

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEÍNAS CRY TÓXICAS PARA IMPORTANTES LEPIDOPTEROS DA CULTURA DO MILHO NO BRASIL

RAFAEL SILVA MENEZES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO/2008**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE DE PROTEÍNAS CRY TÓXICAS PARA IMPORTANTES
LEPDOPTEROS DA CULTURA DO MILHO NO BRASIL**

RAFAEL SILVA MENEZES

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT SOLON DE PONTES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 296/2008

BRASÍLIA/DF
JUNHO/2008

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus thuringiensis* E DETERMINAÇÃO DA
ATIVIDADE DE PROTEÍNAS CRY TÓXICAS PARA IMPORTANTES
LEPDOPTEROS DA CULTURA DO MILHO NO BRASIL**

RAFAEL SILVA MENEZES

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA
DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO VEGETAL.**

APROVADA POR:

**ROSE GOMES MONNERAT SOLON DE PONTES, PhD (Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia - Cenargen)
(ORIENTADORA) CPF: 512.803.701-06
E-mail: rose@cenargen.embrapa.br**

**JEAN KLÉBER DE ABREU MATTOS, Dr. (Universidade de Brasília - UNB)
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 002.288.181-68
E-mail: kleber@unb.br**

**PAULO ROBERTO QUEIROZ DA SILVA, Dr. (Centro Universitário de
Brasília – CEUB)
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 564.300.601-44
E-mail: pqsilva@uol.com.br**

BRASÍLIA/DF, 20 de JUNHO de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Menezes, Rafael Silva

Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* e Determinação da Atividade de Proteínas Cry Tóxicas para Importantes Lepidopteros da Cultura do Milho no Brasil. / Rafael Silva Menezes; orientação de Rose Gomes Monnerat. – Brasília, 2008.

120 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. *Agrotis ipsilon*. 3. *Spodoptera frugiperda*. 4. Proteínas Cry. I. Monnerat, R. II. PhD.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MENEZES, R. S. **Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* e Determinação da Atividade de Proteínas Cry Tóxicas para Importantes Lepidopteros da Cultura do Milho no Brasil.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 112 p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Rafael Silva Menezes

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* e Determinação da Atividade de Proteínas Cry Tóxicas para Importantes Lepidopteros da Cultura do Milho no Brasil.

GRAU: Mestre ANO: 2008

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Rafael Silva Menezes

042.930.347-57

QRSW 08 Bloco A12 Apt. 303

CEP – 70675-812

Brasília/DF - Brasil

(61) 3208-4188 e agronomo.rsm@gmail.com

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, João Gomes Menezes e Rosane Alves da Silva por todo apoio, amor, ensinamentos e confiança.

À minha filha, Letícia Menezes por todo carinho e abraços de “urso” nesses seus três aninhos de vida cheios de alegria.

À minha esposa, Francislete Rodrigues Melo, pelo constante amor e companheirismo nesses anos que estamos juntos.

Vocês são muito especiais.....Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

À Dra. Rose Gomes Monnerat, em especial, pela oportunidade e orientação concedida para a realização deste trabalho e, sobretudo pela confiança e amizade.

Ao Vinicius Fiúza Dumas pelas aulas de biologia molecular e co-orientação deste trabalho e também por toda amizade demonstrada.

À Lílian Botelho e a Viviane pela ajuda na realização dos bioensaios.

À Dra. Francislete Rodrigues Melo pelo apoio e orientações técnicas na elaboração deste trabalho.

À banca examinadora pela revisão e contribuições de melhoria desta dissertação.

À Universidade de Brasília (UnB) em nome de todos os professores da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) pelos ensinamentos prestados.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) pela disponibilização de toda infra-estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os meus familiares (Menezes; Silva; e Marcial) pelo incentivo e carinho.

À todos os colaboradores do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Cenargen (Érica Martins, Felipe Ramos, Paulo Queiroz, Carol Ramiro, Paula, Hélio, Felipe Wagner), que de alguma forma me ajudaram na condução deste trabalho.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia na pessoa de Adriano Duarte Filho pela compreensão, apoio e suporte na elaboração desta dissertação.

À Associação Brasileira de Instituições de Pesquisa Tecnológica (ABIPTI) nas pessoas de Lynaldo Cavalcanti de Albuquerque e Joaci Franklin de Medeiros pelo apoio e suporte para a realização de minhas aulas e pesquisas.

A todos os colegas de trabalho da Unidade de Arranjos Produtivos Locais da ABIPTI e da Coordenação de Tecnologias Setoriais da Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CGTS/SETEC) pelo incentivo e apoio.

ÍNDICE

Capítulos/Sub-capítulos	Página
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
Importância econômica da cultura do milho no mundo e no Brasil	6
Panorama Mundial	6
A cultura do milho no Brasil	8
Lagarta rosca (<i>Agrotis ipsilon</i>)	11
Descrição e Biologia	11
Danos causados por <i>Agrotis ipsilon</i> na cultura do milho	14
<i>Lagarta do Cartucho (Spodoptera frugiperda)</i>	16
Importância e Biologia de <i>Spodoptera frugiperda</i>	16
Danos causados por <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
<i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i>	20
Histórico	22
Toxinas produzidas por <i>Bacillus thuringiensis</i>	23
α -exotoxina	24
β -exotoxina	24
Vip3A	25
δ -endotoxinas	26
Modo de Ação das Proteínas Cry	27
A utilização de <i>Bt</i> na Agricultura	30
Uso de bioinseticidas a base de <i>Bt</i>	30
Milho geneticamente modificado (<i>Milho Bt</i>)	32

OBJETIVOS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO 1	47
Seleção, Caracterização Bioquímica e Molecular de Estirpes de <i>B. thuringiensis</i> Tóxicas Contra <i>Agrotis ipsilon</i>	
INTRODUÇÃO	50
MATERIAIS E MÉTODOS	52
Obtenção de estirpes de <i>Bt</i> e de lagartas <i>A. ipsilon</i>	52
Caracterização Morfológica das estirpes de <i>Bt</i>	52
Avaliação de Patogenicidade de <i>Bt</i> contra <i>A. ipsilon</i>	53
Caracterização Bioquímica	56
Extração de proteínas	56
Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	56
Caracterização Molecular	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
Caracterização morfológica	59
Caracterização entomopatogênica	59
Caracterização bioquímica e molecular	61
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
CAPÍTULO 2	74
Atividade Inseticida de Proteínas Cry Tóxicas Contra <i>Spodoptera frugiperda</i> e Estudo de Receptores de Membrana Específicos	
INTRODUÇÃO	77
MATERIAIS E MÉTODOS	80
Bioensaios contra lagartas de <i>S. frugiperda</i>	80
Obtenção de estirpes de <i>Bt</i> e de lagartas de <i>S. frugiperda</i>	80

Caracterização Morfológica das estirpes de <i>Bt</i>	81
Avaliação de patogenicidade de <i>Bt</i> contra <i>S. frugiperda</i>	81
Purificação e solubilização de proteínas	84
Ativação, quantificação e visualização das proteínas	85
Purificação de Membranas da Microvilosidade Apical (VMMAs)	85
Biotinilação das proteínas	87
Ensaio de ligação	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
Bioensaios contra lagartas de <i>S. frugiperda</i>	89
Purificação e solubilização de proteínas	90
Ativação, quantificação e visualização das proteínas	92
Biotinilação das proteínas	93
Ensaio de ligação	94
CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO A	104
ANEXO B	109

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS **PÁGINA**

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- 1 - (A) Mariposa de *Agrotis ipsilon* (Visão Dorsal) e (B) Lagarta de quinto instar de *A. ipsilon* (em aspecto de rosca). 13
- 2 - (A) Lagarta rosca logo após do ataque e (B) Identificação no campo de plântula de milho atacada pela lagarta rosca. 15
- 3 - (A) Lagarta de quinto instar de *S. frugiperda* e (B) Mariposa de *S. frugiperda* (Visão Dorsal). 16
- 4 - Danos causados por *Spodoptera frugiperda* em milho. (A) folhas raspadas e cortadas; e (B) espiga danificada. 19
- 5 - (A) Microscopia de contraste de fase de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporos (2.000x); e (B) - Colônia de *Bacillus Thuringiensis*. 22
- 6 - Representação esquemática do modo de ação da bactéria *B. thuringiensis*. 27

CAPÍTULO 1

- 7- Placas de bioensaio devidamente fechada e (B) Larvas de segundo instar de *S. frugiperda*. 54
- 8 - (A e B) Detalhe do arranjo de copos de plásticos fechados contendo dieta livre de *Bt* e as lagartas sobreviventes depois de 48h. 55
- 9 - Perfil protéico obtido das estirpes S1450 (*Btk*) S597; S615; em SDS-PAGE a 12%. 61
- 10 - Perfil protéico obtido das estirpes S1450 (*Btk*) S1989 (*Bti*) ;S844; em SDS-PAGE a 12%. 63
- 11 - Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 1Ab. 63

12 -	Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 1Ac	63
13 -	Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 11	64
14 -	Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 2	64

CAPÍTULO 2

15 -	Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%.	91
16 -	Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%.	92
17 -	Perfil protéico obtido das proteínas solubilizadas e tripsinadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%.	93
18 -	Perfil protéico obtido das proteínas solubilizadas, biotiniladas e tripsinadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%.	93
19 -	Ensaio de ligação a VMMA de <i>S. frugiperda</i> com as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab.	94
20 -	(A) Ensaio de ligação a VMMA de <i>S. frugiperda</i> com as proteínas Cry1Ac. (B) Ensaio de ligação a VMMA de <i>S. frugiperda</i> com as proteínas Cry1Ac.	95
21 -	Receptores moleculares das proteínas Cry1A. Receptor do tipo caderina (CADR); receptor aminopeptidase-N (APN); receptor fosfatase alcalina (ALP); receptor glicoconjugado de 270 kDa (GCR) (Bravo <i>et al.</i> , 2007).	96

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA **PÁGINA**

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- | | | |
|-----|---|----|
| 1 - | Produção Brasileira de Milho no período de 2004-2008. | 9 |
| 2 - | Produção de Milho por Região no período de 2002-2008. Safra Total (1.000 t). | 10 |
| 3 - | Produtos formulados a base de <i>B. Thuringiensis</i> com registro de utilização no MAPA. | 31 |

CAPÍTULO 1

- | | | |
|-----|---|----|
| 4 - | Dieta de <i>A. ipsilon</i> utilizada nos bioensaios. | 54 |
| 5 - | Percentual de mortalidade de lagartas de <i>A. ipsilon</i> causada por diferentes estirpes de <i>B. thuringiensis</i> . Resultado obtido através de bioensaios seletivos. | 59 |
| 6 - | <i>genes cry</i> amplificados por PCR e visualizados em gel de agarose 1%. | 65 |
| 7 - | <i>genes cry</i> presentes nas estirpes selecionadas. | 65 |

CAPÍTULO 2

- | | | |
|------|---|----|
| 8 - | Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra <i>S. frugiperda</i> . | 82 |
| 09 - | Dieta de <i>S. frugiperda</i> utilizada nos bioensaios. | 83 |
| 10 - | Resultado dos bioensaios contra lagartas <i>S. frugiperda</i> utilizando as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. | 89 |

ANEXO A

- | | | |
|------|--|-----|
| A1 - | Inseticidas registrados para o controle de <i>Agrotis ipsilon</i> na cultura do milho. | 105 |
|------|--|-----|

A2 -	Inseticidas registrados para o controle de <i>Spodoptera frugiperda</i> na cultura do milho.	105
-------------	--	-----

ANEXO B

B1 -	Principais bioinseticidas comerciais formulados à base de <i>B. thuringiensis</i> .	110
-------------	---	-----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

Símbolo/Abreviações	Descrição
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Btk	<i>Bacillus thuringiensis</i> subs. <i>kurstaki</i>
CL ₅₀	Concentração letal média
CTNBio	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetra-acético
g	Grama
g/L	Grama por litro
GM	Geneticamente Modificado
h	Horas
ha	Hectare
kDa	Quilodalton
kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligrama
min	Minutos
MIP	Manejo Integrado de Pragas
mL	Mililitro
ng	Nanograma
NYSM	Caldo nutritivo suplementado com sais inorgânicos, glicose e extrato de levedura

°C	Grau Celsius
p/v	peso/volume
pb	Pares de bases nitrogenadas
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS–PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
SPD	Sistema de Plantio Direto
t	Tonelada
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TRIS	hidroximetil aminometano
UV	Ultra-violeta
v/v	volume/volume
VIP	“Vegetative Insecticidal Proteins”
VMMA	Vesículas de Membrana da Microvilosidade
	Apical
µL	Microlitro

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar através de métodos bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas contra *Agrotis ipsilon*. Bioensaios seletivos foram realizados com 71 estirpes selecionadas pela sua atividade contra insetos da ordem Lepidoptera. As estirpes que causaram mortalidade de 100% pertencem aos sorotipos galleriae (S597), sotto (S615), aizawiai (S616) e kurstaki (S1450) descritos na literatura como tóxicos a Lepidopteros. As estirpes denominadas S907 e S1168 também causaram 100% de mortalidade. As estirpes S906, S234 e S844 causaram 75%. Testes moleculares foram realizados com as estirpes S597, S615 e S844, as quais não haviam ainda sido caracterizadas, enquanto as demais já tinham sua caracterização bioquímica e molecular descritas. Os resultados dos testes moleculares obtidos com a estirpe S615 identificaram a presença dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2*. A estirpe S844 mostrou a presença dos genes *cry2* e *cry11*. Na estirpe S597 nenhum gene *cry* foi indentificado, de acordo com a metodologia empregada. Objetivando a identificação da atividade tóxica individual de proteínas Cry foram conduzidos bioensaios para determinação da dose letal necessária para causar mortalidade em 50% da população (CL50) de lagartas de *S. frugiperda*. Utilizou-se para isso, as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A presentes no *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (*Btk*). Adicionalmente, foram conduzidos experimentos para verificação da ligação dessas proteínas a receptores de membrana de lagartas de *S. frugiperda*. Três estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* e uma estirpe nativa foram utilizadas nesse trabalho para a produção das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e

Cry2A. Bioensaios de dose com lagartas de segundo instar de *S. frugiperda* apresentaram CL₅₀ de 12,416 ng/cm², 13.434 ng/cm², 108,773 ng/cm² e 164,350 ng/cm², respectivamente, evidenciando diferentes atividades tóxicas. Os resultados dos ensaios de ligação realizados com VMMA de *S. frugiperda* demonstraram ligações de diferentes intensidades a receptores de membrana com as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A marcadas com biotina.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*; *Agrotis ipsilon*; *Bacillus thuringiensis*; proteínas Cry; receptores de membrana.

ABSTRACT

This work aimed to select and characterize through bioassays and biochemical and molecular methods, strains of *B. thuringiensis* which are toxic for *Agrotis ipsilon*. Selective bioassays were done with 71 strains, selected according to toxic activity against Lepdopteran insects. Some *Bt* strains caused 100% of mortality to *A. ipsilon* larvae. These strains belonged to serotypes galleriae (S597), sotto (S615), aizawiai (S616), kurstaki (S1450) described as toxic against Lepdopteran insects. The strains named S906, S234 and S844 caused mortality of 75% to *A. ipsilon* larvae. Molecular analysis were conducted using the strains S597, S615 and S844, which have no characterization described, while all others strains had biochemical and molecular characterization described. The results from molecular tests obtained with strain S615 identified the presence of genes *cry1Ab*, *cry1Ac* and *cry2*. The strain S844 showed the presence of genes *cry2* and *cry11*. On strain S597 wasn't identified any gene *cry*, according to methodology employed. Aiming the identification of individual toxic activity of Cry proteins were conducted bioassays for determination of lethal dosis necessary to causes mortality in 50% of population (LC₅₀) of *S. frugiperda* larvae. Were used the proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A present in *B. thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1 (*Btk*). Additionally, experiments to verify the binding of these proteins to membrane cell receptors of *S. frugiperda* larvae were conducted. Three recombinant strains of *B. thuringiensis* and one wild type strain were utilized at this work to produce of proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A. Bioassays with *S. frugiperda* larvae of second instar showed LC₅₀ of 12.416 ng/cm², 13.434 ng/cm², 108.773 ng/cm² and 164.350 ng/cm², respectively, evidencing

different toxic activity. The results of binding assays done with BBMV (brush border membrane vesicles) of *S. frugiperda* showed binding with membrane cell receptors of proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A marked with biotin.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; *Agrotis ipsilon*; *Bacillus thuringiensis*; *Cry proteins*; membrane cell receptors.

1. INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com relatório elaborado pela Organização das Nações Unidas (ONU) a população mundial deveria ultrapassar 6,1 bilhões de habitantes no ano 2000, fato que foi confirmado. Para o ano de 2050 a perspectiva, de acordo com o mesmo relatório, é que a população alcançará em torno de 9,2 bilhões de habitantes. A maior parte dessa população deve pertencer aos países em desenvolvimento. Essa observação sugere que devemos otimizar cada vez mais a produção de alimentos agricultáveis, já que teremos uma demanda cada vez maior (ONU, 1998).

Observamos que desde os primórdios da civilização, o homem vem continuamente se esforçado para melhorar sua condição de vida. Seu esforço para aumentar a produção em quantidades suficientes de alimentos se contrapôs às devastações causadas pelas pragas. Entretanto, segundo Ehrlich & Raven (1964) a domesticação das plantas causa perda de compostos de resistência tornando-a susceptível a uma variedade de pragas. Silva-Filho & Falcon (2000) afirmam que a perda da safra de alimentos no mundo pelo ataque de insetos praga pode alcançar 15%. Com o intuito de combater essas pragas foram produzidos então os compostos denominados agroquímicos, incluindo fertilizantes e agrotóxicos (Silva & Fay, 2004).

Ao longo dos anos os agrotóxicos têm causado sérios danos ao ambiente, porém, hoje eles são sintetizados com a premissa de exercerem menos impacto sobre os organismos não-alvo e de garantir a eficácia agrônômica no controle de pragas, doenças e plantas daninhas. No entanto, alguns desses compostos podem ainda afetar fortemente a vida selvagem, a saúde do homem, o solo, a água, atuar sobre os inimigos naturais e promover

a seleção de populações de organismos resistentes. Além disso, o custo para obtenção desses defensivos é, geralmente, elevado (Capel, 1993).

Todos esses fatores levaram o homem a procurar técnicas alternativas ao uso de compostos químicos para o controle de pragas que sejam mais econômicos e menos prejudiciais ao meio ambiente. Entre essas alternativas está o uso de produtos biológicos como bactérias, fungos e vírus, os quais têm sido testados com sucesso em programas de proteção de culturas contra insetos, patógenos e plantas daninhas. Segundo Secchi (2002), os bioinseticidas são, na maioria das vezes, seletivos, seguros ao aplicador e não poluem o meio ambiente, representando uma alternativa verdadeiramente sustentável.

O produto biológico mais conhecido para uso agrícola no controle de insetos é produzido utilizando-se o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Silva & Fay, 2004), sendo responsável por 90%–95% do mercado de bioinseticidas no mundo (Valadares-Inglis et al., 1998). Os bioinseticidas formulados a partir de *Bt* são mais comumente usados em combate a insetos da ordem Lepidoptera, porém, também têm sido utilizados para outras ordens como Diptera e Coleoptera (Monnerat & Bravo, 2000).

B. thuringiensis é uma bactéria, aeróbica, Gram positiva, da família *Bacillaceae*, que se caracteriza pela produção de inclusões protéicas cristalinas (proteínas Cry) durante a fase do ciclo de crescimento no momento de sua esporulação. Esta observação levou ao desenvolvimento de pesquisas de bioinseticidas baseados no *Bt* para o controle de certas espécies nas ordens Lepidoptera, Diptera, e Coleoptera (Scnepf et al., 1998).

O modo de ação das proteínas Cry tem sido extensivamente estudado e sabe-se que após a ingestão dessas proteínas (protoxina), ocorre a solubilização no suco digestivo do inseto, geralmente em pH alcalino (Charles, 2000). Em seguida, ocorre a ativação proteolítica da protoxina, principalmente por serino proteinases (Federici, 1990). Finalmente, a proteína ativa se liga a receptores de membrana específicos causando a permeabilização da membrana e conseqüentemente, a perda do suco digestivo, paralisia e morte do inseto por inanição e septicemia (Rabinovitch et al., 2000; Monnerat & Bravo, 2000).

É notável a importância que o uso dessa bactéria pode ter no combate às pragas da agricultura. No caso da cultura do milho (*Zea mays* L.), são conhecidas pelo menos 21 espécies associadas de Lepidopteros, distribuídas nas famílias Arctiidae, Cosmopterigidae, Crambidae, Noctuidae, Pyralidae e Saturniidae (Soto & Nakano, 2003). O Brasil é o 4º maior produtor mundial de milho, sendo que essa cultura ocupa cerca de 13 milhões de hectares, com uma produção média de 41 milhões de toneladas por ano (FNP Consultoria & Comércio, 2006). Porém, o rendimento da cultura do milho é baixo, principalmente quando comparado ao de outros países produtores como a Argentina, China e Estados Unidos. Esse fato deve-se a diversos fatores, entre eles, ao ataque das pragas, tais como, Lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*) e a Lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

A lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*) (Hufnagel, 1766) é uma praga polífaga e cosmopolita, causadora de sérios danos em cultivos hortícolas e em sistemas de produção de grãos, tais como, milho, feijão, soja e algodão. O dano causado pelo inseto é maior se houver população elevada de lagartas grandes,

provenientes de plantas hospedeiras, na fase de germinação das plantas, situação mais provável de ocorrer nos sistemas de plantio direto.

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), pertencente à Ordem Lepidoptera e a família Noctuidae é a principal praga da cultura do milho. As lagartas danificam as folhas centrais do cartucho do milho, o qual pode ser totalmente destruído. Em ocorrências tardias, podem atacar a espiga, destruindo a palha e os grãos, além de propiciarem a entrada de patógenos e umidade, determinando o apodrecimento das mesmas. O ataque pode ocorrer desde a fase de plântula até as fases de pendoamento e espigamento (Ávila et al., 1997). Além do milho, o inseto danifica também outras culturas, incluindo pastagens, arroz, cana-de-açúcar, trigo, aveia, cevada, amendoim, batatinha, alface e diversas hortaliças.

O controle dessas pragas, normalmente, é realizado com aplicação de inseticidas químicos logo no início da infestação, porém, quando a lagarta já se encontra em fase de desenvolvimento mais adiantado, o uso de inseticidas pode causar desequilíbrios ecológicos, resistência de pragas, efeitos toxicológicos e perdas econômicas.

O uso de inseticida biológico a base de *Bacillus thuringiensis*, entretanto, tem se mostrado eficiente se usado logo após a eclosão das larvas ainda nas folhas. Contudo, o elevado custo, a alta concorrência com os produtos químicos e a falta de investimento no desenvolvimento e formulação destes são as principais limitações dos bioinseticidas no mercado (Polanczyk et.al., 2003). Para viabilizar a produção desses bioinseticidas, em todo o mundo, são pesquisadas novas estirpes de *B. thuringiensis* visando o aumento do número de toxinas disponíveis para o controle de insetos. A Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia possui em torno de 2.300 estirpes em seu banco de *Bacillus* entomopatogênicos e é referência mundial na pesquisa da área (Monnerat, et al., 2001).

Estas estirpes estão sendo testadas e caracterizadas contra insetos-praga e vetores de doenças para serem utilizadas como base para produção de bioinseticidas, ou como doadoras de genes codificadores de proteínas inseticidas, que poderão ser utilizados na produção de plantas transgênicas resistentes a insetos.

