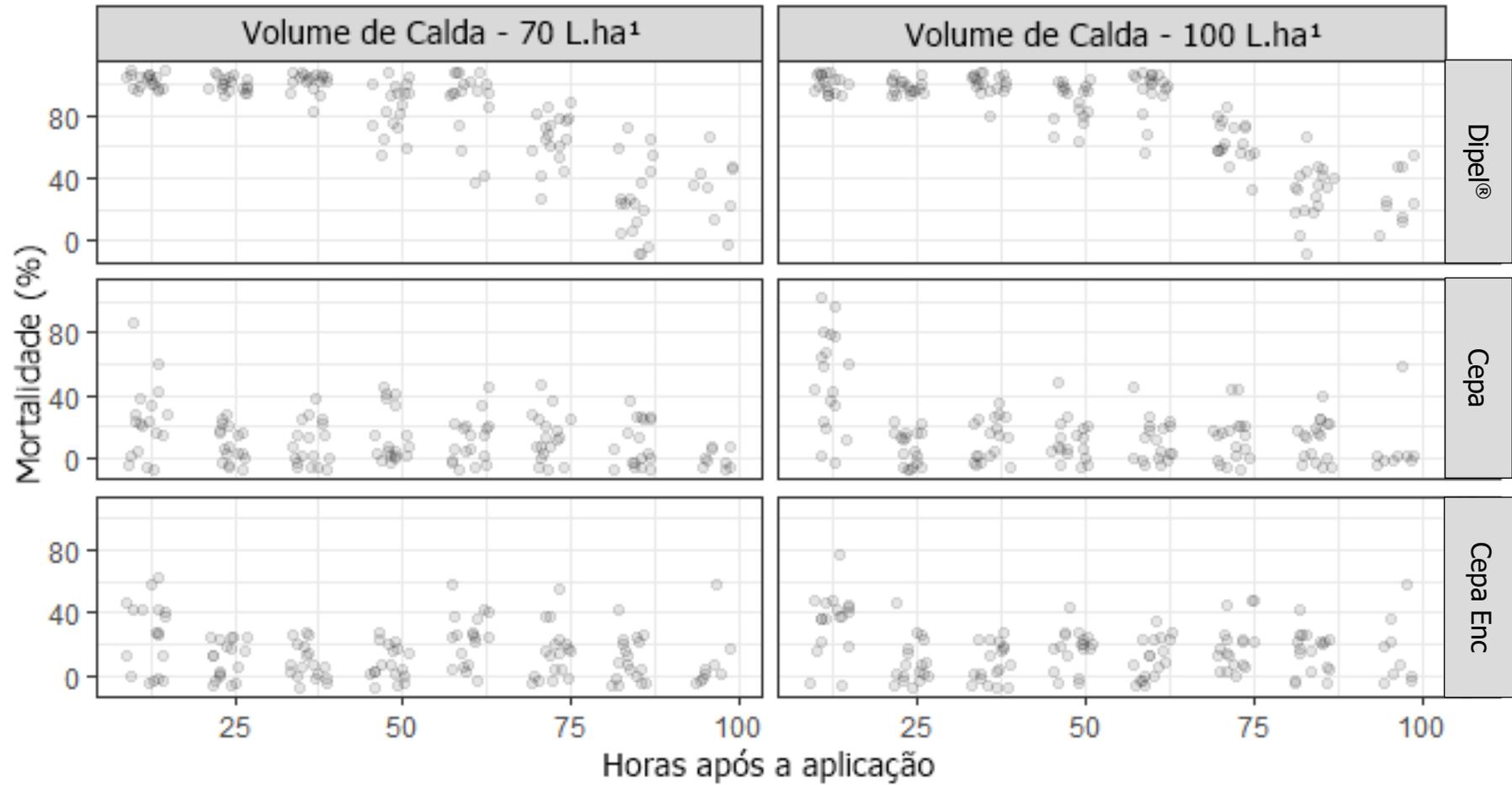


Figura 8- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de volume de calda e produto para o primeiro ano

