

Boletim de Pesquisa 216

e Desenvolvimento ISSN 1676 - 340

Agosto, 2008

Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 216

Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

Karen Bianchi dos Santos

Pedro Neves

Ana Maria Meneguim

Rachel Bianchi dos Santos

Walter Jorge dos Santos

Gislaine Villas Boas

Vinicius Dumas

Erica Martins

Lílian Botelho Praça

Rose Monnerat

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Brasília, DF
2008

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3448-4600 Fax: (61) 3340-3624 <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Sergio Mauro Folle*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Mariante*

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Rosameres Rocha Galvão*

Editoração eletrônica: *Daniele Alves Loiola*

1ª edição

1ª impressão (2008):

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

S 464 Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) Lepidóptera: Noctuidae). / Karen Bianchi dos Santos ... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- p. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340 ; 216).

1. Praga. 2. Algodão. 3. Inseto. I. Santos, Karen Bianchi dos Santos. II. Série.

575.18 – CDD 21

©Embrapa, 2008

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
Introdução	8
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12

Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

*Karen Bianchi dos Santos*¹

*Pedro Neves*¹

*Ana Maria Meneguim*²

*Rachel Bianchi dos Santos*¹

*Walter Jorge dos Santos*²

*Gislaine Villas Boas*¹

*Vinicius Dumas*³

*Erica Martins*³

*Lilian Botelho Praça*³

*Rose Monnerat*³

RESUMO

Entre as pragas de plantas cultivadas o complexo de espécies do gênero *Spodoptera* é um dos mais importantes. Esse gênero é composto por insetos polívoros que atacam, dentre outras culturas, o algodão, o milho, a soja e a mamona. *Spodoptera frugiperda* tem sido relatada como praga primária em algodão, e as espécies *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) têm sido relatadas como pragas importantes de algodão e soja. Este estudo teve por objetivo selecionar e caracterizar estirpes de *Bacillus thuringiensis* altamente patogênicas a *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda*, além de identificar proteínas Cry tóxicas a essas espécies. Com estirpes que apresentaram toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera foram avaliadas através de bioensaios e as mais tóxicas foram caracterizadas através de análises morfológicas, bioquímicas e moleculares e formuladas para execução de testes preliminares de laboratório. As estirpes S1905, S608, BR9, BR10, BR37 e BR45 causaram alta mortalidade sobre *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*. Como os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2* estavam presentes em todas as estirpes tóxicas, as respectivas toxinas por eles codificadas foram testadas individualmente em cada espécie. As proteínas Cry apresentaram diferentes níveis de toxicidade entre as espécies

¹ Universidade Estadual de Londrina

² Instituto Agrônomo do Paraná

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

estudadas, sendo que Cry1Aa e Cry1Ab foram as mais tóxicas a *S. cosmioides*, Cry2A foi a mais tóxica a *S. eridania* e Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2A foram tóxicas a *S. frugiperda*. Cry1Ac, presente em alguns algodões transgênicos como o Bollgard I, apresentou pouca toxicidade às três espécies estudadas.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera frugiperda*, proteína Cry.

ABSTRACT

Among the pests of cultivated plants, the *Spodoptera* species complex is one of the most important. This genus is composed by poliphagous insects that attack, among other cultures, the cotton, the corn, the soy and the castor bean. *Spodoptera frugiperda* has been notified as a primary pest in cotton, and the *Spodoptera eridania* (Cramer) and *Spodoptera cosmioides* (Walker) species have been notified as important pests in cotton and soy. This study focused on selecting and characterizing *Bacillus thuringiensis* strains highly pathogenic to *S. cosmioides*, *S. eridania* and *S. frugiperda*, besides identifying Cry proteins toxic to these species. One hundred strains that presented toxicity Lepidoptera were evaluated through bioassay and the more toxic ones were characterized through morphologic, biochemical and molecular analysis and formulated for execution in preliminary laboratory tests. Since the *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* and *cry2* genes were present in all the toxic strains, the respective toxins codified by them were individually tested in each species. The Cry proteins presented different levels of toxicity among the studied species, being Cry1Aa and Cry1Ab the most toxic to *S. cosmioides*, Cry2A the most toxic to *S. eridania* and Cry1Aa, Cry1Ab and Cry2A toxic to *S. frugiperda*. Cry1Ac, present in some transgenic cotton like the Bollgard I, presented low toxicity to the 3 studied species.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera frugiperda*, proteína Cry.

Introdução

O complexo de espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera:Noctuidae) tem demonstrado elevado potencial de dano sobre diversas plantas cultivadas. Este gênero ataca as culturas do algodoeiro, milho, soja e têm sido referido com freqüência em cultivos de mamona, sorgo, tomate, hortaliças e frutíferas, danificando, através da alimentação, diferentes órgãos das plantas, ocasionando prejuízos significativos (KING e SAUNDERS, 1984; NORA et al., 1989; BAVARESCO et al., 2003; SANTOS, 2007). No Brasil, *Spodoptera frugiperda* (Smith) é considerada praga primária de milho e algodão (SANTOS, 1997; SILVIE et al., 2001; SANTOS, 2007) e as espécies *Spodoptera eridania* (Cramer) e *Spodoptera cosmioides* (Walker) estão sendo relatadas como pragas importantes de algodão e soja (SANTOS, 2007). A ocorrência das espécies em sistemas agrícolas constituídos de soja, milho e algodão, os quais fornecem uma contínua oferta de alimento, tem demandado aplicações freqüentes e sucessivas de inseticidas, onerando os custos de controle, e possibilitando o surgimento de resistência, como também danos ao ambiente e intoxicação para os operadores agrícolas.

Entre as alternativas de controle que minimizam os problemas de impacto ambiental, destaca-se a utilização de *Bacillus thuringiensis* Berliner. Esta bactéria gram-positiva produz inclusões cristalinas compostas por proteínas Cry, durante o processo de esporulação. As proteínas sintetizadas pela bactéria são tóxicas para larvas de insetos e, por serem altamente específicas na sua atividade, não causam danos a insetos não-alvo, a vertebrados e ao meio ambiente (KRIEG e LANGENBRUCH, 1981; HOFTE e WHITELEY, 1989; MONNERAT e BRAVO, 2000). Em função disso, produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* são utilizados no controle de insetos pragas e vetores de doenças (BOREM, 2005; VILAS-BOAS et al., 2007) e alguns de seus genes estão sendo inseridos em culturas de algodão, milho, soja, dentre outros, chamadas plantas Bt (BARROSO e HOFFMANN, 2007).