O presente trabalho tem como objetivos selecionar e caracterizar através de métodos bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas contra larvas de *Agrotis ipsilon* a partir do banco de *Bacillus* entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e a determinação da atividade inseticida de proteínas Cry tóxicas contra larvas e *Spodoptera frugiperda*. Adicionalmente foram conduzidos experimentos para verificar a ligação das referidas proteínas a receptores de membrana de lagartas de *S. frugiperda*. Os resultados obtidos poderão ser utilizados para formulação de novos bioinseticidas mais eficazes para o controle dessas pragas e/ou em estudos moleculares para a escolha de um gene codificador de uma proteína Cry candidata para futuras aplicações biotecnológicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica da cultura do milho no mundo e no Brasil

2.1.1 Panorama Mundial

O milho (*Zea Mays* L.) é um dos mais importantes cereais do mundo, podendo, em vários países, representar a base da alimentação humana e animal (Pinazza, 2007). Os números exatos da produção mundial de milho da safra de 2007/08 ainda não foram divulgados, contudo, segundo relatório do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) de 2007, verificou-se as primeiras estimativas do quadro de oferta mundial de milho para a safra 2007/08, a qual ficou em torno de 766,5 milhões de toneladas. Dessa forma, identifica-se um possível aumento de 9,8% em relação à safra de 2006/07 quando foram produzidas globalmente 697,7 milhões de toneladas (FAEP, 2007).

Segundo Duarte et al. (2005) a cultura do milho é estratégica e deve ser analisada preferencialmente no âmbito das produtivas ou sistemas agro-industriais (SAG). Embora o milho seja insumo para produção de uma centena de produtos, é no SAG de suínos e aves que são consumidos aproximadamente 70% do milho produzido no mundo.

Os maiores produtores mundiais de milho são os Estados Unidos e a China que também são os maiores exportadores. O Brasil ocupa a terceira posição em termos de produção mundial com, aproximadamente, 54 milhões de toneladas produzidas no somatório da 1ª e 2ª safras de 2007/2008. (Conab, 2008).

Nesse cenário, merecem destaque duas importantes mudanças em curso que podem influenciar esses dados nos próximos anos. A primeira vem do fato de que a China vem gradativamente diminuindo seus estoques, por meio de uma agressiva política de exportação. Como a produção chinesa não tem sido suficiente para atender uma demanda crescente, a China deverá em uma primeira fase reduzir às exportações e, em uma segunda fase, passar de exportadora a importadora líquida de milho, em um curto período de tempo. Essa situação abrirá um mercado de cerca de oito a nove milhões de toneladas adquiridas anualmente por países asiáticos que tradicionalmente compravam da China.

A segunda forte mudança nesse cenário é que está ocorrendo um processo de incremento de produção de etanol a partir do milho nos Estados Unidos, o que pode aumentar o consumo interno deste cereal e reduzir as quantidades disponíveis para exportação no país que é responsável por mais de 50% da quantidade comercializada internacionalmente (Pinazza, 2007).

Recentemente, com o estabelecimento da crise mundial de alimentos e a elevação, principalmente, do preço do arroz no mercado mundial a ONU vem combatendo o aumento da área de cultivo de plantas destinadas à produção de biocombustíveis, objetivando evitar a concorrência por áreas agricultáveis e um agravamento da crise. Nesse sentido, os Estados Unidos e o Brasil estão recebendo forte ataque do bloco europeu para conter a destinação do milho para a produção de álcool (EUA) e da soja para a produção de biodiesel (Brasil). Por outro lado, é importante destacar que os países do bloco europeu ocupam praticamente todas as áreas disponíveis para a agricultura de seu continente e possuem pouca diversidade em biomassa. Na Europa, somente

uma planta oleagionosa se destaca para a produção de biodiesel, a colza, que vem sendo amplamente utilizada, contudo, não possuem áreas para aumentar esse plantio. A posição da ONU quanto à utilização do milho e da soja para fins energéticos deve ser considerada, contudo, não podemos desconsiderar os recentes investimentos dos dois países no desenvolvimento da pesquisa e de tecnologias voltadas para a produção dos biocombustíveis. Uma análise de cada caso deve ser feita, levando-se em consideração os pontos fortes e fracos de cada sistema produtivo e o receio dos países europeus em relação a esse assunto parece estar focado, principalmente na tentativa de evitar que o Brasil e EUA se tornem potência nesse setor.

2.1.2 A cultura do milho no Brasil

Segundo Freitas (2001), o milho (*Zea mays mays* L.) é originário da América Central e evoluiu primeiramente do cruzamento de espécies de teosinte (*Zea mays parviglumis* e *Zea mays mexicana*). O milho possui uma história de mais de oito mil anos nas Américas, sendo cultivado desde o período pré-colombiano. Existem, hoje, identificadas 300 raças de milho e dentro de cada raça, milhares de cultivares (CNTBio, 2008).

O Cultivo do milho contribui significativamente para o desenvolvimento do agronegócio brasileiro, pois apresenta altas produtividades e rápido retorno financeiro, tornando-se uma boa opção para a diversificação das atividades na propriedade rural (Souza, 2002). Sua cadeia produtiva é um dos segmentos econômicos mais importantes do agronegócio brasileiro. Segundo Pinazza (2007) o milho responde por cerca de 40% da produção nacional de grãos. Ao mesmo tempo é insumo básico para a avicultura e suinocultura, dois setores

extremamente competitivos em nível internacional e grandes geradores de receitas, via exportação.

A produção de milho no Brasil tem se caracterizado pela divisão da produção em duas épocas de plantio. Os plantios de primeira safra são realizados durante o período chuvoso, durante os meses agosto a setembro, e os de segunda safra, ou "safrinha" se referem ao milho de sequeiro, plantado, em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste (Cnpms, 2008).

A Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) divulgou em seu quinto levantamento 2008 os dados da produção nacional da safra de 2007/2008, que ficou em torno de 53.5 milhões de toneladas (Conab, 2008). Conforme pode ser visualizado na Tabela 1 a produção brasileira nos últimos cinco anos foi crescente em termos de produção de grãos. Esse fator pode ser explicado pelo aumento da área plantada no país e pelo aumento do rendimento por hectare da cultura.

Tabela 1 - Produção Brasileira de Milho no período de 2004-2008. Fonte: Conab, 2008

Safra	2008	2007	2006	2005	2004
Produção (1.000 t)					
Total	53.586,50	51.370	42.514	35.007	42.128
1ª Safra	38.233,60	36.597	31.809	27.298	31.554
2ª Safra	15.353,00	14.773	10.705	7.708	10.574
Área plantada (1.000 ha)					
Total	14.309,00	14.055	12.963	12.208	12.093
1ª Safra	9.684,00	9.494	9.652	9.021	9.465
2ª Safra	4.625,00	4.561	3.311	3.186	3.317
Rendimento (kg.ha-1)					
Total	3.745	3.655	3.279	2.867	3.286
1ª Safra	3.948	3.855	3.295	3.026	3.334
2ª Safra	3.320	3.239	3.233	2.419	3.187

Do total da produção brasileira de milho a região centro-oeste é responsável por 14,1 milhões de toneladas, cerca de 26% da produção nacional atrás somente da região sul que praticamente produz a metade de todo milho brasileiro (Tabela 2). O Distrito Federal é responsável por 316,5 mil toneladas que apesar do aparente pequeno volume produzido aumentou em mais de 100% sua produção nos últimos cinco anos. O estado maior produtor é o Paraná com mais de 5 (cinco) milhões de toneladas de grãos produzidos na safra 2007/2008. Esses números podem ser visualizados e comparados nos levantamentos de safras agrícolas realizados anualmente pela Companhia Nacional de Abastecimento disponível no endereço eletrônico: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>.

Tabela 2 - Produção de Milho por Região no período de 2002 a 2008. Safra Total (1.000 t).Fonte: Conab (2008)

REGIÃO/UF	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002
Norte	1.204,20	1.229	1.129	1.108	1.090	979	855
Nordeste	4.199,20	3.796	3.242	2.969	3.003	3.278	2.055
Centro-oeste	14.173,70	13.686	9.592	7.823	9.355	9.931	7.088
Sudeste	10.524,20	10.337	9.651	10.303	10.649	10.048	8.894
Sul	23.485,30	23.273	18.899	12.804	18.032	23.175	16.375
BRASIL	53.586,60	52.320	42.514	35.007	42.129	47.411	35.267

O aumento da produção e da produtividade também é uma das bases para a redução do custo de produção, de forma que o Brasil se torne competitivo também no mercado internacional já que praticamente toda sua produção é voltada para o consumo doméstico. O rendimento da cultura ainda

pode ser aumentado e, nesse sentido a pesquisa deve ser fomentada objetivando cultivares mais produtivas e melhores adaptadas as variadas condições edafo-climáticas existentes no País. Conforme também pode-se inferir da tabela 1 é que a área plantada com milho aumenta a cada ano agrícola causando segundo, Souza (2005) o aumento da incidência de pragas gerando a necessidade de controlá-las, sejam elas constantes ou apenas esporádicas ou acidentais. No controle dessas pragas o agricultor faz uso, principalmente, de inseticidas químicos aumentando significativamente seu custo de produção, além de causar sérios danos ao meio-ambiente. No anexo A encontram-se listados os inseticidas químicos registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle de *Agrotis ipsilon* e *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil (Agrofit, 2008).

Entre as pragas que atacam o milho a ordem Lepidoptera possui maior número de espécies nocivas, cuja fase larval pode danificar todas as partes da plantas cultivadas (Gallo et al. 1988). Destacam-se, nesse aspecto, os danos causados pela lagarta do cartucho e pela lagarta rosca que juntas são responsáveis por mais de 20% de danos à produção de grãos (Cruz, 1980).

2.2 Lagarta rosca (*Agrotis ipsilon*)

2.2.1 Descrição e Biologia

As lagartas-rosca pertencentes ao gênero *Agrotis* e constituem um importante grupo de insetos-praga, devido, principalmente, aos prejuízos causados a um grande número de plantas cultivadas e à sua vasta distribuição geográfica (Vendramim et al., 1982). *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) é a principal espécie de lagarta-rosca encontrada no Brasil. Ela é uma praga

polífaga e cosmopolita, causadora de sérios danos em cultivos hortícolas (solanáceas, curcubitáceas e crucíferas) e em sistemas de produção de grãos, tais como, milho, feijão, soja e algodão (Vendramim et al., 1982; Silva et al., 1968; Link & Pedrolo, 1987). Trata-se de um inseto de difícil controle, devido à dificuldade de visualização no campo, pois o mesmo possui hábito noturno.

Várias espécies de lagarta-rosca atacam a cultura de milho, porém, a espécie *Agrotis ipsilon* tem sido a mais comum. As plantas atacadas por essa lagarta ficam totalmente improdutivas. Na região do cerrado brasileiro, principalmente em áreas cultivadas com milho sob o Sistema de Plantio Direto (SPD), tem se observado um aumento considerável do ataque de lagarta rosca a cada ano agrícola causando sérios danos aos agricultores. Waquil (2007) em seu estudo sobre manejo fitossanitário e ambiental confirma essa observação ao afirmar que além da técnica de SPD a expansão da safrinha e de culturas hospedeiras irrigadas aumentam a densidade populacional de insetos-praga que passam pelo menos uma de suas fases no solo.

A técnica de SPD mantém praticamente intacta a cobertura morta composta de resíduos de colheitas anteriores, favorecendo o aparecimento da praga, com a disponibilização de alimento permanente, solo úmido e sem o revolvimento constante do solo. Essas características propiciam um ambiente favorável ao seu desenvolvimento e reprodução.

O adulto de *Agrotis ipsilon* é uma mariposa geralmente de coloração marrom-escura, com áreas claras no primeiro par de asas e coloração clara com os bordos escuros, no segundo par (Figura 1A). O adulto mede cerca de 40 mm de envergadura. As lagartas (Figura 1B) são de coloração variável, cinza-escura a marrom-escura e podem medir 45-50 mm no seu máximo

desenvolvimento. Apresentam a sutura epicranial na forma de Y invertido. Segundo Souza (2005) as lagartas apresentam oito pares de patas, sendo três torácicas e cinco abdominais.



Figura 1 (A) Mariposa de *Agrotis ipsilon* (Visão Dorsal) e **(B)** Lagarta de quinto instar de *A. ipsilon* (em aspecto de rosca)

Fonte: bugs.bio.nau.edu/grand_canyon/files/noctuidae.htm

São poucos os estudos publicados na literatura técnico-científica sobre a biologia de *A. ipsilon*. Segundo Bento et al. (2007) esse fato é explicado devido à dificuldade da sua criação em dietas naturais, com exceção do trabalho de Santos & Nakano (1982), que conseguiram criá-lo em folhas de couve.

Como mencionado anteriormente, as lagartas têm hábitos noturnos e durante o dia encontram-se na base da planta, protegidas sob torrões, ou a poucos centímetros de profundidade no solo, na posição de rosca.

Bento et al. (2007) observaram em seu estudo, em dieta artificial, que o desenvolvimento larval de *A. ipsilon* apresentou seis ínstaes. Os mesmos autores afirmam que o peso médio das pupas foi de 484 mg para fêmeas e de 387 mg para machos, com respectivas durações de 12,6 e 12,3 dias até sua eclosão. A razão sexual observada foi de 0,46 e, portanto, de 1 macho:1 fêmea. As longevidades médias de machos e fêmeas visualizadas foram em média de 13,63 e 13,08 dias, respectivamente, com variação de 10 a 17 dias.

As posturas ocorreram durante toda a fase adulta, e 80% do total dos ovos foram depositados até o oitavo dia. Segundo Quintela (2002) o período de incubação dos ovos é, em média, de cinco dias e após o primeiro ínstar, as lagartas dirigem-se para o solo, onde permanecem protegidas durante o dia, só saindo ao anoitecer para se alimentar.

Os dados apresentados acima foram diferentes dos relatados na literatura por Quintela (2002) e Santos & Nakano (1982). Segundos esses autores a fase de lagarta dura em média 28 dias e a fase de pupa dura em torno de 15 dias com a postura situando-se entre 600 e 1000 ovos por mariposa.

2.2.2 Danos causados por *Agrotis ipsilon* na cultura do milho

Segundo Link & Pedrolo (1987), *A. ipsilon* ocorre principalmente em locais mais úmidos. Segundo Cruz et al. (1995) uma larva é capaz de destruir de quatro a seis plantas constituindo-se uma séria ameaça ao bom desenvolvimento da cultura do milho.

A lagarta desse inseto alimenta-se da haste da planta, provocando o seccionamento da mesma (Figura 2 A), que pode ser total, quando as plantas estão com a altura de até 20 cm, pois ainda são muito tenras e finas, e parcial, após esse período. O dano causado pelo inseto será maior se houver população elevada de lagartas grandes, provenientes de plantas hospedeiras, na fase de germinação das plantas. As plantas mais desenvolvidas podem tolerar o dano por mais tempo, porém murcham e podem sofrer tombamento pelo vento (Quintela, 2002).

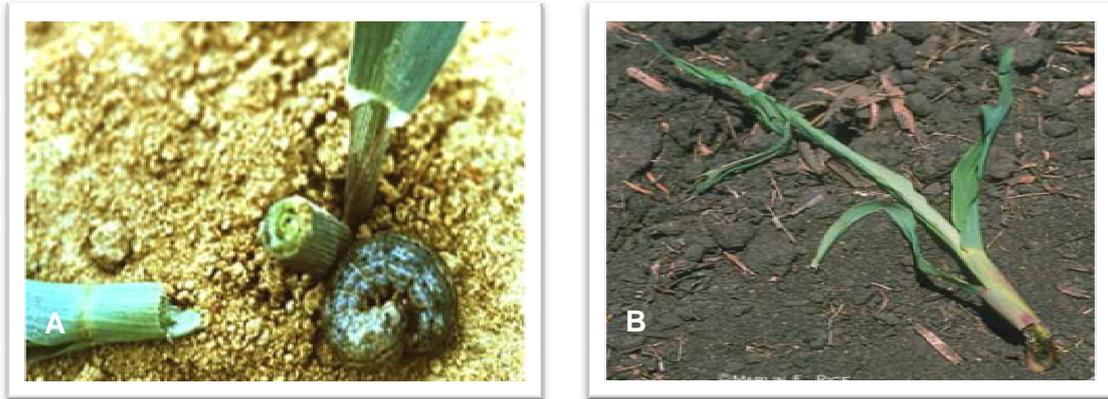


Figura 2 (A) Lagarta rosca logo após o ataque e **(B)** Identificação no campo de plântula de milho atacada pela lagarta rosca. **Fonte:** www.gaipm.org/top50/images/cutworm.jpg

O milho geralmente só é atacado pela lagarta-rosca até atingir cerca de 50 cm de altura. Para identificar o ataque no campo deve-se procurar plantas que apresentam o colmo seccionado na região do coleto (Figura 2B). Os sintomas de ataque da lagarta-rosca são, inicialmente, seccionamento parcial do colmo e, quando a lesão é grande, surge o chamado "coração morto", com a conseqüente morte da planta. Quando a lesão é pequena, surgem manchas semelhantes às causadas por deficiências minerais. A lagarta-rosca pode também provocar perfilhamento, o que é indesejável, pois surgirá uma touceira totalmente improdutiva (Cruz et al., 1995).

Muitas vezes o ataque da lagarta-rosca é confundido com o da lagarta-elasma (*Elasmopalpus lignosellus*), porém, pode ser facilmente distinguido, uma vez que, a lagarta-elasma faz orifícios e penetra no colmo, enquanto a lagarta-rosca alimenta-se externamente, sem penetrar na planta.

Atualmente, o controle de *A. ipsilon* é realizado de forma química, às vezes, utilizando-se produtos de alta toxicidade. O controle tem que ser curativo, dirigindo-se o jato de pulverização para a base da planta ou tratando-

se as sementes, mudas ou o sulco de plantio com piretróides ou produtos de ação sistêmica (Gallo et al., 2002).

2.3 *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith, 1\$797)

2.3.1 Importância e Biologia de *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) primeiramente descrita com o nome de *Phalaena frugiperda* foi reconhecida como a principal praga do milho nos Estados Unidos, no Brasil e em países como Venezuela, Peru, Chile, Colômbia, México e Guatemala (Romano, 2007). Esta lagarta possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas Américas e em algumas ilhas a oeste da Índia (Bertels, 1970; Pedigo, 1989; Cruz, 1995).

A lagarta do cartucho possui coloração variando de pardo-escuro até preta, apresentando três finas linhas longitudinais branca-amareladas na parte dorsal do corpo (Figura 3A). Podem migrar para plantas vizinhas à procura de folhas menos danificadas ou mais tenras. Devido, principalmente, ao canibalismo que se manifesta a partir do terceiro instar, fator pelo qual é raro encontrar mais de duas lagartas na mesma planta (Cruz, 1995).

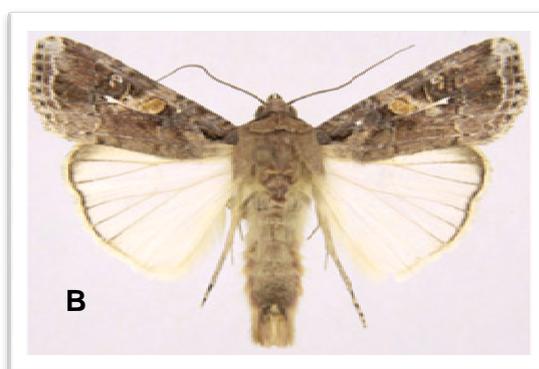


Figura 3 (A) Lagarta de quinto instar de *S. frugiperda* e **(B)** Mariposa de *S. frugiperda* (Visão Dorsal) **Fonte:** <http://www.insects.tamu.edu>. Acessado em: 23/05/2007

A presença de hábito canibal é um comportamento típico da espécie (Escalante, 1974; Raffa, 1987). Segundo Fernandes (2003) o canibalismo, geralmente possui base genética, contudo, em populações naturais, pode estar relacionado à alimentação, densidade populacional, disponibilidade de indivíduos vulneráveis e estresse.

O ciclo de vida da lagarta *S. frugiperda* abrange quatro fases distintas: ovo, larva, pupa e adulto. Segundo Cruz (1995), as mariposas (Figura 3B) voam para longe da área de origem, antes de fazer a postura. Os ovos são colocados em massa nas folhas, geralmente em duas camadas e cobertos por uma camada fina e longa de escamas. O número de posturas colocadas por mariposa varia bastante, sendo que já foi observado um máximo de 13 posturas por fêmea com capacidade variando de 1000 a 2000 ovos (Romano, 2007; Valicente & Cruz, 1991; Polanczyk, 2004; Ferraz, 1982).

Durante a fase larval o inseto pode apresentar de quatro a sete ínstar, variando conforme a fonte de alimento (artificial ou natural), temperatura, sexo e genética. A duração desta fase é de 12 a 30 dias, quando a lagarta atinge aproximadamente 5 cm de comprimento (Lordello et al., 1980; Lucchini, 1977; Nalim, 1991; Parra & Haddad, 1989).

Ao completar o desenvolvimento a lagarta penetra no solo, onde se transforma em pupa. Em campo, a fase de crisálida dura em média 11 dias (Valicente & Cruz, 1991). Em laboratório a duração desta fase varia entre 8 e 11 dias (Leiderman & Sauer, 1953; Melo & Silva, 1987).

Os adultos emergem à noite, medindo cerca de 3,5 cm de envergadura, com as asas anteriores pardo escuras e as posteriores branco-acinzentadas (Cruz, 1995; Ferraz, 1982).

As mariposas durante o dia podem ser encontradas escondidas sob a folhagem, próximas ao solo ou entre as folhas do cartucho. A atividade diária das mariposas começa ao pôr-do-sol e atinge o pico entre duas e quatro horas mais tarde (Romano, 2007).

2.3.2 Danos causados por *Spodoptera frugiperda*

No Brasil, tem-se observado ataque de *S. frugiperda* no cartucho, na base da planta e na espiga (Figuras 4 A e B). As lagartas recém-eclodidas raspam o limbo foliar das folhas mais novas e em ínstares mais adiantados, os insetos passam a perfurá-las. Quando o ataque ocorre nos estágios iniciais da cultura, pode causar a morte de plantas, reduzindo o “stand”. Pode também se dirigir para a região da espiga, atacando o pedúnculo e impedindo a formação de grãos. Pode ainda penetrar nas espigas na sua porção basal e danificar diretamente os grãos ou alimentar-se da ponta da espiga. O dano mais severo é causado por lagartas de quinto e sexto ínstares (Bianco, 1991; Carvalho, 1982; Cruz, 1980; Cruz & Turpin, 1982; Valicente & Cruz, 1991; Waquil et al., 1982; Parra et al., 1995; Gassen, 1996).

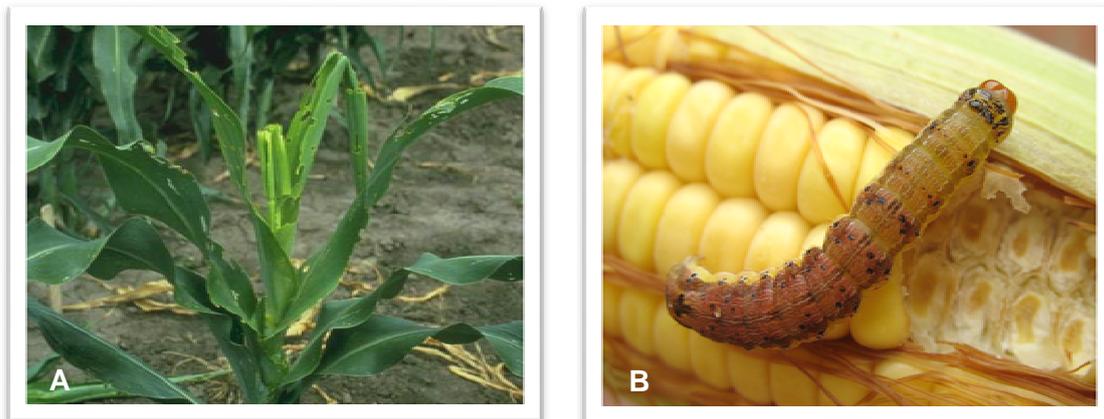


Figura 4 – Danos causados por *Spodoptera frugiperda* em milho. A) folhas raspadas e cortadas; e (B) espiga danificada. **Fonte:** <http://www.agricomseeds.net> e <http://www.agromil.com.br>

Ao longo do desenvolvimento e maturação das plantas, há variações morfológicas e fisiológicas, às quais podem determinar maior atratividade dos adultos ou serem mais adequadas ao estabelecimento e desenvolvimento larval do inseto. Independente do nível de ataque, a produtividade do milho é afetada, pois, a lagarta pode impedir o desenvolvimento da planta com conseqüente má formação de espigas e também pode haver redução do peso das espigas produzidas. Carvalho (1970) e Cruz (1995) indicam que essa praga pode reduzir a produção de milho em até 35,45%. Segundo Cruz et al. (1999), as perdas causadas pela lagarta-do-cartucho no Brasil atingem cerca de U\$ 40 milhões por ano. Waquil & Vilella (2003) afirmam que as perdas pelo ataque de *S. frugiperda* situa-se em 25% do total dos prejuízos causados por pragas ao milho e pela maior parte dos 38,3 milhões de dólares gastos com pulverizações de inseticidas.