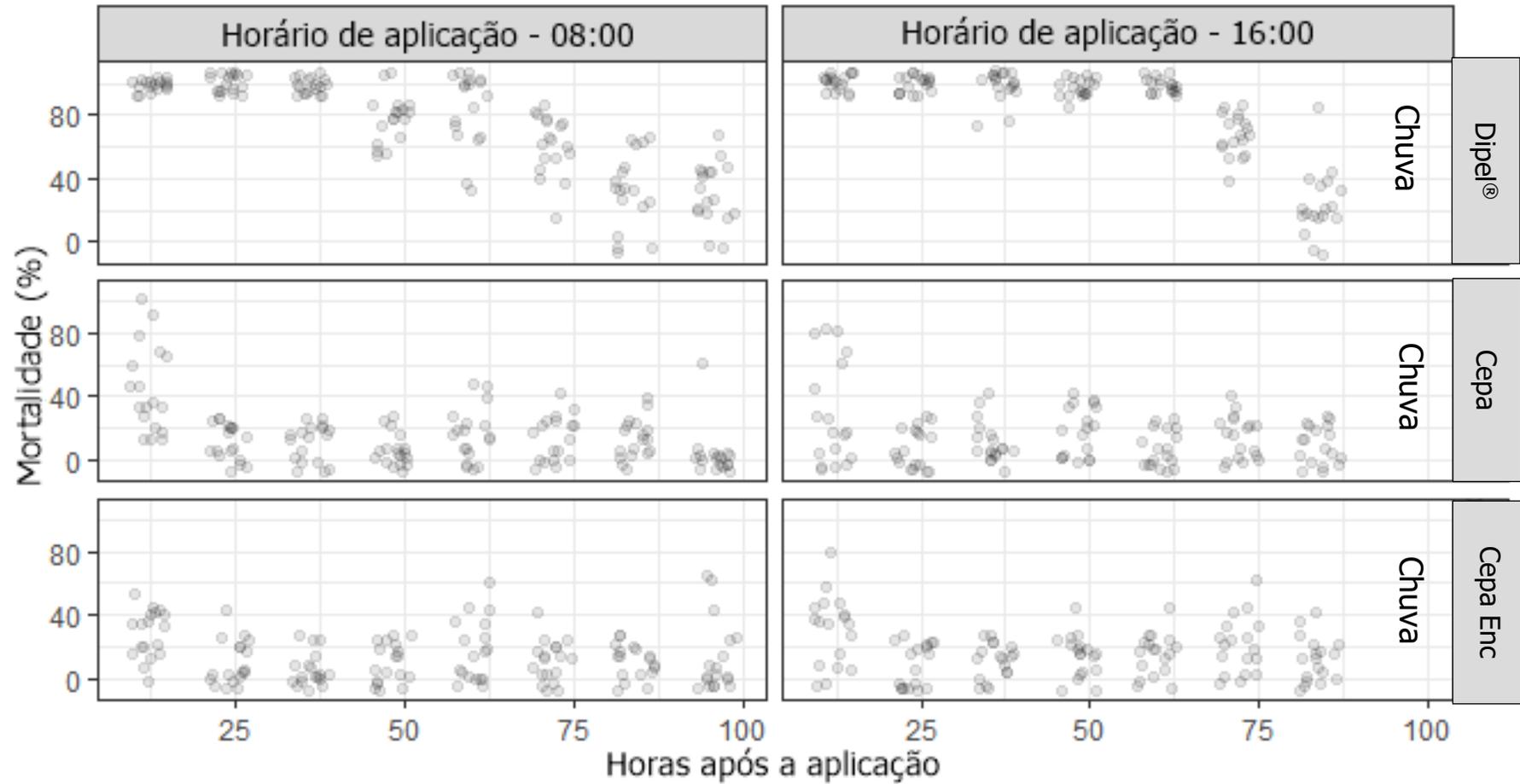


Figura 9- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de horário de aplicação e produto para o primeiro ano