Devido à sua importância dentre as espécies do gênero, muitos trabalhos têm sido realizados para selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. frugiperda* (HERNANDEZ, 1988; LOPES-EDWARDS et al., 1999; MONNERAT et al., 2007), porém não há relatos de trabalhos de prospecção de estirpes desta bactéria sobre *S. eridania* e *S. cosmioides*. Assim, o presente estudo teve como objetivos selecionar e caracterizar estirpes de *B. thuringiensis* patogênicas a *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*, determinar o grau de susceptibilidade dessas espécies a algumas proteínas Cry e determinar os possíveis impactos de bioinseticidas ou de plantas Bt nesse complexo de insetos.

Material e Métodos

Insetos: As colônias das espécies *S. eridania* e *S. cosmioides* foram iniciadas com indivíduos provenientes de lavouras de algodoeiro dos estados do Mato Grosso e Bahia, respectivamente. A criação de *S. frugiperda* foi iniciada com indivíduos provenientes de lavouras de algodoeiro do estado do Paraná. A partir desses indivíduos, iniciou-se a criação estoque das três espécies estudadas, em dieta artificial à base de feijão-carioca, levedo de cerveja e gérmen de trigo (PARRA, 2001). A criação foi realizada no Instituto Agrônomo do Paraná, em câmara climatizada à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Para a obtenção de ovos, adultos foram colocados em gaiolas de PVC (10 cm de diâmetro por 20 cm de altura), fechadas na extremidade superior com filó e na inferior com placa de Petri. Os adultos foram alimentados diariamente com solução aquosa de mel a 10% (SANTOS et al., 2005). A partir da criação massal, foram obtidos ovos que originaram as lagartas de 2ª geração em laboratório, utilizadas para os bioensaios.

Estirpes de *B. thuringiensis*: Cem estirpes de *B. thuringiensis*, pertencentes aos bancos de Entomopatógenos da Universidade Estadual de Londrina e da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (MONNERAT et al., 2007) originárias de amostras de solo e água de diferentes regiões do país e previamente identificadas como patogênicas a espécies da ordem Lepidoptera, foram utilizadas neste trabalho.

Bioensaios contra *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera frugiperda*: Foram realizados dois tipos de bioensaios, o seletivo, para selecionar estirpes patogênicas e o de dose, para determinar a concentração letal necessária para matar 50% dos insetos testados (CL_{50}). Os bioensaios seletivos foram realizados espalhando-se 150 μL da mistura de esporos e cristais obtida a partir do cultivo de cada estirpe de *B. thuringiensis* em meio NYSM (YOUSTEN, 1984) em agitador rotativo a 30°C , 200 rpm por 72 horas, em 6 ml de dieta artificial (PARRA, 2001) distribuída previamente em recipientes plásticos de 100 ml. Após a secagem da mistura de esporos e cristais sobre a dieta, dez lagartas de segundo estágio foram colocadas em cada recipiente, num total de três repetições por estirpe. Em seguida os insetos foram deixados em câmara climatizada à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, UR de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 14h. Como testemunha, três recipientes foram mantidos sem a bactéria. O procedimento de bioensaio seletivo foi o mesmo para as três espécies testadas e foi repetido duas vezes. A quantificação das lagartas mortas foi realizada no quinto dia após o início do bioensaio. As estirpes que causaram no mínimo 70% de mortalidade foram selecionadas para a continuidade do trabalho.

A concentração letal (CL₅₀) foi determinada utilizando-se suspensões liofilizadas de esporos e cristais. As estirpes foram cultivadas de acordo com o método acima descrito, centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min. a 4°C, congeladas “overnight” e liofilizadas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock por 18 h. Posteriormente, concentrações decrescentes (entre 100 e 0,01 µg/ml) do material liofilizado diluído em água estéril foram preparadas e 150 µL dessas suspensões foram aplicadas sobre 6 ml da dieta artificial dos insetos, distribuída em recipientes plásticos de 100 ml, como descrito no ensaio anterior. Nos bioensaios de *S. frugiperda* as lagartas foram individualizadas para evitar canibalismo. Os bioensaios foram repetidos três vezes e mantidos em câmara climatizada à temperatura de 27 ± 2° C, UR de 60 ± 10% e fotofase de 14 h. Os dados de mortalidade foram avaliados no quinto dia após o início do ensaio e submetidos a análise de Probit (FINNEY, 1971), para a determinação da concentração letal.

Bioensaios com formulações à base das estirpes mais tóxicas: Três estirpes de *B. thuringiensis* foram selecionadas para servirem como base de um produto pré-formulado. Cada uma delas foi previamente inoculada em placas de Petri em meio sólido (NYSM) e incubadas em estufa a 27°C durante 12 horas. Em seguida, uma amostra de cada colônia foi inoculada em erlenmyer de 4 L com 1 L de meio de cultura (NYSM) e incubada em incubador rotativo à temperatura de 30 °C, sob agitação de 200 rpm por 12 horas. O material crescido foi transferido para um reator de 10 L contendo 09 litros de meio de produção utilizado rotineiramente na Bthek Biotecnologia. Procedeu-se a fermentação por 10 horas, a 30 °C com agitação e aeração de forma a ter o oxigênio dissolvido em 10 a 15% da saturação. Por fim, foi realizada a transferência de 10 litros do material crescido para um reator de 100 L contendo 90 litros de meio de produção. Procedeu-se a fermentação por 30 horas a 30 °C, com agitação e aeração de forma a ter o oxigênio dissolvido em 10 a 15% da saturação. Durante o processo controlou-se o pH em 7,0 através da adição de ácido (Ácido Acético) ou base (KOH 12,5N), temperatura de 30°C. O processo foi finalizado ao ser atingido 90% de esporulação. O caldo fermentado foi, em seguida, submetido à filtração tangencial, onde o complexo esporo-cristal foi separado do restante do caldo.

As estirpes foram formuladas com uma composição de ingredientes utilizada rotineiramente na empresa Bthek Biotecnologia Ltda., que produz bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*. Esses ingredientes têm como principais funções: (1) fornecer proteção contra os raios ultra-violeta, (2) aumentar a aderência às folhas, (3) conservar a bactéria. A quantidade de ingrediente ativo, ou seja, do complexo esporos-cristais foi de 3%.

