

MARLITON ROCHA BARRETO

Prospecção e Caracterização de Genes de
Bacillus thuringiensis com Potencial Para o
Controle de Insetos-praga da Cultura da Soja

CURITIBA – PARANÁ

2005

MARLITON ROCHA BARRETO

Prospecção e Caracterização de Genes de
Bacillus thuringiensis com Potencial Para o
Controle de Insetos-praga da Cultura da Soja

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Entomologia, do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

CURITIBA – PARANÁ

2005

MARLITON ROCHA BARRETO

Prospecção e Caracterização de Genes de *Bacillus thuringiensis* com Potencial Para o Controle de Insetos-praga da Cultura da Soja

Tese aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Orientador:

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez
Embrapa Soja, Londrina, PR

Profa. Dra. Sônia Maria Noemberg Lázzari
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

Dr. Fernando Hercos Valicente
Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG

Prof. Dr. Ítalo Delalibera Júnior
Escola Sup. de Agric. Luis de Queiroz, Piracicaba, SP

Curitiba, 23 de fevereiro de 2005

OFEREÇO

A Deus, fonte de toda a sabedoria.

Às minhas irmãs pelo amor, força e incentivo.

À minha esposa, Eriana, pela alegria e companhia.

Aos meus pais, Luiz e Onete, pelo exemplo que sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Concluir uma tese é uma tarefa difícil. Contudo, muitas pessoas colaboraram para que esta se tornasse uma experiência coletiva, o que permitiu que todo esse processo me proporcionasse um valioso crescimento. A todas essas pessoas, aqui citadas ou não, a minha imensa gratidão.

Ao Dr. Daniel R. Sosa-Gómez, pelo incentivo, pela amizade, paciência e competência que demonstrou durante a difícil tarefa de orientar.

Ao Curso de Pós-Graduação em Entomologia do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realização do curso, em especial as professoras Dras. Sônia Maria N. Lazzari e Lúcia Massutti de Almeida, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Soja, por disponibilizar a estrutura necessária à realização dos experimentos.

Aos funcionários da Entomologia da Embrapa - Jairo, Fábio, Ivanilda, Jovenil - e da Biotecnologia Vegetal - Silvana Marin e César, pelo auxílio no decorrer dos experimentos e pela amizade.

À banca examinadora, pelo momento ímpar da defesa.

Ao Dr. Fernando H. Valicente, pela amizade, auxílio e incentivo.

A Dra. Olívia M. N. Arantes pelo fornecimento de isolados e pelo auxílio prestado.

A Dra. Gislayne T. Vilas-Bôas pela valiosa colaboração e amizade.

Ao Dr. Eliseu Binneck pelos ensinamentos na área de Bio-informática.

Aos amigos Adriana Micheli, Alberto Marsaro, Amafi Gonzaga, Dalva Santana, Denise Magri, Edson Hirose, Giorla Piubelli, Lúcia Vivan, Maria Clarice, Wilsimar Peres, Lizandra Catelli, Renata Fuganti, Renata Stolf, Noelle Giacomini, pela amizade e pelo companheirismo.

A toda minha família e às demais pessoas que acreditaram em meu trabalho.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS.	IV
LISTA DE TABELAS.	VII
LISTA DE FIGURAS.	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.	IX
RESUMO.	XI
ABSTRACT.	XII
1. INTRODUÇÃO GERAL.	1
1.1. LITERATURA CITADA.	8
2. CAPÍTULO I - Prospecção de genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> e determinação de sua atividade entomocida para espécies de Lepidoptera e Coleoptera pragas da soja.	16
2.1. RESUMO.	17
2.2. ABSTRACT.	18
2.3. INTRODUÇÃO.	19
2.4. MATERIAL E MÉTODOS.	21
2.4.1. Obtenção das amostras de solo e dos isolados de bactéria.	21
2.4.2. Bioensaios de toxicidade de <i>B. thuringiensis</i> em Lepidoptera.	22
2.4.3. Bioensaios de toxicidade de <i>B. thuringiensis</i> em Coleoptera.	24
2.4.4. Determinação da CL ₅₀ para espécies de Lepidoptera.	25
2.4.5. Determinação de sinergismo entre <i>B. thuringiensis</i> e substâncias químicas.	25
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	26
2.5.1. Obtenção das amostras de solo e dos isolados de bactéria.	26
2.5.2. Bioensaios de toxicidade de <i>B. thuringiensis</i> em Lepidoptera.	28
2.5.3. Determinação da CL ₅₀ para espécies de Lepidoptera.	31
2.5.4. Determinação de sinergismo entre <i>B. thuringiensis</i> e substâncias químicas.	32
2.5.5. Bioensaios de toxicidade de <i>B. thuringiensis</i> em Coleoptera.	34
2.6. CONCLUSÕES.	35
2.7. LITERATURA CITADA.	36

3.	CAPÍTULO II - Caracterização de genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> com atividade entomocida contra espécies de Lepidoptera da cultura da soja.	49
3.1.	RESUMO.	50
3.2.	ABSTRACT.	51
3.3.	INTRODUÇÃO.	52
3.4.	MATERIAL E MÉTODOS.	53
3.4.1.	Extração e quantificação do DNA.	53
3.4.2.	Caracterização de genes <i>cryI</i>	54
3.4.3.	Enzimas de restrição.	56
3.4.4.	Análise dos dados.	57
3.4.5.	Clonagem de genes.	57
3.4.6.	Obtenção de células eletrocompetentes.	58
3.4.7.	Transformação de células via Eletroporação.	58
3.4.8.	Preparação de plasmídeos em microplacas.	59
3.4.9.	Precipitação alcoólica de DNA em placas e sequenciamento.	60
3.5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.	61
3.5.1.	Caracterização de genes <i>cryI</i>	61
3.5.2.	Enzimas de restrição.	64
3.5.3.	Análise dos dados.	64
3.5.4.	Clonagem de genes e sequenciamento.	65
3.6.	CONCLUSÕES.	68
3.7.	LITERATURA CITADA.	68
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.	76
5.	ANEXOS.	77

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1 Mortalidade (%) de <i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Pseudoplusia includens</i> , com isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Tabela 2 Concentração letal média (esporos/mL) dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> para lagartas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	31
CAPÍTULO II	
Tabela 1 Iniciadores utilizados para amplificação e caracterização de genes <i>cry</i> , via PCR, dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> selecionados.	55
Tabela 2 Amplificações obtidas dos isolados de <i>B. thuringiensis</i> com ação entomocida para <i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Pseudoplusia includens</i>	63
Tabela 3 Alinhamento da seqüência do isolado CSB284 e demais seqüências obtidas no GenBank.	67
ANEXO	
Anexo 1 Banco de <i>Bacillus thuringiensis</i> obtido por meio de coletas de solo em diferentes regiões do Brasil e de uma província Argentina.	
Anexo 2 Isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> testados nas espécies de Lepidoptera - <i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i> , e Coleoptera - <i>Phyllophaga cuyabana</i> , <i>Sternechus subsignatus</i> , <i>Diabrotica speciosa</i> e <i>Alphitobius diaperinus</i> .	
Anexo 3 Matriz binária utilizada para gerar o dendrograma de similaridade.	
Anexo 4 Distância genética entre os isolados de <i>B. thuringiensis</i> .	

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
Figura 1 Peso médio de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> tratadas com <i>B. thuringiensis</i> e inseticidas ou EDTA.	33
CAPÍTULO II	
Figura 1 Dendrograma dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> com ação entomocida para as espécies <i>Anticarsia gemmatalis</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Pseudoplusia includens</i> , obtido pelo método UPGMA.	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

μg – Micrograma, corresponde a 10^{-6} gramas

μL - Microlitro

Bam HI – Enzima endonuclease obtida de *Bacillus amyloliquefaciens H*

CaCl_2 - Cloreto de Cálcio

CL_{50} - Concentração que mata 50% da população tratada

cry – Gene

Cry – Proteína

CSB – Coleção de culturas de bactérias da Embrapa Soja

CTAB - Brometo de trimetil N-cetil amônio

δ - Delta-endotoxina

D - Dalton - unidade de medida de DNA ou proteína

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP's - Dinucleotídeos

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra acético

FeSO_4 – Sulfato de Ferro

GET – Meio formado por Glicose, EDTA e Tris

HCl – Ácido clorídrico

IPTG – Isopropil thio β -d-galactopironoside

i.a. / Kg ou L – Ingrediente ativo por quilograma ou Litro

Kb - Tamanho do fragmento de DNA por 1000 pares de base

KDa – Kilo Daltons

KOAc - Acetato de Potássio

Kv – Kilo volt

KCl – Cloreto de Potássio

M - Molar

MDa – Mega Daltons

mg – Miligrama, corresponde a 10^{-3} gramas

MgCl_2 - Cloreto de Magnésio

MgSO_4 - Sulfato de Magnésio

mL – Mililitro

mM - Milimolar

MnSO_4 - Sulfato de Manganês

NaCl - Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

ng – Nanograma, corresponde a 10^{-9} gramas

NTSYS - Sistema de Taxonomia Numérica

pb - Pares de base, corresponde ao comprimento do DNA

PCR - Reação de polimerase em cadeia

RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

Rsa I - Enzima endonuclease obtida de *Rhodopseudomonas sphaeroides*

SDS – Sódio dodecil sulfato

Sma I – Enzima endonuclease obtida de *Serratia marcescens*

TAE - Tris base, ácido acético e EDTA

Taq - *Thermus aquaticus*

TBE - Tris base, ácido bórico e EDTA

TE - Tris-HCl e EDTA

u - Unidades

UPGMA - Método das médias aritméticas de grupos não ponderadas

Vip – Vegetative insecticidal protein – proteína vegetativa inseticida

XGal – 5-bromo -4 cloro -3 indolil β -d-galactopironoside

x g = Força centrífuga relativa

ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

RESUMO

No Brasil, o plantio de soja aumentou significativamente a partir de 1970 no Sul e expandiu para as demais regiões do país. Entretanto, dentre os fatores que contribuem para limitar o avanço e a produção da soja no país destacam-se os insetos-praga, alguns dos quais afetam drasticamente a produção, a exemplo das espécies *Anticarsia gemmatalis*, *Sternechus subsignatus* e *Phyllophaga cuyabana*. O *Bacillus thuringiensis* produz proteínas com ação entomocida específica para larvas de Lepidoptera e Coleoptera e, na década de 1980, o avanço no conhecimento da genética molecular desta bactéria permitiu a diversificação das estratégias de sua utilização no controle biológico e a variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a PCR. Assim sendo este trabalho propiciou a formação de um banco de bactérias com potencial para utilização no controle de insetos-praga da soja e, em especial foram selecionados isolados de *B. thuringiensis* com elevada ação entomocida para três insetos-praga de importância na agricultura brasileira – *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *P. includens*. Em consequência, genes inseticidas de 13 isolados foram caracterizados e apresentaram ampliações para os iniciadores *cryAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* e *cryID*. Esses isolados servem para uso em formulações e/ou tecnologia de transgênicos resistentes a insetos-praga.

ABSTRACT

Prospection and characterization of *Bacillus thuringiensis* genes with potential for insect pest control of the soybeans crops.

In Brazil, since 1970 the soybean area increased significantly from the southern states to the northern states. However, insect pests are limiting factors of soybean yields, the most important pests are the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, the gall maker stem borer, *Sternechus subsignatus* and with the grubs such as *Phyllophaga cuyabana*. Populations of these pests can be controlled by biological agents. Among these agents, the bacteria *Bacillus thuringiensis* have potential to be used in field applications as well as source of genes for plant transformation. *B. thuringiensis* produce entomocidal proteins specific to Lepidoptera and Coleoptera larvae. In the decade of 1980, the knowledge in the molecular biology field helped to increase the diversity of tools to be used in biological control strategies. The intraspecific genetic variability of *B. thuringiensis* was studied with techniques based on the PCR. In this work a germplasm depository of *B. thuringiensis* with potentials to be used as soybean pest control was established. We selected *B. thuringiensis* strains with entomocidal activity against three important agricultural pests, *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* and *P. includens*. Insecticidal genes of the thirteen isolates were characterized using specific primers, the obtained products correspond to the following toxins: *cryAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* and *cryID*. These isolates can be used as commercial formulations or transgenic resistant hosts to insect pests.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A crescente preocupação com o meio ambiente tem elevado a importância das pesquisas científicas que procuram diminuir a agressão constante que o ecossistema vem sofrendo por intervenções do homem. Por esse motivo e outros como o elevado custo dos defensivos agrícolas e aumento da resistência das pragas a estes produtos, o número de pesquisas envolvendo microrganismos capazes de promover o controle biológico de pragas agrícolas e de interesse na saúde pública tem aumentado (Destéfano 2003). Entre estes organismos, destacam-se bactérias, fungos e vírus que são agentes naturais de controle de pragas e que podem ser cultivados em laboratórios e/ou em escala industrial.

Atualmente, o mercado mundial de biopesticidas não chega a alcançar 5 % do mercado de pesticidas. Os produtos à base de *Bacillus thuringiensis* representam mais de 90 % dos biopesticidas e são usados especialmente em países como os Estados Unidos (Polanczyk & Alves 2003). Para o controle de insetos vetores de doenças o grande mercado desta bactéria é a África (DeNardo & Capalbo 1998).

Em 1938, teve início a comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis*. Na década de 1970 já existiam produtos para o controle de Coleoptera e, principalmente, Lepidoptera, e foi descoberta a variedade *B. thuringiensis israelensis*, eficientes contra larvas de Diptera, revolucionando o controle de insetos vetores de doenças. Posteriormente, variedades tóxicas a nematóides foram descobertas, embora ainda não sejam utilizadas comercialmente (Arantes *et al.* 2002).

A aplicação de grandes quantidades de produtos à base de *B. thuringiensis* trouxe a necessidade de um maior entendimento de sua distribuição e do verdadeiro papel deste microrganismo na natureza, o que permitirá uma racionalização da sua utilização (Arantes *et al.* 2002). Tal conhecimento pode ainda contribuir no desenvolvimento de métodos mais eficientes de isolamento de novas linhagens, contendo novos genes *cry*, ou outros fatores de virulência ainda não conhecidos, mas importantes para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos com potencial de utilização em programas de controle de pragas.

Em 1996, nos Estados Unidos, tem-se a primeira planta de soja incorporada com o gene *cryIAc* de *B. thuringiensis* que produzia toxina para controle de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae),

Pseudoplusia includens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), insetos-praga da cultura da soja (Stewart Jr *et al.* 1996).

No Brasil, o plantio de soja aumentou significativamente, em área e produção, a partir de 1970 no Sul e expandiu para as demais regiões do país. Entretanto, dentre os fatores que contribuem para limitar o avanço e a produção da soja no país destacam-se os insetos-praga, alguns dos quais afetam drasticamente a produção, a exemplo das espécies: *A. gemmatalis*, *Sternechus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e *Phyllophaga cuyabana* (Moser) (Coleoptera: Scarabaeidae) (Moscardi *et al.* 1999), que podem atacar as folhas, as hastes ou as raízes da planta de soja, respectivamente.

Dentre os desfolhadores da soja, a lagarta-da-soja *A. gemmatalis*, encontra-se distribuída no continente americano desde os Estados Unidos da América até a Argentina (Carner *et al.* 1974, Gazzoni *et al.* 1981, Kogan & Turnipseed 1987). No Brasil, esse inseto pode ser encontrado em todas as regiões onde é cultivada a soja, principalmente no período de novembro até abril (Hoffmann *et al.* 2000), sendo uma praga chave e responsável pelo consumo de mais de 50 % dos inseticidas químicos utilizados nessa cultura (Moscardi 1998).

Outro desfolhador, a lagarta falsa medideira *P. includens*, causa severos danos à cultura da soja no sul dos Estados Unidos (Hamadian & Pitre 2002). No Brasil, a espécie *P. includens* pode ser encontrada em todas as áreas cultivadas com soja e tem-se observado que sua ocorrência é simultânea à de *A. gemmatalis*. Também, não tem sido raro encontrá-las de forma isolada, principalmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento da cultura (Moraes *et al.* 1991). Outras espécies de Lepidoptera, a exemplo da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) - que é uma das principais pragas da cultura do milho em todas as regiões do Brasil - na ausência das plantas preferenciais, pode atacar a cultura da soja (Cruz *et al.* 1996, Gómez *et al.* 1999). Em geral não se alimenta das folhas, mas pode cortar o caule tenro de plântulas de soja com danos em áreas extensivas, com necessidade de replantio. Também pode consumir a casca na base de plantas de soja, causando sintomas que podem ser confundidos com os de outras pragas (Cruz *et al.* 1996).

Dentre as pragas que atacam as raízes da soja tem destaque *P. cuyabana* (Oliveira *et al.* 1997), inseto de hábito subterrâneo que atingiu condições de praga. O controle químico convencional de *P. cuyabana* tem se mostrado, na prática, inviável e conforme relatos de Morón (1986) no México, este controle só é satisfatório temporariamente e, em muitos casos, foi observado o desenvolvimento de resistência aos produtos químicos usados. Os entomopatógenos estão sendo estudados e podem vir a ser uma alternativa de controle no futuro. É possível que a expressão de toxinas de subespécies de *B. thuringiensis*, localizadas na raiz, com atividade contra Coleoptera, seja o caminho viável para o controle de pragas com hábitos subterrâneos (Bezdicsek *et al.* 1994). Dentro os insetos que atacam as hastes e de destaque na cultura da soja é o *S. subsignatus*, pois tanto o adulto como as larvas danificam a planta. Dependendo da intensidade do ataque e da fase fenológica da cultura, o dano é irreversível, ocorrendo a morte da planta e diminuição da população de plantas, o que pode acarretar perda total da área infestada (Hoffmann-Campo 1999).

A partir da bactéria Gram-positiva de solo *B. thuringiensis*, são produzidas proteínas com ação inseticida específica para larvas de Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (Höfte & Witeley 1989). Estas toxinas são usadas na formulação de bioinseticidas comerciais, um dos principais métodos que oferece resultados desejáveis e consistentes em controle biológico. Contudo, problemas relacionados: I) à reduzida persistência das toxinas puras sobre a planta por tempo suficiente para a ação entomocida eficaz, II) ao difícil acesso da toxina à praga pelas suas características físico-químicas, e III) aos ainda elevados custos de fabricação destes bioinseticidas, são responsáveis pelo pouco difundido emprego deste sistema de controle biológico. Como pode ser evidenciado, há ainda a necessidade premente de continuar identificando novas toxinas e cepas, com o intuito de aprimorar a eficácia das formulações inseticidas e reduzir custos. Com o progresso atual no campo da engenharia genética de plantas, surgem alternativas concretas para viabilizar um mais amplo emprego destas toxinas de *B. thuringiensis*, destacando-se a possibilidade de obtenção e uso de plantas transgênicas contendo os genes codificadores dessas toxinas.

A principal atividade inseticida da bactéria *B. thuringiensis* advém de inclusões de cristais protéicos acumulados durante o processo de esporulação, os quais possuem distintos formatos facilmente distinguíveis em microscopia de

contraste-de-fase (Bravo 1997). Höfte & Whiteley (1989) classificaram os genes *cry* de acordo com a seqüência de aminoácidos de seus produtos e a especificidade de ação das toxinas. Por este método foram descritos cinco grupos de genes *cry* diferentes organizados em algarismos romanos (I – V). No entanto, como consequência do avanço da biologia molecular de *B. thuringiensis*, novos genes *cry* foram sequenciados e catalogados, originando diversas exceções dentro desta classificação. Por esta razão, Crickmore *et al.* (1998) propuseram a nova classificação baseada somente na seqüência de aminoácidos codificada pelos genes, não levando em consideração o perfil de toxicidade.

Segundo Lecadet *et al.* (1999) a classificação das linhagens da espécie *B. thuringiensis*, a qual é baseada nas propriedades bioquímicas e composição do antígeno flagelar, contém 69 sorotipos e 13 grupos sub-antigênicos. Esta classificação, no entanto, não leva em conta o perfil de toxicidade apresentado pelas linhagens, o qual é definido principalmente pelo tipo de δ -endotoxina produzida. Também, esta diversidade de linhagens demonstra o elevado grau de variabilidade genética apresentado pela espécie.

Em geral, os genes que codificam as proteínas Cry encontram-se em plasmídeos de diversos tamanhos (4 - 150 MDa), não somente em combinações distintas e/ou várias cópias dentro de um plasmídeo, mas também por combinações de plasmídeos presentes nas diversas cepas de *B. thuringiensis* (Lereclus *et al.* 1993). Há um enorme potencial adaptativo das cepas de *B. thuringiensis*, em termos de insetos-alvo, decorrente desta multiplicidade e diversidade dos cristais protéicos inseticidas. A associação de processos de conjugação e transposição dos genes *cry* seria responsável por tal diversidade (Mahillon *et al.* 1994). Além disso, foi demonstrado que a toxicidade e solubilidade das inclusões de cristais inseticidas das diversas cepas de *B. thuringiensis* estariam relacionadas com a composição de protoxinas existentes, o que varia com a composição gênica existente numa dada cepa (Aronson 1995).

