

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE AGRONOMIA

AMANDA ROBERTA SAMPAIO

**PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis  
includens* Walker, 1857 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

DOIS VIZINHOS

2017

AMANDA ROBERTA SAMPAIO

**PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis includens* Walker, 1857 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso Superior de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de "Engenheira Agrônoma".

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Samara Ernandes

Co-orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Everton Ricardi Lozano da Silva

DOIS VIZINHOS

2017



Ministério da Educação  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Campus Dois Vizinhos  
Diretoria de Graduação e Educação Profissional  
Coordenação do Curso de Agronomia



---

## TERMO DE APROVAÇÃO

PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis includens*  
Walker, 1857 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

por

AMANDA ROBERTA SAMPAIO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 22 de novembro de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro(a) Agrônomo(a). A candidata foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Profª Orientadora Drª Samara Ernandes  
UTFPR - Dois Vizinhos

---

Membro titular - Profª Drª Michele Potrich  
UTFPR - Dois Vizinhos

---

Membro titular - Drª Suzana Costa Wrublack  
Unioeste - Francisco Beltrão

---

Responsável pelos Trabalhos  
de Conclusão de Curso

---

Coordenador do Curso  
UTFPR – Dois Vizinhos

## RESUMO

SAMPAIO, Amanda Roberta. **PATOGENICIDADE DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis includens* Walker, 1857 (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**. 2017. 30 p. Trabalho de Conclusão de Curso - Coordenação do Curso de Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

O controle biológico tem ganhado destaque em pesquisas por ser um meio natural de diminuir populações de insetos-praga, sobretudo com a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Logo, é considerado uma estratégia ecologicamente correta por controlar as espécies alvo, na maioria das vezes com eficácia, não agredindo a natureza e sendo mais seletiva às populações não alvo. Uma das pragas de grande importância na cultura da soja e hortaliças é *Chrysodeixis includens* Walker, 1857 (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta falsa-medideira, considerada de difícil controle. Nesse contexto, a pesquisa por estratégias de controle para *C. includens*, se faz necessário, assim como a condução de estudos de base para o desenvolvimento de novos produtos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar molecularmente e avaliar a patogenicidade de linhagens de *B.thuringiensis*, isoladas do solo, sobre *C. includens*. As amostras de solo para o isolamento de Bt foram coletados em diferentes pontos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos/PR. Estas linhagens foram mantidas refrigeradas em placas de Petri com meio de cultura ágar-nutriente e repicadas periodicamente. Antes da avaliação de patogenicidade foi feita uma pré-seleção das linhagens por meio de análise molecular, identificando a presença dos genes *cry1* e *cry2*, utilizando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação da Polimerase em Cadeia), onde foi possível selecionar cinco amostras que possuem os dois genes, sendo essas as testadas nos bioensaios com *C. includens*. As cinco linhagens foram quantificadas e posteriormente foi realizada a contagem de esporos viáveis pela técnica da “microgota”, para a determinação dos esporos viáveis ajustando a concentração de UFC utilizada nos bioensaios, que ficou na ordem de  $10^8$  ou  $10^7$ . Foram micropipetados 50  $\mu$ L do cultivo de cada linhagem de *B. thuringiensis*, sobre superfície da dieta artificial para *C. includens*, previamente distribuída em placas de cultivo de células com 12 poços, onde colocou-se um inseto por poço, utilizando cinco placas por tratamento (n= 60 insetos). A avaliação foi realizada com 12, 24, 48 e 72 horas após o início do bioensaio, quantificando-se o número de lagartas mortas. Quatorze linhagens de Bt já isoladas das amostras de solo da UTFPR foram submetidas as análises molecular, das quais apenas cinco apresentaram os genes *cry1* e *cry2* (EM41P, PR31P, FR31P, RR14P e PR11P). As cinco linhagens selecionadas causaram mortalidade que variou de 85% a 100% em larvas de segundo ínstar de *C. includens*, ao final de 72 horas de avaliação, não diferindo significativamente da testemunha positiva. Tais resultados indicam um elevado potencial bioinseticida das novas linhagens identificadas. Durante todo o período de avaliação as linhagens causaram mortalidades semelhantes as Dipel WP, não diferindo estatisticamente deste, com exceção da linhagem PR11P, que na avaliação de mortalidade realizada com 12 horas obteve diferença significativa quando comparada ao Dipel WP. Onze das quatorze linhagens isoladas do solo da UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos possuem o gene *cry2*. Cinco delas também tiveram resultado positivo para a amplificação do gene *cry1* e estas, testadas em bioensaios mostraram elevado potencial no controle de *Chrysodeixis includens*.