As estirpes formuladas foram submetidas a bioensaios contra as três espécies de *Spodoptera*. Para isso, a dieta artificial (PARRA, 2001) foi vertida ainda quente, em recipientes plásticos tampados de 7,5 cm de altura x 7,5 cm de diâmetro. Foram realizados bioensaios com os formulados preliminares na dose de 10ml/ 90ml de água destilada esterilizada. Para o comercial a base de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (Bta),

a dose utilizada foi de 1g/ 99ml de água destilada esterilizada. Os formulados preliminares foram aplicados sobre a dieta artificial. Após secagem da solução, 10 lagartas de segundo ínstar de *S. eridania* e *S. cosmioides* foram introduzidas nos recipientes, num total de 4 repetições por estirpe. Para *S. frugiperda* utilizou-se a metodologia anteriormente mencionada, sendo individualizadas 24 lagartas de 2º ínstar. As avaliações de mortalidade foram realizadas no primeiro, segundo e quinto dias após o início do bioensaio. A mortalidade foi comparada através da análise de variância pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e os dados para análise foram transformados segundo raiz de $X + 0,5$.

Caracterização das estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*: As estirpes que causaram no mínimo 70% de mortalidade das três espécies de *Spodoptera* foram caracterizadas quanto à morfologia, perfil de proteínas e presença de genes *cry*.

Caracterização Morfológica: A caracterização morfológica das estirpes foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. As estirpes foram cultivadas em meio NYSM em incubador rotativo a 200 rpm, a 30° C, por 72 horas, em seguida as inclusões cristalinas foram purificadas utilizando o protocolo descrito por Thomas e Ellar (1983). As suspensões de cristais protéicos das estirpes foram liofilizadas em liofilizador Labconco modelo Lyphlock 18. Posteriormente, as amostras foram depositadas sobre suportes metálicos, cobertas com ouro por 180 segundos por meio de um metalizador Emitech Modelo K550 e observadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss modelo DSM 962.

Caracterização de proteínas através de SDS-PAGE: A caracterização bioquímica das estirpes foi realizada por meio de eletroforese de proteínas em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE 10%). As proteínas foram obtidas segundo protocolo descrito por Lecadet et al. (1991), a partir de material crescido em meio NYSM por 72 h a 200 rpm e 30 °C. A estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi utilizada como padrão.

Caracterização molecular: As estirpes selecionadas foram caracterizadas quanto à presença de genes codificadores de proteínas Cry. Para isso, foram realizados testes de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando oligonucleotídeos específicos desenhados para os genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, (IBARRA et al., 2003) e específicos para identificação de *cry1*, *cry4* e *cry9* (CERON et al., 1994, 1995; BRAVO et al., 1998).

A extração de DNA foi realizada a partir de adaptação do protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). As reações de PCR foram realizadas em tubos de polipropileno 0,2 mL em um termociclador MJ Research, Inc. (PTC-100™). Foram transferidos 2µL de DNA de cada amostra para um tubo de polipropileno contendo 12,5µM de cada oligonucleotídeo específico, 100 mM de dNTP mix, tampão de Taq 10x e 2,5 U

de Taq DNA polimerase (5,0 U) em um volume total de 40 μ L. Os resultados das reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%. As estirpes HD-1 de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* e IPS-82 de *B. thuringiensis* subespécie *israelensis* foram utilizadas como padrão.

Proteínas Cry purificadas: As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A foram obtidas a partir da purificação de cristais produzidos por estirpes de *B. thuringiensis* geneticamente modificados que expressam individualmente os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2A*. Essas estirpes foram gentilmente cedidas pelo Dr. Colin Berry da Universidade de Cardiff no Reino Unido. O protocolo de purificação foi o mesmo utilizado para a caracterização morfológica.

Resultados e Discussão

Bioensaio seletivo de estirpes de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera eridania*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera frugiperda*: Das cem estirpes de *B. thuringiensis* testadas através de bioensaios seletivos, apenas sete (S997, S1905, S608, BR9, BR10, BR37 e BR45), além do padrão *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) HD-1 apresentaram toxicidade acima de 70% para as espécies *S. eridania*, *S. cosmioides* e *S. frugiperda*. Embora existam relatos na literatura de que espécies de *Spodoptera* apresentaram baixa susceptibilidade aos produtos à base de Btk (MORALES e NOVOA, 1992; NAVON, 1993; BOHOROVA et al., 1997; NYOUKI et al., 1996), os bioensaios realizados demonstraram que a estirpe Btk HD-1, foi altamente patogênica às três espécies de *Spodoptera* estudadas.

A CL₅₀ das sete estirpes de *B. thuringiensis* variou entre 0,09 a 1,57 μ g/mL para *S. cosmioides*, entre 0,22 a 9,05 μ g/mL para *S. eridania* e entre 0,35 a 2,18 μ g/mL para *S. frugiperda* (Tabela 1). As menores concentrações letais para *S. cosmioides* foram causadas pelas estirpes BR37 e S1905. As estirpes BR10, BR37, BR45 e S608 foram as mais tóxicas para *S. eridania*. Já as estirpes BR9, BR37, BR45, S608 e S1905 foram as mais tóxicas a *S. frugiperda* (Tabela 1).

Tabela 1. CL₅₀ das sete estirpes de *B. thuringiensis* contra lagartas de segundo estágio de *S. cosmioides*, *S. eridania* e *S. frugiperda* após cinco dias do início do bioensaio.

Estirpe	<i>S. cosmioides</i>		<i>S. eridania</i>		<i>S. frugiperda</i>	
	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança (95%)	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança (95%)	CL ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo de confiança (95%)
HD-1	0,56 b	0,26 – 1,04	3,38 c	2,17 – 4,72	1,38 b	0,69 – 2,80
BR9	1,01 b	0,7 – 2,30	1,64 b	1,30 – 2,14	1,01 ab	0,47 – 4,66
BR10	1,57 b	0,70 – 3,56	0,41 a	0,20 – 0,67	1,57 b	0,64 – 2,33
BR37	0,09 a	0,03 – 0,16	0,28 a	0,08 – 0,61	0,63 ab	0,46 – 1,03
BR45	0,90 b	0,60 – 1,28	0,49 a	0,32 – 0,72	0,35 a	0,18 – 0,60
S608	0,61 b	0,30 – 1,16	0,22 a	0,16 – 0,29	0,87 ab	0,34 – 1,93
S997	-	-	3,20 bc	2,08 – 4,78	2,18 b	0,81 – 5,39
S1905	0,40 ab	0,16 – 0,78	9,05 c	4,43 – 18,79	0,76 ab	0,40 – 1,60

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si segundo a análise de Probit.