Até o momento, cerca de 250 genes *cry* foram sequenciados e classificados em 46 grupos e em diferentes subgrupos, dependendo do grau de similaridade de seus aminoácidos (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Estes genes podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40 - 200 MDa) (Gonzáles *et al.* 1982, Sanchis *et al.* 1988, Lereclus *et al.* 1982), ou concomitantemente em ambos. A expressão dos genes *cry* é

regulada por dois mecanismos: I) dependente dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, no qual está classificado a maioria dos genes *cry*, e II) independente do processo de esporulação como o *cryIII*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Inglis *et al.* 1998).

O modo de ação inseticida das δ -endotoxinas é sofisticado em termos moleculares, redundando em alta especificidade e extrema toxicidade (Valadares-Inglis *et al.* 1998). As etapas no processo de ação bioinseticida seriam a: I) ingestão da toxina pelo inseto (ainda sob forma de protoxina de maior peso molecular), II) a solubilização dos cristais no meio alcalino do mesêntero, III) a clivagem proteolítica da protoxina em peptídeos ativos menores (~65 KDa), IV) ligação destes em receptores alojados na porção apical das microvilosidades celulares do mesêntero, V) provável mudança na conformação tridimensional do peptídeo e inserção na membrana, VI) constituição de poros permeáveis que possibilitam vazamento de íons, e VII) turgescência e destruição celular, levando à morte do inseto (Knowles 1994, Nielsen-Leroux 1996).

Nos insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, a intoxicação se manifesta por uma paralisação imediata do tubo digestivo e peças bucais, levando à lise celular e interrupção da alimentação. Estes sintomas são seguidos por ruptura na integridade do intestino, inanição e posterior septicemia levando o inseto à morte (Arantes *et al.* 2002).

Portanto, a disponibilidade de níveis adequados das toxinas de fácil acesso à ingestão pelo inseto, e de persistência assegurada na planta, são os principais argumentos em favor do uso de plantas transgênicas expressando genes *cry* (Koziel *et al.* 1993, Valadares-Inglis *et al.* 1998). Além disso, ensaios de campo realizados com as primeiras plantas transgênicas de milho expressando o gene *cryIAb* de *B. thuringiensis* que confere resistência a *Spodoptera* sp. revelaram um incremento significativo da resistência dos transgênicos ao ataque destes e outros insetos (Williams *et al.* 1997), reafirmando a viabilidade da tecnologia e a importância de se ter genes entomocidas isolados e caracterizados. A constante pesquisa por novos genes e toxinas de *B. thuringiensis* com melhores características de ação sobre insetos-praga deve também fazer parte de um programa de controle biológico envolvendo plantas transgênicas, por oferecer

alternativas à constituição de formulações bioinseticidas mais eficientes e de menor custo (Bohorova *et al.* 1998).

Segundo Arantes *et al.* (2002), na década de 1980, o avanço no conhecimento da genética molecular do *B. thuringiensis* permitiu a diversificação das estratégias de sua utilização no controle biológico. A demanda crescente desta bactéria e a diversidade das formas de controle levaram a uma preocupação com os aspectos ecológicos de sua utilização e também com o impacto que estes produtos podem causar. As técnicas de diagnóstico molecular foram inicialmente utilizadas na taxonomia de microrganismos e têm sido intensamente aplicadas em programas de melhoramento genético. Além disso, tem por objetivo revelar a variabilidade em nível de DNA e, conseqüentemente, detectar diferenças entre indivíduos (Marques *et al.* 2002).

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis, em meados da década de 1980 (Mullis & Fallona 1987, Mullis 1990) e tem como característica polimerizar moléculas de DNA, usando um modelo de DNA de fita simples a partir de uma reação que gera uma dupla fita, utilizando oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores). Essa técnica, inicialmente, causou grande impacto na biologia molecular e depois em várias outras áreas sendo uma das principais o diagnóstico de agentes infecciosos de maneira rápida e específica (Schrank & Vainsteis 2002).

Diversos trabalhos que utilizam a técnica da PCR, diretamente ou de técnicas dela derivadas, têm sido publicados desde a sua descrição (Scheinert *et al.* 1996, Chen & Tsen 2002, Lima *et al.* 2002, Porcar & Juárez-Pérez 2003). Esses trabalhos têm permitido avanços significativos tanto em áreas básicas, como naquelas que buscam o entendimento de processos biológicos fundamentais, como em áreas aplicadas, dentre as quais a identificação de genótipos, o diagnóstico de doenças, estudos filogenéticos, o melhoramento genético de plantas, animais e microrganismos (Anderson & Stasovski 1992, Ouellet & Seifert 1993). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade desta técnica tornaram-na uma poderosa ferramenta em estudos genéticos que envolvem um grande número de organismos vivos (Ferreira & Grattapaglia 1998). Por ser uma técnica simples, pouco tempo após sua descrição, diversos pesquisadores realizavam experimentos empregando modificações no princípio original, de maneira a expandir consideravelmente a aplicação desta técnica (Foster *et al.* 1993).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a PCR. Estas técnicas apresentam aplicações tais como: I) a determinação da persistência da bactéria no ambiente, que segundo Bourque *et al.* (1993), pode ser evidenciada pela presença de genes *cry*, detectada por iniciadores específicos a partir de cadáveres de insetos provenientes de áreas tratadas com bioinseticidas. Os autores fizeram uso da técnica de PCR multiplex para detecção e diferenciação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em inseticidas microbianos e em insetos mortos. Todas as cepas isoladas dos cadáveres de insetos foram correlacionadas aos produtos específicos de PCR encontrados na cepa comercial utilizada e II) a predição da atividade tóxica de uma linhagem pela determinação do tipo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e direcionando os trabalhos de bioensaios (Carozzi *et al.* 1991, Kalman *et al.* 1993, Chak *et al.* 1994, Cerón *et al.* 1995, Bravo *et al.* 1998, Vilas-Bôas *et al.* 2000, Vilas-Bôas 2002).

A técnica de PCR tem sido ainda, utilizada em combinação com a técnica de Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) onde o produto de amplificação é clivado com enzimas de restrição e o padrão de bandas obtidos em géis, determina os tipos de genes *cry* presentes na linhagem ou identifica a ocorrência de novos tipos de genes (Kuo & Chak 1996).

No primeiro capítulo, a obtenção de isolados de *Bacillus thuringiensis* será abordada, bem como bioensaios para avaliação dos mesmos serão realizados por meio da utilização de Lepidoptera e Coleoptera pragas da cultura da soja, visando à obtenção de isolados com atividade entomocida. Destes, iremos determinar a concentração letal média bem como verificaremos a ocorrência de sinergismo entre isolados da bactéria e produtos inseticidas ou EDTA. Também, será destacada a formação do banco de genes, o qual permanecerá disponibilizado a comunidade científica, e caracterizá-lo para uso em formulações e/ou tecnologia de transgênicos resistentes a insetos-praga, e que sirva de recurso para o desenvolvimento de pesquisas em controle de pragas, biodiversidade e sistemática. No segundo capítulo, enfocaremos a análise e caracterização dos isolados que apresentaram atividade entomocida para as espécies de Lepidoptera testadas mediante o uso de técnicas moleculares, a exemplo da PCR e sequenciamento.

Assim sendo, o trabalho tem a finalidade de contribuir para o controle biológico de insetos-praga da soja - *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Pseudoplusia includens*, *Sternechus subsignatus* e *Phyllophaga cuyabana* - através da identificação e do isolamento de genes de *B. thuringiensis* codificadores para toxinas entomocidas eficientes contra raças destes insetos adaptadas às condições tropicais de cultivo.

2. LITERATURA CITADA

Anderson, J.B. & E. Stasovski. 1992. Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia*. 84: 505 - 516.

Arantes, O.M.N., L.A. Vilas-Bôas & G.F.L.T. Vilas-Bôas. 2002. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. 2: 269 – 293. In: Serafini, L.A., N.M. Barros & J.L. Azevedo. (Org.). *Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria*. Caxias do Sul: EDUSC. 463p.

Aronson, A. 1995. The prototoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4057 - 4060.

Bezdicsek, D.F., W.A. Pullman, M.A. Quinn, L. Forse, D. Heron & M.L. Kah. 1994. Insecticidal activity and competitiveness of *Rhizobium* spp. containing the *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* delta-endotoxin gene (*cryIII*) in legume nodules. *Soil biol. biochem.* 26: 1637 - 1646.

Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo. 1998. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412 - 415.

- Bourque, S.N., J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie & R.C. Levesque. 1993.** Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523 - 527.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Peña, M. Nuñez-Valdez, M. Soberón & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965 – 4972.
- Bravo, C. 1997.** Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793 - 2801.
- Carner, G.R., M. Shepard & S.G. Turnipseed. 1974.** Seasonal abundance of insect pests in soybeans. *J. Econ. Entomol.* 67: 487 – 493.
- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola & M.G. Koziel. 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057 - 3061.
- Cerón, J., A. Ortíz, R. Quintero, L. Guereca & A. Bravo. 1995.** Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cry III* genes within a *Bacillus thuringiensis* strains collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826 – 3831.
- Chak, K.F., D. Chao, M. Tseng, S. Kao, S. Tuan & T. Feng. 1994.** Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2415 – 2420.
- Chen M.L. & H.Y. Tsen. 2002.** Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J. Appl. Microbiol.* 92: 912 – 919.

- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum & D.H. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807 - 813.
- Cruz, I., L.J. Oliveira, A.C. Oliveira & C.A. Vasconcelos. 1996.** Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 25: 293 - 297.
- DeNardo, E.A.B. & D.M.F. Capalbo. 1998.** Utilização de agentes microbianos de controle de pragas: mercado, riscos e regulamentações. *In* "Controle Biológico" (I.S. Melo & J.L. Azevedo, Eds.), pp 231 - 262. EMBRAPA, Jaguariúna, SP. 264p.
- Destéfano, R.H.R. 2003.** Detecção e identificação de *Metarhizium anisopliae* em larvas de *Diatraea saccharalis* por primers específicos. Tese de doutorado. ESALQ/USP Piracicaba, 72p.
- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1998.** Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Embrapa-Cenargen. Brasília. 220 p.
- Foster, L.M., K.R. Kozac, M.G. Loftus, J.J. Stevens & I.K. Ross. 1993.** The Polymerase Chain Reaction and its application to filamentous fungi. *Mycol. Res.* 97: 769 - 781.
- Gazzoni D.L., E.B. Oliveira, I.C. Corso, B.S. Corrêa-Ferreira, G.L. Vilas-Boas, F. Moscardi & A.R. Panizzi. 1981.** Manejo de pragas da soja. Londrina: embrapa Soja, 44p. Circular Técnica 5.
- Gomez, S.A., F. Moscardi & D.R. Sosa-Gómez 1999.** Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. *Pesq. Agropec. Bras.* 34: 1539 – 1544.

- González, J.M.J., B.S. Brown & B.C. Carlton. 1982.** Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 6951 – 6955.
- Hamadian, E.I. & H.N. Pitre. 2002.** Oviposition and larval behavior of soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean with different row spacings and plant growth stages. J. Agric. Urban. Entomol. 19: 29 - 44.
- Hoffmann-Campo, C.B. 1999.** Aspectos biológicos e manejo integrado de *Sternechus subsignatus* na cultura da soja. Londrina. Embrapa, CNPSo. Documentos 22, 32 p.
- Hoffmann, C.B., F. Moscardi, B.S. Corrêa-Ferreira, L.J. Oliveira, D.R. Sosa-Gómez, A.R. Panizzi, I.C. Corso, D.L. Gazzoni & E.B. Oliveira. 2000.** Pragas de soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina. Embrapa Soja. 66p. Circular Técnica 30.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242 - 255.
- Kalman, S., K.L. Kiehne, J.L. Libs & T. Yamamoto. 1993.** Cloning of a novel cry IC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131 – 1137.
- Knowles, B.H. 1994.** Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. Adv. Insect. Physiol. 24: 275 - 308.
- Kogan, M. & S.G. Turnipseed. 1987.** Ecology and management of soybean arthropodes. Ann. Rev. Entomol. 32: 507 – 539.

- Koziel, M.G., G.L. Beland, C. Bowman, N.B. Carozzi, R. Crenshaw, L. Crossland, J. Dawson, N. Desai, M. Hill, S. Kadwell, K. Launis, D. Lewis, D. Maddox, K. Mcpherson, M.R. Meghji, E. Merlin, R. Rhodes, G.W. Warren, M. Wright & S.V. Evola. 1993.** Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194 - 200.
- Kuo, W.S. & K.F. Chak. 1996.** Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1369 – 1377.
- Lecadet, M.M., E. Frachon, V.C. Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent & I. Thiéry. 1999.** Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 660 - 672.
- Lereclus D, M.-M. Lecadet, J. Ribier & R. Dedonder. 1982.** Molecular relationshipp among plasmids of *Bacillus thuringiensis* conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *Mol. Gen. Genet.* 186: 391 – 398.
- Lereclus, D., A. Delécluse & M.M. Lecadet. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. pp. 37 - 70. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Enwistle PF, Cory JS, Bailey M and Higgs S; eds). West Sussex, England: John Willey & Sons.
- Lima, A.S.G., A.M. Guidelli, I.L. Abreu. & M.V.F. Lemos. 2002.** Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genet. Mol. Biol.* 25: 225 - 229.
- Mahillon, J., R. Rezsöhazy, B. Hallet & J. Delcour. 1994.** IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. *Genetica* (Netherlands) 93: 13 - 26.

- Marques, E.K., N. Ikuta, V.R. Lunge & A.S.K. Fonseca. 2002.** Diagnóstico molecular e biotecnologia. p. 110 – 130. In: Serafini, L. A., Barros, N. M. de & Azevedo, J. L. de. (Coordenadores). Biotecnologia: avanços na Agricultura e na Agroindústria. EDUCS. Caxias do Sul, RS. 463p.
- Moraes, R.R. de, A.E. Loeck & L.C. Belarmino. 1991.** Flutuação populacional de *Plusiinae* e *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja do Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.* 26: 51 – 56.
- Morón, M.A. 1986.** El género *Phyllophaga* en México; morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Instituto de Ecología, México. 344p.
- Moscardi, F. 1998.** Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. p. 509 – 540. In: S.B. Alves (coord.). Controle Microbiano de insetos. (2ª ed). Piracicaba, FEALQ. 1163p.
- Moscardi, F., D.R. Sosa-Gómez, B.S. Corrêa-Ferreira. 1999.** Soybean IPM in Brazil, with emphasis on biological control tactics. In: World soybean research conference VI. Chicago, Illinois, USA. 331 - 339.
- Mullis, K.B. 1990.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56 - 65.
- Mullis, K.B. & F.A. Fallona. 1987.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzimol.* 155: 335 - 350.
- Nielsen-Leroux, C. 1996.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* toxins. pp. 264 - 269. In: V Symposium of Biological Control – Proceedings of conferences and symposia (Gazzoni DL e Sosa-Gómez; coord). Foz do Iguaçu, PR.

- Oliveira, L.J., A. Garcia, C.B. Hoffmann-Campo, J.R.B. Farias, D.R. Sosa-Gómez & I.C. Corso. 1997.** Coró-da-soja *Phyllophaga cuyabana*. Londrina. Embrapa, CNPSo. Documentos 20. 30 p..
- Ouellet, T. & K.A. Seifert. 1993.** Genetic characterization of *Fusarium graminearum* strains using RAPD and PCR amplification. *Phytopathology*. 83: 1003 - 1007.
- Polanczyk, R. & S.B. Alves. 2003.** *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. *Agrociência*. 7: 1 – 10.
- Porcar, M. & V. Juárez-Pérez. 2003.** PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS. Microbiol. Rev.* 26: 419 - 432.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux & M.-M. Lecadet. 1988.** Multiplicity of delta-endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* 2: 393 - 404.
- Scheinert, P., R. Krausse, U. Ullmann, S. Rainer & G. Krupp. 1996.** Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. *J. Microbiol. Methods*. 26: 103 – 117.
- Schrank, A. & M.H. Vainstein. 2002.** Metodologia da técnica do DNA recombinante: uma visão geral de seus princípios. p.13 - 44. In: Serafini, L.A., N.M. de Barros & J.L. Azevedo. (Coord.). *Biotechnology: avanços na Agricultura e na Agroindústria*. EDUCS. Caxias do Sul, RS. 463p.
- Stewart Jr, C.N., M.J. Adang, J.N. All, H.R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker & W.A. Parrott. 1996.** Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. *Plant physiology*. 112: 121 – 129.

Valadares-Inglis, M.C.C., M.T. De-Souza & W. Shiler. 1998. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. *In* “Controle Biológico” (I.S. Melo and J.L. Azevedo, Eds.), pp 201 - 230. EMBRAPA, Jaguariúna, SP. 264p.

Vilas-Bôas, G.F.L.T. 2002. Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus*. Tese de Doutorado. FCAV/UNESP, Jaboticabal: 102p.

Vilas-Bôas, L.A., G.F.L.T., Vilas-Bôas, H.O. Saridakis, M.V.F. Lemos, D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 2000. Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. FEMS. Microbiol. Ecol. 31: 255 – 259.

Williams, W.P., J.B. Sagers, J.Á. Hanten, F.M. Davis & P.M. Buckley. 1997. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. Crop. Sci. 37: 957 - 962.

2. CAPÍTULO I

**Prospecção de genes de *Bacillus thuringiensis* e
determinação de sua atividade entomocida para espécies
de Lepidoptera e Coleoptera pragas da soja**

2. CAPÍTULO I - Prospecção de genes de *Bacillus thuringiensis* e determinação de sua atividade entomocida para espécies de Lepidoptera e Coleoptera pragas da soja

2.1. RESUMO

A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada e os inseticidas biológicos, são uma alternativa para o controle de insetos nocivos, principalmente, pelo emprego de microrganismos entomopatogênicos. Dentre eles, o *Bacillus thuringiensis* se destaca por apresentar atividade tóxica contra insetos das Ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. O objetivo deste trabalho foi a obtenção de isolados com ação entomocida eficaz de seus *pellets* (esporos e cristais) contra Lepidoptera e Coleoptera pragas da soja, a partir de amostras de solo obtidas em território brasileiro. Determinando-se sua toxicidade, a ação sinérgica quando combinados *B. thuringiensis* e inseticidas (clorpirifós, endossulfan, triclorfon, monocrotofós, spinosad) ou EDTA e a formação de um banco de isolados da bactéria. Como resultado, foi constituído um banco com 341 isolados de *B. thuringiensis*, onde foram obtidos 12 isolados com ação entomocida para as espécies de Lepidoptera estudadas e nenhum isolado apresentou ação entomocida para os Coleoptera (*Sternechus subsignatus*, *Phyllophaga cuyabana*, *Diabrotica speciosa* e *Alphitobius diaperinus*) estudados. Para as espécies *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* a CL_{50} variou conforme o isolado utilizado e não foi possível comprovar nenhuma atividade sinérgica em lagartas de *A. gemmatalis* entre *B. thuringiensis* e os produtos analisados, embora diferenças significativas tenham sido constatadas quando comparados o peso das lagartas de *A. gemmatalis* sobreviventes tratadas com *B. thuringiensis* associado a EDTA ou Nim e a testemunha.

2.2. ABSTRACT

Prospection of *Bacillus thuringiensis* genes and determination of its entomocidal activity against species of the Lepidoptera and Coleoptera pest of the soybeans crops.

Biological insecticides are desirable alternatives to control insect pests, mainly entomopathogenic microorganisms. Among them, *Bacillus thuringiensis* has an outstanding position due to toxic activity on Lepidoptera, Diptera and Coleoptera Orders. Our purposes were to obtain Brazilian isolates with insecticidal activity of their *pellets* (spores and crystals) against Lepidoptera and Coleoptera soybean pests and to establish a *B. thuringiensis* culture collection. Bioassays were performed to study if the isolates had synergic activity when applied with low dosages of insecticides (clorpirifós, endossulfan, triclofon, monocrotofós, spinosad), Neem or EDTA. Isolates were stored in a collection with 341 accessions. Insecticidal activity against Lepidoptera pests (*A. gemmatalis*, *S. frugiperda* and *P. includens*) was observed in 13 isolates, but none biological activity was obtained on Coleoptera (*Sternechus subsignatus*, *Phyllophaga cuyabana*, *Diabrotica speciosa* and *Alphitobius diaperinus*). The CL₅₀ for *A. gemmatalis* and *S. frugiperda* varied according to the isolate used and no synergistic activity was observed the mixtures of *B. thuringiensis* and insecticides or EDTA.