**Palavras chave:** Bioinseticida. Controle biológico. Lagarta falsa-medideira. Bactéria entomopatogênica.

## ABSTRACT

Biological control has gained prominence in research because it is a natural means of decreasing populations of insect pests, especially with the use of the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt). Therefore, it is considered an ecologically correct strategy to control the target species, most often with effectiveness, not attacking nature and being more selective to non-target populations. One of the pest of great importance in soybean and vegetable crops is *Chrysodeixis includens* Walker, 1857 (Lepidoptera: Noctuidae), popularly known as a false-moth caterpillar, considered difficult to control. In this context, the search for control strategies for *C. includens* is necessary, as well as the conduction of basic studies for the development of new products. In view of the above, the objective of this work was to identify molecularly and to evaluate the pathogenicity of isolates of *B. thuringiensis*, isolated from the soil, on *C. includens*. Soil samples for Bt isolation were collected at different points of the Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos / PR. These lines were kept refrigerated in petri dishes with agar-nutrient culture medium and periodically peeled. Before the pathogenicity evaluation, a pre-selection of the strains was done by means of molecular analysis, identifying the presence of *cry1* and *cry2* genes, using PCR (Polymerase Chain Reaction), where it was possible to select five samples that have the two genes, these being those tested in the bioassays with *C. includens*. The five strains were quantified and the spore counts viable were determined by the "microgota" technique, to determine the viable spores by adjusting the concentration of CFU used in the bioassays, which was on the order of 10<sup>8</sup> or 10<sup>7</sup>. 50 µL of culture of each *B. thuringiensis* strain on the artificial diet surface for *C. includens*, previously distributed in 12-well cell culture plates, where one insect was placed per well using five dishes per treatment (n = 60 insects). The evaluation was performed at 12, 24, 48 and 72 hours after the start of the bioassay, quantifying the number of dead caterpillars. Fourteen Bt strains isolated from the UTFPR soil samples were submitted to molecular analyzes, of which only five presented the *cry1* and *cry2* genes (EM41P, PR31P, FR31P, RR14P and PR11P). The five selected strains caused mortality ranging from 85% to 100% in second instar larvae of *C. includens*, at the end of 72 hours of evaluation, and did not differ significantly from the positive control. These results indicate a high bioinsecticidal potential of the new identified strains. Throughout the evaluation period the lineages caused similar mortalities to Dipel WP, not statistically differing from this, except for the PR11P lineage, which in the evaluation of 12 - hour mortality obtained a significant difference when compared to Dipel WP. Eleven of the fourteen strains isolated from the soil of UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos have the *cry2* gene. Five of them also had positive results for *cry1* gene amplification and these, tested in bioassays showed high potential in the control of *Chrysodeixis includens*.