Bioensaio com as formulações à base das estirpes mais tóxicas: Quatro das sete estirpes tóxicas foram formuladas para a avaliação da mortalidade frente às espécies de *Spodoptera* estudadas (Tabela 2). No primeiro dia após o início do bioensaio em dieta na concentração de 10 mL/90 mL, foi observada mortalidade acima de 77% em todos os tratamentos para *S. frugiperda*, merecendo destaque a estirpe S1905 que causou 100% de mortalidade. Para *S. eridania*, foi constatado que as estirpes BR37 e BR45 ocasionaram mortalidade acima de 70%, sendo estatisticamente semelhante ao padrão Bta. No caso de *S. cosmioides*, a estirpe BR37 ocasionou maior mortalidade ao ser comparada às demais estirpes testadas. Houve mortalidade de 100% de *S. frugiperda* nos diferentes tratamentos no 2º dia após experimento. No quinto dia após o bioensaio, foi constatada mortalidade de 100% para as espécies estudadas em todos os tratamentos. Estes resultados comprovam que os formulados preliminares, na concentração estudada, foram tão eficientes para o controle de *S. eridania*, *S. frugiperda* e *S. cosmioides* quanto o produto comercial à base de Bta.

Tabela 2. Mortalidade (%) de lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda*, *S. eridania* e *S. cosmioides* causada por estirpes de *B. thuringiensis* em diferentes dias após inoculação.

Tratamentos	Dias após a inoculação								
	1 dia			2 dias			5 dias		
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera cosmioides</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera eridania</i>	<i>Spodoptera cosmioides</i>
BR37	82,5 a	75 a	92,5 a	100 a	87,5 a	100 a	100 a	100 a	100 a
S1905	100 a	12,5 bc	45 bc	100 a	40 b	97,5 a	100 a	100 a	100 a
BR45	82,5 a	82,5 a	57,5 bc	100 a	85 a	70 a	100 a	100 a	100 a
S608	82,5 a	35 ab	57,5 bc	100 a	42,5 b	75 a	100 a	100 a	100 a
Bta**	77,5 a	85 a	85 ab	100 a	100 a	92,5 a	100 a	100 a	100 a
testemunha	0 b	0 c	0 c	0 b	0 c	0 b	0 b	0 b	0 b

*Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, dados para análise foram transformados segundo raiz de X+0,5.

** Padrão *B. thuringiensis aizawai*

Caracterização das estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a *S. frugiperda*, *S. cosmioides* e *S. eridania*

A caracterização morfológica através de microscopia eletrônica de varredura possibilitou a detecção de diferentes inclusões protéicas cristalinas. As estirpes S608, BR37 e BR45 apresentaram cristais bipiramidais e esféricos (Fig. 1). Nas estirpes BR9 e BR10 foram observados três diferentes tipos de cristais: bipiramidais, esféricos e cubóides (Fig. 1). As estirpes S1950, S997 e HD-1 também apresentaram os 3 tipos de cristais, relatados em trabalhos realizados anteriormente (PRAÇA et al., 2004; MONNERAT et al., 2007). Através de exames microscópicos, a morfologia dos cristais de uma estirpe pode fornecer informações sobre sua atividade inseticida (MARTIN e TRAVERS, 1989; KARAMANLIDOU et al., 1991; MEADOWS et al., 1992; TAILOR et al., 1992; LERECLUS et al., 1993; HABIB e ANDRADE, 1998; SAADOUN et al., 2001). Os cristais bipiramidais estão relacionados à presença de proteínas do tipo Cry1, eficazes contra insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, enquanto que, os cristais cubóides associados às proteínas Cry2, estão relacionados a atividade a lepidópteros e dípteros (SILVA et al., 2004).