2.3. INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 67.000 espécies de insetos causem danos às plantações na ordem de 20 a 30 %, sendo as regiões tropicais as que mais sofrem com a alta incidência de insetos-praga (Herrera-Estrella 1999). Os métodos convencionais de proteção das culturas são feitos com o uso de agroquímicos; entretanto, mesmo com uma movimentação comercial de inseticidas em torno de U\$ 8,11 bilhões em 1997, as perdas de produção continuam elevadas (Peferöen 1997). A busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga tem sido realizada com afinco por vários laboratórios do mundo, devido à necessidade de uma agricultura mais sustentável e desenvolvida, com uma maior preocupação com a preservação do meio ambiente.

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita. Logo após a germinação, vários insetos como *Sternechus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e *Phyllophaga cuyabana* (Moser) (Coleoptera: Melolonthidae) danificam a cultura. As lagartas *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) e *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e outros desfolhadores atacam a planta, ocorrendo em maior número durante as fases vegetativa e de floração.

Dentre os Lepidoptera-praga da cultura da soja, três noctuídeos de destaque são: I) *A. gemmatalis* que se encontra distribuída no continente americano desde os Estados Unidos da América até a Argentina (Gazzoni *et al.* 1981, Kogan & Turnipseed 1987) e no Brasil, esse inseto pode ser encontrado em todas as regiões onde a soja é cultivada (Hoffmann *et al.* 2000), sendo uma praga-chave responsável pelo consumo de mais de 50 % dos inseticidas químicos utilizados nessa cultura (Moscardi 1998), II) *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), que é uma das principais pragas da cultura do milho no Brasil (Cruz *et al.* 1996) e, conforme Moscardi & Kastelic (1985), também pode atacar a cultura da soja e, à semelhança da *A. gemmatalis*, seu controle é feito basicamente com inseticidas químicos, sendo que o controle através do uso de patógenos pode se tornar uma alternativa viável, III) *P. includens* que anualmente causa severos danos à cultura da soja no sul dos Estados Unidos (Hamadian & Pitre 2002); no Brasil, esta espécie pode ser encontrada em todas as áreas cultivadas com soja e tem-se

observado que sua ocorrência é simultânea à de *A. gemmatalis*, também, não tem sido raro encontrá-las de forma isolada, principalmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento da cultura (Moraes *et al.* 1991).

Dentre os representantes dos Coleoptera-praga da cultura da soja, dois se destacam: I) *S. subsignatus*, citado por Panizzi *et al.* (1977) como praga secundária no plantio de soja. Entretanto, como seu potencial de dano é grande, visto que tanto as larvas como os adultos danificam a soja, a cada safra esse inseto se torna mais importante, assumindo, em muitos locais, a condição de praga principal (Hoffmann-Campo *et al.* 1991). O controle químico é insatisfatório, pois são necessárias várias aplicações de inseticidas de amplo espectro de ação e em doses altas nas áreas infestadas e II) *P. cuyabana*, que se caracteriza por atacar as raízes da planta e suas larvas podem causar a morte da planta, principalmente, quando ocorre sincronia da fase inicial da cultura com larvas de mais de 15 mm de comprimento (Hofmann-Campo *et al.* 2000).

Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 50 anos no Brasil, são uma alternativa para o controle mais seletivo de insetos nocivos. Esta prática inclui, principalmente, o emprego de microrganismos (Bobrowski *et al.* 2003). Atualmente, são conhecidos muitos microrganismos entomopatogênicos, especialmente fungos, vírus e bactérias, que podem ser empregados no controle biológico de insetos praga (Valadares–Inglis *et al.* 1998). Além disso, a utilização de inseticidas biológicos no controle de pragas apresenta diversas vantagens para o agroecossistema, comparativamente com a utilização dos inseticidas químicos (Kogan 1998, Moscardi 1999). Dentre os microrganismos empregados no controle biológico, o *B. thuringiensis* se destaca por apresentar atividade tóxica, codificadas pelos genes *cry*, contra cerca de 130 espécies de insetos das Ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera, estando inclusas importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) e *A. gemmatalis* (Lereclus *et al.* 1993). A primeira classificação destes cristais protéicos inseticidas, também denominados de proteínas Cry ou δ -endotoxinas, considerou o espectro de toxicidade em insetos e invertebrados (Hofte & Whiteley 1989). Com o posterior isolamento de mais genes para essas proteínas, tal classificação passou a ser impraticável, visto que surgiram genes homólogos aos já conhecidos, mas com diferente especificidade, bem como genes com especificidades combinadas (Bravo 1997, Crickmore *et al.* 1998).

Diversos estudos têm sido realizados para encontrar ação sinérgica combinadas entre patógeno-patógeno ou patógeno-inseticida para controlar insetos-praga, em especial utilizando *B. thuringiensis* (Govindarajan *et al.* 1976, Richter & Fuxa 1984, Lui & Tabashnik 1997, Broderick *et al.* 2000, Brickle *et al.* 2001). Estudos de inseticidas convencionais e produtos sinérgicos têm ajudado a elucidar os mecanismos da resistência e, em alguns casos, representam ferramentas para combater a resistência (Liu & Tabashnik 1997).

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de isolados com ação entomocida eficaz de seus *pellets* (esporos e cristais) contra Lepidoptera e Coleoptera pragas da soja, a partir de amostras de solo obtidas em território brasileiro. Determinando-se sua toxicidade, a ação sinérgica quando combinados *B. thuringiensis* e inseticidas ou EDTA e a formação de um banco de isolados da bactéria.

2.4. MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1. Obtenção das amostras de solo e dos isolados de bactéria

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Insetos na Embrapa Soja em Londrina, Paraná. As amostras de solo foram obtidas de diferentes Estados brasileiros e de uma província da Argentina (Anexo 1) conforme metodologia descrita a seguir: Foram coletadas cinco amostras de solo, com cerca de 30 g cada e com profundidade máxima de 10 cm. Cada amostra foi colocada separadamente em sacos plásticos e devidamente identificada quanto: I) ao tipo de solo, preferencialmente latossolo, II) localidade de coleta e III) existência ou não de cultura/mata.

Realizada a devida identificação, a cada grama de solo/amostra foi adicionado 5,0 mL de solução salina - a qual foi preparada com 0,8 g de NaCl em 100 mL de água destilada, passando pelo processo de autoclavagem (120 °C por 15 minutos) e armazenagem, em baixa temperatura, após o esfriamento - homogeneizado e aguardado 15 minutos para decantação. Em seguida, 1,0 mL da suspensão foi transferido para um microtubo e dado o choque térmico: 30 minutos a 65 °C seguido de 5 minutos no gelo. Posteriormente, foi retirado 50 µL da suspensão e espalhado em placas de Petri contendo meio de cultura Lurian

Bertani (LB) e penicilina (Silva *et al.* 2002). As placas de Petri foram vedadas com filme de PVC e incubadas a 30 °C por 24 horas. Quando então, as colônias de bactérias que apareceram foram observadas no microscópio de contraste de fase para verificação da presença dos esporos e cristais.

Quanto ao meio de cultura LB, seguindo metodologia de Valicente & Barreto (2003), os reagentes utilizados foram (q.s.p. 1 L): Glicose - 1,0 g; Caldo nutritivo - 8,0 g; Extrato de levedura - 2,0 g; MgSO₄ - 0,3 g; FeSO₄ - 0,02 g; ZnSO₄ - 0,02 g; MnSO₄ - 0,02 g e ágar - 12,0 g (este último, é acrescentado quando necessário para obter meio solidificado). Para o preparo, cada reagente foi colocado em um becker com 500 mL de água destilada até conseguir uma mistura homogênea. O pH da mistura foi ajustado para 7,5 (utilizando NaOH ou HCl). O volume foi completado para 1000 mL no balão volumétrico e posteriormente transferido para o erlenmeyer de 1000 mL, que foi vedado com algodão e papel alumínio. Por fim, o meio de cultura foi esterilizado na autoclave a 120 °C por 15 minutos. Antes de verter o meio LB nas placas de Petri, foram adicionados 10 µg/L de penicilina G-potássica quando o meio atingiu a temperatura aproximada de 55 °C.

As colônias de bactérias que apresentaram cristais e características de *B. thuringiensis* foram selecionadas e plaqueadas individualmente, vedadas e incubadas a 30 °C por 48 horas. Esse plaqueamento foi feito através da alça de platina após flambagem. As colônias de bactérias desenvolvidas foram observadas por meio de lâminas ao microscópio e, aquelas que apresentaram cristais foram selecionadas e seus *pellets* acondicionados em tubos e armazenados a -20 °C para posterior realização dos bioensaios com os insetos selecionados.

2.4.2 Bioensaios de toxicidade de *B. thuringiensis* em Lepidoptera

Numa primeira etapa, apenas 10 isolados, por Estado, foram utilizados (Chack *et al.* 1994). Na ausência de isolados com ação entomocida nos insetos testados, nova seleção foi realizada até que fosse obtido pelo menos um isolado com atividade inseticida. Devido à dificuldade de obter insetos em quantidade suficiente, principalmente os Coleopteras, nem todos os isolados puderam ser testados (Anexo 2).

Nos bioensaios, após a avaliação final, os insetos mortos foram coletados e macerados, a fim de se verificar se os insetos em questão haviam sido mortos pela ação da bactéria. Também, o reisolamento de *B. thuringiensis* a partir dos insetos mortos foi realizado para verificar a possibilidade de conseguir maior mortalidade nos testes feitos com os isolados encontrados.

Três espécies de Lepidoptera foram testadas: I) *A. gemmatalis* - Dietas artificiais (Hoffmann-Campo 1985) foram usadas para alimentação das lagartas de 2^o e 3^o ínstares larvais, II) *S. frugiperda* – as lagartas utilizadas apresentavam idade entre um e dois dias da eclosão e a dieta artificial utilizada foi confeccionada conforme descrita por Barreto *et al.* (1999) e III) *P. includens* – Para esta espécie, foram utilizados os mesmos ínstares larvais e dieta usada para *A. gemmatalis*.

Pedaços de dieta de aproximadamente 0,8 cm³, sem antibiótico, foram banhados com suspensão contendo esporos e cristais obtidos a partir da raspagem da placa de Petri que continha a cultura de cada um dos isolados de *B. thuringiensis* crescidos durante 18 horas, em estufa com temperatura de 30 °C. Estas suspensões continham concentrações superiores a 5,0 x 10⁸ esporos/mL, sendo esta quantidade suficiente para matar o inseto caso apresente atividade inseticida. Um fator importante foi a padronização da dieta artificial utilizada, visto que a mesma, para ser adequada, requer propriedades físicas (consistência, textura) e químicas em proporções balanceadas, de modo que estimule e mantenha a alimentação do inseto (Singh 1985, Parra 2001). O tempo de exposição da dieta na suspensão de *B. thuringiensis* foi de 10 segundos e o tempo de exposição da lagarta à suspensão de bactéria foi de 48 horas.

Foram utilizadas 25 lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*, para cada isolado testado na primeira etapa, com duas repetições. Esta fase tinha como principal finalidade obter isolados com atividade entomocida. Nos bioensaios com *P. includens*, foram utilizadas 20 lagartas/isolado testado com o mesmo número de repetições. Com os isolados que apresentaram atividade inseticida, realizaram-se novos experimentos para determinação da CL₅₀ (Silva-Werneck & Monnerat 2001, Silva *et al.* 2004).

2.4.3. Bioensaios de toxicidade de *B. thuringiensis* em Coleoptera

A atividade de *B. thuringiensis* foi avaliada em quatro espécies de Coleoptera: I) *S. subsignatus* – Folhas e pedaços da haste da planta de soja foram utilizados como substrato de alimentação destes insetos (Hoffmann-Campo *et al.* 1990, 1991), os quais foram banhados com a suspensão (5×10^8 esporos e cristais/mL) seguindo-se o mesmo procedimento descrito para os Lepidoptera. Nesta espécie os isolados da bactéria foram administrados somente para insetos adultos, II) *P. cuyabana* – Raízes secundárias da variedade de soja “Conquista” produzidas em casa-de-vegetação foram utilizadas como substrato de alimentação destes insetos (Oliveira *et al.* 1996, Garcia *et al.* 2003), as quais foram banhadas com a suspensão de esporos e cristais seguindo-se do mesmo procedimento descrito para os Lepidoptera testados. Nesta espécie os isolados da bactéria foram administrados somente para larvas. Sabendo-se, contudo, que os microrganismos participam de processos ecológicos, tais como a ciclagem de matéria orgânica e estrutura de solos (Hawksworth 1991, Trüper 1992) e, estarem intimamente relacionados às raízes e, desta forma poderem afetar os resultados dos experimentos com *B. thuringiensis*, utilizou-se de raízes de soja crescidas em hidroponia (Saxena *et al.* 1999, Saxena & Stotzky 2002), III) *Diabrotica speciosa* (Germar) – Pedaços de cenoura banhados, com a suspensão (5×10^8 esporos e cristais/mL) foram utilizados como substrato de alimentação e os 20 insetos adultos/isolado foram observados durante 5 dias após exposição aos isolados e IV) *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) - Para esta espécie, adultos de idade desconhecida e larvas com tamanho variando entre 0,7 e 1,0 cm de comprimento foram utilizados no experimento. Os insetos foram individualizados e mantidos em potes plásticos com capacidade de 500 mL. Como substrato alimentar, receberam ração para coelho (Chernaki 2004) a qual foi banhadas com a suspensão de *B. thuringiensis* contendo (5×10^8 esporos e cristais/mL) e sua mortalidade foi observada durante oito dias.

As espécies: I) *D. speciosa* é um inseto altamente polífago conhecido popularmente como vaquinha patriota. Hofmann-Campo *et al.* (2000) relataram que a fase larval deste inseto causa danos consideráveis ao sistema radicular de milho e II) *A. diaperinus*, o cascudinho-da-cama-de-aviário, é uma praga de granjas avícolas, sendo considerada uma praga cosmopolita e apresentando altos

níveis populacionais (Chernaki 2004), foram utilizadas como indicadores para espécies de Coleoptera, já que não existem métodos de criação dos Coleoptera pragas da soja. Assim foi possível ampliar o número de espécies de insetos de importância econômica testados com os isolados existentes.

Para as espécies *S. subsignatus* e *P. cuyabana* em função da dificuldade na obtenção de indivíduos suficientes e/ou sua manutenção em laboratório, visto que não são conhecidos métodos de criação em laboratório, somente foram utilizados 10 insetos por isolado. Para as espécies *D. speciosa* e *A. diaperinus* 20 adultos ou larvas, por espécie, foram utilizados por isolado.

2.4.4. Determinação da CL₅₀ para espécies de Lepidoptera

Para cálculo da CL₅₀ dos isolados de *B. thuringiensis* para duas das espécies de Lepidoptera estudadas – *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* - suspensões foram preparadas a partir dos isolados selecionados, contendo esporos e cristais. Essas suspensões, foram utilizadas para banhar cubos de dieta artificial específica para cada espécie que, posteriormente, foram colocados individualmente em copos descartáveis de 50 mL, uma lagarta foi adicionada a cada copo e tampado. Foram utilizadas cinco concentrações ($1,67 \times 10^8$, $0,55 \times 10^8$, $0,18 \times 10^8$, $0,06 \times 10^8$, $0,20 \times 10^8$ e $0,006 \times 10^8$ esporos e cristais / mL) um controle (sem inóculo) para cada isolado, com 30 lagartas por concentração e três repetições. A avaliação da mortalidade foi feita como nos bioensaios de pré-seleção dos isolados, e os valores de CL₅₀ foram determinados por meio de análise de probit (Finney, 1971) das médias dos dados dos bioensaios, realizados em dias diferentes, utilizando-se o programa Micro Probit.

2.4.5. Determinação de sinergismo entre *B. thuringiensis* e substâncias químicas

Buscando encontrar ação sinérgica combinada entre *B. thuringiensis* e inseticidas ou EDTA, foram testados isolados da bactéria (CSB248 e CSB312), inseticidas (clorpirifós, endossulfan, triclorfon, monocrotofós, spinosad), produtos naturais (Nim – *Azadirachta indica*) e EDTA, que foram administrados a lagartas de 2^o ínstar de *A. gemmatalis*, sendo os tratamentos: I) *B. thuringiensis*

(testemunha), II) *B. thuringiensis* + inseticida ou produto natural e III) inseticida ou produto natural, respectivamente para cada inseticida analisado e repetido três vezes. As observações foram realizadas diariamente até o quinto dia após início do experimento, quando então, as lagartas sobreviventes foram pesadas. A concentração utilizada para os isolados CSB314 e CSB312 foi de $3,4 \times 10^6$ e $4,2 \times 10^6$ esporos/mL, respectivamente, para o EDTA e Nim foi de 0,5 % e para os inseticidas, utilizou-se da concentração (g i.a. / Kg ou L) segundo Embrapa Soja (2004). O teste Tukey ($p < 0,05$) e análise de variância foram aplicados nos tratamentos. Também, procurando obter ação sinérgica foi realizado experimento onde em placas de Petri (15 cm Ø) contendo meio de cultura LB solidificado foram colocados, para crescer, isolados da bactéria e, cinco minutos após, foram acrescentados discos de papel (0,8 cm Ø) contendo cada um dos inseticidas ou EDTA. Os pesos das lagartas foram comparados através da análise de variância pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A avaliação final ocorreu 16 horas após.

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1. Obtenção das amostras de solo e dos isolados de bactéria

Amostras de solo foram obtidas em todos os Estados brasileiros à exceção de Alagoas, totalizando 188 amostras de solo e obtendo-se 341 isolados de *Bacillus*, os quais representaram 72 % do total de colônias obtidas. A identificação realizou-se por meio de microscopia com contraste de fase. Aquelas colônias que produziram esporos e cristais foram classificadas como *B. thuringiensis* (Anexo 1). Do total de isolados, 95 % foi coletado no solo, principalmente em latossolo, e a totalidade de isolados com atividade entomocida foi obtida nos Estados do Paraná e São Paulo. Estudos que verificam a abundância, a distribuição e a diversidade de isolados de *B. thuringiensis* são importantes não somente para a busca de novas alternativas de controle de insetos, através de isolados de linhagens com especificidade tóxicas diferentes das atualmente conhecidas, mas também para responder questões ligadas à evolução e as relações ecológicas desta espécie.

Linhagens de *B. thuringiensis* têm sido isoladas principalmente a partir de amostras de solo (Aptosoglou *et al.* 1997, Martin & Travers 1989, Ohba & Aizawa 1986, Valicente & Barreto 2003) de insetos vivos ou mortos (Bernhard *et al.* 1997,

Chaufaux *et al.* 1997) e silos de estocagem de grãos (Bernhard *et al.* 1997), bem como de outras fontes alternativas como do filoplano de espécies vegetais (Damgaard *et al.* 1998, Smith & Couche 1991) e a partir de amostras de águas de rios e lagos (Meadows 1993).

A busca de novas linhagens de *B. thuringiensis*, com potencialidades tóxicas diferentes das atualmente conhecidas, apresenta-se como uma prioridade nos projetos de pesquisa. Como exemplo, análises de amostras de solo dos cinco continentes já foram realizadas (Martin & Travers 1989, Bernhard *et al.* 1997, Chaufaux *et al.* 1997), além de vários outros programas de âmbito nacional, como nos Estados Unidos (DeLucca *et al.* 1981), no Japão (Ohba & Aizawa 1986), no Canadá (DeLucca *et al.* 1982), na Nova Zelândia (Chilcott & Wigley 1993) na Suécia (Landen *et al.* 1994) na Grécia (Aptosoglou *et al.* 1997) em Bangladesh (Hossain *et al.* 1997), na China (Hongyu *et al.* 2000) e no Brasil (Valicente & Barreto 2003).

Em todos os programas citados acima o critério adotado para a identificação das bactérias como pertencentes a espécie *B. thuringiensis* é a presença de um cristal protéico produzido durante a esporulação. Os isolados obtidos são estudados e caracterizados de acordo com um grande número de métodos incluindo a morfologia do cristal, a composição protéica destes cristais, bioensaios, perfis plasmidiais, a sorotipagem baseada nos antígenos flagelares, e os tipos de gene *cry* presentes em cada isolado, os quais vão determinar a especificidade tóxica dos cristais produzidos pela linhagem.