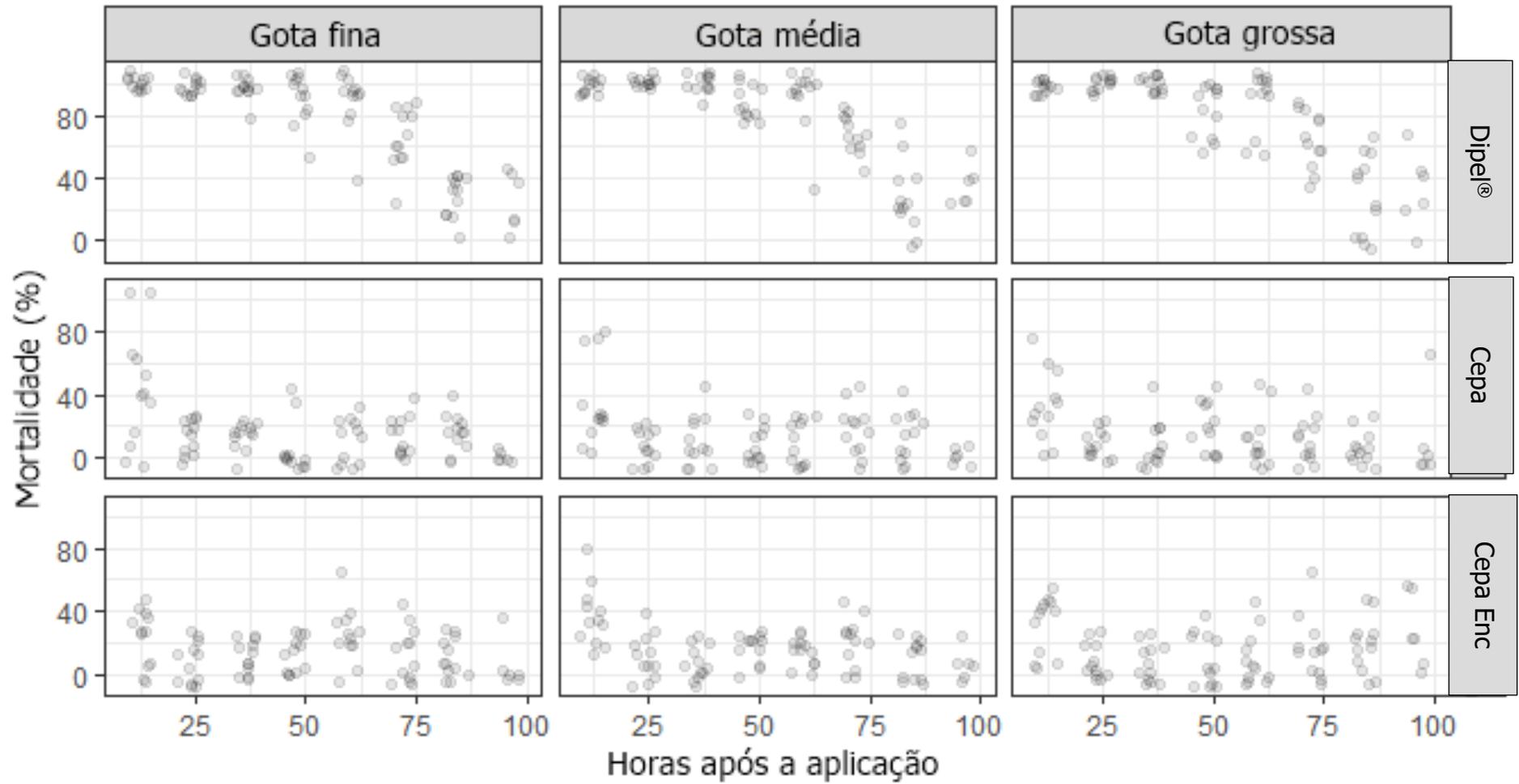


Figura 10- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de espectro de gota e produto produto para o primeiro ano.

3.2.2 Mortalidade de *A. gemmatalis* no segundo ano

A análise dos dados não mostrou diferença na interação entre volume de aplicação e produto (GLM: $p>0.586082$). Devido a reduzida quantidade de avaliações não foi observado decréscimo significativo da mortalidade na formulação comercial, com a mudança do volume, (Figura 11).

A mortalidade de *A. gemmatalis* foi semelhante para a cepa encapsulada e não encapsulada nos dois volumes aplicados. No entanto, o Dipel[®], causou melhor controle quando comparado a formulação da cepa com e sem encapsulamento (Figura 11).

A análise de dados não mostrou diferença na interação entre o horário de aplicação e produto (GLM: $p>0.11002$). No entanto, para o Dipel[®] no horário de aplicação de 08:00 foi observado uma tendência de diminuição da mortalidade de *A. gemmatalis*. No período das avaliações também não foi constatada diferença das formulações da cepa e do encapsulado (Figura 12).

A análise de dados não mostrou diferença na interação entre o espectro de gota e produto (GLM: $p>0.8226$). O Dipel[®], causou maior mortalidade em ambos os espectros de gota, quando comparado as cepas com e sem encapsulamento, para os quais não teve diferença estatística (Figura 13).

Em relação a diferença entre a cepa do segundo ano de experimento e o Dipel[®], não deveria ser observado grande variação na mortalidade, devido ambos produtos conterem a cepa BtkHD-1 como ingrediente ativo. A diferença da mortalidade das formulações pode estar relacionada com os materiais inertes presentes na formulação comercial. Os inertes de um Bt bioinseticida podem influenciar a mortalidade de uma determinada espécie praga, conforme foi descrito para *Spodoptera albula* (Lepidoptera: Noctuidae) por Goncalves et al. (2018).