É importante comentar que as perdas podem variar em função da fase de desenvolvimento da planta atacada, da cultivar utilizada, do local de plantio e segundo as práticas agrônômicas adotadas (Cruz, 1995).

Nesse sentido, Gassen (1994), Cruz (1995) e Turpin (1982) enfatizam que os maiores danos ocorrem na fase em que a planta apresenta de oito a 10 folhas, podendo ocorrer uma redução de aproximadamente 19% no rendimento de grãos. Na fase de até seis e a partir de 12 folhas, os danos são inferiores a 9% na produção de grãos. Hruska e Gladstone (1988) relataram que infestações de *S. frugiperda* em milho irrigado causaram redução de 45% no rendimento da cultura. Silva (1995) constatou que as lagartas reduzem maior área foliar nas infestações nos estágios de 4 a 8 folhas.

O controle da lagarta-do-cartucho tem sido realizado, basicamente, pela aplicação de inseticidas e pela utilização de cultivares resistentes (Gassen, 1996; Grutzmacher et al., 2000; Gallo et al., 2002). Por causa do alto custo dos inseticidas e da dificuldade na obtenção de plantas resistentes e produtivas, há a necessidade de encontrar alternativas de controle eficientes, economicamente viáveis e ecologicamente corretas, como o já mencionado uso do controle biológico como os bioinseticidas produzidos à base de *Bt*.

2.4 *Bacillus thuringiensis* (Bt)

B. thuringiensis (*Bt*) é uma bactéria aeróbia, Gram positiva, da família *Bacillaceae*, caracterizada por produzir inclusões protéicas cristalinas, com atividade entomopatogênica, no momento de sua esporulação durante a fase estacionária de seu ciclo de crescimento (Bravo et al., 1998; Monnerat e Bravo, 2000). Esses cristais são compostos por proteínas denominadas δ -endotoxinas ou proteínas Cry (Monnerat e Bravo, 2000). Tais proteínas são altamente tóxicas e específicas, tornando-as inócuas para uma série de organismos, incluindo o homem e insetos benéficos (Herrero et al., 2001, Siegel, 2001).

Essa bactéria pode ser isolada de amostras de solo, água, superfície de plantas, de insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Bravo et al., 1998). À semelhança de outras bactérias, esta espécie pode manter-se em latência na forma de endósporos, sob condições adversas. Estima-se que existam mais de 50.000 estirpes de *Bacillus* spp. em coleções espalhadas pelo mundo (Monnerat et al., 2001).

Embora geralmente o termo *Bacillus thuringiensis* seja empregado para uma única espécie, na verdade ele pertence a um complexo de várias espécies (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycooides*, e *B. weihenstephanensis*) denominado *B. cereus*. *Bt* e *B. cereus*, por exemplo, mostram características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição, *Bt* pode ser diferenciado pela presença dos cristais (Luthy & Wolfersberger, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase (Figuras 5 A e B), embora este seja um critério com pouco valor taxonômico (Lysenko, 1983). A distinção entre estas espécies não é clara e continua sendo assunto de interesse de muitos taxonomistas (Glare & O'Callaghan, 2000; Hansen & Salamitou, 2000; Schnepf et al., 1998).

As proteínas Cry apresentam um espectro de ação normalmente restrito a uma ordem de insetos em particular. Mais de 300 genes *cry*, que codificam as proteínas Cry, já foram seqüenciados e as proteínas Cry estão classificadas em 46 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de dois grupos de toxinas Cyt, em função do grau de similaridade e identidade de seus aminoácidos. A atualização constante desses dados pode ser visualizada via Internet no endereço: http://www.epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.

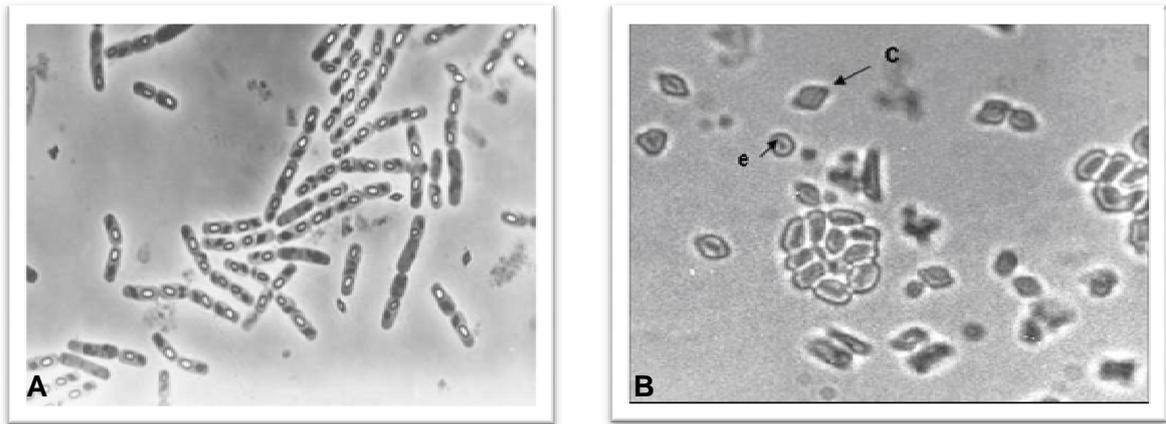


Figura 5 - (A) Microscopia de contraste de fase de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporos (2.000x); e (B) - Colônia de *Bacillus thuringiensis*. Fotos: J. Niore/INRA.

2.4.1 Histórico

O primeiro isolamento de *B. thuringiensis* foi realizado a partir de larvas mortas de bicho da seda (*Bombyx mori*) e descrita em 1901 pelo biólogo japonês Shigetane Ishiwata.

Sua nomenclatura atual data de 1911 quando Emrst Berliner isolou um bacilo a partir de larvas mortas da traça da farinha (*Anagasta kuehniella*) e o nomeou de *Bacillus thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado. A bactéria *B. thuringiensis* pode ser sistematicamente classificada como: Classe: Firmibacteria; Ordem: Eubacteriales; Família: Bacillaceae; Gênero: Bacillus; Espécie: *B. thuringiensis*.

Em 1920, o *B. thuringiensis* (*Bt*) despontou como uma alternativa viável para o controle de insetos na agricultura. Contudo, somente 18 anos depois, na França, registra-se o aparecimento da primeira formulação à base dessa bactéria, a Sporeína (Weiser, 1986). Sua utilização expandiu-se para vários

países da Europa e EUA com o aparecimento de vários inseticidas biológicos à base de *Bt*.

Até a década de 60 sua utilização era voltada para o controle de Lepidopteros. Somente a partir dos anos 70, estudos comprovaram a eficiência do *Bt* contra insetos da ordem Diptera, Coleoptera, Homoptera, Ortoptera. Feilteison (1994) identificou em seus estudos a toxicidade do *Bt* também para algumas espécies de nematóides, protozoários e ácaros.

Recentemente, novas tecnologias aplicadas à transformação genética de plantas passaram a usar genes, que codificam as proteínas entomopatogênicas de *Bt* para conferir resistência a pragas. Os primeiros registros de plantas transgênicas, que expressavam toxinas de *Bt*, foram as plantas de tabaco e tomate e a primeira plantação de milho geneticamente modificado foi realizada nos Estados Unidos em 1995 (USEPA, 1999). A Pesquisa e Inovação aplicadas em novas tecnologias são o foco de diversas instituições de pesquisas em todo o mundo e demonstra a importância dessa bactéria no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de saúde pública.

2.4.2 Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

Sugundo Hansen & Salamiou (2000) o *Bt* pode produzir, além das proteínas Cry, várias outras proteínas com atividade inseticida tais como: α -exotoxina; β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases. É importante comentar que a ação sinérgica dos esporos produzidos pelas proteínas também pode contribuir para a patogenicidade apresentada pelos cristais (Johnson e McGaughey, 1996).

2.4.2.1 α -exotoxina

A α -exotoxina, também conhecida como fosfolipase C, lecitinase ou fosfatidilcolina fosfohidrolase, é uma enzima que possui atividade citolítica ao atuar sobre os fosfolípidios que formam as membranas celulares de diversos tipos celulares (Faust e Bulla Jr., 1982). Esta toxina é termolábil, solúvel em água e altamente tóxica a alguns insetos quando administrada via oral ou intrahemocélica. A toxina, também, pode apresentar toxicidade a ratos e outros vertebrados, causando degeneração e lise de hemácias (Krieg, 1971; Hansen e Salamitou, 2000). O gene correspondente a essa exotoxina já foi clonado e seqüenciado (Monnerat & Praça, 2006; Lechner et al., 1989).

2.4.2.2 - β -exotoxina

As β -exotoxinas ou Thuringiensinas, são toxinas termoestáveis, produzidas durante a fase vegetativa do *Bt*. Existem dois tipos de β -exotoxinas existentes e sua diferença de classificação em Tipo I e Tipo II é devido a diferenças de especificidade e toxicidade. A toxina tipo I é um análogo do ATP, sendo composta de adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico, apresentando massa molecular de 701 Daltons (Farkas et al., 1969). Esta toxina atua inibindo a ação da RNA polimerase, através da competição pelo ATP, sendo altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen & Salamitou, 2000). A β -exotoxina do tipo II é um análogo do UTP e apresenta toxicidade superior à do tipo I, principalmente para coleópteros (Levinson et al., 1990). Os genes responsáveis pela síntese de β -exotoxinas estão localizados em plasmídeos extracromossomais (Levinson et al., 1990).

2.4.2.3 - Vip3A

As protoxinas “Vip” (*vegetative insecticidal proteins*) são proteínas produzidas e secretadas por algumas estirpes de *Bt* durante sua fase vegetativa e de esporulação. Essas proteínas são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Monnerat e Bravo, 2000).

As protoxinas Vips são proteínas produzidas e secretadas durante a fase vegetativa e de esporulação do *Bt*. As Vips foram excluídas da nomenclatura Cry por não formarem cristais protéicos. As Vips são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, antecipando assim, sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois, atualmente, não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (Monnerat e Bravo, 2000).

O gene *vip3A* codifica uma proteína de aproximadamente 88 kDa, que tem apresentado atividade contra diversos insetos da ordem Lepidoptera, tais como, *Agrotis ipsilon*, *S. frugiperda*, *S. exigua* e *Helicoverpa zea* (Yu et al., 1997). Além disso, essas proteínas demonstram ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga quando comparadas a muitas proteínas Cry, mas principalmente contra larvas de lepidópteros (Loguercio et al., 2002).

2.4.2.4 - δ -endotoxinas

As δ -endotoxinas são também denominadas como proteínas Cry e Cyt. Essas proteínas apresentam individualmente um espectro de ação, normalmente, restrito a uma ordem de insetos em particular (De Maagd et al., 2001).

As proteínas Cry são inclusões paraesporais de *Bt* que exibem efeito tóxico a um organismo alvo ou possuem uma seqüência bastante similar de uma proteína Cry conhecida, mas sem efeito tóxico conhecido. Por outro lado, as proteínas Cyt são inclusões protéicas paraesporais de *Bt* que exibem atividade citolítica ou possui uma seqüência similar a uma proteína Cyt conhecida. O processo de formação do cristal está ligado à esporulação, em que essa estrutura é formada a partir do segundo estágio de esporulação e é liberado no momento em que as células são lisadas (Monnerat e Bravo, 2000).

A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* pode sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas. A massa molecular dessas toxinas pode variar entre 14 e 142 kDa. Dependendo da composição da protoxina, o cristal pode ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou, ainda, sem forma definida (Schnepf et al., 1998). Essa habilidade de cristalização das protoxinas pode diminuir sua suscetibilidade à degradação por proteases do hospedeiro.

2.4.3 Modo de Ação das Proteínas Cry

A partir do momento em que o inseto ingere o alimento infestado de cristais e esporos de *B. thuringiensis* vários sintomas são característicos, tais como: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e morte (Aronson et al., 1986). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib & Andrade, 1998; Soberón & Bravo, 2002).

Esse mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em 4 etapas a saber: Fase I (Solubilização e processamento das toxinas); Fase II (União ao receptor); Fase III (Inserção na membrana, agregação e formação do poro); e Fase IV (Citólise). A figura 6 representa graficamente o modo de ação do *Bt*.

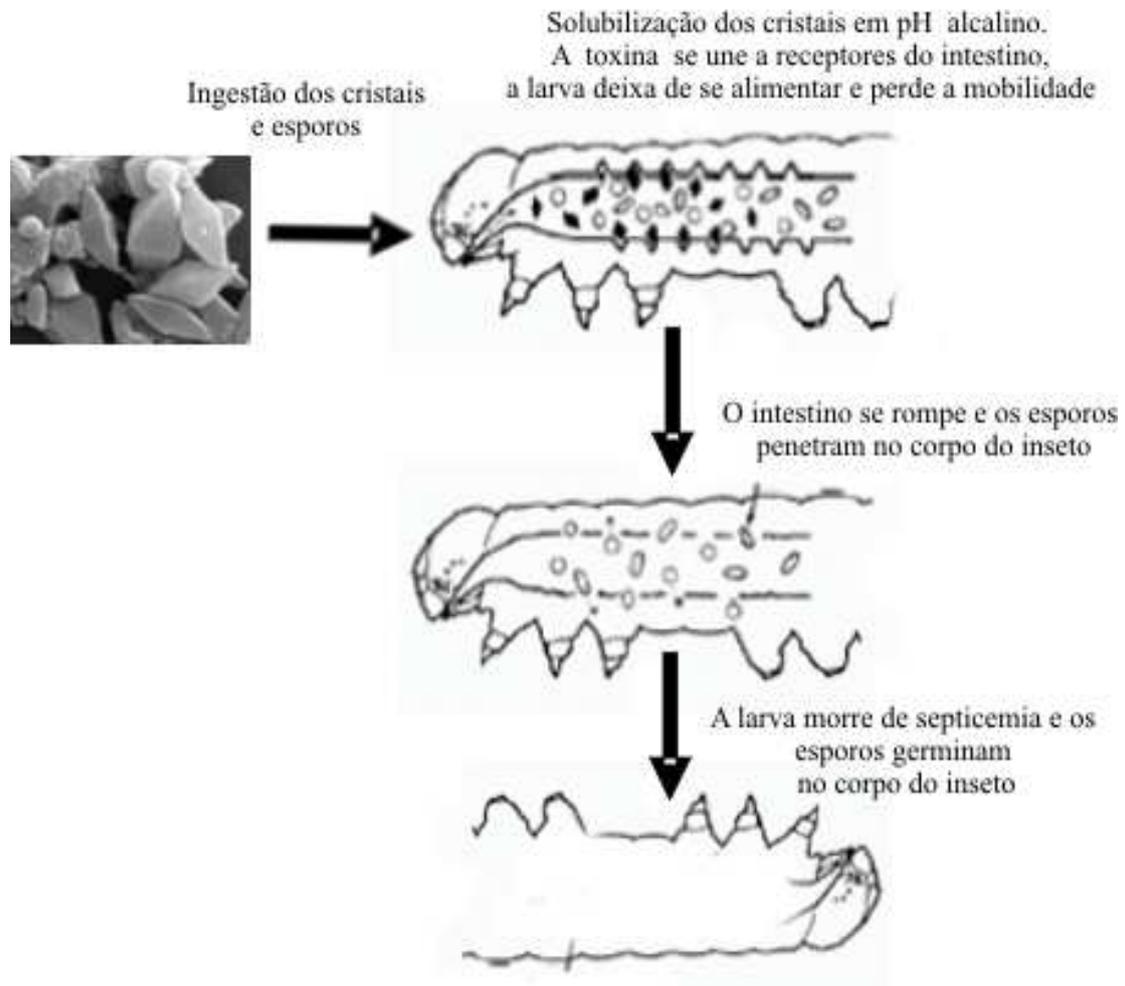


Figura 6 - Representação esquemática do modo de ação da bactéria *B. thuringiensis*.

Na Fase I os cristais produzidos por *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos por larvas de insetos suscetíveis, são solubilizados em pH alcalino do intestino médio das lagartas (Knowles, 1994). Ao serem ativadas por proteases intestinais, as protoxinas perdem a extremidade C-terminal, restando-lhes a porção N-terminal como parte ativa tóxica (Monnerat e Bravo, 2000; Rabinovitch et al., 2000).

Na Fase II, as protoxinas ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino dos insetos (Hoffmann et al., 1988; Bravo et al., 1992; Höfte & Whiteley, 1989;

Ravoahangimalala et al., 1993). Segundo Monnerat & Bravo (2000) esta fase incentivou a pesquisa ao entendimento desse processo pois é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry.

Após ligação a receptores específicos, inicia-se a fase III que se caracteriza quando a toxina Cry se une à membrana plasmática das células epiteliais, com subsequente abertura ou formação de poros ocorrendo, assim, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino das larvas de insetos suscetíveis (Van Rie et al., 1989; Ihara et al., 1993; Liang et al., 1995; Rabinovitch et al., 2000).

A última fase (IV) é caracterizada pela morte de células epiteliais por inativação do sistema que mantém o gradiente de pH e por citólise osmótica (Charles & De Barjac, 1983; Knowles & Ellar, 1987). Uma vez que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso a hemolinfa (Du & Nickerson, 1996), meio no qual germinam. Tais eventos conduzem à lise das células epiteliais do intestino dos insetos e, finalmente, à morte dos insetos por inanição e septicemia (Dai & Gill, 1993; Monnerat & Bravo, 2000).

2.5 A utilização de *Bt* na Agricultura

2.5. 1 Uso de bioinseticidas a base de *Bt*

Desde o primeiro produto lançado na França em 1938, mais de 100 produtos foram lançados no mercado e atualmente constituem cerca de 90% do faturamento com bioinseticidas no mundo (Glare & O'callaghan, 2000). O continente americano é responsável por 50% do mercado de bioinseticidas que segundo Nester et al. (2002) representa 100 milhões de dólares em vendas anuais. Hansen & Salamiou (2000) estimaram que a aplicação mundial anual de bioinseticidas a base de *Bt* é de aproximadamente 13.000 toneladas.

Segundo Céron (2004) atualmente existem mais de 60 formulações comerciais de bioinseticidas de *Bt* no mercado mundial. A tabela completa publicada pelo autor encontra-se no anexo B, inclusive, com a identificação da composição das proteínas Cry de cada formulação comercial.

O produto comercial com maior utilização no mercado é o Dipel (*Bt kurstaki* HD-1). Este produto é inócuo para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros e possui atividade tóxica diferenciada para 170 lepidópteros-praga (Beegle & Yamamoto, 1992; Glare & O'Callaghan, 2000; Polanczyk, 2004)

Na América do Norte, produtos à base de *Bt* são muito utilizados para o controle de pragas florestais, destacando-se a *Lymantria dispar*. O sucesso da aplicação de *kurstaki* para o controle de *L. dispar* culminou com a erradicação da praga na área aplicada. Na Austrália produtos formulados com *Bt* são utilizados para controle de pragas em diversas culturas, com destaque para o algodão, fumo e algumas espécies de plantas frutíferas (Glare & O'Callaghan, 2000; van Frankenhuyzen, 2000).

Na China e no Egito produtos à base de *Bt* são usados em grandes áreas no controle de pragas de grandes culturas. Em vários países do Oriente Médio e da África Ocidental, a utilização destas formulações no controle de pragas está em fase inicial de utilização (Salama & Morris, 1993; Polanczyk, 2004).

No Brasil utilizam-se produtos à base de *Bt* para o controle de cerca de 30 pragas de importância agrícola, porém a área total em que esses produtos são aplicados é de aproximadamente 150.000 hectares, pouca quando comparada a do México, por exemplo, que é três vezes maior (Polanczyk, 2004). No País, existem apenas nove formulações comerciais a base de *Bt* (Tabela 3) que possuem registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Tabela 3 – Produtos formulados à base de *B. thuringiensis* com registro de utilização no MAPA. Fonte: Agrofit (2008).

Marca Comercial	Titular de Registro	Nr. Registro
Agree	MITSUI BRASILEIRA IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO S.A.	6095
Bac-Control WP	VECTORCONTROL IN. E COM. DE PROD. AGR. LTDA.	458791
Bactur WP	MILENIA AGROCIÊNCIAS S.A. - Londrina	1196
Dipel	SUMITOMO CHEMICAL DO BRASIL REPRES. LTDA.	291
Dipel WG	SUMITOMO CHEMICAL DO BRASIL REPRES. LTDA.	4707
Dipel WP	SUMITOMO CHEMICAL DO BRASIL REPRES. LTDA.	858901
Ecotech Pro	BAYER S.A. São Paulo/ SP	2798
Thuricide	IHARABRAS S.A. INDÚSTRIA QUÍMICAS	1608491
Xentari	SUMITOMO CHEMICAL DO BRASIL REPRES. LTDA.	599

Trabalhos voltados para a identificação de novos genes *cry*, o desenvolvimento de novas formulações e a ampliação dos conhecimentos das interações com outros entomopatógenos, predadores, parasitóides e mesmo inseticidas químicos são estratégias que podem contribuir para o aumento do uso de *Bt* no controle de pragas. O uso de genes *cry* também representa um avanço no melhoramento genético de plantas.

2.5. 2 Milho geneticamente modificado (*Milho Bt*)

O desenvolvimento da engenharia genética possibilitou o melhoramento de diversas culturas domesticadas. Assim, por meio da transferência de genes de uma espécie para outra, uma planta pode ter a qualidade nutritiva aprimorada, adquirir resistência a uma praga, tolerância a um herbicida ou até mesmo maior tolerância à seca ou ao frio (Cib, 2008). Estas são as chamadas variedades transgênicas ou geneticamente modificadas (GM). As plantas GM representam uma nova alternativa para o controle de insetos e devem ser utilizadas como componentes estratégicos no âmbito do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

As primeiras plantas transgênicas a expressar toxinas *Bt* foram o fumo e o tomate. A primeira cultura *Bt* registrada na *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) foi o milho, em 1995 (James, 2002). Segundo James (2006) a área total no mundo com plantas GM é de 102 milhões de hectares. Os quatro principais países em termos de área cultivada são EUA (54%), Argentina (18%), Brasil (11%) e Canadá (6%), sendo a soja e o milho as principais culturas cultivadas.

O milho GM passou a ser foco de pesquisa de várias instituições científicas e tecnológicas de vários países. Atualmente, a maior parte dos trabalhos realizados com milho envolve o controle de insetos e a tolerância a herbicidas. Identificam-se no mercado mundial várias cultivares de milho transgênico com tolerância ao herbicida glufosinato de amônio e ao glifosato, além da resistência a vários coleópteros e lepidópteros considerados pragas.

As plantas de milho transgênicas existentes possuem genes que codificam proteínas com propriedades inseticidas e proporcionam resistência a alguns insetos pragas. Entre essas proteínas de *Bt*, destacam-se as Cry1Ab, Cry1F e Cry1Ac, que produzem proteínas capazes de controlar a população de várias lagartas, a exemplo da *S. frugiperda* (Cib, 2008; Fernandes, 2003).