De acordo com Iriarte *et al.* (1998), *B. thuringiensis* pode ser obtido de amostras de solo cultiváveis ou não-cultiváveis, bem como de produtos estocados. Segundo Martin & Travers (1989) a presença constante de insetos não garante a presença do *B. thuringiensis* nas amostras de solo. Estudos ecológicos relatam que o solo pode ser considerado como um depósito dos esporos e, embora uma grande quantidade de esporos de *B. thuringiensis* esteja presente no ambiente para controlar insetos praga, sua multiplicação não ocorre em função das células vegetativas de *B. thuringiensis* morrerem rapidamente no ambiente, possivelmente devido a sua incapacidade de competirem com microrganismos autóctones. E isto é reforçado por alguns autores que relatam o decréscimo significativo do número de células de *B. thuringiensis* em solos não estéreis

quando comparado a solos estéreis (Vilas-Bôas *et al.* 2000, Thomas *et al.* 2000, Ferreira *et al.* 2003).

Hossain *et al.* (1997) relataram que *B. thuringiensis* encontra-se espalhado aleatoriamente em solos agrícolas de Bangladesh e que uma simples correlação e análise de regressão mostraram que o percentual de areia e os níveis de cobre no solo contribuíram positivamente e negativamente, respectivamente, para a abundância e distribuição dessa bactéria em solos agricultáveis. A atividade da bactéria não parece estar relacionada com o seu local de origem (Bernhard *et al.* 1997) e é comum encontrar em solos, isolados de *B. thuringiensis* sem atividade entomocida (Ohba & Aizawa 1986, Ohba *et al.* 1988, Hastowo *et al.* 1992, Bel *et al.* 1997). Estudos realizados em diferentes regiões geográficas têm demonstrado que *B. thuringiensis* é distribuído aleatoriamente em solos naturais, assim como em criatórios naturais de insetos (DeLucca *et al.* 1981, Pádua *et al.* 1982, Ohba & Aizawa 1986, Hastowo *et al.* 1992).

2.5.2. Bioensaios de toxicidade de *B. thuringiensis* em Lepidoptera

A partir da prospecção de isolados foi constituída a Coleção de Culturas de Bactérias da Embrapa Soja, com a presença de 341 isolados da bactéria, que se encontra disponível para realização de pesquisas, a exemplo da busca de novos genes *cry* e, para facilitar sua disponibilização, o mesmo pode ser acessado por meio do endereço eletrônico (www.sicom.cenargen.embrapa.br/sicom/index). Vale ressaltar o grande valor desta coleção, uma vez que engloba todas as regiões climáticas do Brasil, com alta diversidade de ecossistemas. Alguns isolados desta coleção foram originados de grãos estocados, como milho e soja e a grande maioria a partir de amostras de solo. A constituição do banco facilita a busca e a caracterização de novos genes *cry* que pode resultar em novas alternativas para o controle de espécies de insetos com nenhuma ou pouca susceptibilidade às proteínas Cry atualmente conhecidas, além de poder auxiliar no desenvolvimento de sistemas de manejo que evitem ou minimizem o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de campo de insetos alvo.

A patogenicidade de todos os 341 isolados da bactéria foi avaliada em *A. gemmatilis*. Entretanto, apenas 10 mostraram ação entomocida para esta

espécie. Para a espécie *S. frugiperda* apenas 40 isolados foram testados - 10 com ação entomocida comprovada para *A. gemmatalis* e 30 obtidos aleatoriamente do banco e sem ação entomocida para a mesma. Houve a repetição da ação entomocida dos isolados já selecionados para *A. gemmatalis* e mais outros três do grupo sem ação entomocida para *A. gemmatalis*. Para *P. includens*, apenas 13 isolados foram testados e todos apresentaram ação entomocida (Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade (%) de *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens*, com isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Código CNPSO	Espécie		
	<i>A. gemmatalis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>P. includens</i>
CSB314	100	100	78
CSB284	0	90	88
CSB287	100	94	85
CSB325	100	95	90
CSB331	100	90	100
CSB289	0	96	80
CSB293	100	88	100
CSB294	100	85	100
CSB296	100	80	80
CSB300	100	80	95
CSB303	100	88	100
CSB305	0	78	76
CSB312	100	92	90

Dentre os isolados obtidos, encontram-se aqueles provenientes de silos de armazenagem de grãos (CSB294, CSB296, CSB300, CSB303, CSB305) (Tabela 1; Anexo 1). Segundo Meadows *et al.* (1992), os silos são ambientes propícios para a obtenção de novas linhagens de *B. thuringiensis* por serem ambientes com situação ecológica particular (temperatura, umidade relativa e luminosidade controladas) e com alta diversidade biológica de insetos. Nesse ambiente, existe alta estabilidade nas condições climatológicas e ausência de luz solar (irradiação UV), a qual danifica as proteínas Cry, o que pode facilitar a reciclagem de *B. thuringiensis* devido ao fato de haver tempo e condições suficientes para a bactéria infectar, matar larvas de insetos e completar seu ciclo de vida (Lambert & Peferoen 1992). Também, isolados provenientes de solo foram selecionados e apresentaram atividade entomocida para as espécies (CSB284, CSB287 e CSB289) (Tabela 1; Anexo 1).

Diversos trabalhos relatam a atividade entomocida do *B. thuringiensis* nestas espécies (Sumerford & Solomon 2000, Valicente *et al.* 2000, Adamczyk Jr. *et al.* 2001, Ashfaq *et al.* 2001, Valicente & Barreto 2003, Silva *et al.* 2004). Krieg & Langenbruch (1981) relatam que a lagarta-do-cartucho pode ser controlada por *B. thuringiensis* (sorovarietades *thuringiensis* e *kurstaki*), mas não informam a porcentagem de mortalidade das larvas. Do mesmo modo, Hernandez (1988) relata que *B. thuringiensis* var. *kenyae* e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* causaram mortalidade de 100 % em lagartas de *S. frugiperda*, em duas dosagens testadas. Valicente & Fonseca (2004) relataram que *B. thuringiensis* var. *tolworthi* (isolado T09) causou mortalidade de 95,8 % em lagartas de *S. frugiperda* e que a maior mortalidade foi obtida numa concentração de 500 µg da mistura de esporo e cristal diluídos em 1,0 mL de água, para um tempo de exposição de 72 horas.

O fato de se terem isolados com maior efetividade tóxica contra os insetos testados nas regiões Sul e Sudeste (Anexo 2), corroborado por Silva *et al.* (2002) e Valicente & Barreto (2003), pode estar relacionado com altas densidades populacionais dessas espécies de insetos nestas regiões, onde a maior parte da cultura da soja e milho é cultivada, podendo assim essas espécies estarem exercendo uma pressão de seleção positiva sobre a população de *B. thuringiensis*. Neste caso, o controle natural desses insetos por *B. thuringiensis* levaria a uma reciclagem do mesmo, onde o próprio inseto morto seria o ambiente

ideal para que esporos fossem reciclados originando células de *B. thuringiensis* efetivas no controle destes insetos.

2.5.3. Determinação da CL₅₀ para espécies de Lepidoptera

Nossos resultados, corroborado com os de Morales *et al.* (1995), demonstraram que a mortalidade dos insetos pela *B. thuringiensis* variou entre as espécies, dose administrada e isolados testados, fato este que sugere a utilização de doses diferenciadas para o controle destas duas pragas com esse entomopatógeno. Ignoffo *et al.* (1977), constataram que lagartas de *A. gemmatalis* foram 12x mais suscetíveis à bactéria em relação a lagartas de *P. includens*. A diferença de suscetibilidade tem sido constatada em diversos trabalhos (Luttrell *et al.* 1982, Abbas Ali & Young 1993).

Tabela 2. Concentração letal média (esporo e cristal/mL) dos isolados de *Bacillus thuringiensis* para lagartas de 2^o ínstar de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda*.

Código	<i>Anticarsia gemmatalis</i>				<i>Spodoptera frugiperda</i>			
	CL ₅₀	Intervalo de confiança 95 %	χ^2	n	CL ₅₀	Intervalo de confiança 95 %	χ^2	n
CSB314	3,4 x 10 ⁶	2,6 – 6,3 x 10 ⁶	5,2*	37	4,7 x 10 ⁵	2,1 – 7,1 x 10 ⁵	8,2*	19
CSB284	-	-	-	-	4,8 x 10 ⁶	3,0 – 7,2 x 10 ⁶	6,7*	26
CSB287	3,8 x 10 ⁵	1,3 – 6,8 x 10 ⁵	7,3*	26	4,3 x 10 ⁵	2,9 – 8,2 x 10 ⁵	5,8*	25
CSB325	2,4 x 10 ⁵	1,1 – 4,0 x 10 ⁵	1,6*	31	2,5 x 10 ⁵	1,2 – 4,7 x 10 ⁵	9,7*	23
CSB331	4,4 x 10 ⁶	2,6 – 6,1 x 10 ⁶	9,5*	38	4,5 x 10 ⁷	2,3 – 7,1 x 10 ⁷	8,4*	31
CSB289	-	-	-	-	2,2 x 10 ⁷	0,9 – 5,2 x 10 ⁷	9,1*	31
CSB293	4,6 x 10 ⁶	2,3 – 7,3 x 10 ⁶	10,1*	22	5,4 x 10 ⁵	3,6 – 7,7 x 10 ⁵	10,3*	28
CSB294	3,0 x 10 ⁵	1,6 – 8,2 x 10 ⁵	6,3*	41	3,8 x 10 ⁶	1,8 – 5,6 x 10 ⁶	5,4*	36
CSB296	4,4 x 10 ⁶	1,6 – 7,8 x 10 ⁶	11,6*	39	2,9 x 10 ⁶	1,2 – 6,1 x 10 ⁶	4,4*	19
CSB300	6,2 x 10 ⁵	3,2 – 9,8 x 10 ⁵	4,8*	29	7,5 x 10 ⁶	3,6 – 11,1 x 10 ⁶	7,6*	20
CSB303	6,8 x 10 ⁵	3,6 – 16,4 x 10 ⁵	2,5*	36	5,8 x 10 ⁷	2,9 – 13,5 x 10 ⁷	12,8*	28
CSB305	-	-	-	-	2,8 x 10 ⁵	0,6 – 5,9 x 10 ⁵	7,3*	22
CSB312	4,2 x 10 ⁵	2,1 – 8,2 x 10 ⁵	6,2*	27	3,2 x 10 ⁶	1,3 – 7,1 x 10 ⁶	10,6*	24

n. = número de insetos/isolado; * = não significativo

A CL₅₀ dos isolados analisados contra lagartas de *A. gemmatalis* e *S. frugiperda* foi determinada (Tabela 2). Alguns trabalhos realizados para estimativa da CL₅₀ (Aranda *et al.* 1996, Bohorova *et al.* 1997) utilizam proteínas purificadas de *B. thuringiensis* para assegurar que o resultado expresse a atividade somente

para determinadas toxinas Cry, evitando a influência de outras toxinas, como Vip's e exotoxinas. Porém, esse não foi o objetivo deste trabalho que foi conduzido utilizando a suspensão, provavelmente, contendo mais de uma toxina. Outro aspecto a ser considerado é a comparação entre resultados em função da falta de padronização dos bioensaios, uma vez que comparações de eficiência podem levar a conclusões pouco confiáveis (Glare & O'Callaghan 2000).

2.5.4. Determinação de sinergismo entre *B. thuringiensis* e substâncias químicas

Não foi possível comprovar nenhuma atividade sinérgica em lagartas de *A. gemmatalis* entre *B. thuringiensis* e os produtos analisados. Estudos anteriores demonstraram haver sinergismo entre EDTA e *B. thuringiensis* em outras espécies de Lepidoptera (El-Moursy *et al.* 1992, Salama *et al.* 1992, Liu & Tabashnik 1997). Produtos à base de Nim também foram relatados como contendo ação sinérgica com *B. thuringiensis* (Walter 1999 citado por El-Shafie 2001).

Quanto ao peso de lagartas de *A. gemmatalis*, foram constatadas diferenças significativas quando comparados o peso das lagartas sobreviventes tratadas com *B. thuringiensis* (CSB312 e CSB314) associados a EDTA ou Nim e a testemunha (Fig. 1). Os resultados sugerem que a perda de peso nas lagartas é resultante da ação da bactéria, já que não houve diferença significativa quando aplicados isoladamente ou em conjunto. EDTA e Nim, administrados isoladamente, também promoveram perda significativa de peso nas lagartas. No experimento realizado em placas de Petri ficou constatada a ação bactericida do EDTA (0,5 %) sobre *B. thuringiensis* em função da formação de halo de inibição.

A utilização de plantas inseticidas, a exemplo do Nim, pode se constituir numa alternativa viável para o controle de pragas, principalmente considerando-se que os sistemas de produção auto-sustentáveis requerem a implantação de metodologias menos agressivas e que possam ser mantidas por um maior período de tempo como parte do agroecossistema. Nossos resultados indicam que o extrato de Nim administrado com *B. thuringiensis* causou redução no peso das lagartas quando comparado ao ensaio onde o extrato de Nim foi aplicado isoladamente, com conseqüente atraso no desenvolvimento larval. Desta forma,

podemos inferir que esse atraso no desenvolvimento possa ser conseqüência da menor eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido, resultado do desvio de parte da energia para a degradação de substâncias tóxicas presentes no Nim (Tanzubil & McCaffery 1990).

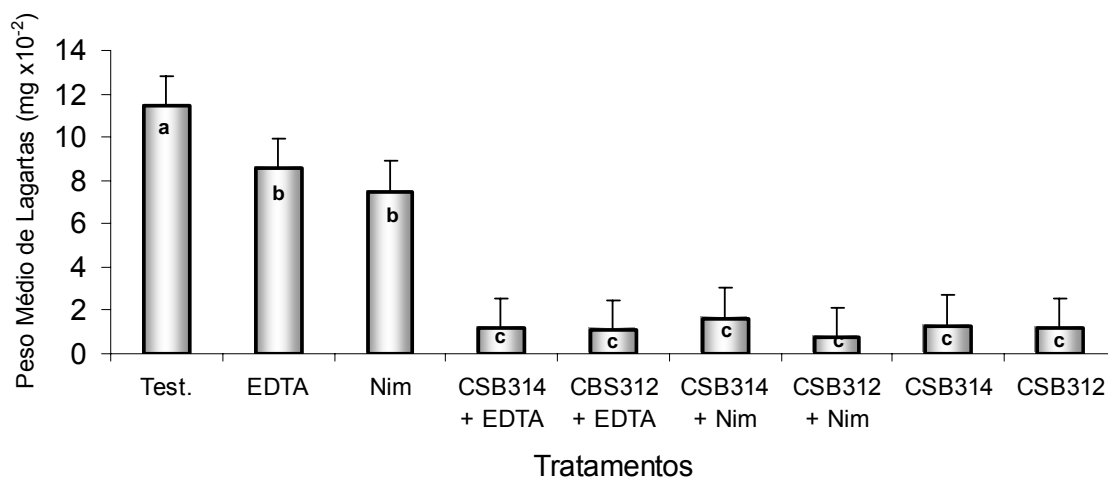


Figura 1 – Peso médio de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* tratadas com *Bacillus thuringiensis* e inseticidas ou EDTA. n = número de lagartas sobreviventes.

Casos de sucesso de sinergismo entre inseticidas químicos e *B. thuringiensis* têm sido descritos para controle de diversos noctuídeos, tais como *Spodoptera litura* (Fabricius) (Govindarajan *et al.* 1976), *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Altahtawy & Abaless 1973) e *Helicoverpa zea* (Boddie) (Brickle *et al.* 2001). Entretanto, algumas limitações no uso de tais misturas foram relatadas: I) a maioria dos inseticidas químicos não foi compatível com o controle biológico de ovo e larva de parasitóides e predadores, enquanto que *B. thuringiensis* não afetou a maioria dos insetos benéficos (Hassan & Graham-Smith 1995, Muckenfuss & Shepard 1994, Young *et al.* 1997), II) a mistura de *B. thuringiensis* com o produto químico não previne a imposição de pressão de seleção contínua para a resistência do microrganismo, III) alguns inseticidas químicos têm efeitos deterrentes sobre a praga e, portanto podem reduzir a ingestão do microrganismo e afetar sua eficácia (Hoy & Hall 1993) e IV) os produtos à base de *B. thuringiensis* reduzem a alimentação das larvas e, portanto minimizam a eficácia dos inseticidas químicos (Navon 2000).

Outra estratégia é o uso de produtos sinérgicos para aumentar a eficácia do *B. thuringiensis* na redução da quantidade de toxina necessária para obter o controle eficaz e na duração da atividade residual (Dubois & Dean 1995, Liu & Tabashnik 1997). Dubois & Dean (1995) relataram que cristais protéicos associados a esporos de *B. thuringiensis* assim como esporos e células vegetativas de algumas bactérias aumentam a mortalidade de lagartas de *Lymantria dispar* (Linnaeus). Lee *et al.* (1996) relataram que a associação das toxinas CryIAa e CryIAc atuam sinergisticamente no controle desta mesma espécie. Tang *et al.* (1996) encontraram sinergismo entre esporos de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e cada uma das três toxinas Cry1A presentes nesse isolado e, também, relataram que esporos de *B. thuringiensis* aumentaram a ação da protoxina contra lagartas de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae). Entretanto, o uso combinado de esporos e toxinas de *B. thuringiensis* aumentou a mortalidade de *P. xylostella* resistentes à toxina, comparativamente a mortalidade obtida quando a toxina foi administrada isoladamente (Miyasono *et al.* 1984, Liu *et al.* 1998).

2.5.5. Bioensaios de toxicidade de *B. thuringiensis* em Coleoptera

Embora as concentrações utilizadas tenham sido elevadas (5×10^8 esporos e cristal/mL), nenhum isolado da bactéria apresentou ação entomocida contra os Coleoptera utilizados nos bioensaios. Entretanto, foram testados 24 isolados em *S. subsignatus*, 27 em *P. cuyabana*, 25 em *D. speciosa* e 167 em *A. diaperinus* (Anexo 2).

Trabalhos envolvendo prospecção de genes para espécies de Lepidoptera e Coleoptera demonstraram que os genes codificadores de proteínas tóxicas para Lepidoptera são os mais abundantes (Bravo *et al.* 1998 e Silva *et al.* 2002). Sendo que alguns dos trabalhos relatam a não obtenção de nenhum gene codificador para Coleoptera (Chak *et al.* 1994, Ben-Dov *et al.* 1997).

Dentre a diversidade das proteínas Cry conhecidas, algumas têm sido relatadas com atividade entomocida contra Coleoptera (Elis *et al.* 2002, Méndez-López *et al.* 2003), em especial para os insetos das famílias Chrysomelidae, Bostrichidae e Curculionidae (Beegle 1996, Saade *et al.* 1996). Adicionalmente, alguns trabalhos relatam que proteínas tóxicas para Lepidoptera, também

apresentam atividade tóxica para insetos da ordem Coleoptera (Tailor *et al.* 1992, Bradley *et al.* 1995), corroborando com que *B. thuringiensis* seja uma importante fonte de diferentes toxinas inseticidas, muitas das quais com atividade inseticida contra Coleoptera praga.

De modo geral, a variação na eficiência dos isolados testados em cada espécie de inseto, seja Lepidoptera ou Coleoptera, pode ser explicada por uma série de fatores, relacionados ou não, ligados ao modo de ação deste patógeno, tais como: I) dissolução do cristal, II) ativação da protoxina e III) ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo este último fator o de maior complexidade funcional e é, geralmente, determinante no desenvolvimento da doença-alvo. Os receptores estão de alguma forma envolvidos na fisiologia dos insetos, como por exemplo, as caderinas, que são essenciais para a manutenção da solidez dos tecidos e também no rearranjo celular que ocorre numerosas vezes, em tecidos neurais e não neurais, durante o desenvolvimento embrionário do inseto (Uemura 1998). Além da especificidade, algumas toxinas podem ligar-se aos receptores sem, no entanto, esta ligação ser suficiente para causar a morte do inseto e isto se deve ao fato dessas toxinas apresentarem reduzida especificidade, resultando numa ligação pouco estável e reversível com o receptor, ou seja, a toxina apenas reconhece o receptor, mas não se liga irreversivelmente a ele. A relação intrínseca entre as toxinas e seus receptores pode levar a efeitos sinérgicos, conforme relatado por Lee *et al.* (1996).

2.6. CONCLUSÕES

Foi constituído um banco com 341 isolados de *Bacillus thuringiensis*, a partir de coleta de amostras de solo no território brasileiro e de material obtido de outras coleções.

A maioria dos isolados obtidos foi coletado no solo, em especial em latossolo, e a totalidade de isolados com atividade entomocida foi obtida nos Estados do Paraná e São Paulo.

Foram obtidos isolados de *B. thuringiensis* com ação entomocida para *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens*.

Os isolados de *B. thuringiensis* não apresentaram ação entomocida para os Coleoptera: *Sternechus subsignatus*, *Phyllophaga cuyabana*, *Diabrotica speciosa* e *Alphitobius diaperinus*.

Foram determinadas as concentrações letais dos isolados com atividade entomocida para as espécies *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*.