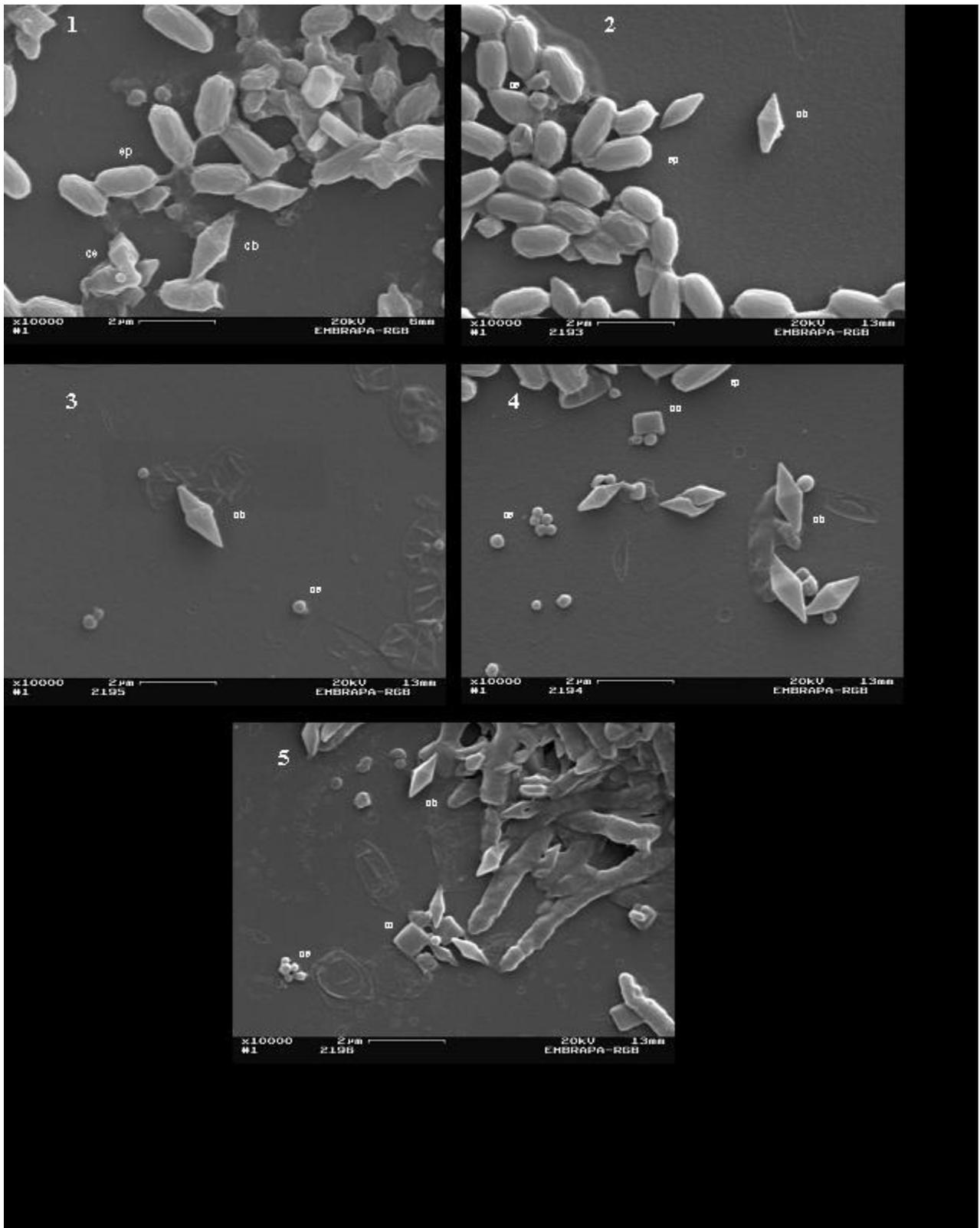


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de mistura esporos-cristais das estirpes de *B. thuringiensis*. 1- S608; 2- BR37; 3- BR45; 4- BR9; 5- BR10. cb – cristal bipiramidal; ep- esporo; ce-cristal esférico; cc- cristal cubóide.

A análise das proteínas das misturas de esporos-cristais das estirpes estudadas, através de SDS-PAGE, mostrou a presença de dois polipeptídios principais de aproximadamente 130 e 65 kDA (Tabela 3). Essas massas moleculares são freqüentemente relacionadas às proteínas-cristal das classes Cry1 e Cry2, respectivamente, sendo ativas contra lepidópteros (SCHNEPF et al., 1998; LERECLUS et al., 1993), confirmando os resultados de bioensaios apresentados pelas estirpes nos bioensaios.

Através da técnica de PCR, utilizando iniciadores específicos desenhados para detecção dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, (IBARRA et al., 2003) e específicos para identificação de *cry1*, *cry4* e *cry9* (CERON et al., 1994, 1995; BRAVO et al., 1998), foi possível determinar quais os genes *cry* de *B. thuringiensis* estavam presentes nas estirpes.

O perfil gênico apresentado na Tabela 3 mostra que as estirpes S608, BR9 e BR10 apresentaram os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* e *cry2* semelhante às estirpes S997 (Praça et al., 2004), HD-1 e S1905 (MONNERAT et al., 2007). A estirpe BR37 apresentou oito genes, sendo que sete pertencem ao grupo *cry1*, enquanto que a estirpe BR45 apresentou apenas os genes *cry1Ab*, *cry1E* e *cry2*. É interessante notar que a estirpe BR10 apresentou também o gene *cry3*, que codifica uma proteína tóxica a coleópteros (MONNERAT e BRAVO, 2000). Bourgouin et al. (1988) constataram que algumas estirpes de *B. thuringiensis* apresentam um único gene, enquanto que outras apresentam cinco genes diferentes, no caso da estirpe BR37, a quantidade de genes é maior. Os genes encontrados com maior freqüência foram os *cry1Ab* e o *cry2A*, que foram constatados em todas as estirpes. O gene *cry1Aa* foi encontrado em 7 estirpes, enquanto *cry1Ac* e *cry1B* em 6 estirpes. Os genes encontrados com menor freqüência foram os genes *cry1C*, *cry1D* e *cry1F* (uma vez) e *cry1E* (duas vezes).

Tabela 3. Genes *cry* e perfil protéico presente em estirpes de *B. thuringiensis*.

Estirpes	Conteúdo Gênico	Perfil Protéico (kDA)
S1905	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B e cry2</i>	130 e 65
S997	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B e cry2</i>	130 e 65
HD-1	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B e cry2</i>	130 e 65
S608	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B e cry2</i>	130 e 65
BR37	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ad, cry1C, cry1D, cry1E, cry1F e cry2</i>	130 e 65
BR9	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B e cry2</i>	130 e 65
BR45	<i>cry1Ab, cry1E e cry2</i>	130 e 65
BR10	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1B, cry2 e cry3</i>	130 e 65

Toxicidade de proteínas Cry purificadas de *Bacillus thuringiensis*

Devido à abundância com que os genes *cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac* e *cry2* foram encontrados nas estirpes tóxicas a *S. frugiperda*, foram realizados testes para avaliar a toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A.

Os bioensaios mostraram que houve diferença entre os resultados de CL₅₀ para as proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A ao serem testadas em *S. eridania, S. frugiperda* e *S. cosmioides* (Tabela 4). Essas diferenças foram estatisticamente significativas. As proteínas Cry1Aa e Cry1Ab foram as mais tóxicas a *S. frugiperda*, a proteína Cry1Ab foi a mais tóxica a *S. cosmioides* e a proteína Cry2A foi a mais tóxica a *S. eridania*. Cabe ressaltar que Cry2A foi pouco tóxica a *S. cosmioides*, Cry1Ac pouco tóxica a *S. frugiperda* e Cry1Aa e Cry1Ab pouco tóxicas a *S. eridania* (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados dos bioensaios de dose realizados com proteínas Cry purificadas efetivas sobre *S. cosmioides, S. eridania* e *S. frugiperda*.