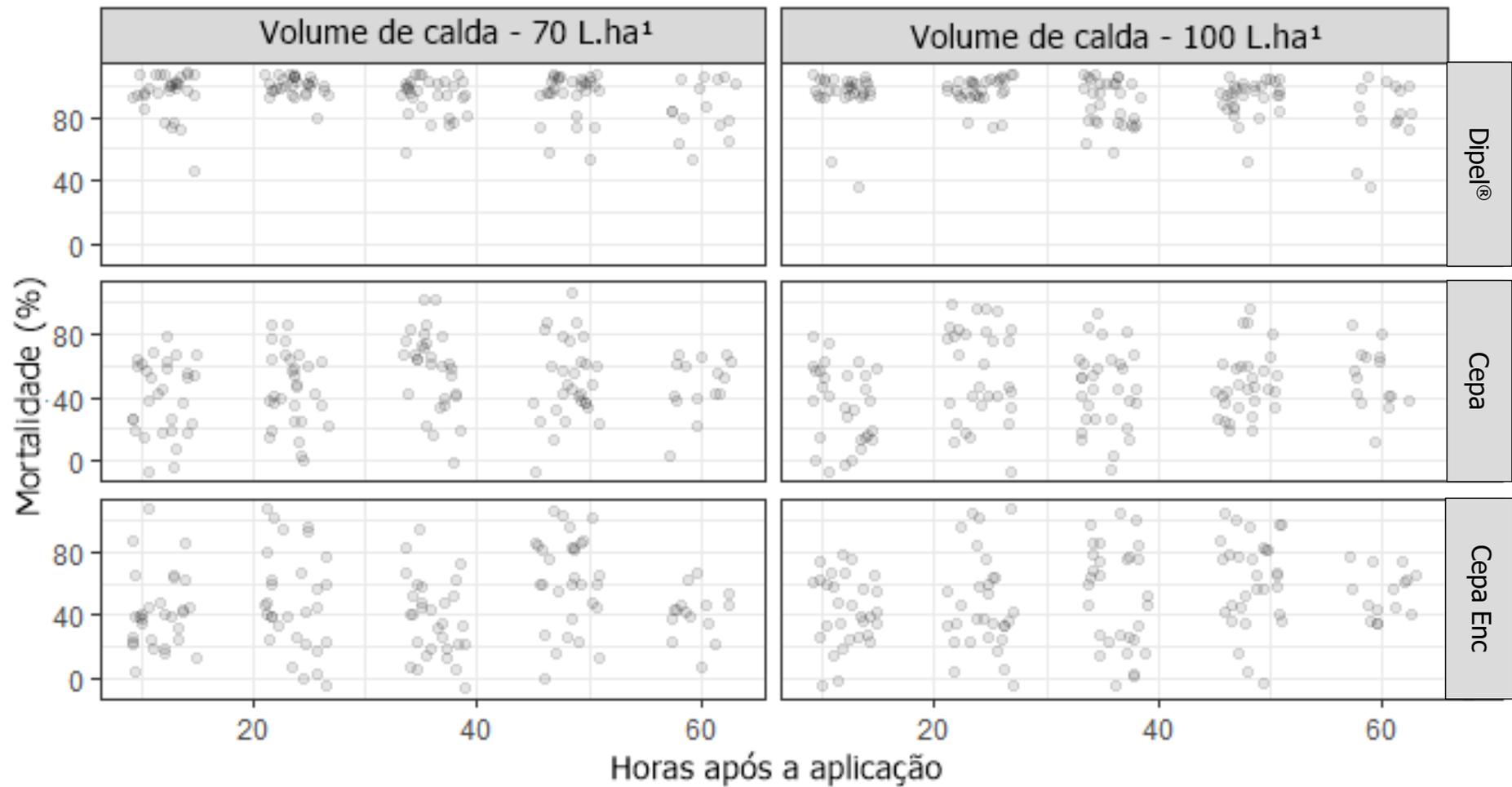


Figura 11- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de volume de calda e produto para o segundo ano.