Não foi possível comprovar nenhuma atividade sinérgica em lagartas de *A. gemmatalis* entre *B. thuringiensis* e os produtos analisados.

Foram constatadas diferenças significativas quando comparados o peso das lagartas de *A. gemmatalis* sobreviventes tratadas com *B. thuringiensis* associado a EDTA ou Nim e a testemunha.

2.7. LITERATURA CITADA

Abbas Ali & S.Y. Young. 1993. *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki activity against larvae of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. J. Econ. Entomol. 86: 1064 – 1068.

Adamczyk Jr., J.J., D.D. Hardee, L.C. Adams & D.V. Sumerford. 2001. Correlating differences in larval survival and development of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to differential expression of Cry1A(c) delta-endotoxin in various plant parts among commercial cultivars of transgenic *Bacillus thuringiensis* cotton. J. Econ. Entomol. 94: 284 – 290.

Altahtawy, M.M. & I.M. Abaless. 1973. An integrated control trial on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) using *Bacillus thuringiensis* with insecticides. Z. Ang. Entomol. 74: 263 – 270.

- Aptosoglou, S.G., A. Sivropoulou & S.I. Koliais. 1997.** Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* in the environment of the olive in Greece. *New Microbiol.* 20: 69 - 76.
- Aranda, E., J. Sanches, N. Peferoen, L. Guereca & A. Bravo. 1996.** Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 68: 202 - 212.
- Ashfaq, M., S.Y. Young & R.W.McNew. 2001.** Larval mortality and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on a transgenic *Bacillus thuringiensis*-cotton cultivar expressing CryIAc insecticidal protein. *J. Econ. Entomol.* 94: 1053 - 1058.
- Barreto, M.R., L.L. Loguercio, F.H. Valicente & E. Paiva. 1999.** Insecticidal activity of culture supernatants from *Bacillus thuringiensis* Berliner strains against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) larvae. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 28: 675 – 685.
- Beegle, C.C. 1996.** Efficacy of *Bacillus thuringiensis* against Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). *Biocontrol. Sci. Tech.* 6: 15 - 21.
- Bel, Y., G. Francisco, T.M. Alberola, M.J. Martínez-Sebastian & J. Ferré. 1997.** Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Source. Syst. Appl. Microbiol.* 20: 652 - 658.
- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers & H.D. Burges. 1997.** Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invert. Pathol.* 70: 59 - 68.

- Bobrowski, V.L., L.M. Fiúza, G. Pasquali & M.H. Bodanese-Zanettini. 2003.** Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Cienc. Rural*. 34: 843 – 850.
- Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo 1997.** Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412 - 415.
- Bradley, D., M.A. Harkey, M.-K. Kim, K.D. Biever & L.S. Bauer. 1995.** The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65: 162 - 173.
- Bravo, A. 1997.** Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793 - 2801.
- Brickle, D.S., S.G. Turnipseed & J. Sullivan. 2001.** Efficacy of insecticides of different chemistries against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic *Bacillus thuringiensis* and conventional cotton. *J. Econ. Entomol.* 94: 86 – 92.
- Broderick, A.N., R.M. Goodman, K.F. Raffa & J. Handelsman. 2000.** Synergy between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.* 29: 101 – 107.
- Chack, K.-F., D.-C. Chao, M.-Y. Tseng, S.-S. Kao, S.-J. Tuan & T.-Y. Feng. 1994.** Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Entomol.* 60: 2415 – 2420.

- Chaufaux, J., M. Marchal, N. Gilois, I. Jehanno & C. Buisson. 1997.** Recherche de souches naturelles du *Bacillus thuringiensis* dans différents biotopes, à travers le monde. *Can. J. Microbiol.* 43: 337 - 343.
- Chernaki, A.M. 2004.** Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos. Tese de doutorado. UFPr. Curitiba. 128p.
- Chilcott, C.N. & P.J. Wigley. 1993.** Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* 61: 244 - 247.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum & D.H. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807 - 813.
- Cruz, I., L.J. Oliveira, A.C. Oliveira & C.A. Vasconcelos. 1996.** Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 25: 293 - 297.
- Damgaard, P.H. & U.M. Heller. 1988.** Observation of the Meissner effect in a lattice Higgs model. *Phys. Rev. Lett.* 60: 1246 – 1249.
- DeLucca, A.J., J.G. Simonson & A.D. Larson. 1981.** *Bacillus thuringiensis* in distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* 27: 865 - 870.
- DeLucca, A.J., M.S. Palmgreen & A. Ciegler. 1982.** *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.* 28: 452 - 453.
- Dubois, N.R. & D.H. Dean. 1995.** Synergism between cry1A insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and

vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. Environ. Entomol. 24: 1741 - 1747.

Ellis, R.T., B.A. Stockho, L. Stamp, H.E. Schnepf, G.E. Schwab, M. Knuth, J. Russell, G.A. Cardineau & K.E. Narva. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1137 - 1145.

El-Shafie, H.A.F. 2001. The use of neem products for sustainable management of homopterous key pests on potato and eggplant in the Sudan. Tese de doutorado. University of Giessen. 165p.

Embrapa Soja. 2004. Tecnologias de produção de soja. Região Central do Brasil 2005. Sistemas de Produção - Embrapa Soja. Documentos 6. 242 p.

Ferreira, L.H.P.L., M.T. Suzuki, E.N. Itano, M.A. Ono & O.M.N. Arantes. 2003. Ecological aspects of *Bacillus thuringiensis* in an oxisol. Sci. Agri. 60: 19 – 22.

Finney, D. 1971. Probit Analysis. Cambridge: Cambridge University Press. 98p.

Gazzoni D.L., E.B. Oliveira, I.C. Corso, B.S. Corrêa-Ferreira, G.L. Vilas-Boas, F. Moscardi & A.R. Panizzi. 1981. Manejo de pragas da soja. Londrina: Embrapa Soja, 44p. Circular Técnica 5.

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

Govindarajan, R., S. Jayaraj & K. Narayanan. 1976. Mortality of the tobacco, *Spodoptera litura* (F.) when treated with *Bacillus thuringiensis* combinations with boric acid and insecticides. Phytoparasitica. 4: 193 – 196.

- Hamadian, E.I. & H.N. Pitre. 2002.** Oviposition and larval behavior of soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean with different row spacings and plant growth stages. *J. Agric. Urban. Entomol.* 19: 29 - 44.
- Hassan, E. & S. Graham-Smith. 1995.** Toxicity of endosulfan, esfenvalerate and *Bacillus thuringiensis* on adult of *Microplitis demolitor* Wilkinson and *Trichogrammatoidea bactrae* Nagaraja. *Z. Pflanzenk. Pflanzensch.* 102, 428 - 442.
- Hastowo, S., B.W. Lay & M. Ohba. 1992.** Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. *J. Appl. Bacteriol.* 73: 108 - 113.
- Hawksworth, D.L. 1991.** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95: 641 - 655.
- Hernandez, J.L.L. 1988.** Évaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. *Entomophaga* 33:163 - 171.
- Herrnstadt, C., G.G. Soares, E.R. Wilcox & D.L.A. Edwards. 1986.** New Strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against Coleopteran Insects *Bio/technology.* 4: 305 - 308.
- Herrera-Estrella, L. 1999.** Transgenic plants for tropical regions: Some consideration about their development and their transfer to the small farmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5978 – 5981.
- Hoffmann, C.B., F. Moscardi, B.S. Corrêa-Ferreira, L.J. Oliveira, D.R. Sosa-Gómez, A.R. Panizzi, I.C. Corso, D.L. Gazzoni & E.B. Oliveira. 2000.** Pragas de soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina. Embrapa Soja. 66p. Circular Técnica 30.

- Hoffmann-Campo, C.B., E.B. Oliveira & F. Moscardi. 1985.** Criação massal da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*). Embrapa/CNPSo. Londrina. 23p.
- Hoffmann-Campo, C.B., J.R.P. Parra & R.M. Mazzarin. 1991.** Ciclo biológico de *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836 (Coleoptera: Curculionidae) em soja no norte do Paraná. Rev. Bras. Biol. 51: 615 - 621.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242 - 255.
- Hongyu, Z., Y. Ziniu & D. Wangxi. 2000.** Composition and ecological distribution of cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. J. Invertebr. Pathol. 76: 191 - 197.
- Hossain, M.A., S. Ahmed & S. Hoque. 1997.** Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. J. Invertebr. Pathol. 70: 221 - 225.
- Hoy, C.W. & F.R. Hall. 1993.** Feeding behaviour of *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* on leaves treated with *Bacillus thuringiensis* and esfenvalerate. Plant Sci. 38: 335 - 340.
- Ignoffo, C.M., D.L. Hostetter, R.E. Pinnell & C. Garcia. 1977.** Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki. J. Econ. Entomol. 70: 60 - 63.
- Iriarte, J., Y. Bel, M.D. Ferrandis, R. Andrew, J. Murillo, J. Ferré & P. Caballero. 1998.** Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. Syst. Appl. Microbiol. 21: 97 - 106.
- Kogan, M. & S.G. Turnipseed. 1987.** Ecology and management of soybean arthropodes. Ann. Rev. Entomol. 32: 507 - 539.

- Kogan, M. 1998.** Integrated pest management: Historical perspectives and contemporary developments. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 243 – 270.
- Krieg, A. & G.A. Langenbruch. 1981.** Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis* p. 837 - 896. In: *Microbial control of insects and mites.* Burges, H.D. (ed.). 949p.
- Lambert, B. & M. Peferoen. 1992.** Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *Bioscience* 42: 112 - 122.
- Landen, R., M. Byrne & A. Abdel-Hameed. 1994.** Distribution of *Bacillus thuringiensis* strains in southern Sweden. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 45 - 50.
- Lee, M.K., A. Curtiss, E. Alcantara & D.H. Dean. 1996.** Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 583 - 586.
- Lereclus, D., A.E. Delécluse & M.-M. Lecadet. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. pp. 37-69. In: *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice* (Enwistle PF, Cory JS, Bailey M and Higgs S; eds). West Sussex, England: John Willey & Sons.
- Liu, Y.B. & B.E. Tabashnik. 1997.** Synergism of *Bacillus thuringiensis* by ethylenediamine tetraacetate in susceptible and resistant larvae of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 287 - 292.
- Liu, Y., B.E. Tabashnik, W.J. Moar & R.A. Smith. 1998.** Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1385 - 1389.
- Luttrell, R.G., S.Y. Young, W.C. Yerian & D.L. Horton. 1982.** Evaluation of *Bacillus thuringiensis* – spray adjuvant-viral insecticide combinations against *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 11: 783 – 787.

- Martin, P.A. & W.R.S. Travers. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *App. Environ. Microbiol.* 55: 2437 - 2442.
- Meadows, M.P. 1993.** *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. p.193 - 220. In: Entwistle, P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey & S. Higgs. (coords.). *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: J. Wiley & Sons.
- Méndez-López, I., R. Basurto-Ríos & J.E. Ibarra. 2003.** *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS. Microbiol. Lett.* 226: 73 – 77.
- Miyasono, M., S. Inagaki, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda & Y. Hayashi. 1994.** Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 111 – 112.
- Moraes, R.R. de, A.E. Loeck & L.C. Belarmino. 1991.** Flutuação populacional de Plusiinae e *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja do Rio Grande do Sul. *Pesq. Agropec. Bras.* 26: 51 – 56.
- Morales, L., F. Moscardi, J.C. Kastelic, D.R. Sosa-Gómez, F.E. Paro & I.L. Soldório. 1995.** Susceptibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hubner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). *An. Soc. Entomol. Brasil.* 24: 593 – 597.
- Moscardi, F. & J.G. Kastelic. 1985.** Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja, PR. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). Resultados de pesquisa de soja, 1984/85. p.128. Embrapa-CNPSO. Documentos 15.

- Moscardi, F. 1998.** Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. p. 509 – 540. In: S.B. Alves (coord.). Controle Microbiano de insetos. (2^a ed). Piracicaba, FEALQ. 1163p.
- Moscardi, F. 1999.** Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 257 – 289.
- Muckenfuss, A.E. & B.M. Shepard. 1994.** Seasonal abundance and response of Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), and natural enemies to esfenvalerate and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Berliner in coastal South Carolina. *J. Agric. Entomol.* 11: 361 - 373.
- Navon, A. 2000.** *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. *Crop Protection.* 19: 669 – 676.
- Ohba, M. & K. Aizawa. 1986.** Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 277 - 282.
- Ohba, M., Y.M. Yu & K. Aizawa. 1988.** Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil of Japan. *Syst. Appl. Microbiol.* 11: 85 - 89.
- Pádua, L.E., P.P. Gabriel, K. Aizawa & M. Ohba. 1992.** *Bacillus thuringiensis* isolated from the Philippines. *Philipp. Entomol.* 5: 199 - 208.
- Panizzi, A.R., B.S. Corrêa, D.L. Gazzoni, E.B. Oliveira, G.G. Newman & S.G. Turnipseed. 1977.** Insetos da soja no Brasil, Centro Nacional de Pesquisa de Soja. *Boletim Técnico* 1: 1 - 20.
- Parra, J.R.P. 2001.** Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico (6^a ed). Piracicaba, FEALQ. 134p.

- Peferöen, M. 1997.** Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. Trends Biotechnol. 15: 173 – 177.
- Richter, A.R. & J.R. Fuxa. 1984.** Pathogen-pathogen and pathogen-insecticide interactions in velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 77: 1559 – 1564.
- Saade, F.E., G.B. Dunphy & R.L. Bernier. 1996.** Response of the carrot weevil, *Listronotus oregonensis* (Coleoptera: Curculionidae), to strains of *Bacillus thuringiensis*. Biol. Cont. 7: 293 - 298.
- Salama, H.S., M.S. Abd El-Baset & M. Ragaei. 1992.** Mode of action of chemical additives in enhancing the potency of *Bacillus thuringiensis* against lepidopterous insects. J. Appl. Entomol. 114: 167 – 173.
- Saxena, D., S. Florest & G. Stotzky. 1999.** Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. Nature 402: 480.
- Saxena, D. & G. Stotzky. 2002.** Bt toxin is not taken up from soil or hydroponic culture by corn, carrot, radish, or turnip. Plant Soil. 239: 165 – 172.
- Silva, S.M.B. da, J.O. Silva-Werneck, R. Falcão, A.C. Gomes, R.R. Fragoso, M.T. Quezado, O.B.O. Neto, J.B. Aguiar, M.F.G. de Sá, A. Bravo & R.G. Monnerat. 2004.** Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. J. Appl. Entomol. 128: 102 – 107.
- Silva, S.F. da, J.M.C.S Dias & R.G. Monnerat. 2002.** Isolamento, identificação e caracterização entomopatogênica de bacilos de diferentes regiões do Brasil. Comunicado técnico 70. Embrapa. 4p.
- Silva-Werneck, J. & R. Monnerat. 2001.** Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Circular Técnica 10. Brasília: Embrapa.

- Singh, P. 1985.** Multiple species rearing diets, p.19 – 24. In: P. Singh, R.F. Moore (eds). Handbook of Insect Rearing. Amsterdam, Elsevier. 1. 534 p.
- Smith, R.A. & G.A. Couche. 1991.** The Phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 311 – 315.
- Sumerford, D.V. & W.L. Solomon. 2000.** Growth of wild *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected from Bt and Non-Bt cotton. *Fla. Entomol.* 83: 354 – 357.
- Tabashnik, B.E. 1992.** Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3343 – 3346.
- Taylor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan & S. Ely. 1992.** Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* (kurstaki) delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. *Mol. Microbiol.* 6: 1211 - 1217.
- Tanzubil, P.B. & A.R. Mccafferry. 1990.** Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the african armyworm, *Spodoptera exempta*. *Crop Protection.* 9: 383 - 386.
- Tang, J.D., A.M. Shelton, J. van Rie, S. De Roeck, W.J. Moar, R.T. Roush & M. Peferoen. 1996.** Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 564 - 569.
- Thomas, D.J.I., J.A.W. Morgan, J.M. Whipps & J.R. Saunders. 2000.** Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 118 – 124.
- Trüper, H.G. 1992.** Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiversity and Conservation* 1: 227 - 236.

- Uemura, T. 1998.** The cadherin superfamily at synapse: more members, more missions. *Cell*. 93: 1095 – 1098.
- Valadares–Inglis, M.C.C., M.T. Sousa & W. Shiler, W. 1998.** Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico, p. 201 - 230. In MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) *Controle Biológico*. EMBRAPA, Jaguariúna, SP. 264p.
- Valicente, F.H & M.M. Fonseca. 2004.** Susceptibilidade da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, a diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Bras. Milho e Sorgo*. 3: 21 – 29.
- Valicente, F.H., M.R. Barreto, M.J.V. Vasconcelos, J.E.F. Figueiredo & E. Paiva. 2000.** Identificação através de PCR dos genes *cryI* de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner eficientes contra a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *An. Soc. Entomol. Brasil*. 29: 147 - 153.
- Valicente, F.H. & M.R. Barreto. 2003.** *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomol*. 32: 639 - 644.
- Vilas-Bôas, L.A., G.F.L.T., Vilas-Bôas, H.O. Saridakis, M.V.F. Lemos, D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 2000.** Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. *FEMS. Microbiol. Ecol*. 31: 255 – 259.
- Young, S.Y., T.J. Kring, D.R. Johnson & C.D. Klein. 1997.** *Bacillus thuringiensis* alone and in mixtures with chemical insecticides against heliothines and effects on predator densities in cotton. *J. Entomol. Sci*. 32: 183 - 191.

3. CAPÍTULO II

Caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com atividade entomocida contra espécies de Lepidoptera da cultura da soja

3. CAPÍTULO II - Caracterização de genes de *Bacillus thuringiensis* com atividade entomocida contra espécies de Lepidoptera da cultura da soja

3.1. RESUMO

Para *Bacillus thuringiensis*, a PCR tem muitas utilidades e pode ser empregada com a finalidade de amplificar regiões conhecidas do DNA, para comparar, geneticamente, isolados pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina. O objetivo deste trabalho foi de analisar e caracterizar isolados de *B. thuringiensis* com potencial de ação entomocida para as espécies *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens*. Todos os 13 isolados que apresentaram ação entomocida contra os Lepidoptera estudados foram caracterizados, via PCR, e apresentaram ampliações para os iniciadores *cryAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* e *cryID*. O seqüenciamento dos fragmentos de DNA do isolado CSB284 apresentou homologia (99 %) com o gene *cryIA*.

3.2. ABSTRACT

Characterization of *Bacillus thuringiensis* genes with entomocidal activity against species of the Lepidoptera of the soybeans crops.

PCR is an important tool on molecular studies of *Bacillus thuringiensis*, can be used in the amplification of known DNA regions to genetically compare *B. thuringiensis* isolates with unknown biological activity. The purpose of this work was characterize *B. thuringiensis* isolates with biological activity against *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens*. Insecticidal genes of thirteen isolates were characterized using specific primers, the obtained products correspond to the following gene toxins: *cryAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* and *cryID*. The sequence of one of them (isolate CSB284) showed high homology (99 %) with the *cryIA* gene. These isolates can be used as commercial formulations or transgenic resistant hosts to insect pests.

3.3. INTRODUÇÃO

Cerca de 250 genes *cry* foram seqüenciados e classificados em 46 grupos, dependendo do nível de similaridade de seus aminoácidos (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Estes genes podem estar localizados tanto no cromossomo como em grandes plasmídeos (40 - 200 MDa) (González *et al.* 1982, Lereclus *et al.* 1982, Sanchis *et al.* 1988), ou concomitantemente em ambos. Sua expressão é regulada por dois mecanismos: I) dependente dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, onde está baseada a classificação da maioria dos genes *cry* e II) independente do processo de esporulação, como o gene *vip 3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (Valadares-Ingliš *et al.* 1998).

A variabilidade genética existente entre diferentes isolados de *B. thuringiensis* foi estudada principalmente por meio da utilização de técnicas que têm como base a reação de polimerase em cadeia (PCR). Essa técnica, que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, se baseia em ciclos contínuos de desnaturação e amplificação das fitas de DNA mediados por enzima de DNA polimerase em pontos específicos do genoma, determinados pelo pareamento de iniciadores (seqüência de nucleotídeos de tamanho pequeno, variando geralmente entre 20 a 30 bases) específicos de seqüências complementares a este ponto (Ferreira & Grattapaglia 1998).

A técnica de PCR tem sido ainda utilizada em combinação com a técnica de Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) onde o produto de amplificação é clivado com enzimas de restrição e o padrão de bandas obtido em géis, determina os tipos de genes *cry* presentes na linhagem ou identifica a ocorrência de novos tipos de genes (Kuo & Chak 1996). Enzimas de restrição são utilizadas para cortar moléculas de DNA em fragmentos específicos que são facilmente manipulados e que podem conter determinado gene. Pequenas diferenças de DNA relacionadas são, rapidamente, detectadas, porque seus fragmentos de restrição podem ser separados e visualizados através de eletroforese em gel.