**Keywords:** Bioinsecticide. Biological control. False-medideira caterpillar. Entomopathogenic bacteria.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>5</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>8</b>
3.1 <i>Chrysodeixis includens</i> (Walker, 1857) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) .....	8
3.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA .....	10
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
4.1 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE <i>B. thuringiensis</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR.....	13
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE <i>B. thuringiensis</i> PARA UTILIZAÇÃO NOS BIOENSAIOS 14	
4.3 EFEITO DAS LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> SOBRE <i>Chrysodeixis includens</i> , EM LABORATÓRIO.....	17
4.3.1 Criação massal de <i>Chrysodeixis includens</i> .....	17
4.3.2 Bioensaio: avaliação das linhagens de <i>Bacillus thuringiensis</i> sobre <i>Chrysodeixis includens</i> .....	18
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE <i>Bacillus thuringiensis</i> ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR.....	20
5.2 EFEITO DAS LINHAGENS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> SOBRE <i>Chrysodeixis includens</i> , EM LABORATÓRIO .....	22
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O atual cenário mundial está focado em atividades e ações que consigam suprir as necessidades atuais dos seres humanos sem comprometer o futuro das próximas gerações. Neste sentido, a agricultura sustentável está ganhando destaque e, visando a não contaminação do solo, água e atmosfera, os agroquímicos devem ser evitados ou terem a sua utilização minimizada. Para suprir a necessidade no controle de pragas, o controle biológico apresenta-se como uma alternativa ou complemento aos métodos de controle usuais.

Um dos insetos-praga chave de várias culturas é *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida popularmente como lagarta falsa-medideira. Em sua fase larval ataca as folhas, diminuindo a área fotossintética da planta e, conseqüentemente, afetando a produtividade dos cultivos.

*Chrysodeixis includens* é considerada uma praga de difícil controle devido à polifagia, à amplitude geográfica dos cultivos, longos e quentes veranicos, às aplicações calendarizadas e indiscriminadas de inseticidas químicos sintéticos, que têm selecionado populações resistentes e ao crescimento dos cultivos “safrinha”, dentre outros. Devido a sua ocorrência e potencial de dano, para o seu controle é empregada uma grande quantidade de inseticidas químicos sintéticos.

Além dos inseticidas sintéticos, a bactéria *Bacillus thuringiensis* apresenta potencial de controle de *C. includens*. *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica que ocorre naturalmente em todos os agroecossistemas, sendo facilmente encontrada nos solos, e pode ser adotada para controle de lepidópteros, dípteros, coleópteros, nematóides, e outros que ainda vem sendo estudados.

Diante da importância de *C. includens* na redução da produção de grãos e da demanda de insumos biológicos para o controle desse inseto tanto nos sistemas convencionais, quanto nos sistemas alternativos de produção, faz-se necessária a pesquisa de agentes de controle biológico, como *B. thuringiensis*. Logo, a pesquisa de isolados que sejam específico para *C. includens* se faz necessário, visto que esta praga ataca além de grandes culturas, muitas hortaliças, cultivos onde o controle biológico é utilizado em maior escala no Brasil.

Para este patógeno ser usado no controle biológico é de extrema importância o isolamento, identificação e avaliação de novas linhagens eficientes no

controle de pragas, como *C. includens*, uma vez que cada linhagem pode apresentar efeitos variados para diferentes espécies de insetos. Este trabalho é a base para o desenvolvimento de possíveis bioinseticidas que possam ser utilizados no controle de *C. includens* com eficiência. Desta forma, pode ser interessante do ponto de vista sustentável e econômico avaliar a patogenicidade de novas linhagens de *B. thuringiensis* isoladas do solo em pragas que causam danos significativos à agricultura.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a patogenicidade de linhagens de *Bacillus thuringiensis*, isoladas de solo sobre *Chrysodeixis includens*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar geneticamente, quanto à presença de genes *cry*, as linhagens de *B. thuringiensis* isoladas;
- Avaliar o efeito inseticida de linhagens de *B. thuringiensis* sobre *C. includens*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Antigamente denominada como *Pseudoplusia includens*, a lagarta falsa-medideira ou lagarta mede-palms, como é popularmente conhecida, hoje pertence ao gênero *Chrysodeixis* devido à sua reavaliação feita em 2003 por Goater et al.. Seu nome popular se deve ao modo como se desloca na fase larval, medindo palms.