No Brasil, a autorização para pesquisa e comercialização de plantas transgênicas é facultada ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) através da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Esta comissão composta de vários especialistas é responsável pela análise e a aprovação de experimentos com plantas transgênicas.

Várias solicitações de pareceres técnicos estão aguardando a análise da CNTBio. O mais recente pedido deferido pela comissão possui como requerente a Syngenta Seeds Ltda. A CTNBio no parecer técnico Nº 1255/2008 que libera a comercialização de milho geneticamente modificado resistente a insetos da ordem Lepidoptera (Milho Bt11, Evento Bt11), bem como todas as progênies provenientes do evento de transformação Bt11 e suas derivadas de cruzamento de linhagens e populações não transgênicas de milho com linhagens portadoras do evento Bt11 (CNTBio, 2008).

O milho GM Bt11 apresenta resistência específica a lagartas do cartucho (*S. frugiperda*) e da espiga (*H. zea*) além de tolerância ao herbicida glufosinato de amônio. Vários estudos comprovaram a efetividade de expressão do gene e da atividade da proteína Cry1Ab em milho Bt11, entre eles, destacam-se os estudos realizados por Martinelli (2001), Koziel et al. (1993), Williams et al. (1997), Burkness et al., (2001); e Burkness et al., (2002).

Martinelli (2001) ao avaliar o padrão de resistência dos milhos geneticamente modificados BT11 e ICP4 em condições de campo concluiu que ambos os milhos BT11 e ICP4 foram eficientes na proteção da planta em relação ao dano de *S. frugiperda* e de *H. zea*.

Koziel et al. (1993) obtiveram sucesso na inserção do gene *cry1Ab* em milho, sendo a proteína Cry1Ab expressa em altas concentrações nos tecidos que também observaram eficiência no controle de *O. nubilalis*, tanto em relação ao consumo de folhas, quanto à perfuração do colmo da planta.

A resistência de diversos híbridos de milho modificado, contendo a proteína Cry1Ab, às lagartas de *S. frugiperda* e *Diatraea grandiosella* foi avaliada em bioensaios de laboratório e testes de campo por Williams et al. (1997). Os estudos demonstraram a ação tóxica da proteína Cry1Ab para *S. frugiperda* e *D. grandiosella*.

Híbridos de milho doce GM como o milho BT11, foram testados, em campo, para a avaliação da eficiência no controle de *O. nubilalis*, *H. zea* e *S. frugiperda*. Os dados obtidos indicaram que o milho BT11 proporcionou consistente padrão de resistência, independente do complexo de pragas, densidade da praga e localização geográfica (Burkness et al., 2001; Burkness et al., 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

O presente trabalho teve como objetivos selecionar e caracterizar por meio de métodos bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a larvas de *Agrotis ipsilon* (lagarta rosca) e determinar da atividade inseticida de proteínas Cry tóxicas a larvas de *S. frugiperda* (lagarta do cartucho) e sua interação com receptores de membrana no referido inseto.

3.2 Específicos

3.2.1. Capítulo 1

Selecionar e caracterizar por meio de métodos bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas contra *Agrotis ipsilon* (Hufnagel,1766) (Lepidoptera: Noctuidae).

3.2.2. Capítulo 2

Determinar a atividade inseticida de proteínas Cry tóxicas contra *S. frugiperda* e estudo da interação das proteínas com receptores de membrana no referido inseto.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Consulta de Produtos Formulados. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em: 21/05/2008.

ARONSON, A. I., BECKMAN, W., DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.** 50, 1-24, 1986.

ÁVILA, C.J.; DEGRANDE, P.E.; GOMEZ, S. A. Insetos-pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: **Milho: informações técnicas**. Dourados, EMBRAPA, 1997. p.168-180. (Embrapa, circular técnica 5).

YAMAMOTO, T., MCLAUGHLIN, R.E. Isolamento de cristais de proteínas de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* tóxicas contra larvas do mosquito, *Aedes taeniorhynchus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.103, p.414-421, 1981.

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Innovation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, v. 124, n.3, p. 587-616, 1992.

BERTELS, A. Estudos da influência da umidade sobre a dinâmica de flutuação de lepidópteros, pragas do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, n.1, p.67-79, 1970.

BIANCO, R. Pragas do milho e seu controle. In: IAPAR. *A cultura do milho no Paraná*. Londrina: **Circular Técnica nº 68 IAPAR**, 1991. p.187-221..

BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F., GONI, I. Effects of dietary fibre and tannins from apple pulp on the composition of faeces in rats. **British Journal of Nutrition**, London, v.67, n.3, p.463-473, 1992.

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

Eric C. Burkness, W. D. Hutchison, R. A. Weinzierl, J. L. Wedberg, S. J. Wold and J. T. Shaw. Eficácia de híbridos de milho expressando toxinas de *Bacillus thuringiensis* contra lepidópteros pragas em Midwestern US. **Crop Protection** - Volume 21, Issue 2, Pages 157-169, 2002.

BURKNESS, E.C.; HUTCHISON, W.D.; BOLIN, P.C. et al. Field efficacy of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for management of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.94, n.1, p.197-203, 2001.

CAPEL, P. D. Organic chemical concepts. In: ALLEY, W. M. (Ed.) **Regional ground-water quality**. New York: Nostrand Reinhold, 1993. p. 155-180.

CARVALHO, R.P.L Danos, flutuação populacional, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho em condições de campo. **Tese de doutorado da ESALq**. 170p. Piracicaba, 1970.

CARVALHO, A.O.R. Pragas e seu controle. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná – **circular técnica IAPAR nº68** pag. 141-148. Londrina, 1982.

CERÓN, J. Productos comerciales: nativos y recombinantes. En *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Bravo, A. y Cerón, J. eds. **Universidad Nacional de Colombia. Bogotá**, Colombia. pp. 123-147. 2004.

CHARLES, J. F., DE BARJAC, H. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. **An. Microbiol.** (Inst. Pasteur). 134A: 197-218, 1983.

CHARLES, J. F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application, 181-197. 2000. **Kluwer Academic Publishers**. Printed in the Netherlands.

CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. and Molec. Biol. Rev.** 62:807-813, 1998.

CIB - Conselho de Informações sobre Biotecnologia, A Aplicação da Biotecnologia na cultura. **Boletim Informativo Cib**, 6 páginas – Janeiro de 2008.

CNPMS – Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - Embrapa Milho e Sorgo. A cultura do milho. **Sistemas de Produção, 2, ISSN 1679-012X Versão Eletrônica** - 3ª edição Set./2008.

CTNBIO - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – Ministério da Ciência e Tecnologia. Liberação comercial do milho geneticamente modificado; **Parecer Técnico CTNBio/MCT nº 1255/2008**. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/ctnbio>. Acessado em: 12/04/08.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Sistema de informações de safras agrícolas: histórico da produção de milho. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php>. Acessado em: 15/01/08.

CRUZ, I., Turpin F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 17: 355 – 359, 1982.

CRUZ, I. A lagarata do cartucho na cultura do milho. **Publicação da Embrapa**. Sete Lagoas: 1995 - 45 páginas.

CRUZ, I., D.A.N. de Lima, M.L.C. Figueiredo & F.H. Valicente. Aspectos biológicos do parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) criados em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith). **An. Soc. Entomol. Brasil**. 24: 201-208. 1995.

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. L. C.; MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. (**Embrapa-CNPMS Circular Técnica, 30**) Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1999. 40 p.

CRUZ, I. Impacto f fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith and Abbot, 1797), on grain yield in Field corn. **Dissertation (M.S.) – Purdue University**. Lafayette, 1980

DAI, S. M. & GILL, S. S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CRYIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Bioch. and Molec. Biol** .23: 273-283, 1993.

DE MAAGD R.A, BRAVO A, CRICKMORE N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet**. 17:193–99.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. (1964) Butterflies and Plants: A study in Coevolution. Evolution 18, in J. B. HARBONE, Introduction to Ecological Biochemistry, 3rd ed. **Academis Press**, London 1988, pp. 586-608.

ESCALANTE G., J. A. 1974. Contribución al conocimiento de la biología de *Heliothis zea* y *Spodoptera frugiperda*, en el Cusco. **Rev. Peruana Entomol**. 17: 121-122.

FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Boletim Informativo nº 946**, semana 19 a 25 de fevereiro de 2007.

FARKAS, J., SEBESTA, K., HORSKA, K., SAMEK, Z., DOLIJS, J. AND SORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, 34:1118-1120, 1969.

FEDERICI, B. A.; LUTHY, P.; IBARRA, J. A. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: structure, protein composition, and toxicity. p. 16-44. In **Bacterial control of mosquitoes and blackflies**. 1990. Rutgers University Press, New Brunswick.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: Proceedings of XXVII Annual Meeting of the **Society For Invertebrate Pathology**, p.184. Montpellier, France, 1994.

FERNANDES, O. D. Efeito do milho geneticamente modificado (MON810) em *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) e no parasitóide de ovos *Trichogramma* spp. **Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz** - 164 p., 2003.

FERRAZ, M.C.V.D. Determinação das exigências térmicas de *Spodoptera frugiperda* em cultura de milho. Piracicaba, 1982. 81 p. **Dissertação de Mestrado da Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo**.

FNP CONSULTORIA & COMERCIO. AGRIANUAL 2006 - **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: 506p, Outubro, 2005.

FREITAS, F. O. Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho - *Zea mays mays* e feijão - *Phaseolus vulgaris*. **Tese de Doutorado. University Of Manchester Institute Of Science And Technology, UMIST, Inglaterra**. Ano de Obtenção: 2001.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BATISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIN, J. D. **Manual de entomologia agrícola**. 2 ed. São Paulo: Ceres, 486p, 1988.

GALLO, D.; HAKANO, S.; SILVEIRA NETO, R. P. L.; CARVALHO, G. C.; DE BAPTISTA, E.; BERTI FILHO, J. R. P.; PARRA, R. A.; ZUCCHI, S. B.; ALVES, J. D.; VENDRAMIM, L. C.; MARCHINI, J.R.S.; LOPES, C. OMOTO. **Entomologia Econômica**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GASSEM, D. **Pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 92 páginas, 1994

GASSEN, D.N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo : Aldeia Norte, 1996. 134p

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

GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S.; CUNHA, U.S. da. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT,

J.M.B. **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p.87-102.

HABIB, M. E. M., ANDRADE, C. F. S. **Bactérias entomopatogênicas**. In: Controle microbiano de insetos. Ed. Alves, S.B., FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

HANSEN, B. M., SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application (Charles, J. *et alli*, eds), pp. 41-64, **Kluwer Academic Publishers**, 2000

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Diferentes mecanismos de resistência a toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n.3, p.1085-1089, 2001.

HOFFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H., HÖFTE, J., VAN RIE, J., JANSSENS, H., VAN RIE, J., MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:7844-7848, 1988.

HOFTE, H., WHITELEY, H. R. **Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis***. Microbiol. Rev., 53 (2): 242-255, 1989.

IHARA, H., KURODA, E., WADANO, A., HIMENO, M. **Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori***. *Biocience, Biotechnology and Biochemistry*, 57:200-204, 1993.

JAMES, C. **Global review of commercialized transgenic crops**: ISAAA (Briefs, 36: Preview). Ithaca: ISAAA, 2006. 20p.

JOHNSON, D.E., McGAUGHEY, W.H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores do toxicity of purified Cry proteins towards indianmeal moth larvae. **Curr. Microbiol.**, 33:54-59, 1996.

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

KNOWLES, B.H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in insect Physiology.** 24:275-308. 1994.

Koziel, M. G., N. B. Carozzi, T. C. Currier, G. W. Warren & S. V. Evola. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: Past, present and future uses. *Biot. Gen. Engin. Rev.* 11: 171-228, 1993..

KRIEG, A. Is the potential pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **J. Invertebr. Pathol.** 18: 425-426, 1971.

LECHNER, M., KUPKE, T., STEFANOVIC, S., GÖTZ, F. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 621-626. 1989.

LEIDERMAN, L.M.; SAUER, H.F.G. A lagarta dos milharais. **O Biológico**, v.19, p.105-113, 1953;

LEVINSON, B.L.; KASYAN, K.K.J; CHIU,S.S; CURRIER,S.; GONZÁLEZ JR.J.M. Identification of b-exotoxin production, plasmids encoding b-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, 1990. p. 3172-3179.

LIANG, Y., PATEL, S. S., DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **J. Biol. Chem.** 270:24719-24724, 1995.

LINK, D.; PEDROLO, S.S. Aspectos biológicos de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) em Santa Maria - RS. **Revista de Ciências Rurais**, v.17, p.309-317, 1987

LOGUERCIO, L. L., CARNEIRO, P. N., CARNEIRO, A. A. MILHO Bt. Alternativa biotecnológica para controle biológico de insetos-praga. **Biotechn. Ciên. & Desen.** 24: 46-52, 2002.

LORDELLO, A.L.L.; LARA, F.M.; PARRA, J.R.P. Preferência para alimentação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em sorgo, em condições de laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.9, n.2, p.219-241, 1980.

LUCCHINI, F. Biologia de *Spodoptera frugiperda* (Smith & Abbot, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Níveis de prejuízos e avaliação toxicológica de inseticidas para o seu combate em milho. Curitiba, 1977. 114f. **Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná.**

LUTHY, P.; WOLFERSBERGER, M. G. 2000. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Florida Entomologist**, v.82, n.2, p. 254, 262.

Lysenko, O. 1983. *Bacillus thuringiensis*: evolution of taxonomic concept. **J. Invertebr. Pathol.** 42:295-298.

MARTINELLI, S. Efeito de híbridos de milho Bt expressando toxinas de *Bacillus* for the presence of Cry1Ab. **Molecular Ecology**, v.10, p.525-533, 2001.

MATOSSO, M. J., GARCIA, J. C., Duarte, J. O. ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE O MILHO E OS SISTEMA AGRO-INDUSTRIAIS DE SUÍNOS E AVES. **Anais do VII Simpósio Goiano de Avicultura e II Simpósio Goiano de Suinocultura – Avesui Centro-Oeste Seminários Técnicos Conjuntural – Suínos e Aves** 13, 14 e 15 de setembro de 2005 – Goiânia – GO

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agrofit on-line.** Disponível em: [:<http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acessado em: 17/10/07.

MELO, M.; SILVA, R.F.P. Influência de três cultivares de milho no desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Porto Alegre, v.16, n.1, p.37-49, 1987.

MONNERAT, R. G, BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, **Embrapa Meio Ambiente, Vol. 3**, p.163-200, 2000.

MONNERAT, R.G & PRAÇA, L.B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In: OLIVEIRA-FILHO, E.C. & MONNERAT, R.G. Fundamentos para a Regulação de Semioquímicos, Inimigos Naturais e Agentes Microbiológicos de Controle de Pragas. Planaltina-DF; **Embrapa Cerrados, 352 p.** 2006.

MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 5 p. (**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 10**), 2001.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. S.; Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 65 páginas.

SOTO, S.S.; Nakano, O. SCIENTIFIC NOTE: New record of Lepidoptera on corn crop in Brazil. **Neotrop. Entomol.** vol.32 no.2 Londrina Apr./June 2003

NALIM, D.M. Biologia, nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. 1991. 150p. **Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.**

NESTER, E., THOMASHOW, L.S., METZ, M., GORDON, M. **100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment**. 2002.. Disponível em: <http://www.asmus.org>, acesso em 12/07/2007

UN – Nations United; World Population Prospect: The 1998 Revision (New York: UN, 1998) and estimatives by the population reference bureau.

PARRA, R.P.P.; HADDAD, M.L. **Determinação do número de ínstaes de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1989, 49p.

PARRA, J.R.P., HADDAD, M.L.; SILVEIRA NETO, S. Tabela de vida de fertilidade de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville,1842) (Lepidoptera, Lyonetiidae) em três temperaturas. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v.39, n.1, p.125-129. 1995.

Pedigo, L.P. 1989. Entomology and pest management. New York, **Mcmillan Publishing Co.**, 646p.

PINAZZA, L. A. Cadeia produtiva do milho / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; 108 p. ; 17,5 x 24 cm – **(Série Agronegócios ; v. 1) – Brasília : IICA : MAPA/SPA, 2007.**

POLANCZYK, R. A.; SILVA, ROGÉRIO F. P.; FIUZA, LIDIA M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMIth) (Lepidoptera: Noctuide). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.10, n. 2, p. 209-214, abr-jun, 2004

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Revista Brasileira de Agrociência**. Vol. VII, Nº 2, Pag. 1-10. 2003.

QUINTELA, Eliane Dias. Manual de identificação dos insetos e invertebrados : pragas do feijoeiro / Eliane Dias Quintela. – Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 52 p. : il. – **(Documentos / Embrapa Arroz e Feijão)**.

RABINOVITCH, L.; SILVA, C. M. B.; ALVES, R. S. de A. Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S; Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, **Embrapa Meio Ambiente, Vol. 2**, p.17-90, 2000.

RAFFA, K.F. Effect of host plant on cannibalism rates by fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Environ. Entomol.** 16: 672-675, 1987.

RAVOAHANGIMALALA, O., CHARLES, J. F., SCHOELLER-RACCAUD, Y. J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in

midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **Res. Microbiol.** 44, 271-278, 1993.

ROMANO, F. C.; Comparação da ocorrência de insetos na cultura do feijoeiro cultivado nos sistemas orgânico e convencional. **Dissertação de Mestrado da UNESP**, Botucatu – SP, Agosto de 2003.

SALAMA, H. S.; MORRIS, O. N. 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in developing countries. **Chichester**: John Willey, cap. 11, p.237-253.

SANTOS, H.R.; NAKANO, O. Dados biológicos sobre a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera, Noctuidae). **Anais da Sociedade Brasileira Entomológica do Brasil**, v.11, p.33-48, 1982

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN REIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p. 775-806, 1998.

SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. Agrotóxicos & Ambiente. Brasília – DF: **Embrapa Informação Tecnológica**, 2004.

SILVA, P.H.S. da. Avaliação de danos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) no milho cultivado com dois níveis de fertilidade **Piracicaba: ESALQ**, 1995.. 84p.

SILVA, A.G.A., C.R. GONÇALVES, D.M. GALVÃO, A.J.L. GONÇALVES, J. GOMES, M.N. SILVA L. S. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil. Seus parasitos e predadores. Parte 2, Insetos, hospedeiros e inimigos naturais. Rio de Janeiro, **Ministério da Agricultura**, 622p, 1968..

SOBERÓN, M., BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* y sus toxinas insecticidas. Disponível em: <<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>>. Acesso em: 20 jul. 2002.

SOUZA, J. C.; Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Circular Técnica da Epamig** N.º: 141: Abril ANO: 2002.

SOUZA, J. C. Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Circular técnica da Epamig**, NN. 180 - Março - 2005

Cruz, I. & F. T. Turpin. 1982. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 17: 355 - 359.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY.. **R.E.D. Facts, *Bacillus thuringiensis***. EPA-738-F-98-001, March 1999. 6 p, 1999.

VALADARES-INGLIS, M.C.C.; SHILER, W.; SOUZA, M.T. de. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v.1, p.201-230.

VALICENTE, F. H., CRUZ, I. Controle biológico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com o baculovirus. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 23p. (**EMBRAPA/CNPMS. Circular Técnica, 15**), 1991.

VAN RIE, J., JANSSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D., VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**: 186, 239-247 - 1989.

van Frankenhuyzen, K. 2000. Application of *Bacillus thuringiensis* in Forestry. pp. 371-382 in: J.C. Charles, A. Delecluse and C. Nielsen LeRoux, eds. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Kluwer Publ.

VENDRAMIM, J.D.; FERRAZ, M.C.V.D.; PARRA, J.R.P. Biologia comparada de *Agrotis subterranea* (F) em meios natural e artificial. **O Solo**, v.74, p.76-80, 1982.

VIANA, P.A.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, L.J.; CORRÊA-FERREIRA. Manejo de pragas em agroecossistemas sob plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 208, p.63-72, jan./fev. 2001.

WAQUIL, J. M. ; VILELLA, F. M. F. . Gene bom. **Grandes Culturas Cultivar, Pelotas**, RS, v. V, p. 22 - 26, 01 abr. 2003.

WAQUIL, J.M. Manejo Fitossanitário e Ambiental: Milho transgênico *Bt* e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho. 2007. Artigo em Hipertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/manfito/index.htm>. Acesso em: 8/6/2008

WAQUIL, J.M. et al. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.163-166, 1982.

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

WILLIAMS, M.J., C.A. KELLY-BEGAZO, R.L. STANLEY, Jr., K.H. QUESENBERRY, and G.M. Prine. 1997. Establishment of rhizoma peanut: Interaction of cultivar, planting date, and location on emergence and rate of cover. **Agronomy Journal**. 89:981–987

YU, C-G., MULLINS, M. A., WARREN, G. W., KOZIEL, M. G., ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.63, p.532-536, 1997.

CAPÍTULO 1:

Seleção, caracterização bioquímica e molecular de estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas contra *A. ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae).

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar por meio de métodos bioquímicos e moleculares estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas contra *A. ipsilon*. Essas estirpes pertenciam ao banco de *B. thuringiensis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Lagartas de segundo ínstar de *A. ipsilon* foram adquiridas da Empresa BUG Agentes Biológicos sediada em Piracicaba-SP. Bioensaios seletivos foram realizados com 71 estirpes, selecionadas pela sua atividade contra insetos da ordem Lepidoptera. As estirpes que causaram mortalidade de 100% pertenciam aos sorotipos galleriae (S597), sotto (S615), aizawiai (S616), kurstaki (S1450) descritos na literatura como tóxicos a Lepidópteros. As estirpes denominadas S907 e S1168 também causaram 100% de mortalidade. As estirpes S906, S234 e S844 causaram percentual de mortalidade de 75%. Testes moleculares foram realizados com as estirpes S597, S615 e S844, às quais não haviam ainda sido caracterizadas, enquanto as demais já tinham sua caracterização bioquímica e molecular descritas. Os resultados dos testes moleculares obtidos com a estirpe S615 identificaram a presença dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2*. A estirpe S844 mostrou a presença dos genes *cry2* e *cry11*. Na estirpe S597 nenhum gene *cry* foi indentificado, de acordo com a metodologia empregada.

Palavras-chave: *Agrotis ipsilon*; lagarta rosca; *Bacillus thuringiensis*; proteínas Cry; controle biológico.

ABSTRACT

This work aimed to select and characterize through bioassays and biochemical and molecular methods, strains of *B. thuringiensis* which are toxic for *A. ipsilon*. These strains originated from a collection of *B. thuringiensis* in Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Larvae from second development stage of *A. ipsilon* were obtained from BUG Agentes Biológicos from Piracicaba, SP. Selective bioassays were carried out with 71 strains, selected according to toxic activity against Lepdopteran insects. Some *Bt* strains caused 100% mortality of *A. ipsilon* larvae. These strains belonged to serotypes galleriae (S597), sotto (S615), aizawiai (S616), kurstaki (S1450) described as toxic against Lepdopteran insects. The strains denominated S906, S234 and S844 caused 75% mortality of *A. ipsilon* larvae. Molecular analyse were carried out using the strains S597, S615 and S844, which have not been characterized, while all other strains have been characterized by biochemical and molecular methods. The results from molecular tests obtained with strain S615 identified the presence of genes Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2. The strain S844 showed the presence of genes Cry2 and Cry11. No cry gene was identified for the strain S597 using this method.

Keywords: *Agrotis ipsilon*; blackcutworm; *Bacillus thuringiensis*; cry proteins; biological control.

1. INTRODUÇÃO

Agrotis ipsilon (Hufnagel,1766), conhecida como lagarta rosca, é uma praga polífaga e cosmopolita, causadora de sérios danos em cultivos hortícolas e em sistemas de produção de grãos, tais como, milho, feijão, soja e algodão. Segundo Souza (2005), o dano causado pelo inseto é maior se houver população elevada de lagartas grandes, provenientes de plantas hospedeiras, na fase de germinação das plantas, situação mais provável de ocorrer em Sistemas de Plantio Direto (SPD).