Para *B. thuringiensis*, a PCR tem muitas utilidades e pode ser empregada com a finalidade de amplificar regiões conhecidas do DNA, para comparar,

geneticamente, isolados pouco conhecidos, além de indicar o potencial inseticida de uma determinada toxina (Porcar & Juárez-Pérez 2003, Polanczyk & Alves 2003). Estas técnicas apresentam aplicações tais como: I) a determinação da persistência da bactéria no ambiente, que segundo Bourque *et al.* (1993), pode ser evidenciada pela presença de genes *cry*, detectada por iniciadores específicos a partir de cadáveres de insetos provenientes de culturas tratadas com bioinseticidas. Os autores fizeram uso da técnica de PCR multiplex para detecção e diferenciação de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* em inseticidas microbianos e em insetos mortos. Todas as cepas isoladas dos cadáveres de insetos foram correlacionadas aos produtos específicos de PCR encontrados na cepa comercial utilizada e II) a predição da atividade tóxica de uma linhagem pela determinação do tipo de genes *cry*, muitas vezes evidenciando a presença de genes desconhecidos e direcionando os trabalhos de bioensaios (Cerón *et al.* 1995, Bravo *et al.* 1998, Vilas-Bôas *et al.* 2000, Lima *et al.* 2002, Vilas-Bôas 2002).

O objetivo deste trabalho foi de analisar e caracterizar molecularmente isolados de *B. thuringiensis* com potencial de ação entomocida para as espécies de Noctuidae *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) e *Pseudoplusia includens* (Walker).

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Soja em Londrina, Paraná. Os protocolos utilizados neste trabalho são usados rotineiramente neste laboratório e, algumas vezes, são modificados em função da adequação ao objetivo proposto ou da disponibilidade de materiais.

3.4.1. Extração e quantificação do DNA

A extração de DNA genômico dos isolados de *B. thuringiensis* selecionados (CSB314, CSB284, CSB287, CSB325, CSB331, CSB289, CSB293, CSB294, CSB296, CSB300, CSB303, CSB305 e CSB312) foi realizada conforme descrito a seguir: Tubos Falcon (10 mL) contendo 5,0 mL de meio Lurian Bertani (LB) e inóculo de cada isolado foram mantidos sob agitação constante de 100 r.p.m. e 30 °C por um período de 16 horas. Após o crescimento dos isolados foram coletados

4,5 mL da cultura por centrifugação a 13.000 x g, 25 °C por 2 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) com o auxílio de pipeta. Foram adicionados 40 µL de tampão de Lise (25 mM de Tris em pH 8, 1 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 15 % de sacarose) contendo 5,0 mg de Lisozima mL⁻¹ e incubados, em banho-maria, por 1 hora a 37 °C. Passado este período foram adicionados 30 µL de SDS (10 %) e agitados suavemente durante 3 minutos. Em seguida, foram acrescentados 5,0 µL de NaCl (1 M), foi realizada branda agitação e acrescentados 300 µL de clorofórmio : álcool isoamílico (24 : 1). A mistura foi agitada, manualmente, para homogeneizar as amostras, até tornar sua aparência leitosa. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g, 25 °C por 5 minutos e os sobrenadantes transferidos com o auxílio de pipeta para novos tubos (1,5 mL), aos quais foram adicionados 2,5 volumes de etanol gelado e mantidos a -20 °C por 1 hora. As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000 x g, 5 °C durante 20 minutos. Novamente os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensionados em 50 µL de TE.

A integridade e concentração do DNA foram inferidas através de gel de agarose (0,8 %) corado com 0,1 ng/mL de brometo de etídio, utilizando como padrão Lambda DNA nas concentrações de 25ng, 50ng e 75ng. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1x (21,6 g de Tris; 11,0 g de ácido bórico; 8,0 mL de EDTA 0,5 M e água destilada) a 120 V por 60 minutos. A visualização do gel foi feita em transluminador de luz ultravioleta *THX-35M* da *Life Technologies*, a imagem foi fotografada por meio do sistema *Kodak Digital DC 290* e gravada em computador. As amostras foram diluídas 100x em água estéril para serem utilizadas na PCR e as alíquotas foram armazenadas a -20 °C.

3.4.2. Caracterização de genes *cryI*

A caracterização de genes *cry* foi realizada através da técnica de PCR em isolados de *B. thuringiensis* que demonstraram atividade entomocida (CSB314, CSB284, CSB287, CSB325, CSB331, CSB289, CSB293, CSB294, CSB296, CSB300, CSB303, CSB305 e CSB312), em bioensaios de laboratório, sobre *A. gemmatalis*, *S. frugiperda* e *P. includens*, utilizando-se de iniciadores gerais e específicos - *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIEa*, *cryIF*, *cry9A*,

cry9B, *cry9C* - bem como outros desenhados por Valicente, F.H. - Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1) e seguindo as condições descritas conforme Cerón *et al.* (1994 e 1995) e Bravo *et al.* (1998) (Tabela 1). Também, iniciadores do gene *gyrB*, amplamente utilizados para diferenciar espécies de *Bacillus* (Yamamoto & Harayama 1995, Yamada *et al.* 1999, Chen & Tsen 2002) foram utilizados para confirmação de que os isolados selecionados pertenciam a este gênero.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação, via PCR, de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*.

Gene	Seqüência 5' a 3'	Temp. pareamento	Gene	Seqüência 5' a 3'	Temp. pareamento
<i>cryIAa</i> *	ttataactggttcaggccc (f) ttggagctctcaagggtgaa (r)	53 °C	<i>cry9A</i> §	gttgatacccgaggcaca (f) ccgctccaataacatctttt (r)	51°C
<i>cryIAb</i> *	aacaactatctgttcttgac (f) ctcttattatactactactac (r)	53 °C	<i>cry9B</i> §	tcattggataagagttggtgatagac (f) ccgctccaataacatctttt (r)	51°C
<i>cryIAc</i> *	gtagattaatagtagtgg (f) ttagctggtactgtattg (r)	53 °C	<i>cry9C</i> §	ctggccgttcaatcc (f) ccgctccaataacatctttt (r)	51°C
<i>cryIB</i> *	ctcatcacgatggagtaa (f) cataattggtcgttctgtt (r)	53 °C	<i>cry1Fb3</i> completoF ⁺	aaagtcgacatatgaagaataacattc	55 °C
			<i>cry1Fb3</i> completoR	aaagtcgactcgcgactattcctccataag	
<i>cryIC</i> *	aaagatctggaacacctt (f) caaactctaaatccttcac (r)	53 °C	<i>cry1Ab4</i> completoF ⁺	aaaggatccgaggttaacttatggataac	60 °C
			<i>cry1Ab4</i> completoR	aaaggatccgaggttaacttatggataac	
<i>cryID</i> *	ctgcagcaagctatccaa (f) atngaattgtcaaggcctg (r)	53 °C	<i>cry1Fa1</i> completoF ⁺	gtggaggggaacatatggag	51 °C
			<i>cry1Fa1</i> completoR	gagactattcctccataag	
<i>cryIEa</i> #	ggaaccaagacgaactattgc (f) ggttgaatgaaccctactccc (r)	53 °C	<i>cry1Fa + Fb 1321F</i> ⁺	taatagggcggaaattggag	54 °C
			<i>cry1Fa + Fb 1561R</i>	aagccccagttacataatgag	
<i>cryIF</i> #	tgaggattctccagtttctgc (f) cggttaccagccgtatttcg (r)	53 °C	<i>cry1Fb 1192F</i> ⁺	gggtttacaggtggtgat	47 °C
			<i>cry1Fb 2400R</i>	cccgttacattgtttt	
<i>cryIG</i> #	atatggagtgaatagggcg (f) tgaacggcgattacatgc (r)	53 °C	<i>cry1Fb1 - 1F</i> ⁺	tgcaatgaattatgggtc	51 °C
			<i>cry1Fb 390R</i>	cacaaagtgaaccaattttac	

Iniciadores desenhados por: * = Cerón *et al.* (1994), # = Cerón *et al.* (1995), § = Bravo *et al.* (1998) e + = Valicente, F.H. (Dados não publicados).

As temperaturas de pareamento foram determinadas em função da literatura (Cerón *et al.* 1994, 1995, Bravo *et al.* 1998) e confirmadas por meio da realização

de testes de gradiente de temperatura, onde os componentes da reação foram preparados e distribuídos em 12 microtubos – um tubo para cada temperatura, colocados para realização da amplificação em termociclador *PTC 200 – MJ Research*, nas seguintes condições: 2 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto de 48° a 60 °C (48,0; 48,3; 48,9; 50,0; 51,4; 53,1; 55,2; 56,9; 58,2; 59,1; 59,7; 60,0 °C), e 1 minuto a 72 °C, com complemento de 5 minutos a 72 °C. A eletroforese foi realizada em géis de agarose a 1,0 %, corado com brometo de etídio (0,1 mg/mL), em cubas horizontais (Horizon 20 – 25), a 120 V durante 150 minutos. Visualizado em transluminador de luz ultravioleta *THX-35M* da *Life Technologies*, a imagem foi fotografada por meio do sistema *Kodak Digital DC 290* e armazenada em computador.

Após confirmação da temperatura de pareamento, foram preparadas as reações, onde 5,0 µL de DNA diluído foram transferidos para tubo contendo 1,0 µL de dNTP's (2,5 mM), 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µL de cada oligonucleotídeo (10 µM), 2,0 µL de tampão (tris-KCl) (10x) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5,0 u/µL), em um volume total de 20 µL. A amplificação foi processada em termociclador, conforme as seguintes condições: 2 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto de 48 °C a 62 °C (dependendo da temperatura de pareamento dos iniciadores utilizado – tabela 1), 1 minuto a 72 °C, com complemento de 5 minutos a 72 °C. O mesmo procedimento de visualização e armazenamento da imagem foi realizado conforme descrito anteriormente.

3.4.3. Enzimas de restrição

As enzimas – *Bam* HI, *Rsa* I e *Sma* I – foram utilizadas isoladamente para verificar diferenças entre sítios de restrição nos isolados amplificados com o par de iniciadores *cryIFb1* e *cryIFb 390*. Reações de digestão foram preparadas com 7,5 µL de água, 0,5 µL (10 u/µL) da enzima, 2,0 µL de tampão (10x) e 10,0 µL DNA (20 µg/mL) e, mantidas a 37 °C por 120 minutos. A eletroforese foi realizada em gel de agarose (1,5 %) contendo brometo de etídio a 120 V por 150 minutos.

3.4.4. Análise dos dados

Uma matriz binária foi gerada analisando-se os géis em que a PCR gerou produto onde apenas as bandas mais visíveis e reproduzíveis foram analisadas (Roderick 1996, Sidorenko & Berezovskaya 2001) e considerando a presença ou ausência de atividade entomocida dos isolados nas três espécies de Lepidoptera. Por meio do programa NTSYS-pc (Rohlf 1992), a similaridade entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice e, dessa matriz de similaridade, foram gerados os agrupamentos, pelo método UPGMA.

3.4.5. Clonagem de genes

Os fragmentos de DNA dos isolados CSB284, CSB287, CSB289, CSB294, CSB312 e CSB314 de *B. thuringiensis*, com atividade entomocida contra Lepidoptera pragas, foram amplificados com os pares de iniciadores *cryIFa1* (F e R) e *cryIFb3* (F e R), recortados do gel de agarose e purificados utilizando o protocolo e o *KIT Wizard SV gel and PCR clean-Up system* da *Promega*.

Os fragmentos de DNA cortados do gel foram transferidos para tubos com capacidade para 1,5 mL previamente pesados e identificados; mais uma vez os tubos foram pesados e obtida a diferença matemática dos pesos para cada tubo, referente ao peso do gel. Em seguida, foi adicionado 1,0 µL de *Binding Solution* para cada 1,0 mg de gel, realizada vigorosa agitação, e a solução foi incubada a 65 °C até completa dissolução do gel (5 – 10 minutos). Após 30 segundos de centrifugação a solução foi transferida para coluna SV (*spin vacuum*) acoplada a tubo com capacidade para 1,5 mL, mantida a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto. Foi descartado o conteúdo do tubo, adicionados 700 µL de *Wash Buffer* à coluna SV e novamente foi centrifugada a 10.000 x g por 1 minuto. O conteúdo do tubo foi descartado e 500 µL de *Wash buffer* foram adicionados a coluna e foi realizada centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. A coluna foi então transferida para novos tubos com capacidade para 1,5 mL, foram adicionados 20 µL de água estéril e incubado em temperatura ambiente por 1 minuto, realizada centrifugação a 10.000 x g por 1 minuto e o DNA obtido foi armazenado a -20 °C.

3.4.6. Obtenção de células eletrocompetentes

Para obter células eletrocompetentes de *E. coli*, conforme Ausubel *et al.* (1995), foram crescidas colônias da cepa de *E. coli* (DH10B) em placa contendo meio LB. Uma colônia foi inoculada em 10 mL de meio, incubada durante 18 horas a 37 °C e 200 r.p.m. para formação do pré-inóculo. Deste, foram retirados 5 mL e colocados em 500 mL de meio LB e deixado para crescer a 37 °C, com agitação de 190 x g, até atingir densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,5 a 0,7. As células foram mantidas no gelo por aproximadamente 20 minutos e centrifugadas a 4.500 x g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e realizada a ressuspensão do *pellet* com 500 mL de glicerol 10 % gelado. Foi repetida a centrifugação a 4.500 x g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido com 250 mL de glicerol 10 % gelado e a centrifugação a 4.500 x g por 15 minutos a 4 °C, com descarte do sobrenadante. O *pellet* foi então ressuspendido com 20 mL de glicerol 10 % gelado e transferidos para tubos Falcon (50 mL) esterelizados e foi realizada nova centrifugação a 4.500 x g por 15 minutos a 4 °C, com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em 2,5 mL de glicerol 10 % gelado. As células foram aliquotadas e armazenadas a -80 °C.

A reação de ligação foi realizada com *Kit pGemt Easy Vector system I* da Promega. Foi utilizado 5,0 µL de Tampão (2x), 0,5 µL de T4 ligase, 0,5 µL de vetor *pGemt Easy vector* e 4,0 µL de fragmento de DNA purificado e mantido a 4 °C por 18 horas, conforme instruções do fabricante do *Kit*.

3.4.7. Transformação de células via Eletroporação

Baseado no protocolo elaborado por Miller & Nickoloff (1995), em 40 µL de células de *E. coli* (DH10B) eletrocompetentes foram adicionados 4,0 µL de DNA plasmidial e homogeneizado. Em seguida, o DNA com as células foram transferidos para cubeta (0,2 cm distância entre eletrodos) pré-resfriadas em gelo por 5 minutos, sendo agitadas levemente para acomodar as células no fundo da cubeta. Esta foi levada à câmara do eletroporador *Micro Pulser* da Bio-Rad, aplicado o pulso (2,5 Kv), removida a cubeta e, imediatamente após, foram adicionados 1000 µL de meio SOC (0,5 % de extrato de levedura, 2,0 % de

triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose). O conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo estéril e incubado, por 60 minutos, com agitação de 180 r.p.m. a 37 °C. Posteriormente, 400 µL das culturas transformadas foram plaqueados em meio LB solidificado contendo 100 µg/mL de ampicilina, 50 µL de IPTG (0,1 M) e 10 µL de XGal (50 µg/mL) aplicados sobre a superfície do meio, e incubadas por 18 horas a 37 °C. Após esse período foi observada a diferenciação das colônias por coloração – brancas contendo os transformantes e azuis não contendo os transformantes.

3.4.8. Preparação de plasmídeos em microplacas

Foram inoculadas colônias individuais em poços de uma microplaca contendo 1 mL de meio Circle Grow (CG) com 100 µg/mL de ampicilina. A placa foi selada com adesivo, furos pequenos foram feitos em cima de cada poço para facilitar a aeração, e incubada a 37 °C, 180 r.p.m. por 18 horas. Após esse período uma cultura permanente, por colônia, foi feita em placa estéril, com uma alíquota de 75 µL da bactéria e 75 µL de glicerol 50 % estéril e armazenada em freezer (-80 °C). A microplaca foi centrifugada por 6 minutos a 4.000 x g, o sobrenadante foi descartado, e a placa mantida invertida sobre papel absorvente por 5 minutos. Foram adicionados, a cada amostra, 240 µL de solução GET (23 mL de glicose a 20 % filtrado, 10 mL de EDTA (0,5 M) pH 8,0 autoclavado, 13 mL de Tris-HCl (1 M) pH 7,4 autoclavado e água (q.s.p. = 500 mL)), a placa foi selada com adesivo e agitada vigorosamente por 2 minutos, para ressuspender as células. As células foram sedimentadas por centrifugação a 4.000 x g por 9 minutos, o sobrenadante foi descartado e a placa mantida invertida em papel absorvente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados, a cada amostra, 65 µL de solução GET contendo 0,8 mg/mL de RNase A, todo o material foi ressuspensionado e transferido para uma microplaca (tipo Elisa) de fundo em U. Então foram adicionados, a cada amostra, 65 µL de solução contendo 0,2 N de NaOH e 1 % SDS, a placa foi selada com adesivo, o conteúdo misturado por inversão e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente.

A placa foi centrifugada por alguns segundos para retirar a solução do adesivo e foi adicionado a cada amostra 60 µL de KOAc 3 M gelado, o conteúdo foi misturado por inversão e incubado por 10 minutos. Novamente a placa foi

centrifugada a 4.000 x g, 4 °C por 9 minutos, foram transferidos 90 µL de sobrenadante para uma placa Millipore (MAGV N22) fixada no topo de uma microplaca de fundo em “V” e centrifugada por 5 minutos, 4.000 x g, 4 °C. A placa Millipore foi descartada e 90 µL de isopropanol gelado foram adicionados ao filtrado, o conteúdo da placa foi misturado por inversão e centrifugado por 45 minutos, 4.000 x g, 4 °C. O sobrenadante foi descartado, 150 µL de etanol (70 %) gelado foram adicionados a cada amostra e a placa foi centrifugada por 5 min, 4.000 x g a 4 °C, o sobrenadante descartado novamente, e um pulso de 900 x g, 4 °C foi aplicado. A placa foi mantida a temperatura ambiente por 60 minutos para secar e em seguida o DNA foi ressuscitado com 30 µL de água MilliQ. O DNA foi armazenado a -20 °C.

A confirmação da presença do fragmento de DNA no vetor foi feita pela digestão com enzimas de restrição *Eco* RI, porque o vetor utilizado na clonagem *pGEMt Easy* possui sítio de restrição para essa enzima próximo as duas extremidades da região de inserção. A reação de digestão foi preparada com 0,5 µL de *Eco* RI (10 u/µL), 1,5 µL de tampão React3, 8,0 µL de água e 5,0 µL de DNA. Os componentes foram misturados nos tubos, com leve agitação e incubados por 2 horas a 37 °C. Após a digestão procedeu-se à eletroforese em gel de agarose 1 %. A preparação do plasmídeo foi realizada baseada no protocolo obtido na *Applied biosystems* (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

3.4.9. Precipitação alcoólica de DNA em placas e sequenciamento

Foram adicionados 80 µL de isopropanol (75 %) em cada amostra, selada a placa e deixada à temperatura ambiente por 15 minutos, protegida da luz. Em seguida, o material foi centrifugado por 45 minutos a 4.000 x g, o sobrenadante foi descartado por inversão da placa sob papel absorvente. Foi aplicado um pulso (500 x g) na centrífuga com a placa invertida sob papel absorvente, 100 µL de etanol (70 %) foram acrescentados por amostra e realizada nova centrifugação por 15 minutos a 4.000 x g. A lavagem com etanol (70 %) foi novamente repetida. O sobrenadante foi descartado, novo pulso (500 x g) foi aplicado e o *pellet* mantido à temperatura ambiente durante 5 minutos, protegido da luz. Os DNAs foram ressuscitados em 10 µL de Hi-formamida, a placa foi brandamente

agitada por 2 minutos, antes de ter sido realizado novo pulso na centrífuga. Em seguida, a reação foi levada ao termociclador a 95 °C por 5 minutos, imediatamente após a placa foi transferida para o gelo e a mesma foi colocada no seqüenciador. A precipitação alcoólica de DNA foi realizada baseada no protocolo obtido na *Applied biosystems* (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

A PCR para o seqüenciamento foi realizada utilizando iniciadores (T7 e M13) com sequências complementares às extremidades da região que flanqueia o sítio de inserção do DNA no vetor. A reação de amplificação foi preparada com 2,0 µL de *Save money*, 2,0 µL de *Mix Terminator*, 0,8 µL de iniciadores (2,0 pmol) e 2,2 µL de água. O *Mix Terminator* é uma solução adquirida pronta, própria para o sequenciador ABI PRISM 3100 (*Applied Biosystems*), que contém a enzima *Taq polimerase*, dNTP's e tampão para manter o pH da solução constante. As condições para amplificação foram: 96 °C por 2 minutos, 25 ciclos a 96 °C por 10 minutos e 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

As seqüências foram submetidas ao tratamento de limpeza pelo programa *VectorNTI*, dispensando qualquer subsequência do vetor utilizado no processo de clonagem e seqüenciamento, que tenha contaminado a seqüência original. As seqüências de consenso foram submetidas à busca por similaridades com todas as seqüências do *GenBank* através do programa *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e o alinhamento das seqüências foi realizado usando o programa *ClustalW* (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. Caracterização de genes *cryI*

A análise de amplificação para os genes *cryI*, onde foram usados iniciadores para amplificar regiões específicas dos genes *cryIA* a *cryIF* além de outros desenhados (Tabela 1), envolvendo os 13 isolados de *B. thuringiensis*, não permitiu demonstrar a distribuição dos genes codificadores de proteínas tóxicas para as espécies de *Lepidoptera* estudadas, com base no tamanho do produto final da PCR, em função de todos os isolados terem apresentado o mesmo padrão eletroforético. O iniciador *gyrB*, permitiu comprovar que todos os isolados

estudados pertenciam ao gênero *Bacillus*, com base no tamanho do produto final da PCR (360 pb).