A fase larval dura de 14 a 20 dias, no qual passa por seis ínstaes e, neles os insetos possuem coloração verde clara, listras longitudinais esbranquiçadas e pontos pretos ao longo do dorso. Seu tamanho, no último estágio desta fase, chega a aproximadamente 40 a 45 mm de comprimento e, a partir de então, começa a tecer uma teia, na maioria das vezes, na face abaxial da folha onde empupa. Sua pupa, também de coloração verde clara, fica protegida e dali emergem os adultos, as mariposas, que apresentam asas dispostas de forma inclinada e com manchas prateadas no centro do primeiro par de asas. As fêmeas podem atingir uma oviposição de 600 ovos e viver de 15 a 18 dias (SOSA-GÓMEZ, et al., 2014). Seus ovos, logo após a oviposição, são de coloração creme-clara e, com o passar de 2,5 dias, próximos à eclosão, se tornam marrom-claro (MOSCARDI et al., 2012).

O desenvolvimento de *C. includens* é favorecido na ausência de chuvas e em lavouras desequilibradas biologicamente, onde há poucos inimigos naturais (CARVALHO, et al., 2012). Ocorre em toda a América e, no Brasil tem maior incidência no Oeste da Bahia, e em estados como Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (MOSCARDI, et al., 2012).

Na literatura a lagarta falsa-medideira tem sido citada como hóspede de uma grande variedade de plantas indo desde grandes culturas como algodão e soja até mesmo em plantas daninhas, olerícolas e ornamentais (MOSCARDI, 2012). Porém, mesmo com essa grande gama de hospedeiros a sua melhor adaptação acontece em soja (BERNARDI, 2012). *Chrysodeixis includens* já foi considerada praga secundária desta cultura, porém cada vez ganha mais destaque na soja,

apresentando prejuízos mais significativos e tendo maior importância econômica (CARVALHO, et al. 2012).

Em soja, *C. includens*, em seu estágio inicial, prefere consumir folhas mais jovens do terço inferior, porém, conforme se desenvolve, deixa de ter preferências e consome até mesmo as folhas mais fibrosas (BERNARDI, 2012; BUENO et al., 2007). É típico dano desta praga o aspecto rendilhado da folha após o ataque, pois a lagarta falsa-medideira não se alimenta das nervuras, apenas do limbo foliar, diminuindo a área fotossintética da planta (FREITAS, 2011; CARVALHO, et al., 2012; SOSA-GÓMEZ et al. 2014)

A importância de *C. includens* se deve não apenas aos surtos em soja, mas ao seu grande número de hospedeiros, podendo chegar a 73 espécies de plantas (BUENO et al., 2007). Segundo Carvalho et al. (2012) a polifagia pode colaborar com o sucesso da praga, já que esta pode se desenvolver em diferentes plantas na mesma região.

Em *Solanum tuberosum* (Batateira), Silva (2016) afirma ser a falsa-medideira a principal praga desfolhadora da cultura, verificando em seus estudos que 45 dias após o plantio o Nível de Dano Econômico varia entre 0,14 lagartas por planta e 1,36 lagartas por planta, sendo que o Nível de Controle então se situa em 0,11 e 1,08 lagartas por planta.

A cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) também têm sofrido muito com o ataque de *C. includens*, principalmente pelo fato de ser semeado logo após a colheita da soja. No algodão, a espécie ataca a parte inferior das plantas, o que dificulta seu controle e favorece a infestação (ANDRADE JUNIOR; VILELA, 2009).

De acordo com Bueno et al. (2007) o surto de lagartas falsa-medideira foi fortalecido pelo agroecossistema desequilibrado causado pelo uso, favorecendo o aumento de população da praga agrícola desenfreado de inseticidas químicos sintéticos não-seletivos, sem seguir critérios técnicos estabelecidos, que acabam levando à morte também inimigos naturais. Além disso, o aumento na aplicação de fungicidas após o aparecimento da ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, diminuiu a incidência de fungos entomopatogênicos que antes equilibravam naturalmente populações de algumas pragas.