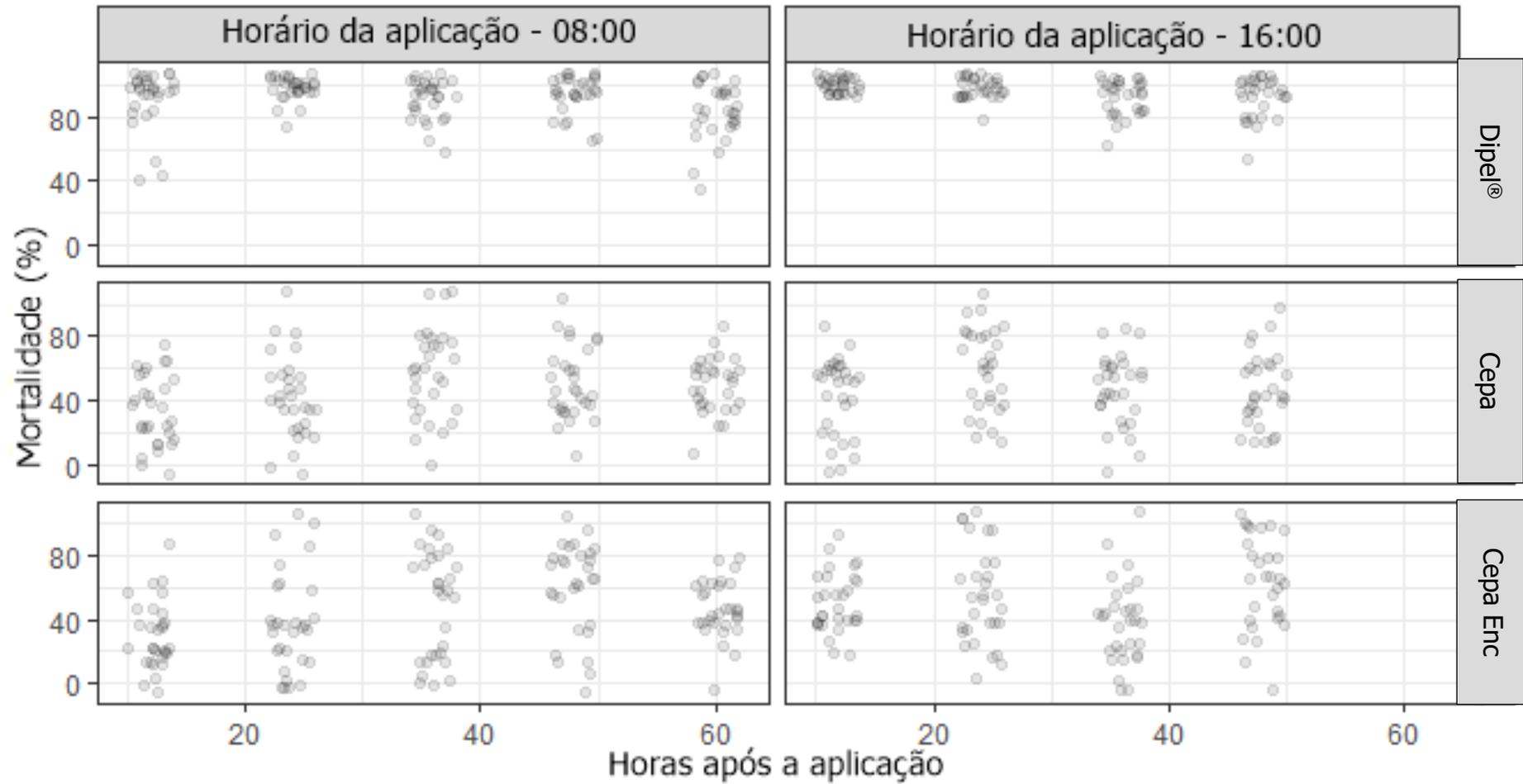


Figura 12- Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de horário de aplicação e produto para o segundo ano.