Ainda de acordo com Souza (2005) as pragas de hábitos subterrâneos, como a *A. ipsilon*, são difíceis de controlar com inseticidas químicos e devido à escassez de informações sobre a biologia, o comportamento e as suas interações com o meio ambiente, estão sendo consideradas pragas-chaves no sistema de produção de grãos, principalmente em SPD.

Segundo Viana et al. (2001), no plantio direto, em que o solo é mantido sob cobertura permanente com diversas culturas em sucessão e sem revolvimento influencia o desenvolvimento de uma comunidade de insetos, onde as interações e relação de dependência entre espécies são mais complexas do que no manejo convencional do solo. No plantio em sistema convencional as operações de aração e gradagem quebram a estrutura do solo causando a exposição de ovos, larvas, ninfas, pupas e adultos de insetos à ação do sol e de seus predadores como pássaros, ocorrendo provavelmente sua morte.

Nessa condição, principalmente os insetos subterrâneos, como a lagarta rosca, constituem um grupo dinâmico e diversificado de espécies que se desenvolvem em grupos de pragas com ciclo biológico mais longo, cuja

bioecologia difere substancialmente do Sistema de Plantio Convencional (SPC). A maioria dos insetos subterrâneos considerados pragas é polífaga e utiliza, como hospedeiros, culturas como o milho, soja, trigo, arroz, feijão, usualmente componentes do SPD (Souza, 2002; Vianna, et al., 2001).

O controle da lagarta rosca geralmente é realizado a base de inseticidas químicos causando vários danos ao meio ambiente e ao próprio homem. A utilização do *B. thuringiensis* conforme comentado na revisão bibliográfica se torna uma alternativa viável, tanto na produção de bioinseticidas, ou como fonte de genes codificadores de proteínas Cry candidatas para futuras aplicações biotecnológicas. Maagd et al. (2003) lembram porém que as plantas transgênicas de milho que expressam proteínas de *Bt* são resistentes somente as pragas primárias da cultura presentes na Europa, não sendo eficaz contra *A. ipsilon*.

Com o objetivo de selecionar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas a lagarta rosca realizou-se bioensaios seletivos com diversas estirpes do Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As estirpes identificadas foram caracterizadas por meio de métodos bioquímicos e moleculares para identificação das proteínas Cry responsáveis pela atividade. A metodologia empregada e os resultados são apresentados nesse capítulo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção de estirpes de *Bt* e de lagartas *A. ipsilon*

Diferentes estirpes de *B. thuringiensis* pertencentes ao Banco de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram selecionadas para avaliação de efeito tóxico contra larvas de *A. ipsilon*. Estas estirpes foram isoladas de amostras de solo e água de várias regiões do Brasil, de acordo com a metodologia descrita no Protocolo da Organização Mundial da Saúde de 1987 (World Health Organization, 1987; Monnerat et al., 2001)

A atividade tóxica já comprovada para insetos da ordem Lepidoptera foi o fator principal para a seleção das 71 estirpes escolhidas para os ensaios. Essas estirpes foram isoladas a partir de amostras de solo e água (Monnerat et al., 2001).

As lagartas de *A. ipsilon* foram adquiridas comercialmente através da empresa BUG Agentes Biológicos, localizada em Piracicaba – São Paulo. Esta empresa é referência na venda de insetos para programas de controle biológico de pragas e, também, para a realização de pesquisas laboratoriais.

2.2 Caracterização Morfológica das estirpes de *Bt*

As estirpes foram crescidas em meio NYSM (Yousten, 1984), em incubador rotativo a 200 rpm, 28°C, durante 72h (até completa esporulação). Após o crescimento, as formas das células vegetativas, esporos e cristais dos bacilos foram visualizados em microscópio de contraste de fase (a fresco) com aumento de 1000 vezes para identificar a presença de esporos e cristais do *Bacillus*. Para preparar o material, depositou-se uma gota do material crescido

dissolvido em solução salina ou uma gota do isolado crescido em meio líquido em uma lâmina de vidro coberta por lamínula.

2.3 Avaliação de Patogenicidade de *Bt* contra *A. ipsilon*

Com objetivo de selecionar estirpes com atividade tóxica para a lagartarossa foram realizados bioensaios seletivos.

Primeiramente, foi preparada uma dieta específica para essas lagartas, a qual teve sua composição estabelecida pela empresa BUG. Os ingredientes foram utilizados seguindo a proporção descrita na Tabela 4. Em seguida, após homogeneização manual, a dieta foi colocada em autoclave por 20 min a 120 °C. Utilizando uma câmara de fluxo laminar, a dieta foi distribuída, ainda quente e líquida, em poços de placas de cultura de células de acrílico de aproximadamente 15 x 8 cm. Uma quantidade suficiente para preencher metade de cada poço foi utilizada. Em seguida, as placas foram colocadas sob luz ultra-violeta em câmara de fluxo laminar por 10 minutos para esterilização e solidificação da dieta. Na sequência, com auxílio de uma pipeta espalhou-se 35 µl das culturas de bacilos sob a dieta distribuída previamente em placas. Após aproximadamente 10 minutos os meios de cultura contendo *Bt* foram absorvidos pela dieta. Lagartas de segundo instar foram adicionadas às placas, sendo colocada uma lagarta para cada poço (Figura 7 B), já que as mesmas podem adotar comportamento canibal. Uma placa foi deixada como testemunha, ou seja, sem a bactéria, porém contendo dieta e lagartas. Imediatamente após colocar as lagartas as placas foram tampadas com tampas de acrílico e ligas elásticas (Figura 7 A). A incubação dos bioensaios foi realizada em sala destinada para esse fim, à temperatura ambiente e com iluminação constante. Para cada estirpe de *Bt* foram utilizados 12 poços da

placa (12 repetições). Como cada placa continha 24 poços, foram utilizados duas diferentes estirpes de *Bt* por placa.

Tabela 4 – Dieta de *A. ipsilon* utilizada nos bioensaios

Ingredientes	Quantidade
Feijão	75g
Germe	60g
Proteína de Soja	30g
Caseína	30g
Levedura de Cerveja	37,5g
Solução Vitamínica	9 ML
Ac. Ascórbico	3,6g
Ac. Sórbico	1,8g
Nipagin	3g
Tetraciclina	0,11g
Formol	3,6 mL
Ágar	27g
Água	1,2 L

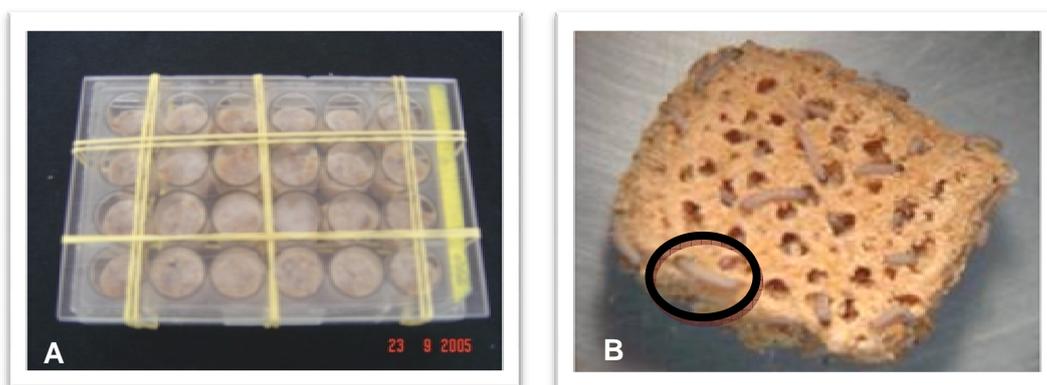


Figura 7 - (A) Placa de bioensaio devidamente fechada e (B) Larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. Fonte: (Melatti, 2005)

A primeira verificação do número de lagartas mortas (leitura) foi feita 48 horas após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas individualmente para copos de plástico de 50 mL contendo pedaços de aproximadamente 1 x 1 cm de dieta sólida, livre do bacilo (Figura 8). Os copos foram fechados com tampas de acrílico. No quinto dia do ensaio foi feita a segunda e última leitura para determinação da mortalidade das lagartas. Após esse procedimento, todo o material foi autoclavado e posteriormente descartado.

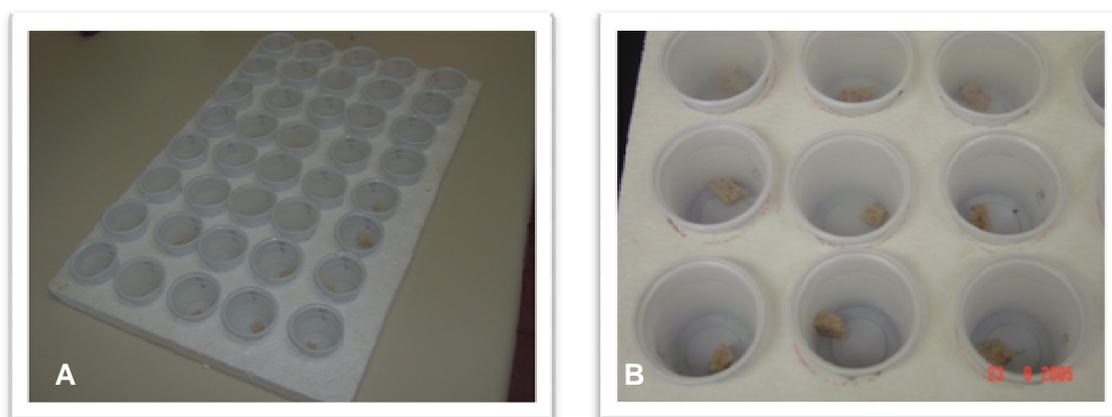


Figura 8 - (A e B) Detalhe do arranjo de copos de plásticos fechados contendo dieta livre de *Bt* e as lagartas sobreviventes depois de 48h de bioensaio

As estirpes de *Bt* que causaram mortalidade igual ou superior a 75% foram selecionadas e caracterizadas.

2.4 Caracterização Bioquímica

2.4.1. Extração de proteínas

As estirpes bacterianas selecionadas nos bioensaios seletivos foram crescidas em meio NYSM (Yousten, 1984) por 72 horas. Em seguida, as proteínas foram extraídas de acordo com Lecadet et al. (1991). As estirpes previamente crescidas foram analisadas em microscópio óptico para a verificação da presença de cristais. Após a verificação, 1,5 mL de cada cultura bacteriana foi centrifugada em microtubos de polipropileno (ependorfs) individuais a 14.000 rpm por 15 minutos. Esse procedimento foi repetido por três vezes, sempre, descartando o sobrenadante ao final de cada processo. Após a terceira centrifugação, fazendo uso de uma pipeta, foi ressuspensão o precipitado (pellet) de cada eppendorf com 1,5 mL de NaCl 5M. Foi realizada uma nova centrifugação com a solução de NaCl. Após a centrifugação foi descartado o sobrenadante e o excesso de NaCl foi removido com auxílio de papel filtro. Após esse procedimento foi feita nova ressuspensão do pellet com 1,5 ml de solução PMSF (1 mM) + EGTA (10 mM) + EDTA (100 mM). Foram realizadas duas novas centrifugações de 15 minutos cada realizando o procedimento anterior especificado. Após a segunda centrifugação foi ressuspensão o pellet em 500 µL da solução PMSF + EGTA + EDTA. Todo procedimento foi realizado no gelo.

2.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) com concentração de 12%, de acordo com Laemmli, (1970). Alíquotas de 20 µL das preparações de esporos-cristais foram

diluídas em tampão de amostra de proteína 5X (1,5M Tris-HCl, pH 6,8, Glicerol, SDS, 2b-Mercaptoetanol, Azul de Bromofenol) fervidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Usaram-se 10 µL de marcador de proteína massa molecular (Bench Mark™ Prestained Protein Ladder, Invitrogen). A eletroforese foi realizada em aparelho Hoefer miniVE vertical electroforesis system – Amersham Pharmacia, contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), a voltagem constante de 150 V, por 1 hora e 30 minutos. O gel foi corado em solução corante de Comassie blue (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-R) por uma hora e descorado em solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético) por 1-2 horas até visualização dos perfis protéicos das estirpes. *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* foi utilizado com padrão.

2.5 Caracterização Molecular

O DNA total dos isolados foi extraído segundo metodologia de Bravo et al. (1998). As estirpes foram crescidas em meio LB (Lúria) para extração no dia seguinte (12-14 horas de crescimento). De cada placa foram retirados dois inóculos com ajuda de uma alça estéril, sendo os mesmos, posteriormente, colocados em microtubos contendo 200 µL de água estéril. Os preparados foram homogeneizados e posteriormente congelados a -20°C durante 60 minutos. Em seguida as amostras foram fervidas em banho-maria a 100°C por 10 minutos (procedimento realizado com o objetivo de lisar as células) e colocadas no gelo durante 2 minutos. As amostras foram centrifugadas 14.000 rpm por 1 minuto, sendo, em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo. Todo o procedimento acima descrito foi realizado no gelo.

Para a realização da PCR (Reação em cadeia da Polimerase), 10 µL do sobrenadante da cultura foram transferidos para um tubo contendo 0,5 µM de cada “primer” (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de Taq 1X e 2,5 U de Taq DNA polimerase em um volume total de 50 µL.

Foram usados “primers” gerais para identificação de genes *cry1*, *cry4*, *cry 11*, *cyt* e específicos para identificação de *cry1* e *cry9*.

Para a identificação de genes *cry1* nos isolados foram usados o par de “primers” gerais *gral-cry1* (Bravo et al., 1998), e as condições de PCR que seguidas foram descritas pelos autores. Foram usadas misturas de “primers” e condições de PCR multiplex descritas por Bravo et al. (1998) para identificação de *cry9*, *cry11* e *cyt* (mistura de “primers” específicos *spe-cry9A*, *spe-cry9B*, *spe-cry9C* e gerais *gral-cry11* e *gral-cyt* na mesma reação).

Para a identificação de genes da subclasse *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C* e *cry1D*) foi usada a mistura de “primers” específicos CJ1 a CJ13 e as condições descritas por Ceron et al. (1994) para PCR multiplex. Para os genes *cry1E*, *cry1F* e *cry1G* foi usada a mistura de “primers” específicos CJ14 a CJ19 (Ceron et al., 1995).

A detecção dos genes *cry 2* foram utilizados “primers” *gral-cry2* (Ibarra, et al., 2003). Para identificação de genes *cry4* foram feitas PCRs com os pares de primers gerais *Dip1A*, *Dip1B*, *Dip2A* e *Dip2B* (Carozzi et al., 1991; Ceron, 1994) nas condições descritas pelos autores. Uma alíquota de 20 µL de cada produto de PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfológica

Por meio de observação por microscopia óptica foi possível confirmar que todas as estirpes analisadas apresentavam morfologia correspondente a *B. thuringiensis*, contendo esporos e cristais.

3.2 Caracterização entomopatogênica

Das 71 estirpes testadas, seis causaram 100% de mortalidade e três causaram mortalidade de 75% nos bioensaios seletivos. As estirpes que causaram mortalidade de 100% pertenciam aos sorotipos *galleriae* (S597), *sotto* (S615), *aizawiai* (S616), *kurstaki* (S1450) descritos na literatura como tóxicos a Lepidópteros. As estirpes S907 e S1168 também causaram mortalidade de 100%. As estirpes S906, S234 e S844 causaram mortalidade de 75%. Os resultados de todas as estirpes testadas nos bioensaios podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 – Percentual de mortalidade de lagartas de *A. ipsilon* causada por diferentes estirpes de *B. thuringiensis* obtido através de bioensaios seletivos.

N°	Estirpe	% Mortalidade	N°	Estirpe	% Mortalidade
1	18	41,67	37	1122	41,67
2	62	25,00	38	1168	100,00
3	89	41,67	39	1170	41,67
4	93	25,00	40	1178	33,33
5	109	33,33	41	1207	25,00
6	112	58,33	42	1267	33,33
7	130	33,33	43	1269	66,67
8	166	41,67	44	1271	41,67
9	202	33,33	45	1273	16,67
10	234	75,00	46	1365	33,33
12	392	16,67	47	1450	100,00
13	456	25,00	48	1457	50,00
14	550	41,67	49	1537	8,33
15	597	100,00	50	1538	50,00
16	608	50,00	51	1549	16,67
17	612	33,33	52	1551	16,67

18	615	100,00	53	1576	66,67
19	616	100,00	54	1876	58,33
20	619	33,33	55	1905	66,67
21	655	50,00	56	2003	41,67
22	700	25,00	57	2242	0,00
23	701	66,67	58	2243	41,67
24	711	58,33	59	2244	58,33
25	764	25,00	60	2245	16,67
26	811	41,67	61	2246	25,00
27	844	75,00	62	2247	50,00
28	845	66,67	63	2248	8,33
29	906	75,00	64	2249	33,33
30	907	100,00	65	2250	33,33
31	908	41,67	66	2251	33,33
32	997	66,67	67	2252	41,67
33	1022	33,33	68	2253	41,67
34	1066	50,00	69	2254	16,67
35	1068	41,67	70	2255	25,00
36	1078	25,00	71	2362	41,67

Das nove estirpes selecionadas neste trabalho que causaram mortalidade igual ou superior a 75% nos bioensaios seletivos, as estirpes S234, S615, S616, S844, S906 e S907 já haviam sido identificadas como tóxicas a insetos-praga por Praça et al., (2003), Melatti et al., (2005), Batista, et al., (2006) e Melatti (2008).

Praça et al. (2003) em seus estudos sobre prospecção de estirpes de *Bt* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, coleoptera e diptera identificaram que a estirpe S234 apresentou toxicidade contra *S. frugiperda*, *A. gemmatalis*, *A. grandis*, *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*. Vale resaltar que a CL₅₀ obtida para essa estirpe nos bioensaios de dose realizados contra *S. frugiperda* foi três vezes menor do que o padrão *B. thuringiensis subsp. kurstaki (Btk)*.

A atividade tóxica das estirpes S844, S906 e S907 contra lagartas de *A. gemmatalis* foi relatada por Batista et al. (2006) em seu estudo de prospecção

de estirpes de *Bt* efetivas para o controle de *S. frugiperda* inseto-praga que é o principal casusador de danos na cultura da soja no Brasil.

Melatti et al. (2005) demonstraram que *S. frugiperda* é susceptível a estirpe S615 através de bioensaios seletivos realizados com diferentes estirpes de *Bt*. Nos bioensaios de dose realizados a CL_{50} foi estimada em $1,04 \text{ ng/cm}^2$ mais eficiente até que o *Btk* que apresentou $1,34 \text{ ng/cm}^2$ de CL_{50} nos bioensaios realizados.

Melatti (2008) conduziu estudo específico para a identificação de estirpes de *Bt* ativas contra o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*) identificando a atividade tóxica da estirpe S616 para este inseto-praga.

3.3 Caracterização Bioquímica e Molecular

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos cristais protéicos das nove estirpes selecionadas nos bioensaios revelou bandas de 130 kDa e de 72 kDa (Figuras 9 e 10).

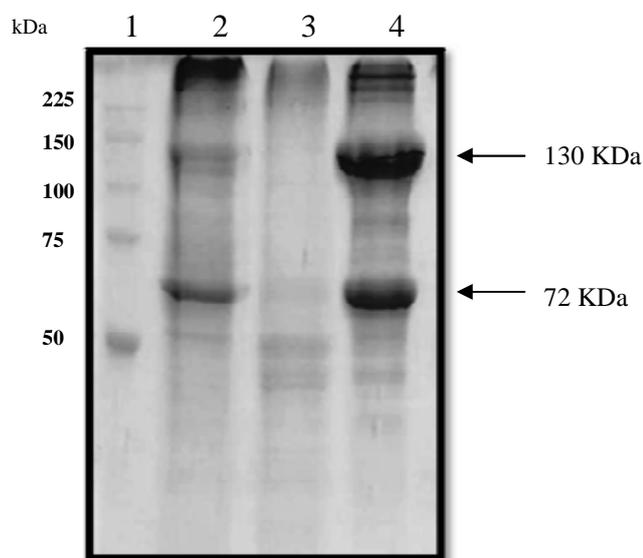


Figura 09 - Perfil protéico obtido das estirpes S1450 (*Btk*) S597; S615; em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador Bench Mark (Invitrogen), 2: Controle positivo *Btk* (S1450), 3: S597 e 4: S615.

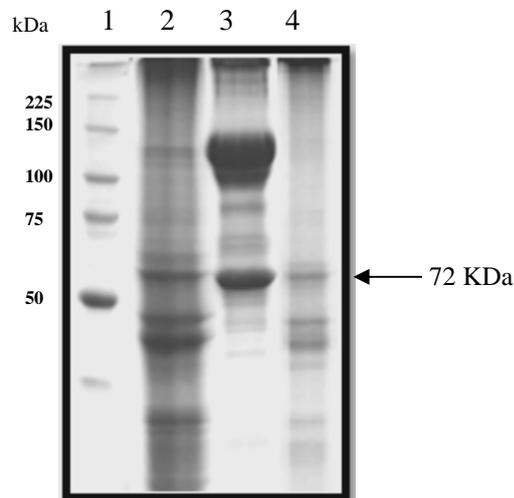


Figura 10 - Perfil protéico obtido das estirpes S1450 (*Btk*) S1989 (*Bti*) ;S844; em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador Bench Mark (Invitrogen), 2: S1989 (*Bti*), 3: S1450 (*Btk*); e 4: S844.

Utilizando os produtos das reações de PCR realizadas foi possível verificar a presença de bandas correspondentes aos genes estudados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figuras 11 a 14). Foram visualizadas bandas correspondentes aos genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry 2* e *cry 11* (216 pb, 180 pb, 526 pb e 345 pb, respectivamente) para as estirpes estudadas.

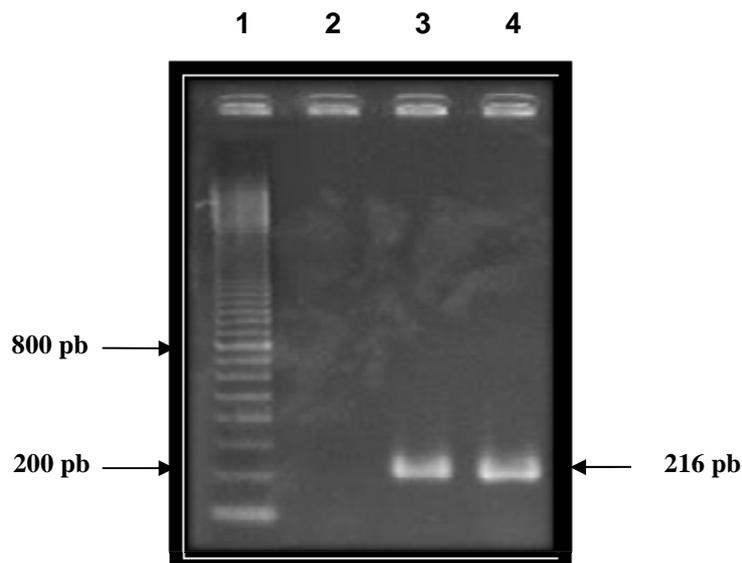


Figura 11 - Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 1Ab. M: marcador de massa molecular (1); C-: Controle negativo (água destilada) (2); Btk: (*B. thuringiensis* sp. *kurstaki*) controle positivo (3); 615: estirpe de *B. thuringiensis* do banco de bactérias entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa/Cenargen identificada numericamente de 615 (4). As duas setas da esquerda indicam a massa molecular correspondente e a seta da direita indica as bandas amplificadas em torno de 216 pb.