### 3.2 *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS-PRAGA

O gênero *Bacillus* é o maior da família Bacillaceae e são essas bactérias os mais promissores agentes para utilização no controle microbiano de insetos, pois produzem esporos bastante resistentes às adversidades do ambiente, podem ser mantidos na forma de pó ou emulsão e são altamente específicos, não causando danos ao ambiente e às espécies benéficas (MORAES; CAPALBO; ARRUDA, 2001).

*Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911) (Bt) é uma bactéria gram-positiva, esporulante, geralmente móvel, produtora de cristais proteicos com atividade inseticida. Devido à variedade de metabólitos produzidos, caracteriza-se como a principal bactéria entomopatogênica (ANGELO; VILAS-BÔAS; CASTRO-GÓMEZ, 2010).

Segundo Capalbo et al. (2005), inseticidas microbianos à base de Bt são os mais bem sucedidos, utilizados no cultivo de grãos, proteção florestal e na saúde pública combatendo vetores de doenças humanas. Finkler et al. (2010) afirmam que para a produção em escala comercial de *B. thuringiensis* é essencial a produção de esporos.

Durante a fase de esporulação esta bactéria sintetiza cristais proteicos (proteínas *Cry*) que conferem sua entomopatogenicidade em ordens Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Dictyoptera, Orthoptera, Mallophaga, Strongylida, Tylenchida, Diplomonadida e Acari, sendo que os perfis de toxicidade distintos são determinados pela combinação de genes *cry* que a mesma apresenta, os quais codificam as proteínas (CAPALBO, et al., 2005). Além das proteínas *Cry* ou  $\delta$ -endotoxina produzidas durante a esporulação em condições nutricionais desfavoráveis, *B. thuringiensis* produz também  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas (VIPs) que podem aumentar a toxicidade da linhagem (LIMA, 2010).

Os cristais proteicos juntamente com os esporos ingeridos por insetos da ordem Lepidoptera causam uma ruptura e paralisia do epitélio do intestino médio das lagartas, reduzindo sua alimentação em 95% em poucas horas, o que evita a desfolha à nível de dano econômico. Essas lesões servem como abertura para a

mistura entre a hemolinfa e o conteúdo do intestino da praga e a germinação dos esporos dentro do inseto, matando-o por septicemia. (MOSCARDI, 2003).

Ramos (2008) aponta *B. thuringiensis* como uma bactéria de baixa periculosidade ambiental devido aos resultados encontrados em sua pesquisa, a qual avaliou o efeito adverso de um produto comercial à base de Bt em peixes, caramujos e camundongos (espécies não-alvo), apresentando resultados satisfatórios com a linhagem por ele testada.

Em 2000, o Dipel® foi o produto a base de Bt com maior alcance no mercado mundial apresentando baixa toxicidade a ácaros, coleópteros, dípteros, hemípteros, mas servindo como controle para 170 lepidópteros-praga (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). O conjunto de espécies do gênero *Bacillus* (*B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. moycoides* e *B. weihenstephanensis*) em 2003 era responsável por 90% dos biopesticidas disponíveis no mercado (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Em 2009, 8,7% das casas de vegetação do Brasil faziam uso do controle biológico, representado principalmente pelo *B. thuringiensis*, pois é o de mais fácil acesso, estando disponível facilmente no mercado (PALLINI, 2009). Apenas no Paraná há 14 marcas comerciais de *Bacillus thuringiensis* liberadas, sendo que a maioria se aplica em todas as culturas, sendo citadas muitas olerícolas, com presença do alvo biológico (*Helicoverpa spp.*, *Anticarsia gemmatalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*, entre muitos outros) e poucos deles têm restrições no uso (AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ, 2017).