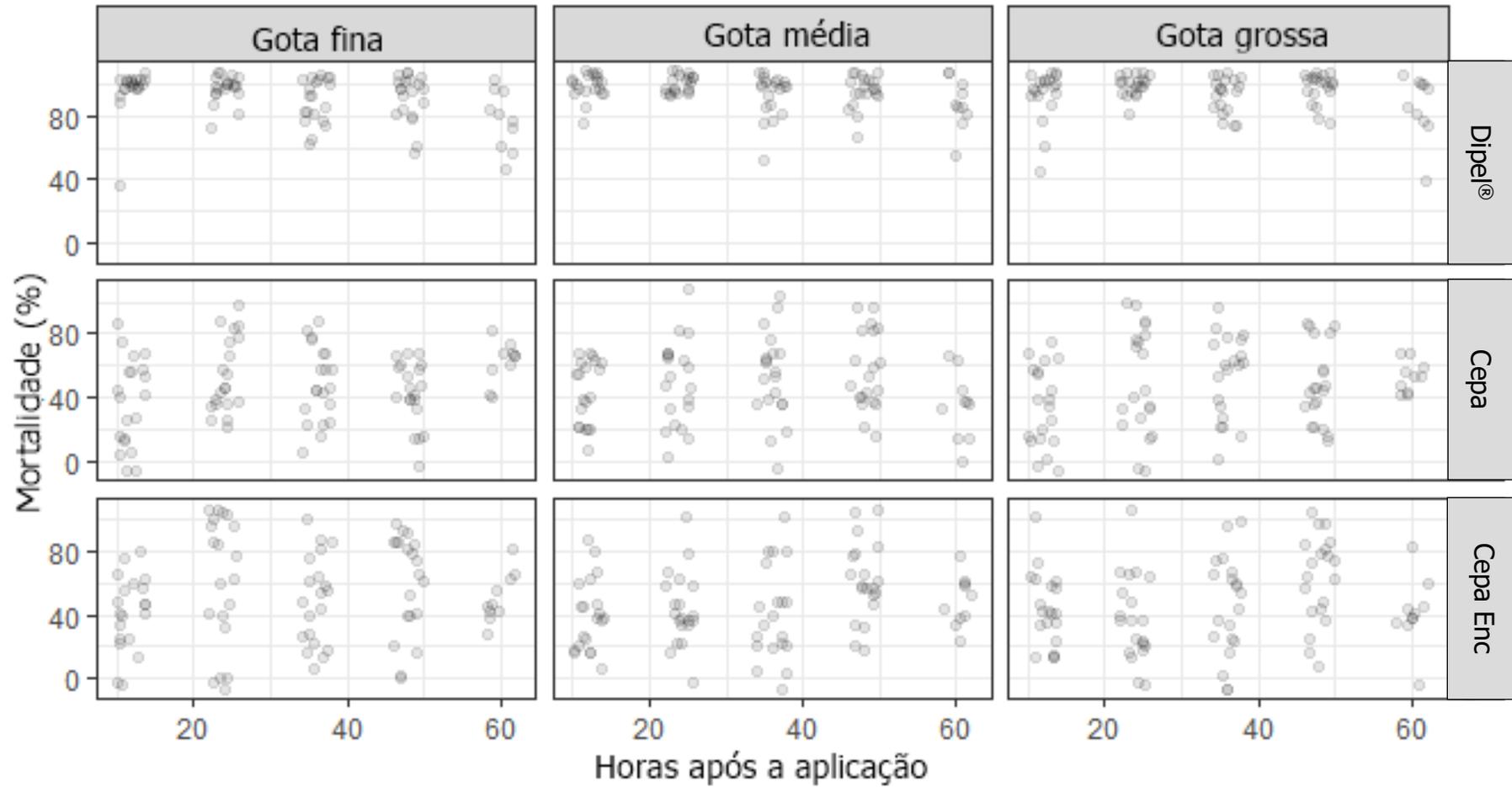


Figura 13 - Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*, com a interação de espectro de gota e produto produto para o primeiro ano.

4 - CONCLUSÕES

Não foi observado diferença na contagem de esporos de Bt em relação aos diferentes produtos, horário de aplicação, volume de calda e espectro de gota avaliados.

O espectro de gotas não apresentou diferença estatística na mortalidade de *A. gemmatalis*.

O horário de aplicação não diferiu estatisticamente sobre a mortalidade de *A. gemmatalis*.

O volume de aplicação não diferenciou estatisticamente sobre a mortalidade de *A. gemmatalis*.

A formulação comercial do Bt bioinseticida (Dipel®) apresentou maior mortalidade em espectro de gota, horário de aplicação e volume de calda quando comparado a cepa encapsulada e não encapsulada.

A cepa encapsulada testada não influenciou a persistência de bioinseticidas Bt em campo.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azambuja R, Degrande PE, Santos RO, Souza EP, Gomes CEC (2015) Effect of Bt Soybean on Larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural Science** 7:90–94.
- Baur ME, Sosa-Gomez DR, Ottea J, Leonard BR, Corso IC, Silva JJ, Temple J, Boethel DJ (2010) Susceptibility to Insecticides Used for Control of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae) in the United States and Brazil. **Journal of Economic Entomology** 103:869–876.
- Becheleni FRC, Campolino ML (2017) Aplicação Biotecnológica da bactéria *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda*. **Revista Brasileira de Ciências da Vida** 5:1-17
- Behle, R., & Birthisel, T. (2014). **Formulations of entomopathogens as biopesticides**. In *Mass Production of Beneficial Organisms* (pp. 483-517). Academic Press.
- Bernardi O, Dourado PM, Carvalho RA, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2014) High levels of biological activity of Cry1Ac protein expressed on MON 87701 × MON 89788 soybean against *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science** 70:588–594.
- Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger GU, Head GP, Omoto C (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68:1083–1091.
- Brand, R. J., Pinnock, D. E., Jackson, K. L., & Milstead, J. E. (1976). Viable spore count as an index of effective dose of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 27(2), 141-148.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49:423–435.
- Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology** 33:161–168.
- Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE (2016) Can Pyramids and Seed Mixtures Delay Resistance to Bt Crops? **Trends in Biotechnology** 34:291–302.
- Carvalho VFP, Vacari AM, Pomari AF, De Bortoli CP, Ramalho DG, De Bortoli SA (2012) Interaction between the predator *Podisus nigrispinus* (Hemiptera: Pentatomidae) and the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. **Environmental entomology** 41:1454-1461.

Collier FA, Elliot SL, Ellis RJ (2005) Spatial variation in *Bacillus thuringiensis/cereus* populations within the phyllosphere of broad-leaved dock (*Rumex obtusifolius*) and surrounding habitats. **FEMS Microbiology Ecology** 54:417–425.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números** (2018) Londrina: Embrapa Soja. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>. Acesso em: 02 jul 2019

FORIM, Moacir Rossi et al. **Processo de obtenção de nanopartículas biopoliméricas contendo óleo e extratos de Azadirachta indica a. juss (neem), nanopartículas biopoliméricas e micropartículas em pó.** 31 jul. 2014.