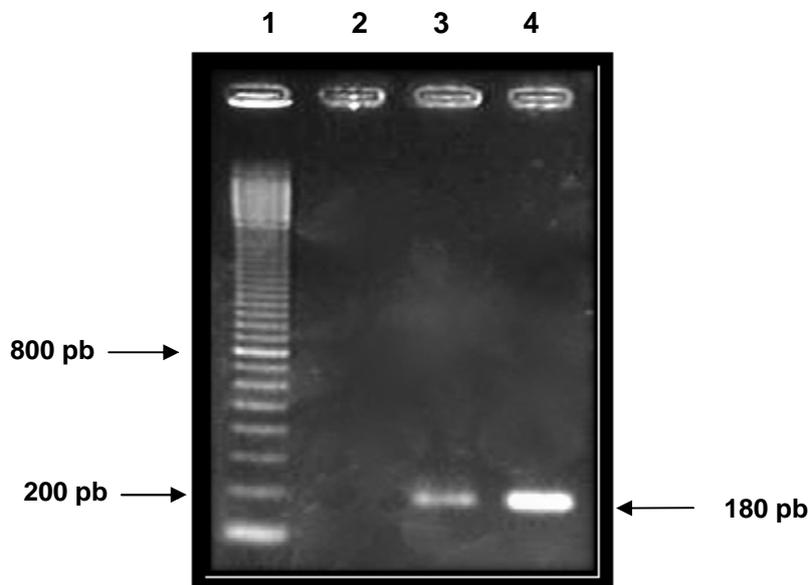


Figura 12: Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 1Ac. M: marcador de massa molecular (1); C-: Controle negativo (água destilada) (2) Btk: (*Bacillus thuringiensis* sp. *Kustaki*) controle positivo (3); 615: estirpe de *B. thuringiensis* do banco de bactérias entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa/Cenargen identificada numericamente de 615 (4). As duas setas da esquerda indicam a massa molecular correspondente e a seta da direita indica as bandas amplificadas em torno de 180 pb.

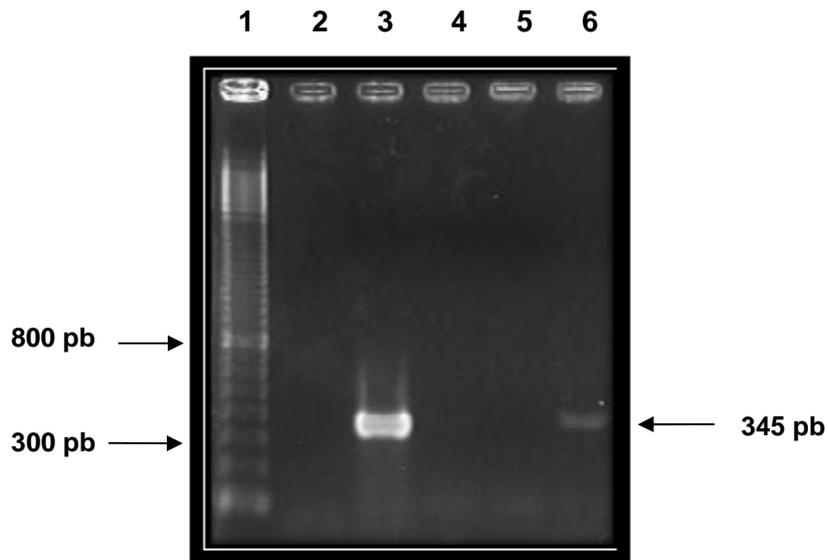


Figura 13: Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 11. M: marcador de massa molecular (1); C-: Controle negativo (água destilada) (2); *Bti*: (*Bacillus thuringiensis* *sbp. israelensis*) controle positivo (3); estirpes de *B. thuringiensis* do banco de bactérias entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa/Cenargen identificadas numericamente de 597 (4); 615 (5); e 844 (6); respectivamente. As duas setas da esquerda indicam a massa molecular correspondente e a seta da direita indica as bandas amplificadas em torno de 345 pb.

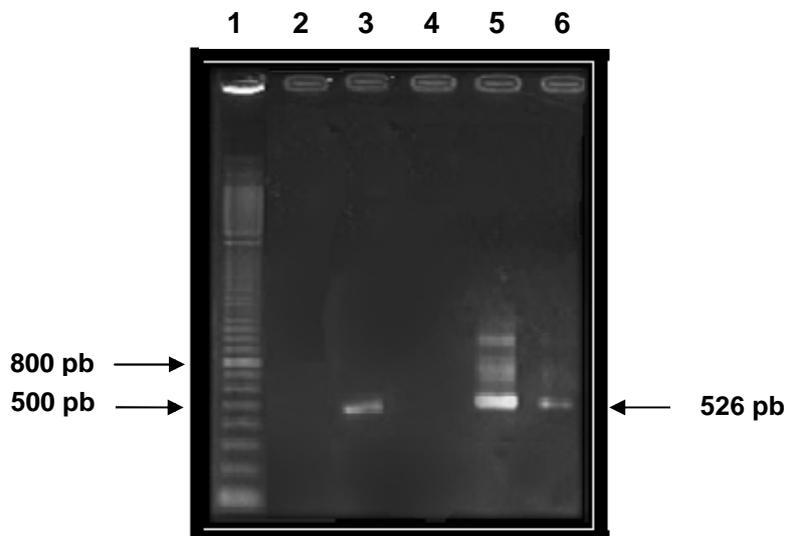


Figura 14: Gel de agarose 1% utilizando oligonucleotídeos específicos para o gene correspondente a proteína Cry 2. M: marcador de massa molecular (1); C-: Controle negativo (água destilada) (2); *Btk*: (*B. thuringiensis* *sbp. kurstaki*) controle positivo (3); estirpes de *B. thuringiensis* do banco de bactérias entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Embrapa/Cenargen identificadas numericamente de 597 (4), 615 (5) e 844 (6), respectivamente. As duas setas da esquerda indicam a massa molecular correspondente e a seta da direita indica as bandas amplificadas em torno de 526 pb.

Os resultados dos testes moleculares obtidos com a estirpe S615 identificaram a presença de genes *cry 1Ab*, *cry 1Ac* e *cry2*. Os resultados com a estirpe S844 identificaram a presença dos genes *cry2* e *cry11*. Na estirpe S597 não foi identificado nenhum gene *cry*, de acordo com a metodologia utilizada (Tabela 6).

Tabela 6 – genes *cry* amplificados por PCR e visualizados em gel de agarose 1%

Estirpes	Mortalidade	genes <i>cry</i>
615	100,00	<i>cry1Ab; cry1Ac; cry2</i>
597	100,00	-
844	75,00	<i>cry2; cry11</i>

As demais estirpes selecionadas nos bioensaios realizados aqui foram analisadas anteriormente por colaboradores e os resultados estão descritos na tabela 7. Esses resultados foram apresentados nos estudos realizados por Praça et al. (2003), Melatti et al. (2005) e Melatti (2008).

Tabela 7 – genes *cry* presentes nas estirpes selecionadas

Estirpes	% Mortalidade	genes <i>cry</i>
1450	100,00	<i>cry 1Aa; cry1Ab; cry1Ac; cry1B; cry2</i>
1168	100,00	-
907	100,00	<i>cry1B</i>
616	100,00	<i>cry8</i>
234	75,00	<i>cry 1Aa; cry 1Ab, cry1Ac; cry1B cry2</i>
906	75,00	<i>cry1B</i>

Esses resultados demonstram que diferentes proteínas Cry podem estar envolvidas na atividade tóxica contra as larvas de *A. ipsilon*. Os resultados dos testes moleculares obtidos com as estirpes selecionadas apresentaram a presença de genes *cry1*, *cry2*, *cry8* e *cry11*. Os genes *cry1* e *cry2* foram

predominantes nas nove estirpes selecionadas nos bioensaios realizados sugerindo serem os principais responsáveis pela toxicidade a este inseto.

São poucos os estudos disponíveis na literatura técnico-científica específicos para a seleção de toxinas Cry de *B. thuringiensis* contra *A. ipsilon*, contudo merece destaque as pesquisas conduzidas por Maagd *et al.* (2003) e Gilliland *et al.* (2002).

Os trabalhos conduzidos por Maagd *et al.* (2003) testaram a atividade de doze proteínas Cry1 e duas Cry9 contra lagartas de *A. ipsilon*. Os resultados obtidos indicaram que a lagarta rosca não foi susceptível a maioria das toxinas analisadas. Porém, entre elas, três apresentaram atividade significativa: Cry 9Ca foi a mais tóxica, seguida por Cry1Aa e Cry1Fb. A proteína Cry 1Aa está presente nas estirpes S234 e S1450 selecionadas nesta pesquisa confirmando sua possível toxicidade a *A. ipsilon*.

Maagd *et al.* (2003) não identificaram atividade tóxica das proteínas Cr1Ab e Cry1Ac em seus bioensaios. Porém, no trabalho de Gilliland *et al.* (2002) reportou-se significativa atividade da proteína Cry1Ac na mortalidade de lagartas de *A. ipsilon*. Gilliland *et al.* (2002) testaram quatro diferentes toxinas Cry e a proteína Cry1J também demonstrou resultados satisfatórios, além da Cry1Ac.

As proteínas Cr1Ab e Cry1Ac estão presentes nas estirpes S234, S1450 (*Btk*) e S615. As estirpes S1450 e S615 causaram 100% de mortalidade, enquanto a S234 causou 75% nos bioensaios realizados sugerindo a possível atividade tóxica dessas proteínas contra *A. ipsilon*.

Entretanto, é muito difícil estabelecer a contribuição de cada toxina, pois a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ser devido a interações

é sinérgicas entre as toxinas encontradas, ou mesmo, pela interação destas com os esporos. Novos testes devem ser conduzidos com proteínas individuais e em conjunto para confirmar a toxina responsável pela mortalidade de *A. ipsilon* (Lee et al. (1996); Schnepf et al. (1998). É importante mencionar também que a susceptibilidade de insetos às proteínas de *Bt* podem variar de acordo com a origem geográfica da população da praga. Evidenciando essa afirmação López-Edwards et al. (1999) estimaram diferentes resultados de CL₅₀ de um mesmo isolado de *Bt* para diferentes populações de *S. frugiperda*, coletadas em 5 regiões do México.

A proteína Cry 1Ab identificada nos testes moleculares deste estudo como possível causadora de mortalidade de *A. ipsilon* aparece na literatura causando toxicidade a diferentes insetos da ordem Lepidoptera, tais como, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens*, *Pieris brassicae*, *Manduca sexta*, *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis* (Bravo et al., 2002; Ribeiro & Crook, 1998; Martens et al., 1995; Praça et al., 2003).

Kannak & Fiúza, (2006) lembram que tanto a proteína Cry1Ab como a Cr1Ac já estão sendo utilizadas há bastante tempo na formulação de bioinseticidas. Essas proteínas estão presentes no *Bt* Kurstaki HD-1 que é base de formulação dos principais bioinseticidas presentes no mercado mundial, tais como, o Dipel e o Biobit da empresa Abbott Labs. No anexo B são apresentados em forma de tabela um levantamento dos principais bioinseticidas comercializados no mundo e sua formulação.

No caso das plantas geneticamente modificadas que codificam as proteínas Cry 1Ab e Cry 1Ac, podemos citar, no caso da Cry1Ab, o repolho resistente a *Plutella xylostella* (Bhattacharya et al., 2002) e o algodão resistente

ao ataque de *Heliothis virescens* Fabr. (Perlak et al.,1990). Para a proteína Cry1Ac destacamos a Canola resistente a *Trichoplusia ni* Hübner, *Spodoptera exigua* Hübner, *Heliothis virescens* Fabr. e *Helicoverpa zea* Boddie (Stewart et al., 1996) e o tomate resistente a *Heliothis armigera* Hübner (Mandaokar et al., 2000).

Observou-se a presença de Cry 11 nos testes realizados com a estirpe S844. Essa classe de genes é responsável pela atividade tóxica a insetos da ordem díptera, podendo representar, após bioensaios específicos, uma nova alternativa de controle de mosquitos.

A busca de estirpes que apresentem melhores resultados e novos genes *cry* causadores de patogenicidade contra *A. ipsilon* do que a subespécie *kurstaki* (padrão) deve ser foco da pesquisa científica nos próximos anos devido ao seu difícil controle e aos danos causados em plantios comerciais de diversas culturas de interesse agrônomo.

Outra potencial alternativa para o controle de *A. ipsilon* são proteínas produzidas e secretadas por algumas estirpes de *Bt* durante sua fase vegetativa e de esporulação, as chamadas proteínas VIPs, do inglês “*Vegetative Insecticidal Proteins*”. Estruch et al. (1996) e Lee et al. (2003) em suas pesquisas identificaram resultados satisfatórios de toxicidade das proteínas VIP3A contra este inseto.

4. CONCLUSÃO

Das 71 estirpes testadas, seis causaram 100% de mortalidade e três causaram mortalidade de 75% nos bioensaios seletivos. As estirpes que causaram mortalidade de 100% pertencem aos sorotipos *galleriae* (S597), *sotto* (S615), *aizawiai* (S616), *kurstaki* (S1450) descritos na literatura como tóxicos a Lepidópteros. As estirpes S907 e S1168 também causaram mortalidade de 100%. As estirpes S906, S234 e S844 causaram percentual de mortalidade de 75%.

A análise molecular por PCR mostrou que nas estirpes S615 e S844 foram encontrados os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry2* e *cry11*. Os resultados dos testes moleculares obtidos com estirpe S615 identificaram a presença dos genes *cry1Ab*, *cry1Ac* e *cry2*. Os resultados com a estirpe S844 identificaram a presença dos genes *cry2* e *cry11*. Na estirpe S597 não foi identificado nenhum gene *cry*, de acordo com a metodologia utilizada.

Através dos resultados obtidos, foi possível selecionar dentre as 71 subespécies testadas, nove que apresentaram índice de mortalidade considerável contra o inseto-alvo do trabalho, *A. ipsilon*. Assim, esse trabalho contribui para a seleção de bioinseticidas mais específicos para a lagarta rosca, bem como, identifica possíveis genes de resistência aplicáveis a engenharia genética na transformação de plantas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, A. C. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* e estudos de produção para o desenvolvimento de um bioinseticida visando o controle de pragas agrícolas. Brasília: **Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília**, 2006, 88p. Dissertação de Mestrado.

BHATTACHARYA, R. C.; VISWAKARMA, N. BHAT, S.R.; KITI, P.B.; CHOPRA, V.L. Development insect-resistance transgenic cabbage plants expressing a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Sci.*, 83:146-150, 2002.

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

BRAVO, A.; MIRANDA, R.; GOMEZ, I.; SOBERON, M. Pore formation activity of Cry 1Ab toxin from *Bacillus Thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. **Biochemistry et Biophysical Acta** 1562: 63-69 - 2002.

CAROZZI, N.B., KRAMER, V.C., WARREN, G.W. EVOLA, S. & M.G. KOZIELI. Prediction of insecticidal of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Appl. Environ. Microbiol.** 57:3057-3061. ESTRUCH, J.J - 1991.

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

WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; GRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.93, p.5398-5394, 1996

GILLILAND A.; CATHERINE E. C., EILEEN J. B., AND ELLAR, J. D.; Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ Endotoxin Binding in Determining Potency during Lepidopteran Larval Development. **Applied and Environmental Microbiology**, April 2002, p. 1509-1515, Vol. 68, No. 4

IBARRA, J.; RINCÓN, C.; ORDÚZ, S.; NORIEGA, D.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; OLIVEIRA, C.M.F.; LANZ, H.; RODRIGUEZ, M.H.; SÁNCHEZ, J.; PEÑA, G.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species.

Applied and Environmental Microbiology, v.69, p.5269-5274, 2003.

KANNAK, N. & FIUZA, L. N.; Genes cry1Ab e cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** ano IX, p 26 – 31, nº 36 - janeiro/junho 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature** 227, 680 (1970)

LEE,W-J., LEE,J-D, Kravchenko,V.V., Ulevitch,R.J. and Brey, P.T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. **Proc. NatlAcad. Sci. USA**, **93**, 7888–7893.

LEE, S.; PETERSON, C.J.; COATS, J.R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.77-85, 2003.

LÓPEZ-EDWARDS, M., J. L. HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. PESCADOR-RUBIO, J. MOLINA-OCHOA, R. LEZAMAGUTIERREZ, J. J. HAMM, AND B. R. WISEMAN. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomol.** 82: 254-262.

MAAGD, RUUD A. de; HENDRIKS, M. W.; MOLTHORFF, J. W.; NAIMOV, S.; Activity of eild-type and hybrid *Bacillus Thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. **Arch Microbiol** n179: 363 - 367, 2003.

MANDAOCAR, A. D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R.P.; ALTOSAR, I. KUMAR, P.A. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera*) **Crop. Prot.**; 19:307-312, 2000.

MELATTI, V. Seleção de Estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*). **Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária**, 2008.

MELATTI, V., BATISTA, A.; DEMO, C.; PRAÇA, L. BROD, C.; MONNERAT R. G.; Determinação da susceptibilidade de Spodoptera frugiperda a diferentes subspécies de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia** (2005).

MELATTI, V. Avaliação de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Sodoptera frugiperda*. Monografia de graduação. **Centro Universitário de Brasília**, 2005.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 65 p.

PEELAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.O.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J. T.; FISHHLFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Biotecnology**, 8: 939-943, 1990.

MAAGD, RUUD A. de; HENDRIKS, M. W.; MOLTHORFF, J. W.; NAIMOV, S.; Activity of eild-type and hybrid *Bacillus Thuringiensis* δ -endotoxins against *Agrotis ipsilon*. **Arch Microbiol n179**: 363 - 367, 2003.

MANDAOCAR, A. D.; GOYAL, R.K.; SHUKLA, A.; BISARIA, S.; BHALLA, R.; REDDY, V.S.; CHAURASIA, A.; SHARMA, R.P.; ALTOSAR, I. KUMAR, P.A. Transgenic tomato plants resistant to fruit borer (*Helicoverpa armigera*) Crop. Prot.; 19:307-312, 2000.

MARTENS, J. W. M., KNOESTER, M., WEIJTS, F., GROFFEN, S. J. A., HU, Z., BOSCH, D., VLAK, J. M. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* Cru1A(b) crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. 66, 249-267, 1995.

PRAÇA, L. B. Prospecção de estirpes brasileiras de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Coleóptera, Lepidoptera e Díptera, Brasília: **Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília**, 2003. Dissertação de Mestrado.

RIBEIRO, B. M., CROOK, N. E. (1998). Construction of occluded recombinant baculoviruses containing the full-length *cry1Ab* and *cry1Ac* genes from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**: 31, 763-769.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN REIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 775-806, 1998.

SOUZA, J. C. Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Circular técnica da Epamig**, NN. 180 - Março - 2005

SOUZA, J. C.; Principais aspectos sobre as pragas do milho em plantios direto e convencional. **Circular Técnica da Epamig N.º: 141**: Abril ANO: 2002.

STEWART, C. N., ADANG, M. J., RAYMER, S.; Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIA (c) gene. **Plant Physiology** 112: 115– 120

VIANA, P.A.; CRUZ, I.; OLIVEIRA, L.J.; CORRÊA-FERREIRA. Manejo de pragas em agroecossistemas sob plantio direto. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 208, p.63-72, jan./fev. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors***. WHO Mimeograph Document 87.3, 1987.

YOUSTEN, A.A. ***Bacillus sphaericus*: Microbiological factors related to its potencial as mosquito larvicide**. Advanced in Biotechnology Processes 3, 315-343. 1984.

CAPÍTULO 2:

Determinação da atividade inseticida de proteínas Cry contra *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) e estudo da interação dessas proteínas com receptores de membrana

RESUMO

Objetivando a identificação da atividade tóxica individual de proteínas Cry foram conduzidos bioensaios para a determinação da dose letal necessária para causar mortalidade em 50% da população (CL₅₀) de lagartas de *S. frugiperda*. Utilizou-se para isso, as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A presentes no *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (*Btk*). Adicionalmente, foram conduzidos experimentos para verificação da ligação dessas proteínas a receptores de membrana de lagartas de *S. frugiperda*. As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas para os bioensaios foram provenientes do laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Três estirpes recombinantes de *B. thuringiensis* e uma estirpe nativa foram utilizadas nesse trabalho para a produção das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. Bioensaios de dose com lagartas de segundo ínstar de *S. frugiperda* apresentaram CL₅₀ de 12, 416 ng/cm², 13.434 ng/cm², 108,773 ng/cm² e 164,350 ng/cm², respectivamente, evidenciando diferentes atividades tóxicas. Os resultados dos ensaios de ligação realizados com vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMAs) de *S. frugiperda* demonstraram ligações de diferentes intensidades a receptores de membrana com as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A marcadas com biotina.

Palavras-chave: *Spodoptera frugiperda*; lagarta do cartucho; *Bacillus thuringiensis*; proteínas Cry; receptores de membrana.

ABSTRACT

Aiming the identification of individual toxic activity of Cry proteins were conducted bioassays for determination of lethal dose necessary to causes mortality in 50% of population (LC₅₀) of *S. frugiperda* larvae. The proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A present in *B. thuringiensis* subspecies *kurstaki* HD-1 (*Btk*) were tested. Additionally, experiments to verify binding of these proteins to membrane cell receptors of *S. frugiperda* larvae were conducted. The *S. frugiperda* larvae used in bioassays were obtained from insect creation of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Three recombinant strains of *B. thuringiensis* and one wild type strain were utilized at this work to produce the proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A. Bioassays with *S. frugiperda* larvae of second development stage showed LC₅₀ of 12.416 ng/cm², 13.434 ng/cm², 108.773 ng/cm² and 164.350 ng/cm², respectively, evidencing different toxic activity. The results of binding assays done with BBMV (brush border membrane vesicles) of *S. frugiperda* showed binding with membrane cell receptors of proteins Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry2A marked with biotin.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; *bacillus thuringiensis*; cry proteins; membrane cell receptors.

1. INTRODUÇÃO

A *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797), conhecida como a lagarta do cartucho, é a principal praga agrícola da cultura do milho no Brasil. As lagartas pequenas são pouco representativas, mas depois de desenvolvidas, passam a danificar as folhas centrais do cartucho do milho, o qual pode ser totalmente destruído. O ataque pode ocorrer desde a fase de plântula até as fases de pendoamento e espigamento. Além do milho, o inseto danifica também outras culturas, incluindo pastagens, arroz, cana-de-açúcar, trigo, aveia, cevada, amendoim, batatinha, alface e diversas hortaliças (Agrofit, 2008).

O controle de *S. frugiperda* tem sido realizado, basicamente, pela aplicação de inseticidas químicos, (Grutzmacher et al., 2000; Gallo et al., 2002) cuja aplicação exige um grande investimento, onerando ou mesmo inviabilizando em alguns casos a produção (França, 2004). Contudo, com a evolução da agricultura, aumentou o número de pesquisas visando à substituição de inseticidas de alta periculosidade no controle de pragas. Com esse propósito, vários métodos passaram a ser recomendados, como o uso de feromônio, emprego de parasitas e predadores como inimigos naturais, desenvolvimento de plantas resistentes a pragas, bem como a utilização de bioinseticidas formulados a base de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (Salgado, 1979).

A atividade tóxica de estirpes de *Bt* contra insetos da ordem Lepidoptera foi comprovada através de inúmeros trabalhos realizados por renomados institutos de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e serviram de apoio para a formulação dos principais bioinseticidas disponíveis no mercado mundial (Anexo B). O *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (*Btk*) foi amplamente

utilizado na formulação desses bioinseticidas, principalmente, pela sua ampla e eficaz toxicidade contra lepidópteros-praga responsáveis por danos econômicos na agricultura moderna.

Waquil et al. (1982) destacam que mesmo sendo o *Bt* efetivo no controle de várias espécies de pragas do milho, conforme seu registro de uso, a eficiência das estirpes utilizadas nos principais bioinseticidas hoje comercializados sobre a lagarta do cartucho é baixa.