É importante o isolamento desta bactéria, para buscar novas linhagens que sejam eficazes para outros insetos-praga pela diversidade de toxinas e suas diferentes combinações, minimizando os riscos de resistência dos mesmos (LIMA, 2010). Segundo Lobo (2015) os índices de isolamento de *B. thuringiensis* têm se mostrado variados nas diferentes regiões do país. Em seu trabalho, obteve um percentual de 31,26% de *B. thuringiensis* nas 1225 colônias bacterianas obtidas de 39 amostras do solo do Cerrado Maranhense.

Além dos diferentes índices de isolamento, Wang (2003) percebe uma variação também na distribuição de genes *cry* entre estudos em diferentes locais, o que se dá pelas características biológicas, geográficas e ecológicas do local onde a amostra foi coletada para o isolamento de *B. thuringiensis*. A associação de duas ou

mais classes de toxinas em uma mesma linhagem pode indicar uma atividade sinérgica que potencializa o poder de toxicidade dessas linhagens, trazendo melhores resultados (LOBO, 2015).

Wang (2003) em seu trabalho com 310 isolados de *B. thuringiensis* de diversas regiões da China mostrou alta tendência dos genes *cry1* e *cry2* ocorrerem simultaneamente, enquanto *cry9* não demonstrou tendência de estarem associados a genes *cry1* e *cry2*. Apesar da especificidade de cada gene, Constanski et al (2015) verificou a morte de lepidópteros com um isolado que não continha os genes *cry1* nem *cry2*.

Utilizando alguns métodos de controle de *C. includens*, Borges (2016) obteve os melhores resultados com a utilização de *B. thuringiensis*, comparando com Flubendiamida (tratamento químico) e com o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*, no qual os tratamentos com a bactéria obtiveram eficiência na mortalidade dos insetos superior a 80%.

Outro estudo recente foi conduzido por Carvalho (2017) que obteve resultados satisfatórios de mortalidade de pragas com *B. thuringiensis*. Este utilizou 50 linhagens da bactéria pertencentes ao Banco de Microrganismo da Embrapa Milho e Sorgo, que já haviam sido isoladas de amostras de solo e de lagartas mortas de diversas regiões do Brasil e, quatro delas apresentaram patogenicidade com índice de mortalidade de 100% para *C. includens* em primeiro ínstar. Estas quatro cepas foram as selecionadas para as análises moleculares quanto à presença dos genes *cry1*, *cry2* e *cry9*, junto com outras quatro cepas que obtiveram mortalidade de 27 a 33% e duas com mortalidade de 4 a 5%, obtendo nestas 10 cepas maior frequência dos genes *cry2*, seguido do *cry1*. O *cry9* apareceu em apenas 12% das cepas.

Além de *C. includens*, Carvalho (2017) deu continuidade ao trabalho avaliando a mortalidade de lagartas do gênero *Spodoptera* submetidas à dieta com as linhagens de *B. thuringiensis* que causaram mortalidade de 100% em *C. includens*, onde duas apresentaram mortalidade de 80-100% para *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782), *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), mostrando eficiência em controlar mais de uma praga simultaneamente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos Laboratórios de Controle Biológico I e II da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Câmpus Dois Vizinhos/PR.

### 4.1 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *B. thuringiensis* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR

Para a realização do experimento foram utilizadas 14 linhagens de *B. thuringiensis*, produtoras de cristal, isoladas de amostras de solo provenientes de diferentes pontos de coleta na UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos, ocupados com cultivos de pastagem (PR11P, PR21P, PR31P, PM32P, PM31S e PM33P), soja (SR31P), erva-mate (EM41P), floresta (FR11P, FM33P e FR31P), criação de caprinos (CM42P) e área de restauração (RR13P e RR14P). Estas linhagens são mantidas refrigeradas em placas de Petri com meio de cultura ágar-nutriente e repicadas periodicamente.