Frye, R. D., Scholl, C. G., Scholz, E. W., & Funke, B. R., 1973. Effect of weather on a microbial insecticide. *J. Invertebr. Pathol.* 22, 50-54.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology** 30:250–258.

Gómez SDR, Ferreira BSC, Campo CBH, Corso IC, Oliveira LJ, Moscardi F, Panizzi AR, Bueno AF, Hirose E, Roggia S (Eds.) (2014). Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Embrapa Soja 100p.

Gonçalves, K.C., Leal, A., Júnior, B., Duarte, R.T., 2018. *Spodoptera albula* susceptibility to *Bacillus thuringiensis* -based biopesticides. **Journal of Invertebrate Pathology** 157, 147–149.

Gould F (2002) Sustainability of Transgenic Insecticidal Cultivars: Integrating Pest Genetics and Ecology. **Annual Review of Entomology** 43:701–726.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (2015) Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487–488.

Guedes JV, Fiorin RA, Stürmer GR, Prá ED, Perini CR, Bigolin M (2012) Sistemas de aplicação e inseticidas no controle de *Anticarsia gemmatalis* na soja. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi** 16:910-914

Haase S, McCarthy CB, Ferrelli ML, Pidre ML, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Development of a recombination system for the generation of occlusion positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* Multiple Nucleopolyhedrovirus. **Viruses** 7:1599–1612.

Horikoshi RJ, Bernardi O, Amaral FSA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistant to Bt maize. **Journal of Invertebrate Pathology** 161:1–6.

Huang F, Andow DA, Buschman LL (2011) Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 140:1–16.

Ignoffo, C. M., Hostetter, D. L., & Pinnell, R. E., 1974. Stability of *Bacillus thuringiensis* and *Baculovirus heliothis* on soybean foliage. *Environ. Entomol* 3, 117-119.

Jakka SRK, Knight VR, Jurat-Fuentes JL (2014) *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Invertebrate Pathology** 122:52–54.

Jurat-Fuentes, J. L., & Crickmore, N. (2017). Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of invertebrate pathology**, 142, 5-10.

Lacey LA (2017) Entomopathogens used as microbial control agents. In.: Lacey LA (Ed.) **Microbial control of insect and mite pests**. United States:Academic Press, p. 3-12.

Leong KLH, Cano RJ, Kubinski AM (2015) Factors Affecting *Bacillus thuringiensis* Total Field Persistence. **Environmental Entomology** 9:593–599.

Machado V, Fiuza LM (2011) Manejo da resistência: Na era das plantas transgênicas. Navon A (2000) *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - Reality and prospects. **Crop Protection** 19:669–676.
Oecologia Australis 15:291–302.

Mohan, M., Gujar, G.T., 2001. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Crop Protection** 20, 311–316. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00157-5)

Mohd-Salleh, M. B., Beegle, C. C., Lewis, L. C., 1980. Fermentation media and production of exotoxin by three varieties of *Bacillus thuringiensis*. **J. Invertebr. Pathol.** 35, 75-83

Omoto C, Bernardi O (2015) Estratégias de manejo podem prolongar vida útil das tecnologias de milho Bt. **Visão agrícola** 13:107–109.

Panizzi AR (2013) History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. **Neotropical Entomology** 42:119–127.

Paula AR, Carolino AT, Paula CO, Samuels RI (2011). The combination of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with the insecticide Imidacloprid increases virulence against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasites and Vectors** 4:1–8.

Pinnock DE, Brand RJ, Milstead JE, Jackson KL (1975) Effect of tree species on the coverage and field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology** 25:209–214.

Pinnock, D. E., Brand, R. J., & Milstead, J. E., 1971. The field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores. *J. Invertebr. Pathol.* 18, 405-411.

Raymond B, Federici BA, Raymond B (2018) Reply to the article “In defense of *Bacillus thuringiensis*, the safest and most successful microbial insecticide available to humanity-a response to EFSA.” **FEMS microbiology ecology** 94: 1–8.

Rodríguez, A. P. G., Martínez, M. G., Barrera-Cortés, J., Ibarra, J. E., & Bustos, F. M. (2015). Bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* spores encapsulated with amaranth derivatized starches: studies on the propagation “in vitro”. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(2), 329-339.

Salama, HS, Foda, MS, Dulmage, HT e El-Sharaby, A. (1983). Novos meios de fermentação para a produção de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 41 (1), 8-19.