As proteínas presentes no *Btk* são das classes Cry1 e Cry2, entretanto, é muito difícil estabelecer a contribuição de cada toxina, pois a toxicidade de algumas estirpes aos insetos-alvo pode ocorrer devido a interações sinérgicas entre as toxinas encontradas ou mesmo, pela interação destas com os esporos. (Lee et al. (1996); Schnepf et al., (1998)).

A verificação da ligação das proteínas Cry a receptores de membrana de lagartas de *S. frugiperda* pode contribuir para que as mesmas proteínas sejam apontadas com maior confiabilidade como causadoras da atividade tóxica verificada anteriormente em bioensaios. As protoxinas ligam-se a receptores específicos localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino dos insetos (Hoffmann et al. (1988), Bravo et al. (1992), Höfte & Whiteley (1989), Ravoahangimalala et al. (1993)).

A união das proteínas Cry a estes sítios é uma etapa determinante da alta especificidade das δ -endotoxinas (Van Rie et al., 1989) por isso diversos grupos de pesquisa tem dedicado um grande esforço a entender como ocorre esse processo. Segundo Monnerat (2003) a metodologia mais usada são os estudos cinéticos de união utilizando proteínas marcadas com isótopos radioativos e vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA).

Ainda segundo Monnerat (2003), várias pesquisas já demonstraram que para apresentar atividade tóxica a proteína deve se ligar a um receptor específico. Esse processo é fundamental para que os efeitos deletérios das proteínas Cry sejam observados, entretanto, o fato da proteína se ligar ao receptor não quer dizer, necessariamente, que a mesma apresente toxicidade.

Nesse sentido, na condução deste trabalho buscou-se avaliar tanto a toxicidade do inseto a quatro proteínas Cry presentes no *Btk*, bem como identificar através de métodos bioquímicos a ligação dessa proteína aos receptores de membrana no referido inseto.

Visando a identificação da atividade tóxica individual de proteínas Cry eram conduzidos bioensaios para determinação da dose letal necessária para causar mortalidade em 50% da população (CL₅₀) de lagartas de *S. frugiperda*, utilizando para isso, as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A presentes no *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (*Btk*).

Adicionalmente foram conduzidos experimentos para verificação da ligação dessas proteínas a receptores de membrana de lagartas de *S. frugiperda*, bem como, a realização de ensaios de competição entre essas proteínas pelos receptores presentes na membrana do referido inseto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Bioensaios contra larvas de *S. frugiperda*

2.1.1 Obtenção de estirpes de *Bt* e de lagartas *S. frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas para os bioensaios foram provenientes do laboratório de criação massal de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As lagartas foram criadas em dieta artificial e criadas em insetário regulado a temperatura de 28°C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 10-14 horas (Schmidt et al., 2001).

Foram utilizadas nesse trabalho três estirpes recombinantes e uma nativa para a produção das proteínas Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. As três estirpes *B. thuringiensis* recombinantes que sintetizam as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry2A foram cedidas pelo Dr. Colin Berry (Universidade de Cardiff – Reino Unido). Os genes dessas estirpes estão clonados no plasmídeo pHT315 (Arantes & Lereclus, 1991) sob o comando do gene Cyt1A. A estirpe nativa que sintetiza a proteína Cry1Ac foi cedida pela Dra. Olivia Marcia Nagy Arantes, pesquisadora da Universidade Estadual de Londrina.

2.1.2 Caracterização Morfológica das estirpes de *Bt*

As estirpes foram crescidas em meio NYSM (Yousten, 1984), em incubador rotativo a 200 rpm, 28°C, durante 72h (até completa esporulação). Após o crescimento, as formas das células vegetativas, esporos e cristais dos bacilos foram visualizados em microscópio de contraste de fase (a fresco) com aumento de 1000 vezes. Para preparar o material, depositou-se uma gota do material crescido dissolvido em solução salina ou uma gota do isolado crescido em meio líquido em uma lâmina de vidro coberta por lamínula.

2.1.3 Avaliação de Patogenicidade de *Bt* contra *S.frugiperda*

Com o objetivo de se determinar a concentração letal necessária para matar metade da população de lagartas testadas (CL₅₀), foram realizados bioensaios com diferentes doses utilizando as proteínas liofilizadas Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A.

Inicialmente, as estirpes foram cultivadas por 72 h em meio NYSM contendo basicamente esporos e cristais sendo liofilizadas posteriormente para a realização dos bioensaios. Para isso, estes cultivos foram centrifugados a 12.800 rpm por 30 minutos a 4°C (centrífuga BR4i, Jouan), congelados durante 12 horas e liofilizados por 18 horas em liofilizador (marca labconco e modelo lyphlock 18). Para a realização das diluições, os materiais liofilizados foram pesados na quantidade de 1 mg e adicionou-se aos mesmos 1mL de água destilada estéril em um microtubo de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf). Após completa homogeneização em agitador tipo “vortex”, obteve-se a suspensão I. A partir desta suspensão, obteve-se a suspensão II, pipetando 571,4 µL da suspensão I e adicionando-se 428,6 µL de água, obtendo-se uma concentração final de 571,4 µg/mL em um novo microtubo. Para os testes foram preparadas

dez diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) da diluição II, sendo que a primeira dose possuía uma concentração de 20 µg de proteína/mL de solução. Na tabela 8 são apresentadas as diluições utilizadas na realização do bioensaio.

Tabela 8 - Concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra *S. frugiperda*.

Dose	Suspensão II (µL)	Água (µL)	Concentração (ng/cm ²)
1	200	800	2000
2	120	880	1200
3	72	928	720
4	43,2	956,8	432
5	25,9	974,1	259
6	15,5	984,5	155
7	9,3	990,7	93
8	5,6	994,4	56
9	3,4	996,6	34
10	2	998	20

A dieta utilizada nos bioensaios teve sua composição estabelecida por (Shmidt et al. 2001). Os ingredientes foram pesados em béquer seguindo a proporção descrita na Tabela 9.

Tabela 9 – Dieta de *S.frugiperda* utilizada nos bioensaios

Ingredientes	Quantidade
Feijão carioca	140,4g
Levedo de cerveja	42,9g
Germe de trigo	67.4g
Ac. Ascórbico**	4,3g
Ac. Sórbico**	1,4g
Nipagin*	2,65g
Formol**	10,6 mL
Ágar	17.0g
Água	1,0 L

*Ingredientes não autoclaváveis

** Ingredientes utilizados somente na dieta da troca do bioensaio

Em seguida, após homogeneização manual, a dieta foi colocada em autoclave por 20 min a 120 °C. Utilizando uma câmara a de fluxo laminar, a dieta foi distribuída, ainda quente e líquida, em poços de placas de cultura de células de acrílico de aproximadamente 15 x 8 cm. Uma quantidade suficiente para preencher metade de cada poço foi utilizada. Em seguida, as placas foram colocadas sob luz ultra-violeta em câmara de fluxo laminar por 10 minutos para esterilização e solidificação da dieta. Na sequência, espalhou-se 35 µl da proteína a ser testada em cada poço da placa contendo dieta. Após aproximadamente 10 min lagartas de 2º instar foram adicionadas às placas, sendo colocada uma lagarta para cada poço, já que as mesmas podem adotar comportamento canibalista, assim como, *A. ipsilon*. Uma placa foi deixada como testemunha, ou seja, sem a bactéria, porém contendo dieta e lagartas. Imediatamente após colocar as lagartas as placas foram tampadas com tampas de acrílico e ligas elásticas. A incubação dos bioensaios foi realizada

em sala destinada para esse fim, à temperatura ambiente e com iluminação constante. A primeira leitura foi feita 48 h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copinhos de plástico de 50 mL, contendo dieta livre da proteína. No quinto dia foi feita a segunda e última leitura (Monnerat et al., 2001; Silva-Werneck, 2001).

Os dados de mortalidade obtidos foram analisados através de análise Probits (Finney, 1971) e a concentração letal (CL₅₀) foi determinada. As proteínas do cristal de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 (Btk) foram utilizadas como padrão e controle positivo.

2.2 Purificação e solubilização de proteínas

As estirpes de *Bt* estudadas foram crescidas a 28 °C e 200 rpm durante 72 h em um meio de cultura até esporulação (Lereclus *et al.*, 1995). Adicionou-se 25µg/mL de eritromicina ao meio das estirpes transformadas. As estirpes foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. Após a eliminação do sobrenadante o precipitado contendo esporos e cristais foram lavados três vezes com um tampão contendo NaCl 0,3 M e EDTA 0,01 M (pH 8,0) e em seguida, repetindo esse procedimento por três vezes consecutivas com um segundo tampão contendo PMSF 1%, sempre descartando o sobrenadante ao final de cada centrifugação dos cultivos. Após a última centrifugação com PMSF o precipitado foi ressuspensão em tampão TTN (20 mM de Tris, 300 mM de NaCl, 0,1 % de triton X-100, pH 7,2). Os cristais foram isolados por gradiente de sacarose de acordo com o protocolo descrito por Thomas & Ellar (1983). Os cristais foram recuperados utilizando Triton 1% e PMSF 1% e solubilizados com uma solução alcalina contendo tampão carbonato de sódio a

500mM e pH 10,5 com 0,2% de β -mercaptoetanol por 2h a 37 °C com agitação constante de 37 rpm. Depois desse processo as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

2.3 Ativação, quantificação e visualização das proteínas

Para iniciar o processo de reação de ativação das proteínas, foram utilizadas alíquotas de 100 μ L de volume total na proporção de 10% de tripsina e 90% de proteína. Após o preparo da amostra a reação foi incubada por 2 horas em agitação de 37 rpm. Após o término da incubação a reação foi interrompida com PMSF a 1mM e centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Após o final da centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. A dosagem de proteínas do sobrenadante (proteínas solúveis) foi realizada seguindo-se do método de Bradford (Bradford, 1970). Após a quantificação, a massa molecular e a integridade das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%, conforme Laemmli (1970). O gel foi corado e fixado em solução de 40% de metanol, 10% de ácido acético e Comassie blue 0,1% por cerca de 16h, sob leve agitação e descorado em solução de 40% de metanol e 10% de ácido acético por 3h, sob leve agitação.

2.4 Purificação das Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMAs)

As VMMAs foram obtidas a partir de intestinos médios de *S. frugiperda* de quarto ínstar de desenvolvimento. Os intestinos foram retirados com auxílio de pinças entomológicas, lavados e conservados em solução tampão (manitol

200 mM, DTT 1 mM e Hepes-Tris 1 mM pH 7,4) a temperatura de -80 °C. Um grama dos intestinos foram submetidos a nove pulsos a 2250 rpm em um aparelho homogenizador blender-polytron juntamente com um tampão de homogeneização contendo 300 mM de manitol, 17 mM de Tris-HCl, 10 mM de Hepes, 2 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 1 mM de PMSF. Adicionou-se uma solução gelada de MgCl₂ a 24 mM e incubou-se a mistura em gelo por 15 min. As amostras foram transferidas para tubos falcon de 50 ml e em seguida a reação foi centrifugada a 4.500 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 16.000 rpm (Rotor: AH627 / Centrífuga: Sorvall OTD75B) por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 5 mL de tampão de homogeneização e 5 mL de MgCl₂ a 24 mM. Uma nova centrifugação foi realizada durante 15 minutos a 4.500 rpm a 4°C (Centrífuga Jouan 78I). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 16.000 RPM (Rotor: AH627 / Centrífuga: Sorvall OTD75B) por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspense em 5mL de água Milli-Q fria. Após todas essas centrifugações, as amostras foram submetidas a três pulsos do aparelho homogenizador a 2250 rpm. Em seguida, as mesmas foram dialisadas durante aproximadamente 16 horas a 4 °C em dois litros de uma solução (pH 7,4) contendo 150 mM de KCl, 2 mM de EGTA, 0,5 mM de EDTA, 10 mM de Hepes. As VMMA's purificadas foram divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a temperatura de -80 °C.

2.5 Biotinilação das proteínas

As proteínas solubilizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A foram biotiniladas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (Amersham) de acordo com as recomendações do fabricante. Após esse processo, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1970) e dialisadas em quatro litros de água destilada durante aproximadamente 16 h a 4°C. As proteínas foram analisadas por eletroforese em dois géis desnaturantes de poliacrilamida SDS-PAGE a 12%. Um dos géis foi visualizado e o outro gel foi utilizado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - nitrocellulose membrane – Amersham). A transferência foi realizada a corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hofer) por 40 min em tampão de transferência [25 mM Tris, 192 mM Glicina e metanol 20% (v/v)]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1X para que fosse renaturada e incubada com streptoavidina - peroxidase conjugada (Amersham) diluída 1:4000 em 30 mL de PBS 1X durante uma hora. Em seguida, a membrana foi processada com PBS 1X contendo Tween 20 a 0,05% (v/v) e revelada utilizando o kit SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) de acordo com as especificações do fabricante.

2.6 Ensaio de ligação

O ensaio de ligação foi realizado como descrito por Aranda *et al.* (1996) e caracterizou-se pela ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A às VMMA, extraídas do intestino médio de *S. frugiperda*. As toxinas (10 nM) foram incubadas com 10 µg de VMMA em 100 µL de tampão de ligação [PBS (pH 7,6), 0,1% (p/v) BSA, 0,1% (v/v) Tween 20 a temperatura ambiente durante

1h sob leve agitação. As proteínas não ligadas às VMMAAs foram removidas no processo de centrifugação (10 min a 14000 x g). As VMMAAs foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspensas em 15 µL de PBS 1X e 5 µL de tampão de carregamento de amostra Laemmli 4X [0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 4% (p/v) SDS, 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01% (p/v) Azul de Bromofenol]. Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos e aplicadas em um gel desnaturante de poliacrilamida SDS-PAGE a 9%. O gel foi utilizado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - nitrocellulose membrane – Amersham). A membrana foi incubada por 16 horas com PBS 1X para que fosse renaturada. A ligação das toxinas marcadas com as VMMAAs foi visualizada com streptoavidina - peroxidase conjugada (1:6000 - Amersham) por 1h seguida de incubação com SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. 1 Bioensaio contra *S. frugiperda*

Os resultados dos bioensaios evidenciaram que a proteína que apresentou maior toxicidade a larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda* foi a Cry1Aa, seguidas das proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. Ficou evidente nos resultados obtidos que das quatro proteínas testadas a Cry1Aa e a Cry1Ab demonstraram eficiência cerca de nove vezes maior que a Cry1Ac e treze vezes maior Cry 2A. Os valores em ng/cm² das CL₅₀ obtidas e os intervalos de confiança são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - Resultado dos bioensaios contra lagartas de *S. frugiperda* utilizando as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A.

Proteína	n	CL ₅₀ (ng/cm ²)	Intervalo de confiança
Cry1Aa	72	12,416 ^a	9,098 – 16,337
Cry1Ab	72	13.434 ^a	9,613 – 17,955
Cry1Ac	72	108,773 ^b	80,351 – 143,462
Cry2A	72	164,350 ^b	119,482 – 217,904

Contudo, a partir das análises dos intervalos de confiança verificamos que os resultados de CL₅₀ das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab não são diferentes estatisticamente, assim como a comparação dos resultados das proteínas Cry1Ac e Cry2A. Todas as outras correlações possíveis entre os resultados das proteínas testadas apresentaram diferenças estatísticas.

Poucos autores na literatura técnico-científica realizaram a determinação da atividade isolada das proteínas testadas contra *S. frugiperda*. Nesse contexto merece destaque o trabalho conduzido por Martins (2005) que avaliou a atividade tóxica da proteína Cry1Ab contra insetos da ordem Lepidoptera. Em seu estudo comparativo com a estirpe padrão *Btk* a autora identificou diferença estatística entre as amostras, sendo o *Btk* mais tóxica que a proteína Cry1Ab contra *S. frugiperda* (Martins, 2005).

3.2 Purificação e solubilização das proteínas.

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida dos cristais protéicos e das proteínas solúveis (Figura 15) demonstrou bandas de 130kDa para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e de 72kDa para a proteína Cry2A. Esses resultados estão de acordo com a massa molecular esperada para as referidas proteínas. As proteínas da classe Cry1 de *B. thuringiensis* têm uma massa molecular em torno de 130-140 kDa (Höfte & Whiteley, 1989). O grupo de proteínas do tipo Cry2 é formado por quatro membros: Cry2Aa, Cry2Ab, Cry2Ac e Cry2Ad. A toxina do tipo Cry2A foi isolada do *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, porém pode ser produzida por estirpes de várias subespécies. Essas proteínas apresentam alta atividade larvicida para lepidópteros e baixa para dípteros. O gene da classe *cry2A* codifica uma proteína de aproximadamente de 70 kDa, aproximadamente, que se acumula na bactéria formando um cristal cubóide durante a fase de esporulação (Widner e Whiteley, 1989; Yamamoto *et al.*, 1981). Uma banda protéica de aproximadamente 72 kDa foi verificada em SDS-PAGE (Figura 15).

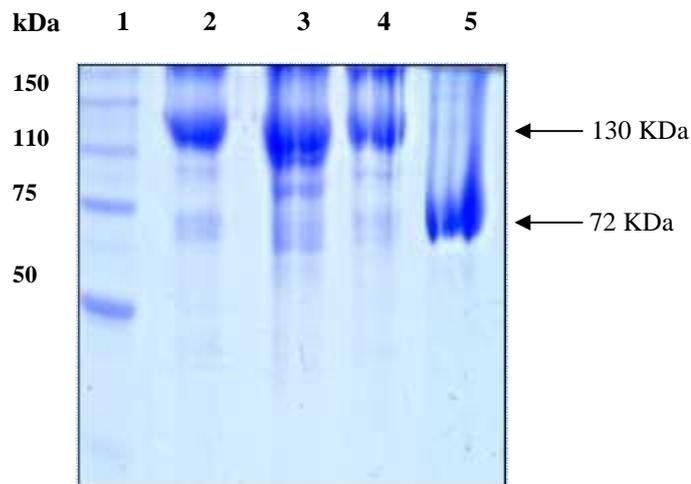


Figura 15. Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa, 3: proteína Cry1Ab, 4: proteína Cry1Ac e 5: proteína Cry2A.

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis* ao serem ingeridos pelas lagartas de *S. frugiperda* são solubilizados no intestino médio (pH alcalino), liberando uma ou mais proteínas Cry (Figura 16). Além disso, é necessário um ambiente redutor já que as pontes dissulfeto são abundantes na metade C-terminal das proteínas de 130 kDa. O intestino médio da maioria das larvas de insetos susceptíveis (lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros) apresenta alto pH e condições redutoras (Knowles, 1994). Entretanto, existem exceções como o caso da proteína Cry3A que se dissolve tanto em pH ácido (3,9 a 4,2) quanto em pH alcalino (9,5 a 11,3), permanecendo insolúvel em pH neutro (Koller *et al.*, 1992).

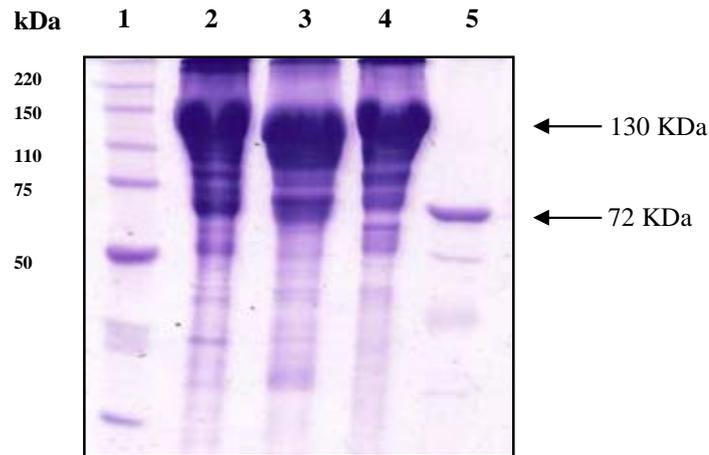


Figura 16. Perfil protéico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa, 3: proteína Cry1Ab, 4: proteína Cry1Ac e 5: proteína Cry2A

3.3 Ativação, quantificação e visualização das proteínas

Após a digestão por tripsinas, no intestino médio de insetos suscetíveis (Tojo e Aizawa, 1983), são originadas proteínas ativas de 60-70 kDa (Aronson et al., 1986; Höfte e Whiteley, 1989; Bravo et al., 2005). As toxinas Cry1A de 130 kDa são clivadas na porção N-terminal e C-terminal por proteases produzindo toxinas ativas de 60 kDa, aproximadamente (Li *et al.*, 1991). Foi verificada a presença de bandas protéicas com massa molecular de aproximadamente 65 kDa, mostrando que as proteínas foram clivadas por tripsina da maneira esperada (Figura 17).

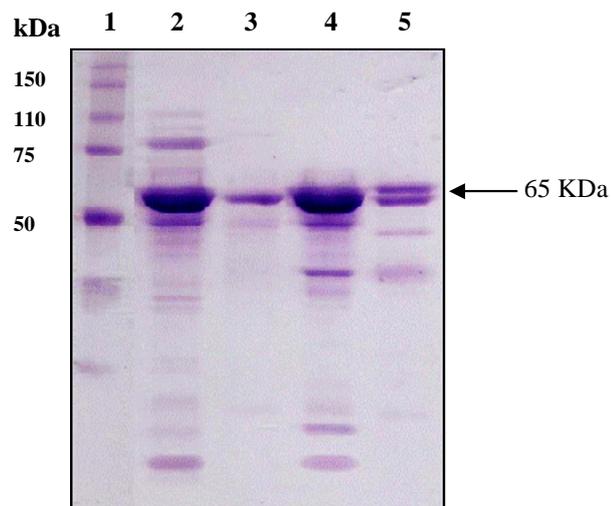


Figura 17. Perfil protéico obtido das proteínas solubilizadas e tripsinadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa, 3: proteína Cry1Ab, 4: proteína Cry1Ac e 5: proteína Cry2A.

3.4 Biotinilação das proteínas

As proteínas solubilizadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A foram biotiniladas com o kit ECL Protein Biotinylation System e resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% (Figura 18) identificando as proteínas ativas com bandas em torno de 65 kDa.

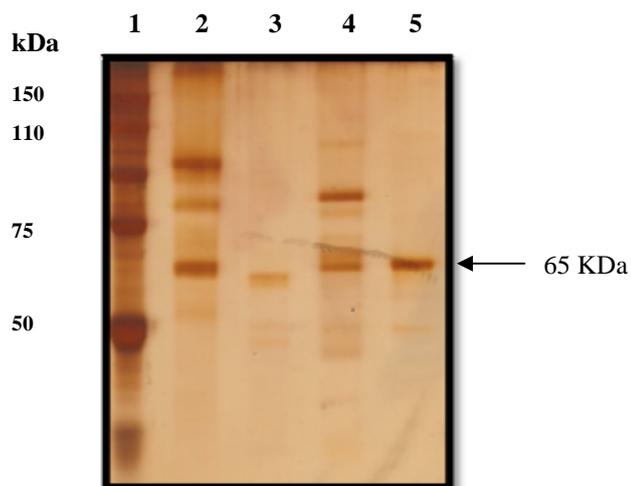


Figura 18. Perfil protéico obtido das proteínas solubilizadas, biotiniladas e tripsinadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador protein ladder (Promega), 2: proteína Cry1Aa, 3: proteína Cry1Ab, 4: proteína Cry1Ac e 5: proteína Cry2A.

3.5 Ensaio de ligação

Após incubação por 16h a revelação em membrana de nitrocelulose mostrou a presença de bandas protéicas, as quais foram obtidas após a aplicação de amostras contendo VMMA's de populações de *S. frugiperda* incubadas com as proteínas biotinizadas Cry1Aa e Cry2b (Figura 19), Cry1Ac (Figura 20A) e Cry2A (Figura 20B). Estes resultados indicam que existem ligações das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A as proteínas receptoras na membrana apical do intestino médio dos insetos testados. A ligação das toxinas marcadas com às VMMA's foi visualizada com streptoavidina - peroxidase conjugada (1:6000 - Amersham) por 1h seguida de incubação com SuperSignal chemiluminescence substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.