Para a pré-seleção das linhagens foi feita a análise molecular da presença dos genes *cry1* e *cry2*, pois estes expressam proteínas efetivas contra lepidópteros. Para detectar a presença destes genes foi utilizada a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação da Polimerase em Cadeia), que amplifica a sequência genética de interesse com a utilização de *primers* específicos.

Primeiramente as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura Luria Bertani sólido e incubadas durante 12 horas a 28°C então, para a extração do DNA se utilizou uma quantidade de bactérias de uma colônia, que corresponde a aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro.

A extração de deu pelo método de fervura em tampão TE (pH 8,0) e remoção do sobrenadante contendo DNA. A reação PCR foi realizada com o preparo de uma mistura 17,75 µl de água MilliQ, 2,5 µl de solução tampão, 1 µl de DNTP, 1 µl de cada primer (início e fim) para Bt do gene *cry1* [5'CTGGATTTACAGGTGGGGATAT(d)/ 5' TGAGTCGCT TCGCATATTTGACT (r)], 0,2 µl de enzima Taq polimerase, 0,75 µl de Mg e por fim, 5 µl do DNA de cada

amostra. Essa mistura foi feita para cada uma das 14 amostras de linhagens da bactéria em microtubos que, após fechados, foram levados ao termociclador, que repetiu um processo de oscilações de temperatura 39 vezes, elevando a temperatura à 94°C (onde ocorre o rompimento da fita de DNA) por 45 segundos, diminuindo para 52°C (temperatura no qual o primer encontra a sequência no DNA) por um minuto e, subindo novamente para 72°C (onde o primer multiplica o gene) por 45 segundos.

Após isso, 5µl de cada DNA da PCR foram diluídos em 2µl de Loading Buffer (produto utilizado para dar densidade, cor e eletromagnetismo aos produtos). As amostras diluídas e amplificadas foram separadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %. O gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz ultravioleta.

O mesmo processo foi realizado para identificação dos genes *cry2*, havendo substituição dos *primers* específicos de *cry1* para *cry2* [5'GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT(d)/5'GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG(r)]. Ao analisar as imagens da eletroforese sob luz UV foi possível selecionar quais amostras possuíam os genes *cry1* e *cry2*, sendo essas as testadas nos bioensaios subsequentes.

#### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE *B. thuringiensis* PARA UTILIZAÇÃO NOS BIOENSAIOS

Após a seleção das linhagens, conforme descrito no item 5.1, estas foram quantificadas, para a determinação dos esporos viáveis (Unidades Formadoras de Colônia). Para isso, se retirou três “pellets” de cada uma das linhagens que estavam acondicionadas em incubadora BOD, com temperatura entre 28 a 30°C, sem fotoperíodo por aproximadamente 72 horas (Figura 1).

Os “pellets” foram inoculados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura Luria Bertani líquido (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio e 1000 mL de água destilada) em cada. Foram feitas duas dessas suspensões para cada uma das linhagens, os Erlenmeyers foram levados ao shaker a 110 rpm por cinco dias, a 30°C.



Após esse período de multiplicação, para a retirada de impurezas e metabólitos secundários presentes no meio de cultura, foi realizada a centrifugação de cada uma das linhagens selecionadas por 10 minutos em 3500 rpm, sendo repetido três vezes, sendo que cada vez se retirava o sobrenadante e a massa de bactérias era lavada com água destilada, até se concluir o processo, guardando-se então somente a massa de bactérias em tubos de ensaio (Figura 2).

Em seguida, foi feita a diluição seriada. Para tal, foram preparados nove tubos de ensaio com 4,5 mL de água esterilizada. De cada tubo de ensaio contendo a massa de bactérias concentrada, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, a qual foi transferida para um dos tubos com 4,5 mL de água destilada esterilizada, diluindo-se até a concentração  $10^{-9}$ . Em cada uma das diluições agitou-se os tubos com as mãos, até se obter uma mistura homogênea. Cinco microlitros de cada diluição, nas concentrações -6, -7, -8 e -9, foram inoculados em dez pontos de  $5\mu\text{L}$  cada (técnica da “microgota”) nas placas de Petri com meio de cultura Luria Bertani sólido (Figura 3).