Sayyed AH, Ferre J, Wright DJ (2000) Mode of inheritance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* in a diamondback moth (*Plutella xylostella*) population from Malaysia. **Pest Management Science** 56:743–748.

Silva AT, Pratisoli D, Carvalho JR, Santos HJGS, Paes JPP, Bueno RCOF, Bueno ADF (2012) *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Parasitism of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) Eggs Under Different Temperatures. **Annals of the Entomological Society of America** 105:82–89.

Silva DM, Bueno AF, Andrade K, Stecca CS, Neves PMOJ, Moscardi F (2016) Selectivity of organic compounds to the egg parasitoid *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Platygastridae). **Semina: Ciências Agrárias** 37:55–66.

Sosa-Gómez DR (2004) Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology** 27: 378-384.

Sundaram, A., Sundaram, K.M.S., Sloane, L., 1996. Spray deposition and persistence of a *Bacillus thuringiensis* formulation (Foray® 76b) on spruce foliage, following aerial application over a northern Ontario forest. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes** 31, 763–813.

Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW, Heckel DG (1994) Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology** 60:4627–4629.

Valicente, F. H., Barreto, M. R., de Vasconcelos, M. J., de FIGUEIREDO, J. E., & Paiva, E. (2000). Identificação através de PCR dos genes CryI de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). ***Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)***.

VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. HC. (2008)Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)-based biopesticide. ***Neotropical entomology***, v. 37, n. 6, p. 702-708,.

Vemmer M, Patel AV (2013) Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. ***Biological Control*** 67:380–389.

Yano SA, Specht A, Moscardi F, Carvalho RA, Dourado PM, Martinelli S, Head GP, Sosa-Gómez DR (2016) High susceptibility and low resistance allele frequency of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to Cry1Ac in Brazil. ***Pest management science*** 72:1578–1584.

Zancanaro PO, Buchweitz ED, Junior ALB, Moro JR (2012) Avaliação de tecnologias de refúgio no cultivo de milho transgênico. ***Pesquisa Agropecuaria Brasileira*** 47:886–891.

6 CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo esperava-se um incremento de mortalidade de *A. gemmatalis* na cepa encapsulada em relação a cepa sem encapsulamento. Temos duas hipóteses para a falta desse incremento: (1) o método de encapsulamento não foi adequado; embora o uso de *spray drier* no encapsulamento de agentes biológicos seja amplamente relatado (Behle, et al 2014 Rodríguez, 2015; (2) os inertes presentes no bioinseticida Dipel® proporcionam maior proteção ao cristal, responsável por grande parte da atividade inseticida do Bt em comparação ao processo de encapsulamento.

Este é um trabalho pioneiro para as condições agrícolas brasileiras e contribuiu de forma significativa para o entendimento da relação persistência do Bt ao longo do tempo, no entanto não é um trabalho conclusivo. Os resultados demonstram a necessidade de estudos para aprimorar a relação do cristal, persistência e toxicidade, pois até o presente momento o esporo é um indicativo da persistência, mas este estudo demonstrou que não reflete a atividade toxica do Bt ao longo do tempo.

Mais trabalhos relacionados a persistência de *Bacillus thuringiensis* devem ser realizados, principalmente em regiões tropicais, visto que a literatura avaliando a persistência em clima tropical são escassas, pois os trabalhos existentes, na maioria foram conduzidos em espécies florestais, no hemisfério norte, com condições climática, bastante diferentes das encontradas no Brasil.

Além disso é necessário também desenvolver metodologias que são capazes de avaliar a influência de fatores climáticos na degradação do cristal, visto a grande contribuição que o mesmo tem para a mortalidade.

A pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações irá auxiliar na maior adoção de bioinseticidas Bt para o controle de pragas. Como exemplo, o controle de populações resistentes a cultivos Bt, uma vez que a pesquisa relacionadas a uso de Bt para tal finalidade tem ganhado destaque. Além de trabalhos avaliando a compatibilidade do bioinseticida Bt, com outras moléculas inseticidas, como moléculas utilizadas para o controle de plantas daninhas e doenças.

Diante do exposto, trabalhos futuros devem avaliar qual a interferência da condição climática sobre a degradação do cristal, alguns trabalhos mostram que a

radiação solar causa a quebras de alguns aminoácidos como o triptofano e a histidina, e quebra pode estar relacionada com a perda de atividade inseticida (Pozsgay et al.1987), a quebra de aminoácidos pode resultar na alteração da configuração tridimensional da proteína Cry (Cohen et al. 1991)

Com a alteração da configuração pode ocorrer a perda de sua atividade biológica, visto que o modo de ação de Bt, existem varias etapas determinantes para para que ocorre a morte do inseto, a alteração da estrutura pode interferir em alguma etapa, e ocorrer perda da atividade tóxica do cristal (Jurat-Fuentes e Crickmore 2014).