Figura 19. Ensaio de ligação a VMMA's de *S. frugiperda* com as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab. 1: Marcador Biotinylated Hig range (BioRad); 2: Cry 1Aa unida às VMMA's de *S. frugiperda* e 3: Cry 1Ab ligada às VMMA's de *S. frugiperda*.

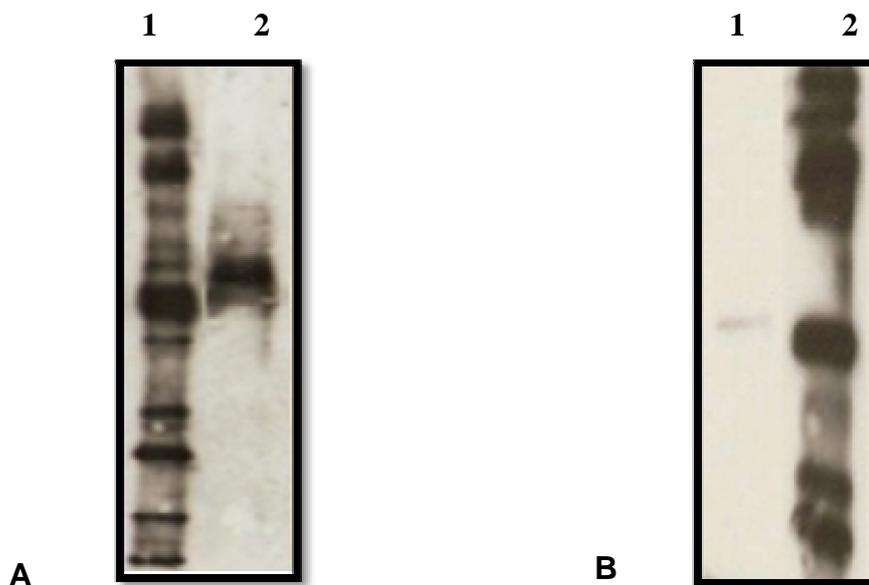


Figura 20 - Ensaio de ligação a VMMA de *S. frugiperda* com as proteínas Cry1Ac. 1: Marcador Biotinylated Hg range (BioRad); 2: Cry 1Ac unida às VMMA de *S. frugiperda*. (B) Ensaio de ligação a VMMA de *S. frugiperda* com as proteínas Cry1Ac. 1: Cry 1Ac unida às VMMA de *S. frugiperda*. 2: Marcador Biotinylated Hg range (BioRad);

Pelos ensaios realizados conclui-se que as proteínas testadas ligaram-se aos receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das lagartas de *S. frugiperda*, conforme seu modo de ação descrito por de Maagd *et al.*, (2001) e Bravo *et al.*, (2005).

Nas ligações obtidas ficaram evidentes diferentes intensidades de marcação entre as proteínas testadas. Uma relação direta pode ser relacionada entre a atividade tóxica encontrada nos bioensaios e a intensidade da marcação na membrana. As ligações das proteínas Cr1Aa e Cry1Ab (maior toxicidade nos bioensaios) foram de maior intensidade que as proteínas Cry1Ac e Cry2A. Ficou evidente também, que a proteína Cry2A que causou menor toxicidade a lagartas de *S. frugiperda* entre as proteínas testadas foi a que apresentou ligação de menor intensidade (Figura 20B).

A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (Van Rie et al., 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (Schnepf et al., 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (Van Rie et al., 1989; Monnerat e Bravo, 2000). A interação inicial está relacionada entre a toxina e o carboidrato do receptor, enquanto a irreversível está associada com uma interação proteína-proteína (Liang *et al.*, 1995).

Em relação às toxinas Cry1A, pelo menos quatro diferentes receptores (Figura 4) foram descritos em diferentes larvas de lepidópteros: a proteína do tipo caderina (CADR), uma fosfatase alcalina (FA) ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma aminopeptidase-N (APN) ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) e um glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007).

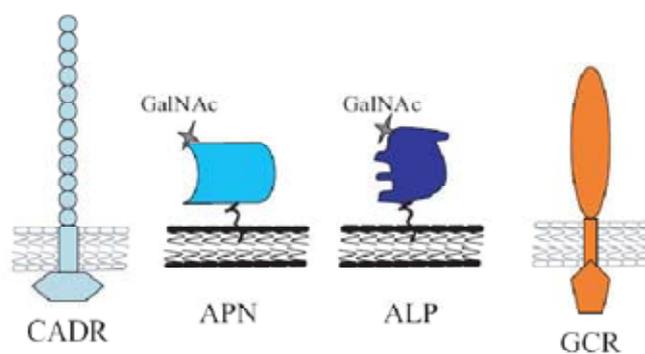


Figura 21 - Receptores moleculares das proteínas Cry1A. Receptor do tipo caderina (CADR); receptor aminopeptidase-N (APN); receptor fosfatase alcalina (ALP); receptor glicoconjugado de 270 kDa (GCR) (Bravo *et al.*, 2007).

A partir do processo de formação do poro, as toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isso causa um colapso na diferença de potencial da membrana, ocasionando uma má redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. Além disso, ocorre a alcalinização do citoplasma, interferindo no metabolismo celular normal e, conseqüentemente, ocorre morte celular e destruição do epitélio (Wolfersberg, 1992).

Assim que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso a hemolinfa (Du e Nickerson, 1996), ambiente no qual germinam. Tais eventos conduzem à lise das células epiteliais do intestino dos insetos e, finalmente, à morte dos insetos por inanição e septicemia (Dai e Gill, 1993; Monnerat e Bravo, 2000).

Este estudo comprovou que houve ligação das proteínas testadas a receptores de membrana apical do intestino médio da população de *S. frugiperda* configurando um dos passos importantes para a ação tóxica dessas proteínas contra insetos. Contudo, espera-se que novos estudos específicos possam identificar a que tipo específico de receptor cada proteína se liga, principalmente, para entendimento de possíveis mecanismos de resistência desse inseto a *Bt*. Segundo Ferré & Van Rie, (2002), o mecanismo de resistência melhor caracterizado é a alteração dos receptores específicos no intestino médio dos insetos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados dos bioensaios evidenciaram que todas as proteínas testadas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A) apresentaram toxicidade a larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. A proteína que apresentou maior toxicidade contra *S. frugiperda* foi a Cry1Aa, seguidas das proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. Os resultados obtidos evidenciaram que a atividade tóxica das proteínas Cry1Aa e a Cry1Ab tiveram eficiência cerca de dez vezes maior que Cry2A e Cry1Ac.

A análise de eletroforese em gel de poliacrilamida dos cristais protéicos e das proteínas solúveis revelou bandas de 130kDa para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e de 72kDa para a proteína Cry2A.

A ativação das proteínas foi demonstrada através de gel de poliacrilamida dos cristais protéicos e das proteínas solúveis e tripsinadas, com a identificação de bandas protéicas com massa molecular de aproximadamente 65 kDa, mostrando que as proteínas foram clivadas por tripsina da maneira esperada.

Os resultados dos ensaios de ligação com as membranas contendo as VMMAAs de populações de *S. frugiperda* demonstraram ligações quando submetidas à marcação com biotina das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. Estes resultados indicam que existem ligações dessas quatro proteínas a receptores de membrana apical do intestino médio da população de *S. frugiperda*.

Nas ligações obtidas ficaram evidentes diferentes intensidades de marcação entre as proteínas testadas. Uma relação direta pode ser relacionada entre a atividade tóxica encontrada nos bioensaios e a intensidade da

marcação na membrana. As ligações das proteínas Cr1Aa e Cry1Ab (maior toxicidade nos bioensaios) foram de maior intensidade que as proteínas Cry1Ac e Cry2A. Ficou evidente também que a proteína Cry2A causou menor toxicidade a lagartas de *S. frugiperda*. Entre as proteínas testadas foi a que apresentou ligação de menor intensidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Consulta de Produtos Formulados. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em: 21/05/2008.

ARONSON, A. I., BECKMAN, W., DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.** 50, 1-24, 1986.

ÁVILA, C.J.; DEGRANDE, P.E.; GOMEZ, S. A. Insetos-pragas: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: **Milho: informações técnicas**. Dourados, EMBRAPA, 1997. p.168-180. (Embrapa, circular técnica 5).

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248-254, 1976.

BRAVO, A., GILL, S.S., SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: **Comprehensive Molecular Insect Science**. Elsevier BV, Amsterdam, pp. 175–206 - 2005.

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

BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F., GONI, I. Effects of dietary fibre and tannins from apple pulp on the composition of faeces in rats. **British Journal of Nutrition**, London, v.67, n.3, p.463-473, 1992.

DAI, S. M. & GILL, S. S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CRYIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Bioch. and Molec. Biol.** 23: 273-283, 1993.

DU, C., NICKERSON, K. W. (1996). *Bacillus thuringiensis* HD73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**: 62, 3722-3726.

FERRE J, VAN RIE J.; Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Ann. Rev. Entomol.** 47:501-533 - 2002.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1971.

FRANÇA, F. H. (2004). Cotton Production in Brazil. Ministério da Agricultura. **Embrapa. Cenargen**. 23 p.

GALLO, D.; HAKANO, S.; SILVEIRA NETO, R. P. L.; CARVALHO, G. C.; DE BAPTISTA, E.; BERTI FILHO, J. R. P.; PARRA, R. A.; ZUCCHI, S. B.; ALVES, J. D.; VENDRAMIM, L. C.; MARCHINI, J.R.S.; LOPES, C. OMOTO. **Entomologia Econômica**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GRÜTZMACHER, A.D., J.F. MARTINS da S., CUNHA U.S. da. 2000. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea, p.87-101. In J.M.B. Parfitt (ed.), Produção de milho e sorgo em várzea. Pelotas, **Embrapa Clima Temperado**, 146p. (Documentos, 74).

HOFFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H., HÖFTE, J., VAN RIE, J., JANSSENS, H., VAN RIE, J., MELLAERT, J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85:7844-7848, 1988.

HOFTE, H., WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.**, 53 (2): 242-255, 1989.

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

KOLLER, C. N., BAUER, L. S., HOLLINGWORTH, R. M. (1992) Characterization of the pH mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. San Diego native δ -endotoxin crystal. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 184, n. 2, p. 692-699.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature** 227, 680 (1970)

LEE,W-J., LEE,J-D, Kravchenko,V.V., Ulevitch,R.J. and Brey, P.T. (1996) Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, *Bombyx mori*. **Proc. NatlAcad. Sci. USA**, 93, 7888–7893.

LERECLUS, D., AGAISSE, H., GOMITED, M., CHAUFAX, J. (1995) Overproduction encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spoOA mutant. **Bio/Technology** 13, 67-71.

LI, J., CARROLL, J AND ELLAR, D.J. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. **Nature**: 353, 815-821.

LIANG, Y., PATEL, S. S., DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **J. Biol. Chem.** 270:24719-24724, 1995.

DE MAAGD R.A, BRAVO A, CRICKMORE N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends Genet.** 17:193–99.

MARTINS, E. S. Clonagem, Expressão e Análise da Patologia de Proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis*, em insetos-praga. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde – Pós graduação em Patologia Molecular. 123 páginas. Brasília, 2005.

MONNERAT, R. G.; Identificação, caracterização e disponibilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes ao controle de lepidópteros desfoliadores da cultura do algodão. **Embrapa Cenargen**. Relatório Final Facual. Brasília, 2003.

MONNERAT, R. G, BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Controle Biológico, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L, Jaguariúna, SP, **Embrapa Meio Ambiente, Vol. 3**, p.163-200, 2000.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 65 p.

RAVOAHANGIMALALA, O., CHARLES, J. F., SCHOELLER-RACCAUD, Y. J. Immunological localization of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* toxin in midgut cells of intoxicated *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). **Res. Microbiol.** 44, 271-278, 1993.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN REIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D.R., DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p. 775-806, 1998.

SCHMIDT, F.G.V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. 2001. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

THOMAS, W. E. & ELLAR, D. J. (1983) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **J. Cell Sci.** 60, 181-197.

TOJO A., AIZAWA, K.; Dissolution and degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by gut juice protease of the silkworm *Bombix mori*. *Appl Environ Microbiol* 45: 576-580, 1983.

VAN RIE, J., JANSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D., VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the mid-gut of target insects. **European Journal of Biochemistry**: 186, 239-247 - 1989.

WAQUIL, J.M. et al. Controle da lagarta-do-cartucho em milho com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.163-166, 1982.

HOFTE H., WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** 53, 242–25 – 1989.

WOLFERSBERG, M. G.; ATPase-energized epithelia and biological insect control. **The Journal of experimental biology**: 172, 377-386 - (1992).

YAMAMOTO, T., MCLAUGHLIN, R.E. Isolation of a protein from the paraesporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.103, p.414-421, 1981.

- ANEXO A -

**INSETICIDAS REGISTRADOS PELO MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO PARA O
CONTROLE DE *A. ipsilon* e *S. frugiperda* NA CULTURA DO
MILHO.**

Tabela A1 - Inseticidas registrados para o controle de *Agrotis ipsilon* na cultura do milho

Ingrediente ativo	Nome comercial	Formulação	Classe	Fabricante
Carbaryl	Carbaryl Fersol 480 SC	SC	II	Fersol
	Carbaryl Fersol Pó 75	DP	III	Fersol
carbofuran	Furadan 350 TS	SC	I	FMC
	Ralzer 350 SC	SC	I	Fersol
terbufos	Counter 150 G	GR	I	Basf
	Counter 50 G	GR	I	Basf
chlorpyrifos	Lorsban 480 BR	EC	II	Dow AgroScience
	Vexter	EC	II	Dow AgroScience
cypermethrin	Galgotrin	EC	II	Chemotécnic a Sintyal
lambdacyhalothrin	Karate Zeon 250 CS	CS	III	Syngenta
permethrin	Pounce 384 CE	EC	II	FMC

Tabela A2 - Inseticidas registrados para o controle de *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Formulação	Classe	Fabricante
alpha-cypermethrin	Fastac 100 SC	SC	III	Basf
beta-cyfluthrin	Bulldock 125 SC	SC	II	Bayer
	Full	EC	II	Bayer
	Novapir	EC	II	Cheminova
	Turbo	EC	II	Bayer
Carbaryl	Carbaryl Fersol 480 SC	SC	II	Fersol
	Carbaryl Fersol Pó 75	DP	III	Fersol Ltda.
	Sevin 480 SC	SC	II	Aventis
carbofuran	Carbofuran	SC	I	Dow
	Sanachem 350 TS			AgroScience
	Carboran Fersol 350 SC	SC	I	Fersol
	Diafuran 50	GR	I	Hokko
	Furadan 350 TS	SC	I	FMC
	Furadan 50 G	GR	III	FMC
	Ralzer 350 SC	SC	I	Fersol

Ingrediente ativo	Nome comercial	Formulação	Classe	Fabricante
	Ralzer 50 GR	GR	I	Fersol
chlorfenapyr	Pirate	SC	III	Basf
chlorfluazuron	Atabron 50 CE	EC	I	Ishihara
chlorpyrifos	Astro	EW	III	Bayer
	Clorpirifós Fersol 480 CE	EC	II	Fersol
	Clorpirifos Sanachem 480 CE	EC	I	Dow AgroScience
	Klorpan 480 CE	EC	II	Agripec
	Lorsban 480 BR	EC	II	Dow AgroScience
	Nufos 480 CE	EC	III	Cheminova
	Pyrinex 480 CE	EC	II	Agricur
	Sabre	EW	III	Dow AgroScience
	Vexter	EC	II	Dow AgroScience
cyfluthrin	Baytroid CE	EC	III	Bayer
cypermethrin	Arrivo 200 CE	EC	III	FMC
	Cipermetrina Nortox 250 CE	EC	I	Nortox
	Cipertrin	EC	II	Prentiss
	Commanche 200 CE	EC	III	FMC.
	Cyptrin 250 CE	EC	I	Agripec
	Galgotrin	EC	II	Chemotécnic a Sintyal
	Ripcord 100	EC	II	Basf
deltamethrin	Decis 25 CE	EC	III	Aventis
	Decis 4 UBV	UL	III	Aventis
	Decis 50 SC	SC	IV	Aventis
	Decis Ultra 100 CE	EC	I	Aventis
	Keshet 25 CE	EC	I	Agricur
deltamethrin + triazophos	Deltaphos	EC	I	Aventis
diflubenzuron	Dimilin	WP	IV	Uniroyal
enxofre	Kumulus DF	WG	IV	Basf
esfenvalerate	Sumidan 25 CE	EC	I	Sumitomo
etofenprox	Trebon 300 CE	EC	III	Sipcam
fenitrothion	Sumibase 500 CE	EC	II	Sumitomo
	Sumithion 500 CE	EC	II	Sumitomo
fenpropathrin	Danimen 300 CE	EC	I	Sumitomo
furathiocarb	Promet 400 CS	SL	III	Syngenta
lambda- cyhalothrin	Karate 50 CE	EC	II	Syngenta
	Karate Zeon 250 CS	CS	III	Syngenta
	Karate Zeon 50 CS	CS	III	Syngenta

Ingrediente ativo	Nome comercial	Formulação	Classe	Fabricante
lufenuron	Match CE	EC	IV	Syngenta
malathion	Malathion 500 CE	EC	III	Action
	Sultox			
methomyl	Lannate BR	SL	I	Du Pont
	Lannate Express	SL	II	Du Pont
	Methomex 215 LS	SL	II	Agricur
methoxyfenozid e	Intrepid 240 SC	SC	IV	Dow AgroScience
	Valient	SC	IV	Bayer
monocrotophos	Agrophos 400	SL	I	Agripec
novaluron	Gallaxy 100 CE	EC	IV	Agricur
	Rimon 100 CE	EC	IV	Agricur
parathion- methyl	Bravik 600 CE	EC	I	Action
	Folidol 600	EC	II	Bayer
	Folidol ME	CS	III	Bayer
	Folisuper 600 BR	EC	I	Agripec
	Mentox 600 CE	EC	II	Prentiss
	Paracap 450 MCS	CS	III	Cheminova
	Parathion Metílico Pikapau	DP	I	Químicas São Vicente
permethrin	Ambush 500 CE	EC	II	Syngenta
	Corsair 500 CE	EC	II	Aventis.
	Permetrina Fersol 384 CE	EC	I	Fersol
	Piredan	EC	II	Du Pont
	Pounce 384 CE	EC	II	FMC
	Talcord 250 CE	EC	II	Basf
	Valon 384 CE	EC	II	Dow AgroScience
profenofos	Curacron 500	EC	III	Syngenta
pyridaphenthion	Ofunack 400 CE	EC	III	Sipcam
spinosad	Credence	SC	III	Dow AgroScience s
	Tracer	SC	III	Dow AgroScience
tebufenozide	Mimic 240 SC	SC	IV	Dow AgroScience
thiodicarb	Futur 300	SC	III	Aventis.
thiodicarb	Futur 300	SC	III	Aventis.
	Larvin 800 WG	WG	II	Aventis.
	Semevin 350	SC	III	Aventis
triazophos	Hostathion 400 BR	EC	I	Aventis.
trichlorphon	Dipterex 500	SL	II	Bayer
	Triclorfon 500 Milena	SL	II	Milena

Ingrediente ativo	Nome comercial	Formulação	Classe	Fabricante
triflumuron	Alsystin 250 PM	WP	IV	Bayer
	Alsystin 480 SC	SC	IV	Bayer.
	Brigadier	WP	II	Bayer
	Certero	SC	IV	Bayer
	Rigel	SC	IV	Cheminova
zeta-cypermethrin	Fury 180 EW	EW	II	FMC
	Fury 200 EW	EW	III	FMC
	Fury 400 CE	EC	II	FMC

- ANEXO B -

PRODUTOS FORMULADOS À BASE DE *B. thuringiensis*

(*Bt*) COMERCIALIZAZOS NO MUNDO.

Tabela B1 – Principais bioinseticidas comerciais formulados à base de *B. thuringiensis*.

Empresa	Nome comercial	Variedade	Ordem	Proteínas
Abbott Labs.	Dipel, Biobit	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Gnatrol	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
	Novodor Xentari	<i>tenebrionis aizawai</i>	C L	3Aa3 1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1
	Dibeta	N.D.	N.D.	β-exotoxina
American Cyanamid	Acrobe	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Bactec	Bernan Bt	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Bthek Biotecnologia	Bt-horus	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
	Ponto Final	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Biochem Products	Bactmos	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Compagnia di Ricerca chim. CRC	Bactis	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Bactucide	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
	Exobac	N.D.	N.D.	β-exotoxina
Ecogen Inc.	Lepinox (R)	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ac, 2A, 1F-
	Crymax	ED7826	L	1Ac (R)
	Raven	<i>kurstaki</i>	C	1Ac, 2A, 1C (R)
	Condor	ED7841	L	1Ac, 3A, 3Bb (R)
	Cutlass (T)	<i>kurstaki</i>	L	Transconjugante
	Foil	EG7673	L/C	Transconjugante
		<i>kurstaki</i> (T)		1Ac, 3Aa (T)
		<i>kurstaki</i> (T)		
		<i>kurstaki</i> (T)		

Empresa	Nome comercial	Variedade	Ordem	Proteínas
Farbwerke-Hoechst	Biospor	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B
Fermenta ASC Co.	Cutlass	<i>kurstaki</i>	L	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B
Glavmikrobioprom	Dendrobacillin	<i>dendrolimus galleriae</i>	L	N.D.
	Endobacterin	<i>tolworthi</i>	L	1Cb1
	Eksotoksin	<i>thuringiensis</i>	N.D.	β -exotoxina
	Insektin	<i>tolworthi</i>	L	1Ba1
Toxobacterin		N.D.	β -exotoxina	
Jewin-Joffe Industry Limeted	Bitayon	N.D.	L	N.D.
Knoll Bioproducts	Larvo-Bt	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Korea Explosives	Bt	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Kyowa-Hatto Kogyo Co.	Selectgyn	<i>aizawai</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1
Liebec	Sporine	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Merck	Agritol	N.D.	N.D.	N.D.
Mycogen	Mattch	<i>Pseudomonas sp (EC)</i>	L	EC.
	MTrak (R)		L	3A (EC)
	MVP (R)	<i>Pseudomonas sp (EC)</i>	C	EC.
		<i>Pseudomonas sp(EC)</i>		
Phillips Duphar	Bactospeine	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Bactimos	<i>israelensis</i>	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa
Procida	Plantibac	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
Radonja	Baturad	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1
	Nubilacid	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1

Empresa	Nome comercial	Variedade	Ordem	Proteínas
Sandoz Corp.	Javelin	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1,
	Thuricide	<i>kurstaki</i>	L	2Ab1
	Certan	<i>aizawai</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1,
	Teknar	<i>israelensis</i>	D	2Ab1
	Trident	<i>tenebrionis</i>	C	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1, 4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa 3 A
Scientific & Technology Developing	Bt 8010, Rijin	N.D.	L	N.D.
SDS Biotech K.K.	Delfin, Thuricide	N.D.	L	N.D.
Thermo Trilogy Corporation	Able	<i>kurstaki</i>	L	N.D.
	Agree	<i>aizawai</i> -GC91	L	Transconjugante
	Teknar	(T)	D	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1,
	Thuricide	<i>israelensis</i>	L	CytAa
	Javelin,	<i>kurstaki</i>	L	1Aa1, 1Ab1,
	Delfin,	<i>kurstaki</i> -SAH	L	1Ac1, 2Aa1,
	CoStar	<i>kurstaki</i> -SA12	L	2Ab1
Steward	<i>kurstaki</i>	L	N.D.	
Trident	<i>tenebrionis</i>	C	N.D.	
Tuticorin Alkali Chemicals and Fertilisers Limited	Spicturin	<i>galleriae</i>	L	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1, 3Aa1
			L	1Cb1

Legenda: L: lepidoptera, C: coleoptera, D: diptera. Fonte: (Cerón, 2004)