Proteínas Cry	<i>S. cosmioides</i>			<i>S. eridania</i>			<i>S. frugiperda</i>		
	CL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (95%)	de	CL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (95%)	de	CL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança (95%)	de
Cry1Aa	0,58 ab	0,14 – 1,52		74,74 c	42,83 – 121,4		0,32 a	0,14 – 0,72	
Cry1Ab	0,37 a	0,12 – 0,82		62,33 c	37,34 – 188,22		0,88 a	0,40 – 1,74	
Cry1Ac	2,77 b	1,20 – 6,26		21,34 b	14,29 – 33,97		10,90 b	4,78 – 30,65	
Cry2A	23,98 c	8,91 – 171,1		1,00 a	0,42 – 2,36		1,87 ab	0,70 – 5,30	

* Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo Intervalo de Confiança.

Diversos estudos realizados com *S. frugiperda* têm demonstrado que este inseto apresenta variações na susceptibilidade a diferentes toxinas de *B. thuringiensis*, provavelmente relacionados com a variabilidade genética entre diferentes populações. Bohorova et al. (1997) constataram que a proteína Cry1Ab purificada foi mais tóxica para *S. frugiperda* do que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac juntas. Waquil et al. (2004) observaram que a proteína Cry1Ab ocasionou a inibição do acúmulo de biomassa das lagartas de *S. frugiperda* em 89,81%. Van Rie et al. (1990) afirmaram que espécies de *Spodoptera* são tolerantes as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab. Aranda et al. (1996) relataram que a proteína Cry1Ab produzida pela estirpe HD-1 não foi tóxica para *S. frugiperda*. Luttrell et al. (1999) observaram baixa eficiência da proteína Cry1Ac no controle de *S. frugiperda*. Aguiar et al. (2006) constataram que a proteína Cry2A apresentou toxicidade a *S. frugiperda*. Todos os autores trabalharam com populações distintas desse inseto. Monnerat et al. (2006) observaram diferenças de toxicidade de diversas estirpes de *B. thuringiensis* em populações de *S. frugiperda* oriundas do México, Brasil e Colômbia. Posteriormente verificaram que esta diferença de susceptibilidade ocorria em função da alta variabilidade genética entre as populações, que não apresentavam receptores para a toxina Cry1D (no caso da população brasileira) e Cry1B (no caso da população mexicana), não sendo, portanto susceptíveis às respectivas toxinas. Já a toxina Cry1C foi medianamente tóxica às três populações testadas.

Todos esses dados devem ser cuidadosamente analisados antes de se optar pelo uso de um biolarvicida ou uma planta transgênica à base de *B. thuringiensis*. Um ponto importante é a susceptibilidade de diferentes populações de *S. frugiperda* e das diferentes espécies do complexo do gênero *Spodoptera*. Atualmente estão disponíveis no mercado bioinseticidas à base de Btk HD-1, que contém proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B e Cry2A e à base de Bt subsp. *aizawai* (Bta), que contém as proteínas Cry1Ab, Cry1C e Cry1D que são tóxicas em nível variável às lagartas do complexo *Spodoptera* e a diferentes populações de *S. frugiperda*. Relatos de produtores da região do Distrito Federal apontam eficiência variável (às vezes alta, às vezes baixa) dos produtos à base de Btk para *S. frugiperda* e uma eficiência melhor com relação aos produtos à base de Bta. Como os dois produtos contêm a toxina Cry1Ab, além de outras proteínas tóxicas à praga, é possível que existam problemas relacionados à formulação do produto e à tecnologia de aplicação, que não é muito desenvolvida no Brasil, e não à eficácia em si da bactéria.

Também estão disponíveis, tanto registradas, quanto em fase de registro, plantas transgênicas expressando as toxinas Cry1Ac como o Bollgard, (MACINTOSH et al., 1990; STEWART et al., 2000, 2001; ARMSTRONG et al., 2007, no prelo), DP90 e NUOPAL (VOHLK, 2007), Bollgard II que foi desenvolvido através da incorporação da proteína Cry2Ab em variedades de algodão Bollgard (GREENPLATE et al., 2000a, 2000b), DP50 que expressa maior concentração das proteínas tóxicas Cry2Ab e Cry1Ac (Bollgard II) (SANTOS, 2007), WideStrike que expressa Cry1Ac e Cry1F e VipCot, que expressa a proteína VIP3, também proveniente do *B. thuringiensis* (ICAC, 2004).

Vohlk et al. (2007) avaliaram a eficiência das variedades de algodão transgênico DP90 e NUOPAL, atualmente registradas no Brasil, que expressam o gene *cry1Ac*. Nas avaliações foram constatados danos ocasionados por *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e espécies de *Spodoptera*, principalmente *S. eridania*. Segundo os autores, devido aos danos causados por essas pragas, houve a necessidade de aplicações de inseticidas nestas variedades, visando o controle dessas lagartas. Em outro estudo a campo realizado com as cultivares DP90B e NUOPAL, Miranda et al. (2007) observaram a eficiência dessas cultivares sobre *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). No entanto, houve a necessidade de aplicações adicionais de inseticidas para o controle de *S. cosmioides*. As constatações de Miranda et al. (2007) e Vohlk et al. (2007) evidenciaram a baixa eficiência da proteína Cry1Ac sobre *S. cosmioides* e *S. eridania* em cultivares que expressam o gene desta proteína no Brasil. Os dados obtidos neste trabalho mostraram que Cry1Ac é pouco tóxica a estas espécies e explicam os resultados obtidos pelos autores citados.

A inserção da proteína Cry2Ab promove um aumento da atividade inseticida em variedades de algodão Bollgard. Estudos relatam a maior eficiência de Bollgard II em relação à Bollgard (PENN et al., 2001; VOTH et al., 2001), por conter as proteínas Cry2Ab e Cry1Ac. Stewart et al. (2001) observaram que nenhuma lagarta de *H. virescens*, *S. frugiperda* e *S. exigua* sobreviveu até o estágio de pupa quando alimentadas com Bollgard II, entretanto houve sobrevivência de lagartas dessas espécies criadas em Bollgard. No Brasil, estão em andamento pesquisas a campo com a cultivar DP50 que expressa maior concentração das proteínas tóxicas Cry2Ab e Cry1Ac (Bollgard II – Monsanto) (SANTOS, 2007), as quais são relatadas como eficientes no controle de *S. frugiperda* (STEWART et al., 2000, 2001). O Bollgard II além de ser efetivo contra as pragas controladas pelo Bollgard, controla satisfatoriamente *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda*, *S. eridania* e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) (JACKSON et al., 2001; CHITKOWSKI et al., 2003; DEGRANDE e FERNANDES, 2006; LI et al., 2007).