Conforme observado na Tabela 2, os isolados CSB287 e CSB312 apresentaram ampliações para os iniciadores *cryAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* e *cryID*, os isolados CSB284, CSB294, CSB296, CSB300 e CSB314 apresentaram ampliações para os iniciadores *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* e *cryID* e os isolados CSB303 e CSB305 também apresentaram ampliações para os iniciadores *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIB*, *cryIC* e *cryID*. Também foi observado, que a maioria dos isolados apresentou resultado para *cryIAb*, *cryIB* e *cryID*. Outros iniciadores (*cryIEa*, *cryIF*, *cryIG*, *cry9A*, *cry9B* e *cry9C*), não produziram fragmentos de tamanho esperado, podendo indicar a ausência do gene.

De acordo com a literatura, os genes *cryID* e *cryIC* são os mais tóxicos para lagartas de *S. frugiperda* (Cerón *et al.* 1995). Entretanto, de acordo com Bohorova *et al.* (1997) os genes *cryID*, *cryIE* e *cryIF* são mais eficientes no controle de *S. frugiperda*. Praça *et al.* (2004), trabalhando com isolados de *B. thuringiensis* para controle de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, relataram que, provavelmente, a mortalidade obtida nestas espécies se deva ao gene *cryIB*. Bradley *et al.* (1995) observaram, também, atividade da proteína CryIBa contra *Manduca sexta* (Fabricius) (Lepidoptera: Sphingidae). Rie *et al.* (1990) afirmaram que espécies de *Spodoptera* são tolerantes às proteínas CryIAa e CryIAb. Com relação a *A. gemmatalis*, Praça *et al.* (2004) relataram que a atividade entomopatogênica das estirpes estudadas pode ocorrer em razão da presença dos genes *cryIA*.

Stewart Jr *et al.* (1996) relataram que a incorporação do gene *cryIAc* em plantas de soja produzia altas quantidades de toxina *B. thuringiensis*, com bons resultados no controle de *A. gemmatalis* e *P. includens*. Sumerford & Solomon (2000) avaliaram o peso de lagartas de *P. includens* e relataram a ocorrência de alta variabilidade na tolerância destas ao *cryIAc*. Bobrowski *et al.* (2001) relataram quatro novos isolados de *B. thuringiensis* que exibiram atividade tóxica acima de 90 % de mortalidade para lagartas de *A. gemmatalis*, e que os mesmos apresentaram fragmentos de DNA de regiões codificantes de genes *cryI*.

Tabela 2. Amplificações obtidas dos isolados de *Bacillus thuringiensis* com ação entomocida para *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens*.

Código	<i>cry</i>											
	IAa	IAb	IAc	IB	IC	ID	IEa	IF	IG	9A	9B	9C
CSB314	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
CSB284	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
CSB287	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CSB325	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
CSB331	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CSB289	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
CSB293	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CSB294	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
CSB296	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
CSB300	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
CSB303	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CSB305	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CSB312	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

* = Ver Anexo 1 para localizar procedência dos isolados.

A suscetibilidade apresentada por lagartas de *A. gemmatalis* em relação ao *B. thuringiensis* já havia sido relatada (Ignoffo *et al.* 1977, Luttrell *et al.* 1982, Abbas Ali & Young 1993 e Morales *et al.* 1995). Nossos resultados, demonstraram que a mortalidade dos insetos pela *B. thuringiensis* variou entre as espécies, dose administrada e isolados testados, fato este que sugere a utilização de doses diferenciadas para o controle destas duas pragas com esse entomopatógeno. Também, analisando as amplificações obtidas e associando-as à CL₅₀ dos isolados, provavelmente a diferença entre a atividade dos isolados pode ser devida à presença de outras toxinas, além daquelas constatadas, e que podem

interagir entre si, elevando ou diminuindo o potencial dos genes *cry* (Loguercio *et al.* 2001, Fatoretto 2002). Onde, os resultados podem indicar que a atividade de uma determinada toxina pode variar de acordo com a origem/espécie de inseto testada.

3.5.2. Enzimas de restrição

Foram observados idênticos perfis, entre os isolados após a restrição com a enzima *Sma* I, *Bam* HI ou *Rsa* I. Estes resultados podem indicar a inexistência de polimorfismo genético dos isolados para esta restrição ou ausência de clivagem, impossibilitando a determinação do tipo de genes *cry* presente nos isolados. Arango *et al.* (2002) relataram a digestão de DNA de plasmídeos de *B. thuringiensis* com *Eco* RI, obtendo fragmentos de diversos tamanhos.

3.5.3. Análise dos dados

Baseando-se nas fotografias dos géis que apresentaram ampliações (*cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB*, *cryIC* e *cryID*) e na presença (1) ou ausência (0) de mortalidade nas espécies de insetos testadas, foi construída uma matriz binária (Anexo 3) a qual foi utilizada para gerar um dendrograma, e a partir deste foram determinados os isolados que seriam utilizados na purificação e sequenciamento (Fig. 1).

A análise de distância genética gerou o agrupamento que mostra a separação dos acessos em dois grupos principais. No primeiro grupo, subdivido em dois subgrupos, com coeficiente de dissimilaridade de apenas 11 %, incluem-se quatro isolados (CSB284, CSB294, CSB296 e CSB300), formando um subagrupamento com 100 % de similaridade, e um único isolado (CSB314) formou o outro subgrupo. No segundo grupo, houve subdivisão em seis subgrupos, com similaridade genética variando de 78 % a 100 %, incluem-se oito isolados (Fig. 1).

Dois isolados (CSB287 e CSB312) apresentaram 100 % de similaridade e 95 % de dissimilaridade do isolado CSB331. O isolado CSB293 apresentou índice de similaridade de 78 % comparado aos demais isolados do segundo grupo e de 75 % quando comparado ao primeiro grupo. Os demais isolados do segundo grupo

(CSB325, CSB303, CSB305 e CSB289) apresentaram índice de similaridade variando entre 85 % a 94 % (Fig. 1).

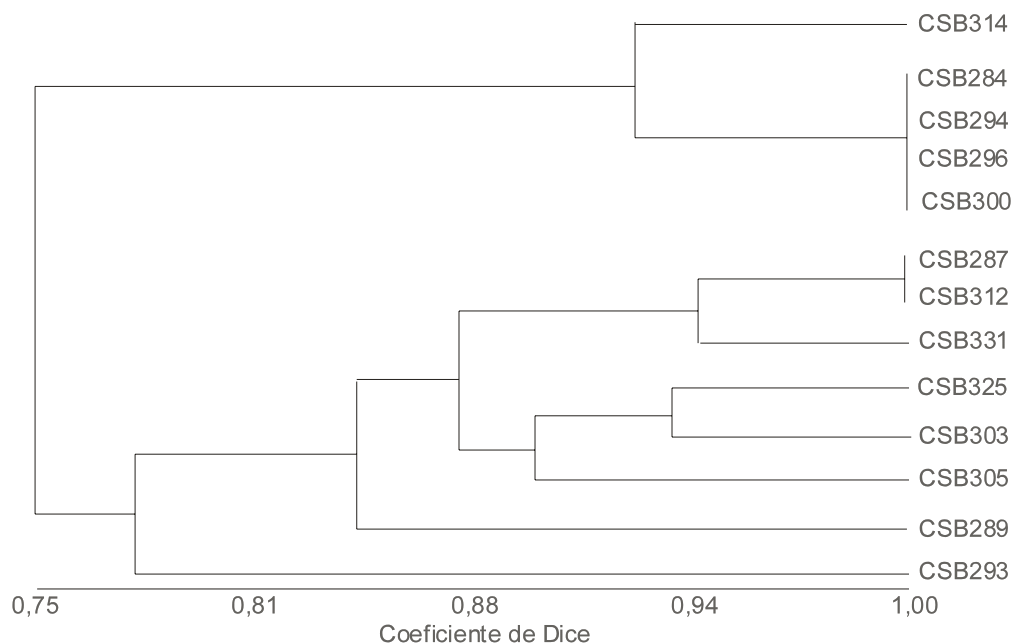


Figura 1. Dendrograma dos isolados de *Bacillus thuringiensis* com ação entomocida para as espécies *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda* e *Pseudoplusia includens*, obtido pelo método UPGMA.

Quando analisada a distância genética (Anexo 4), foi obtida uma média de 0,833 entre os isolados de *B. thuringiensis*. Foi constatado que, embora o dendrograma (Fig. 1) agrupe os isolados CSB289 e CSB305 em sub-grupos diferentes, eles apresentam igual distância para o isolado CSB314, que foi agrupado em grupo diferente. Resultado semelhante acontece quando analisado o isolado CSB293, que quando comparado com os isolados CSB303 e CSB331, apresenta mesma distância, mesmo estando em sub-grupos diferentes.

3.5.4. Clonagem de genes e sequenciamento

Os isolados utilizados no sequenciamento foram escolhidos a partir da constituição do dendrograma (Fig. 1), onde um representante de cada grupo

formado (CSB284, CSB287, CSB289, CSB293, CSB305, CSB312, CSB314 e CSB325) foi selecionado para clonagem e sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados. Entretanto, os fragmentos de DNA dos isolados CSB293, CSB305 e CSB325 não foram seqüenciados. Os isolados (CSB287, CSB289, CSB312 e CSB314) apresentaram grande similaridade com *B. cereus* (dados não apresentados). Entre os autores ligados à análise filogenética de gênero *Bacillus*, Priest *et al.* (1994) e Daffonchio *et al.* (2000) aplicaram este tipo de avaliação molecular em linhagens de *B. anthracis*, *B. cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* e *B. thuringiensis* e encontraram uma grande similaridade existente entre os genes destas espécies, o que corrobora o fato de que as seqüências obtidas com nossos isolados terem apresentado forte identidade com seqüências de linhagens de *B. cereus*. A seqüência do gene obtido do isolado CSB284 apresentou homologia para o gene *cryIA* com, aproximadamente, 100 % de similaridade (Tabela 3). Através do sequenciamento, foi confirmado o resultado da tabela 2, em que o isolado CSB284 apresenta amplificações para o gene seqüenciado. Entretanto, em função do mesmo apresentar baixa toxicidade para *A. gemmatalis* e alta toxicidade para *S. frugiperda* e *P. includens*, verifica-se a necessidade de estudos mais aprofundados para este isolado.

3.6. CONCLUSÕES

Foi constatado que a maioria dos isolados (85 %) apresentaram os genes das toxinas *cryIAb*, *cryIB* e *cryID*.

Os índices de similaridade entre os isolados da bactéria estudados foram superiores a 75 %.

Foi obtida uma média de 0,833 entre os isolados de *B. thuringiensis*, quando analisada a distância genética.

Foi obtido um fragmento de DNA dos isolado CSB284 que apresentou homologia com o gene *cryIA*.

Estudos mais aprofundados para o isolado CSB284 são necessários, em função do mesmo apresentar baixa toxicidade para *A. gemmatalis* e alta toxicidade para *S. frugiperda* e *P. includens*.

3.7. LITERATURA CITADA

Abbas Ali & S.Y. Young. 1993. *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki activity against larvae of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton. J. Econ. Entomol. 86: 1064 – 1068.

Aranda, E., J. Sanchez, M. Peferoen, L. Güereca & A. Bravo. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invert. Pathol. 68: 203 - 212.

Arango, J.A., M. Romero & S. Orduz. 2002. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Colombia with insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Appl. Microbiol. 92: 466 – 474.

- Aronson, A. 1995.** The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 61; 4057 - 4060.
- Aususbel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidmann, J.A. Smith & K. Struhl (ed.). 1995.** Current protocols in molecular biology. Wiley, New York, N.Y.
- Bobrowski, V.L., G. Pasquali, M.H. Bodanese-Zanettini & L.M. Fiuza. 2001.** Detection of *cry1* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from south of Brazil and activity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian J. Microbiol.* 32: 105 - 109.
- Bohorova, N.B, M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo. 1997.** Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* Cry1 type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412 - 415.
- Bohorova, N., A.M. Maciel, R.M. Brito, L. Aguilart, J.E. Ibarra & D. Hoisington. 1996.** Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. *Entomophaga.* 41: 153 - 165.
- Bourgouin, C., A. Delécluse, J. Ribier, A. Klier & G. Rapoport. 1988.** A *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* gene encoding a 125-kilodalton larvicidal polypeptid is associated with inverted repeat sequences. *J. Bacteriol.* 170: 3575 - 3583.
- Bourque, S.N., J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie & R.C. Levesque. 1993.** Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523 - 527.

- Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, D. Brever & L.S. Bauer. 1995.** The insecticidal CryIB protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invert. Pathol.* 65: 162 – 173.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Peña, M. Nuñez-Valdez, M. Soberón & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965 - 4972.
- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola & M.G. Koziel. 1991.** Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057 - 3061.
- Cerón, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina & A. Bravo. 1994.** PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 353-356.
- Cerón, J., A. Ortíz, R. Quintero, L. Guereca & A. Bravo. 1995.** Specific PCR primers directed to Identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826 – 3831.
- Chak, K.F., D.C. Chao, M.Y. Tseng, S.S. Kao, S.J. Tuan & T.Y. Feng. 1994.** Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2415 – 2420.
- Chen M.L. & H.Y. Tsen. 2002.** Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J. Appl. Microbiol.* 92: 912 – 919.

- Daffonchio, D., A. Cherif & S. Borin. 2000.** Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the "*Bacillus cereus* group". *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5460 - 5468.
- Fatoretto, J.C. 2002.** Associação de bioensaio e caracterização molecular para seleção de isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda*. Unesp. Jaboticabal, SP. Monografia. 105p.
- Ferreira, M.E. & D. Grattapaglia. 1998.** Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. Embrapa-Cenargen. 220 páginas.
- González, J.M.J., B.S. Brown & B.C. Carlton. 1982.** Transfer of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 6951 – 6955.
- Ignoffo, C.M., D.L. Hostetter, R.E. Pinnell & C. Garcia. 1977.** Relative susceptibility of six soybean caterpillars to a standard preparation of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*. *J. Econ. Entomol.* 70: 60 – 63.
- Kalman, S., K.L. Kiehne, J.L. Libs & T. Yamamoto. 1993.** Cloning of a novel *cry* IC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131 – 1137.
- Kronstad, J.W. & H.R. Whiteley. 1986.** Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene.* 43: 29 – 40.
- Kuo, W.S. & K.F. Chak. 1996.** Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1369 – 1377.

- Lereclus, D., M.-M., Lecadet, J. Ribier & R. Dedonder. 1982.** Molecular relationships among plasmids of *Bacillus thuringiensis*: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. *Mol. Gen. Genet.* 186: 391 – 398.
- Lereclus, D., A.E. Delécluse & M.-M. Lecadet. 1993.** Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Enwistle PF, Cory JS, Bailey M and Higgs S; eds). West Sussex, England: John Willey & Sons; pp. 37 - 69.
- Lereclus, D., J. Ribier, A. Klier, G. Menou & M.-M. Lecadet. 1984.** A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *EMBO Journal*, 3: 2561 - 2567.
- Lima, A.S.G., A.M. Guidelli, I.L. Abreu & M.V.F. Lemos. 2002.** Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. *Genet. Mol. Biol.* 25: 225 - 229.
- Loguercio L.L, C.G. Santos, M.R. Barreto, C.T. Guimarães & E. Paiva. 2001.** Association of PCR and feeding bioassays as a large-scale method to screen tropical *Bacillus thuringiensis* isolates for a *cry* constitution with higher insecticidal effect against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Lett. Appl. Microbiol.* 32: 362 - 367.
- Luttrell, R.G., S.Y. Young, W.C. Yerian & D.L. Horton. 1982.** Evaluation of *Bacillus thuringiensis* – spray adjuvant-viral insecticide combinations against *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 11: 783 – 787.
- Miller, E.M. & J.A. Nickoloff. 1995.** *Escherichia coli* electrotransformation, pp. 105 – 113. In: *Electroporation Protocols for Microorganisms*, edited by J.A. NICKOLOFF. Humana Press, Totowa, NJ.
- Morales, L., F. Moscardi, J.C. Kastelic, D.R. Sosa-Gómez, F.E. Paro & I.L. Soldório. 1995.** Susceptibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hubner e

Chrysodeixis includens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). An. Soc. Entomol. Brasil. 24: 593 – 597.

Nyouki, F.F.R., J.R. Fuxa & A.R Richter. 1996. Spore-toxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Entomol. Sci. 31: 52 – 62.

Polanczyk, R. & S.B. Alves. 2003. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. Agrociência. 7: 1 – 10.

Porcar, M. & V. Juárez-Pérez. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS. Microbiol. Rev. 26: 419 - 432.

Praça, L.B., A.C. Batista, É.S. Martins, C.B. Siqueira, D.G. de S. Dias, A.C.M.M. Gomes, R. Falcão & R.G. Monnerat. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesq. Agropec. Bras. 39: 11 – 16.

Priest, F.G, D.A. Kaji, Y.B. Rosato & V.P. Canhos. 1994. Characterization of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria by ribosomal RNA gene restriction fragment length polymorphisms. Microbiol. 140: 1015 – 1022.

Rie, J. van, W.H. Mcgaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett & H. van Mellaert. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science. 247: 72 - 74.

Roderick, G.K. 1996. Geografic structure o insect populations: gene flow, phylogeography, and the uses. Ann. Rev. Entomol. 41: 325 - 352.

Rohlf, F.J. 1992. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80.

- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 250p.
- Sanchis, V., D. Lereclus, G. Menou, J. Chaufaux & M.-M. Lecadet. 1988.** Multiplicity of delta-endotoxin genes with different specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai*. Mol. Microbiol. 2: 393 - 404.
- Sidorenko, A.P. & O.P. Berezovska. 2002.** Genetic Structure of Populations of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). Genetika. 38: 1485 – 1491.
- Stewart Jr, C.N., M.J. Adang, J.N. All, H.R. Boerma, G. Cardineau, D. Tucker & W.A. Parrott. 1996.** Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIIAc gene. Plant physiology. 112: 121 – 129.
- Sumerford, D.V & W.L. Solomon. 2000.** Growth of wild *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae collected from Bt and non-Bt cotton. Fla Entomol. 83: 354 – 357.
- Valadares–Inglis, M.C.C., M.T. Sousa & W. Shiler. 1998.** Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico, p. 201-230. In MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (eds.) Controle Biológico. EMBRAPA, Jaguariúna, SP, 264p.
- Vilas-Bôas, G.F.L.T. 2002.** Diversidade e estrutura genética de populações de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus cereus*. Tese de Doutorado. FCAV/UNESP, Jaboticabal: 102p.
- Vilas-Bôas, L.A., G.F.L.T., Vilas-Bôas, H.O. Saridakis, M.V.F. Lemos, D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 2000.** Survival and conjugation of *Bacillus thuringiensis* in a soil microcosm. FEMS. Microbiol. Ecol. 31: 255 – 259.

Yamada, S., O. Eiji, A. Norio & K. Venkateswaran. 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1483 – 1490.

Yamamoto, S. & S. Harayama. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1104 – 1109.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na seleção de isolados de *B. thuringiensis* para as espécies de insetos testadas, bem como para outras espécies, uma série de fatores afeta diretamente a suscetibilidade dos insetos. Assim sendo, estudos posteriores serão necessários para determinar as razões do sucesso ou não desta etapa.