Os dados obtidos neste estudo devem servir de alerta para que sejam realizados estudos de susceptibilidade de cada inseto-alvo primário ou secundário frente a cada estirpe ou toxina candidata a ser utilizada no manejo. Pragas secundárias e atualmente pouco importantes para a cultura do algodão podem se tornar pragas primárias, caso o manejo de controle não seja bem feito. Usando os resultados das toxinas estudadas neste trabalho pode-se alertar para o risco da utilização dessas para o controle do complexo de *Spodoptera*, pois a susceptibilidade das espécies é diferente. Usando toxinas Cry1Aa ou Cry1Ab como exemplo, pode-se teorizar que se poderia estar selecionando *S. eridania* e talvez elevando seu "status" de praga secundária para praga primária. O mesmo pode ocorrer com *S. cosmioides* e a toxina Cry2A.

Por outro lado, a construção de transgênicos "piramidais" expressando mais de uma toxina pode ser uma boa alternativa para o controle do complexo de espécies do gênero *Spodoptera*, no caso das espécies

estudadas uma boa opção seria a utilização dos genes *cry1Aa* ou *cry1Ab* (codificadores de toxinas ativas a *S. frugiperda* e *S. cosmioides*) e *cry2A* (codificador da toxina ativa a *S. eridania*). Nesse contexto, produtos biológicos à base de estirpes nativas que expressem essas toxinas também seria uma estratégia recomendada.

Para o Manejo Integrado de Pragas (MIP), a formulação de novos bioinseticidas à base de estirpes de *B. thuringiensis* e a obtenção de plantas que expressam diferentes proteínas Cry são de grande importância para a redução do desenvolvimento do potencial de resistência de *Spodoptera* spp. O uso de bioinseticidas e de plantas que apresentam diversidade de proteínas Cry minimiza a pressão de seleção que induz à resistência do complexo *Spodoptera* em áreas pareadas e de sucessão de soja, algodão e milho. A presença e a expressão de múltiplas toxinas possibilitam a constituição de plantas que expressam genes *cry* além da formulação de bioinseticidas como instrumento no Manejo Integrado de Pragas.

Referências

AGUIAR, R. W. de S.; MARTINS, É. S.; FERNANDEZ, R. S.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. **Avaliação da toxicidade da proteína recombinante inseticida Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* contra larvas de *S. frugiperda***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 139). 38 p.

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECA, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARMSTRONG, J. S.; ADAMCZYK JUNIOR, J. J.; GREENBERG, S. M. Fall Armyworm susceptibility to Bollgard I, Bollgard II, and Widestrike cotton as determined by a leaf-dish assay. **Entomological Society of America Proceedings**, [S.l.]. No prelo.

BARROSO, P. A. V.; HOFFMANN, L. V. Algodoeiro geneticamente modificado. In: FREIRE E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007, p. 141-174.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRUTZMACHER, A. D.; FORESTI, J.; RUDINEY; RINGENBERG, R. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 993-998, 2003.

BOHOROVA, N. E.; CABRERA, M.; ABARCA, C.; QUINTERO, R.; MACIEL, A. M.; BRITO, R. M.; HOISINGTON, D. A.; BRAVO, A. susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 90, n. 2, p. 412-415, 1997.

BORÉM, A. (Org.). **Biotecnologia e meio ambiente**. 1. ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2005. v. 1, 425p.

BOURGOUIN, C.; DELÉCLUSE, A.; RIBIER, J.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptide is associated with inverted repeat sequences. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 3575-3583, 1988.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

CERON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 353-356, 1994.

CERON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECIA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CHITKOWSKI, R. L.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, M. J.; BRIDGES JUNIOR, W. C. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 96, n. 3, p. 755-762, 2003.

DEGRANDE, P. E; FERNANDES, M. G. O Brasil com Bt. **Cultivar: Grandes Culturas**, Pelotas, v. 8, n. 87, p. 16-21, 2006.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3. ed. Cambridge: Cambridge University, 1971. 333p.

GREENPLATE, J. T.; PENN, S. R.; MULLINS, J. W.; OPPENHUIZEN, M. Seasonal CryI_{Ac} levels in DP50B: the "Bollgard basis" for Bollgard II. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 2000, San Antonio. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 2000a. p. 1039-1040.

GREENPLATE, J. T.; PENN, S. R.; SHAPPLEY, Z.; OPPENHUIZEN, M.; MANN, J.; REICH, B.; OSBORN, J. Bollgard II efficacy: quantification of lepidopteran activity in a 2-gene product. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 2000, San Antonio. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 2000b. p. 1041-1043.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas, In: ALVES, S. B. (ed.), **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1998. p. 383-446.

HERNANDEZ, J. L. L. Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. **Entomophaga**, Paris, v. 33, p. 163-171, 1988.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p. 242-255, 1989.

IBARRA, J.; RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C. M. F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M. H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5269-5274, 2003.

INTERNATIONAL COTTON ADVISORY COMMITTEE. Update genetically engineered cotton. **The ICAC Recorder**, Washington, v. 22, n. 2, p. 12-15, Dec. 2004.

JACKSON, R. E.; BRADLEY JUNIOR, J. R.; VAN DUYN, J. W.; BURD, A. D. Efficacy of Bollgard and Bollgard II cottons against bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) in field and greenhouse studies, In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 2001, Anaheim, CA. **Proceedings...** Memphis, TN: National Cotton Council, 2001. p. 815-819.

KARAMANLIDOU, G.; LAMBROPOULOS, A.; KOLIAIS, S.; MANOUSIS, T.; ELLAR, D.; KASTRITSIS, C. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2277–2282, 1991.

KING, A. B. S.; SAUNDERS, J. L. **The invertebrate pests of annual food crops in Central America**. London: Overseas Development Administration, 1984, 166 p.

KRIEG, A.; LANGENBRUCH, G. A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. In: BURGESS, H. D. (Ed.). **Microbial control of pests and plant disease 1970-1980**. London: Academic Press, 1981. p. 837-896.

LECADET, M. M.; CHAUFAUX, J.; RIBIER, J.; LERECLUS, D. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 840-849, 1991.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. HIGGES, S. (Ed.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. 5. ed. Chichester: John Wiley, 1993. p. 37-69.

LI, Y. X.; GREENBERG, S. M.; LIU, T. X. Effect of Bt cotton expressing Cry1Ac and Cry2Ab, non-Bt cotton and starvation on survival and development of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, GB, v. 63, n. 5, p. 476-482, 2007.

LÓPEZ-EDWARDS, M.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, J. L.; PESCADOR-RUBIO, A.; MOLINA-OCHOA, J.; LEZAMA-GUTIÉRREZ, R.; HAMM, J. J.; WISEMAN, B. R. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, Gainesville, US, v. 82, p. 254-262, 1999.

LUTTRELL, R. G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 92, n. 1, p. 21-32, 1999.

MACINTOSH, S. C.; STONE, T. B.; SIMS, S. R.; HUNST, P. L.; GREENPLATE J. T.; MARRONE, P. G.; PERLAK, F. J.; FISCHHOFF, D. A.; FUCHS, R. L., Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, US, v. 56, p. 258-266, 1990.

MARTIN, P.; TRAVERS, R. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2437-2442, 1989.

MEADOWS, M. P.; ELLIS, D. J.; BUTT, J.; JARRETT, P.; BURGESS, H. D. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 1344-1350, 1992.

- MIRANDA, J. E.; BARBOSA, K. de A.; COUTO, A. F.; FERNANDEZ, J. I. Flutuação populacional e necessidades de controle químico de pragas em algodoeiro transgênico BT1. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2007, p. 1-5. CD-ROM.
- MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T. S.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCAO, R.; BERRY, C. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, Orlando, US, v. 41, p. 291-295, 2007.
- MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariuna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000, v. 3, p. 163-192.
- MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P.; ORDUZ, S.; BENITENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M. D.; IBARRA, J.; BRAVO, A. Genetic variability in *Spodoptera frugiperda* Smith populations in Latin America is associated to variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 7029-7035, 2006.
- MORALES, G. G.; NOVOA, A. S. Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* para control de insectos lepidópteros. **Southwestern Entomologist**, Dallas, US, v. 17, n. 1, p. 63-67, 1992.
- NAVON, A. Control of Lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley, 1993. p. 125-146.
- NORA, I.; REIS FILHO, W.; STUKER, H. Danos de lagartas em frutos e folhas de macieira: mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 2, p. 54-55, 1989.
- NYOUKI, F. F. R.; FUXA, J.; RICHTER, A. R. Spore-toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, US, v. 31, n. 1, p. 52-62, 1996.
- PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 6. ed. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001. 134p.
- PENN, S. R.; REICH, B.; OSBORN, J.; EMBRY, K.; GREENPLATE, J. Quantification of lepidopteran activity in a 2-gene product: a 2-year summary of Bollgard II. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 2001, Anaheim, CA. **Proceedings...** Memphis, TN: National Cotton Council, 2001. p. 830-832.
- PRAÇA, L.; MARTINS, E.; BATISTA, A. C.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Díptera e Coleoptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 11-16, 2004.
- SAADOUN, I.; AL-MOMANI, F.; OBEIDAT, M.; MEQDAM, M.; ELBETIEHA, A. Assessment of toxic potential of local Jordanian *Bacillus thuringiensis* strains on *Drosophila melanogaster* and *Culex* sp. (Diptera). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, UK, v. 90, p. 866-872, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, K. B.; NEVES, P. M. O. J.; MENEGUIM, A. M. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

SANTOS, W. J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o Cerrado Brasileiro. In: FREIRE E. C. (Ed.). **Algodão no Cerrado do Brasil**. Brasília, DF: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p. 403-521.

SANTOS, W. J. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: FUNDAÇÃO MT/EMBRAPA. **Mato Grosso auto-suficiência, eficiência e ciência: o algodão no caminho do sucesso**. Rondonópolis, 1997. p. 48-71. (Boletim, 2).

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

SILVA, S. B.; SILVA-WERNECK, J. O.; FALCAO, R.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SÁ, M. F. G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R. G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 128, p. 1-6, 2004.

SILVIE, P.; LEROY, T.; JEAN-LOUIS, B.; MICHEL, B. **Manual de Identificação das pragas e seus danos no algodoeiro**. Cascavel: Coodetec/Cirad-CA, 2001. 100p. (Boletim Técnico, n.34)

STEWART, S. D.; ADAMCZYK JUNIOR, J. J.; KNIGHTEN, K. S.; DAVIS, F.M. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of Noctuid (Lepidoptera) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 94, p. 752-760, 2001.

STEWART, S. D.; KNIGHTEN, K. S.; DAVIS, F. M. Efficacy of Bt cotton expressing two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* berliner on selected caterpillar pests. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 2000, San Antonio. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 2000. p. 1043-1048

TAILOR, R.; TIPPET, J.; GIBB, G.; PELLIS, S.; PIKE, D.; JORDAN, L.; ELY, S. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 1211-1217, 1992.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, London, v. 60, p. 181-197, 1983.

VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W.; JOHNSON, D. E.; BARNETT, D. B.; VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 247, p. 72-74, 1990.

VILAS-BOAS, G. F. L. T.; PERUCA, A. P. S.; ARANTES, O. M. N. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 673-687, 2007.

VOHLK, P. H. F.; SILVIE, P. J.; TAKIZAWA, E.; ALMEIDA MELO, F. L.; DIOUM, C.; KAMINSKI, E.; COLPANI, C. M. Avaliação e manejo de pragas dos algodoeiros Bt: primeira safra no Mato Grosso, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 6., 2007, Uberlândia. **Resumos**. Uberlândia, 2007. p. 1-7, 1 CD-ROM.

VOTH, R. D.; GREENPLATE, J. T.; MANN, J. E.; MULLINS, J. W. Bollgard II cotton technical review. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 2001, Anaheim, CA. **Proceedings...** Memphis, TN: National Cotton Council, 2001. p. 830.

WAQUIL, J. M.; VILELA, F. M. F.; SIEGFRIED, B. D.; FOSTER, J. E. Atividade biológica das toxinas do *Bt*, Cry1A(b) e Cry1F em *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, MG, v. 3, n. 2, p. 153–163, 2004.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potencial as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, [S.l.], v. 3, p. 315-343, 1984.