A capacidade dos genes *cry* dos isolados de *B. thuringiensis* é conhecida por estar relacionada à toxicidade, e sua identificação por meio da PCR tem sido explorada para prever atividades inseticidas dos isolados e determinar a distribuição dos genes *cry*. Mas, para completa caracterização dos isolados esta técnica deve ser complementada com outros métodos, tais como a determinação da composição e toxicidade dos cristais por meio de eletroforese e bioensaios.

A variabilidade genética de uma população de isolados de *B. thuringiensis* pode ser analisada através de uma combinação de métodos. Entretanto, uma extensa variabilidade genética é encontrada e a caracterização do conteúdo de genes *cry* dos diferentes isolados nem sempre é obtida por meio dos pares de oligonucleotídeos testados. Este resultado leva a crer, portanto, que dentro de uma coleção de isolados, possa existir sérios candidatos a conter genes *cry* potencialmente diferentes dos conhecidos atualmente.

Desta forma, estudos que verificam a abundância, a distribuição e a diversidade de isolados de *B. thuringiensis* são importantes não somente para a busca de novas alternativas de controle de insetos, mas também para responder questões ligadas à evolução e as relações ecológicas desta espécie.

Assim sendo, este trabalho contribuiu para o controle biológico de insetos-praga da soja - *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Pseudoplusia includens*, *Sternechus subsignatus* e *Phyllophaga cuyabana* - através da identificação, do isolamento e da caracterização de genes de *B. thuringiensis* codificadores para toxinas entomocidas eficientes contra estes insetos. Foi verificado que a toxina dos isolados estudados ou apresentou alta toxicidade aos insetos ou estes sobreviveram sem externar danos aparentes à sua fisiologia de desenvolvimento. A formação do banco de genes, foi de suma importância e permanecerá disponibilizado a comunidade científica.

5. ANEXOS

Anexo 1. Banco de *Bacillus thuringiensis* obtido por meio de coletas de solo em diferentes regiões do Brasil e de uma província da Argentina, depositado no Laboratório de Patologia de Insetos da Embrapa Soja.

Código CNPSo	Nome científico	Origem	Data coleta (mm/aa)	Cidade	Estado - País	Forma armazenamento	Coletor da amostra de solo
CSB01	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB02	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB03	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB04	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB05	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB06	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB07	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB08	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB09	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB10	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-00	Porto Blest	Rio Negro - ARG	pellet congelado	Daniel R. Sosa-Gómez
CSB11	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB12	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB13	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB14	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB15	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB16	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB17	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB18	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB19	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB20	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-01	N. Senhora do Socorro	Sergipe - BR	pellet congelado	Luiz Araújo Barreto
CSB21	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB22	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB23	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB24	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB25	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB26	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB27	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Porto Acre	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB28	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Rio Branco	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB29	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Rio Branco	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB30	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-01	Rio Branco	Acre - BR	pellet congelado	Antônio Gilson Mesquita
CSB31	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB32	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB33	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB34	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB35	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB36	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB37	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB38	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Santo Antônio de Goiás	Goiás - BR	pellet congelado	Eliane Quintela
CSB39	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB40	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB41	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Mogi Guaçu	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB42	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB43	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB44	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB45	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB46	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB47	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana
CSB48	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	São Miguel Arcanjo	São Paulo - BR	pellet congelado	Daiva L. Queiroz Santana

Continua...

Continuação.

CSB49	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Chapadão do Céu	Goiás - BR	pellet congelado	Enviado - Embrapa Soja
CSB50	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Mineiros	Goiás - BR	pellet congelado	Enviado - Embrapa Soja
CSB51	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Mineiros	Goiás - BR	pellet congelado	Enviado - Embrapa Soja
CSB52	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Rolim de Moura	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB53	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Rolim de Moura	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB54	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Rolim de Moura	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB55	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Porto Velho	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB56	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Malhadinho do Oeste	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB57	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Ouro Preto do Oeste	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB58	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Ouro Preto do Oeste	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB59	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Ouro Preto do Oeste	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB60	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Ouro Preto do Oeste	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB61	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Ouro Preto do Oeste	Rondônia - BR	pellet congelado	Abadio Hermes Vieira
CSB62	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Belém	Pará - BR	pellet congelado	Maria Lurdes Ruivo
CSB63	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Belém	Pará - BR	pellet congelado	Maria Lurdes Ruivo
CSB64	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Belém	Pará - BR	pellet congelado	Maria Lurdes Ruivo
CSB65	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-01	Belém	Pará - BR	pellet congelado	Maria Lurdes Ruivo
CSB66	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cachoeirinho	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Lídia Mariana Fiuza
CSB67	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cachoeirinho	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Lídia Mariana Fiuza
CSB68	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cachoeirinho	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Lídia Mariana Fiuza
CSB69	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cachoeirinho	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Lídia Mariana Fiuza
CSB70	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Muritiba	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB71	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Muritiba	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB72	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cruz das Almas	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB73	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cruz das Almas	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB74	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Cruz das Almas	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB75	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Santo Amaro	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB76	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Santo Amaro	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB77	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Santo Amaro	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB78	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Santo Amaro	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB79	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Conceição de Feira	Bahia - BR	pellet congelado	Alba R. Nunes Faria
CSB80	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB81	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB82	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB83	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB84	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB85	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB86	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB87	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB88	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB89	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Seropédica	Rio de Janeiro - BR	pellet congelado	Veronica Reis
CSB90	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Petrolina	Pernambuco - BR	pellet congelado	Tâmara Gomes
CSB91	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Petrolina	Pernambuco - BR	pellet congelado	Tâmara Gomes
CSB92	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Petrolina	Pernambuco - BR	pellet congelado	Tâmara Gomes
CSB93	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Petrolina	Pernambuco - BR	pellet congelado	Tâmara Gomes
CSB94	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Petrolina	Pernambuco - BR	pellet congelado	Tâmara Gomes
CSB95	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Petrolina	Pernambuco - BR	pellet congelado	Tâmara Gomes
CSB96	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Vacaria	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Adalécio Kovalesk
CSB97	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Vacaria	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Adalécio Kovalesk
CSB98	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Vacaria	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Adalécio Kovalesk
CSB99	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Vacaria	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Adalécio Kovalesk
CSB100	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Altamira	Pará - BR	pellet congelado	Otávio N. Lopes
CSB101	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Altamira	Pará - BR	pellet congelado	Otávio N. Lopes
CSB102	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Altamira	Pará - BR	pellet congelado	Otávio N. Lopes
CSB103	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Altamira	Pará - BR	pellet congelado	Otávio N. Lopes
CSB104	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Altamira	Pará - BR	pellet congelado	Otávio N. Lopes
CSB105	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mai-01	Altamira	Pará - BR	pellet congelado	Pedro Celestino

Continua...

Continuação.

CSB220	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Videira	Santa Catarina - BR	pellet congelado	Fabiane Cerutti
CSB221	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Videira	Santa Catarina - BR	pellet congelado	Fabiane Cerutti
CSB222	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Videira	Santa Catarina - BR	pellet congelado	Fabiane Cerutti
CSB223	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Chapecó	Santa Catarina - BR	pellet congelado	Flávio Garcia
CSB224	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Chapecó	Santa Catarina - BR	pellet congelado	Flávio Garcia
CSB225	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Chapecó	Santa Catarina - BR	pellet congelado	Flávio Garcia
CSB226	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Teresina	Piauí - BR	pellet congelado	João Erivaldo S. Serpa
CSB227	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Teresina	Piauí - BR	pellet congelado	João Erivaldo S. Serpa
CSB228	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Teresina	Piauí - BR	pellet congelado	João Erivaldo S. Serpa
CSB229	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Teresina	Piauí - BR	pellet congelado	João Erivaldo S. Serpa
CSB230	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Teresina	Piauí - BR	pellet congelado	João Erivaldo S. Serpa
CSB231	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Macapá	Amapá - BR	pellet congelado	Dr. Leite
CSB232	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Macapá	Amapá - BR	pellet congelado	Dr. Leite
CSB233	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Macapá	Amapá - BR	pellet congelado	Dr. Leite
CSB234	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Macapá	Amapá - BR	pellet congelado	Dr. Leite
CSB235	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Macapá	Amapá - BR	pellet congelado	Dr. Leite
CSB236	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Macapá	Amapá - BR	pellet congelado	Dr. Leite
CSB237	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Ronda Alta	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Embrapa Soja
CSB238	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Ronda Alta	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Embrapa Soja
CSB239	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Carazinho	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Embrapa Soja
CSB240	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Independência	Rio G. do Sul - BR	pellet congelado	Embrapa Soja
CSB241	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB242	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB243	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB244	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB245	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB246	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB247	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Boa Vista	Roraima - BR	pellet congelado	Dalton R. Schwengber
CSB248	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB249	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB250	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB251	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB252	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB253	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB254	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jul-01	Gurupi	Tocantins - BR	pellet congelado	Leonardo Collier
CSB255	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Alagoa Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB256	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Alagoa Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB257	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Alagoa Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB258	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Alagoa Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB259	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Alagoa Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB260	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Alagoa Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB261	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Joarez Távora	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB262	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Joarez Távora	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB263	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Itabaiana	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB264	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Itabaiana	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB265	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Campina Grande	Paraíba - BR	pellet congelado	Carlos Alberto
CSB266	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB267	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB268	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB269	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB270	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB271	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Bom Jardim	Maranhão - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB272	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Bom Jardim	Maranhão - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB273	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Bom Jardim	Maranhão - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB274	<i>B. thuringiensis</i>	solo	ago-01	Bom Jardim	Maranhão - BR	pellet congelado	Carlos Roberto R. Leite
CSB275	<i>B. thuringiensis</i>	solo	set-01	Nova Mutum	Mato Grosso - BR	pellet congelado	Gilberto Canapelle
CSB276	<i>B. thuringiensis</i>	solo	set-01	Nova Mutum	Mato Grosso - BR	pellet congelado	Gilberto Canapelle

Continua...

Continuação.

CSB277	<i>B. thuringiensis</i>	solo	set-01	Nova Mutum	Mato Grosso - BR	pellet congelado	Gilberto Canapelle
CSB278	<i>B. thuringiensis</i>	solo	set-01	Nova Mutum	Mato Grosso - BR	pellet congelado	Gilberto Canapelle
CSB279	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jun-92	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Edson Hirose
CSB280	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jun-02	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Edson Hirose
CSB281	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jun-02	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Edson Hirose
CSB282	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jun-02	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Edson Hirose
CSB283	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jun-02	Manaus	Amazonas - BR	pellet congelado	Edson Hirose
CSB284	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jan-90	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB285	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-90	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB286	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jan-90	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB287	<i>B. thuringiensis</i>	solo	fev-90	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB288	<i>B. thuringiensis</i>	solo	mar-90	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB289	<i>B. thuringiensis</i>	solo	jan-92	Ribeirão Preto	São Paulo - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB290	<i>B. thuringiensis</i>	solo	set-91	Ijaci	Minas Gerais - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB291	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	out-91	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB292	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	out-91	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB293	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB294	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	fev-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB295	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	mar-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB296	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	abr-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB297	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	dez-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB298	<i>B. thuringiensis</i>	solo	abr-92	Bela Vista do paraíso	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB299	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	abr-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB300	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	abr-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB301	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	abr-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB302	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB303	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB304	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB305	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB306	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB307	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB308	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB309	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	jul-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB310	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	abr-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB311	<i>B. thuringiensis</i>	grãos	abr-92	Londrina	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB312	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	Paraná - BR	pellet congelado	Olivia Arantes
CSB313	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB314	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB315	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB316	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB317	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB318	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB319	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB320	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB321	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB322	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB323	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB324	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB325	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB326	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB327	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB328	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB329	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB330	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB331	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB332	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB333	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk

Continua...

Continuação.

CSB334	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB335	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB336	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	São Paulo - BR	pellet congelado	Ricardo Polanczyk
CSB337	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	*	pellet congelado	Rose Gomes Monnerat
CSB338	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	*	pellet congelado	Rose Gomes Monnerat
CSB339	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	*	pellet congelado	Rose Gomes Monnerat
CSB340	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	*	pellet congelado	Rose Gomes Monnerat
CSB341	<i>B. thuringiensis</i>	*	*	*	*	pellet congelado	Rose Gomes Monnerat

* = dados não disponíveis

Anexo 2. Isolados de *Bacillus thuringiensis* testados nas espécies de Lepidoptera - *Anticarsia gemmatalis*, *Pseudoplusia includens* e *Spodoptera frugiperda*, e Coleoptera - *Phyllophaga cuyabana*, *Sternechus subsignatus*, *Diabrotica speciosa* e *Alphitobius diaperinus*. Isolado testado (T), não testado (NT).

Código CNPSo	Testado em:						
	<i>A. Gemmatalis</i>	<i>P. cuyabana</i>	<i>S. subsignatus</i>	<i>A. diaperinus</i>	<i>D. speciosa</i>	<i>P. includens</i>	<i>S. frugiperda</i>
CSB01	T	T	T	T	NT	NT	NT
CSB02	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB03	T	T	T	NT	NT	NT	NT
CSB04	T	NT		NT	NT	NT	NT
CSB05	T	NT	NT	NT	NT	NT	T
CSB06	T	T	T	T	NT	NT	NT
CSB07	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB08	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB09	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB10	T	NT	NT	NT	NT	NT	T
CSB11	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB12	T	NT	T	T	NT	NT	NT
CSB13	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB14	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB15	T	NT	T	NT	NT	NT	T
CSB16	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB17	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB18	T	NT	T	T	NT	NT	NT
CSB19	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB20	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB21	T	T	T	NT	NT	NT	NT
CSB22	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB23	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB24	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB25	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB26	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB27	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB28	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB29	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB30	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB31	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB32	T	T	NT	NT	NT	NT	NT
CSB33	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB34	T	T	NT	NT	NT	NT	NT
CSB35	T	T	NT	T	NT	NT	T
CSB36	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB37	T	T	NT	NT	NT	NT	NT
CSB38	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB39	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB40	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB41	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB42	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB43	T	T	NT	T	NT	NT	NT
CSB44	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB45	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB46	T	T	NT	NT	NT	NT	NT

Continua...

continuação

CSB47	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB48	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB49	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB50	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB51	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB52	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB53	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB54	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB55	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB56	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB57	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB58	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB59	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB60	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB61	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB62	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB63	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB64	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB65	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB66	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB67	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB68	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB69	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB70	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB71	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB72	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB73	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB74	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB75	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB76	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB77	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB78	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB79	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB80	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB81	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB82	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB83	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB84	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB85	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB86	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB87	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB88	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB89	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB90	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB91	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB92	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB93	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB94	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB95	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB96	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB97	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB98	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB99	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB100	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB101	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB102	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB103	T	NT	NT	T	NT	NT	NT

Continua...

continuação

CSB104	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB105	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB106	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB107	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB108	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB109	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB110	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB111	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB112	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB113	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB114	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB115	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB116	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB117	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB118	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB119	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB120	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB121	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB122	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB123	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB124	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB125	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB126	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB127	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB128	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB129	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB130	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB131	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB132	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB133	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB134	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB135	T	NT	NT	NT	NT	NT	T
CSB136	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB137	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB138	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB139	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB140	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB141	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB142	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB143	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB144	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB145	T	NT	NT	NT	NT	NT	T
CSB146	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB147	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB148	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB149	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB150	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB151	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB152	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB153	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB154	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB155	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB156	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB157	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB158	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB159	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB160	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Continua...

continuação

CSB161	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB162	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB163	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB164	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB165	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB166	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB167	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB168	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB169	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB170	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB171	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB172	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB173	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB174	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB175	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB176	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB177	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB178	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB179	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB180	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB181	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB182	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB183	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB184	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB185	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB186	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB187	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB188	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB189	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB190	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB191	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB192	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB193	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB194	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB195	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB196	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB197	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB198	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB199	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB200	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB201	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB202	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB203	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB204	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB205	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB206	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB207	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB208	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB209	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB210	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB211	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB212	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB213	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB214	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB215	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB216	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB217	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Continua...

continuação

CSB218	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB219	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB220	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB221	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB222	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB223	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB224	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB225	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB226	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB227	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB228	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB229	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB230	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB231	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB232	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB233	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB234	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB235	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB236	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB237	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB238	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB239	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB240	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB241	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB242	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB243	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB244	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB245	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB246	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB247	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB248	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB249	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB250	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB251	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB252	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB253	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB254	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB255	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB256	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB257	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB258	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB259	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB260	T	NT	NT	T	NT	NT	T
CSB261	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB262	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB263	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB264	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB265	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB266	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB267	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB268	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB269	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB270	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB271	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB272	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB273	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB274	T	NT	NT	T	NT	NT	NT

Continua...

continuação

CSB275	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB276	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB277	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB278	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB279	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB280	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB281	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB282	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB283	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB284	T	NT	NT	NT	T	T	T
CSB285	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB286	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB287	T	NT	NT	NT	T	NT	NT
CSB288	T	NT	NT	T	NT	NT	NT
CSB289	T	NT	T	T	T	T	T
CSB290	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB291	T	NT	T	T	NT	NT	NT
CSB292	T	NT	NT	NT	T	NT	NT
CSB293	T	NT	NT	NT	T	T	T
CSB294	T	NT	NT	T	T	T	T
CSB295	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB296	T	NT	NT	NT	T	T	T
CSB297	T	NT	T	T	T	NT	NT
CSB298	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB299	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB300	T	NT	NT	NT	T	T	T
CSB301	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB302	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB303	T	NT	NT	T	T	T	T
CSB304	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB305	T	NT	NT	NT	T	T	T
CSB306	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB307	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB308	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB309	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB310	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB311	T	NT	NT	NT	T	NT	NT
CSB312	T	NT	NT	NT	NT	T	T
CSB313	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB314	T	NT	T	T	T	T	T
CSB315	T	NT	NT	NT	NT	NT	T
CSB316	T	NT	T	T	NT	NT	NT
CSB317	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB318	T	NT	T	T	NT	NT	NT
CSB319	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB320	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB321	T	NT	T	T	T	NT	T
CSB322	T	NT	T	NT	NT	NT	NT
CSB323	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB324	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB325	T	NT	NT	NT	T	T	T
CSB326	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB327	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB328	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB329	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB330	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB331	T	NT	NT	NT	T	T	T

Continua...

continuação

CSB332	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB333	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB334	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB335	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT
CSB336	T	NT	NT	NT	NT	NT	T
CSB337	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB338	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB339	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB340	T	NT	NT	NT	T	NT	T
CSB341	T	NT	NT	NT	T	NT	T

Anexo 3. Matriz binária utilizada para gerar o dendrograma de similaridade.

Código	Mortalidade			<i>cry</i>					
	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Pseudoplusia includens</i>	IAa	IAb	IAC	IB	IC	ID
CSB314	1	1	1	0	1	1	1	0	1
CSB284	0	1	1	0	1	1	1	0	1
CSB287	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CSB325	1	1	1	1	1	0	0	1	1
CSB331	1	1	1	1	1	1	1	1	0
CSB289	0	1	1	1	1	1	0	1	1
CSB293	1	1	1	1	0	0	1	1	0
CSB294	1	1	1	0	1	1	1	0	1
CSB296	1	1	1	0	1	1	1	0	1
CSB300	1	1	1	0	1	1	1	0	1
CSB303	1	1	1	1	1	0	1	1	1
CSB305	0	1	1	1	1	0	1	1	1
CSB312	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Presença (1) ou ausência (0).

Anexo 4. Distância genética entre os isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	CSB314	CSB284	CSB287	CSB325	CSB331	CSB289	CSB293	CSB294	CSB296	CSB300	CSB303	CSB305	CSB312
CSB314	1,00												
CSB284	0,92	1,00											
CSB287	0,80	0,88	1,00										
CSB325	0,62	0,71	0,88	1,00									
CSB331	0,71	0,80	0,94	0,80	1,00								
CSB289	0,77	0,71	0,88	0,86	0,80	1,00							
CSB293	0,50	0,62	0,80	0,77	0,86	0,62	1,00						
CSB294	0,92	1,00	0,88	0,71	0,80	0,71	0,62	1,00					
CSB296	0,92	1,00	0,88	0,71	0,80	0,71	0,62	1,00	1,00				
CSB300	0,92	1,00	0,88	0,71	0,80	0,71	0,62	1,00	1,00	1,00			
CSB303	0,71	0,80	0,94	0,93	0,88	0,80	0,86	0,80	0,80	0,80	1,00		
CSB305	0,77	0,71	0,88	0,86	0,80	0,86	0,77	0,71	0,71	0,71	0,93	1,00	
CSB312	0,80	0,88	1,00	0,88	0,94	0,88	0,80	0,88	0,88	0,88	0,94	0,88	1,00