As placas com as suspensões bacterianas foram incubadas em BOD, com temperatura entre 28 a  $30^{\circ}\text{C}$ , sem fotoperíodo, por aproximadamente oito horas. Esta técnica possibilitou a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cada uma das “microgotas”, onde se fez uma média para conseguir descobrir o número médio de UFC em  $5\mu\text{L}$  de determinada concentração.

Com esses dados pode-se ajustar a concentração de UFC em  $10^8$ , devido a este ser a concentração também utilizada em produtos comerciais. A única linhagem que fugiu dessa padronização foi a FR31P, pois seu valor inicial da massa de bactérias já não atingia essa concentração, sendo então diluída para uma concentração conhecida de  $10^7$ .

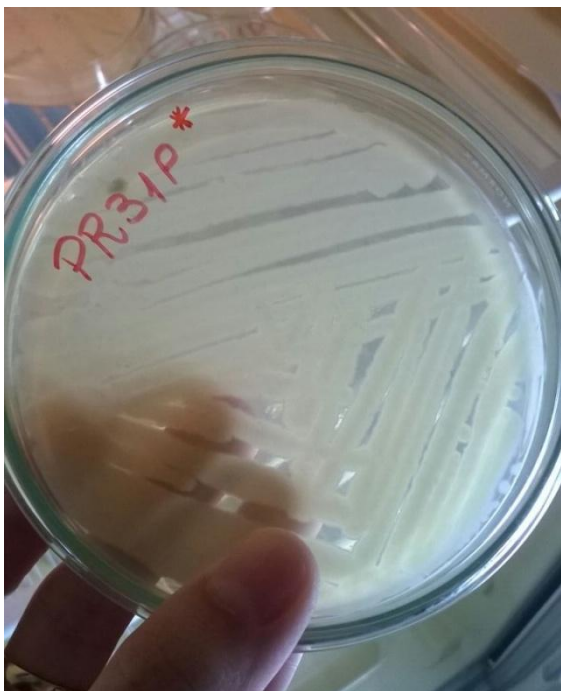


Figura 1 - Placas de Petri com crescimento de *Bacillus thuringiensis* em meio Luria Bertani inoculados pelo método de estriamento.  
Fonte: A Autora, 2017.



Figura 2 - Massa de bactérias *Bacillus thuringiensis* purificadas acondicionadas em tubos de ensaio.  
Fonte: A Autora, 2017.



Figura 3 - Placa de Petri com unidades formadoras de colônia de *Bacillus thuringiensis* após inoculação em pontos de 5  $\mu$ L.  
Fonte: A Autora, 2017.

### 4.3 EFEITO DAS LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis includens*, EM LABORATÓRIO.

#### 4.3.1 Criação massal de *Chrysodeixis includens*

Foi feita a criação massal de *C. includens* para realização das avaliações do efeito inseticida das linhagens de *B. thuringiensis* pré-selecionadas. Para dar início à criação foram fornecidas lagartas de terceiro ínstar pela empresa Simbiose - Indústria e Comércio de Fertilizantes e Insumos Microbiológicos LTDA. As lagartas foram transferidas para copos plásticos com capacidade de 400 mL, contendo 40 mL de dieta artificial para *C. includens* conforme Hoffman-Campo (1985) adaptado de Greene et al. (1976) (Tabela 1). Os copos foram, então, tampados e acondicionados em câmara climatizada tipo BOD, à temperatura de  $27 \pm 2$  °C, umidade relativa de  $70 \pm 5\%$  e fotofase de 14 horas. As lagartas foram trocadas de copos, ganhando dietas novas conforme consumiram a do copo anterior, até atingirem a fase de pupa.

As pupas foram retiradas dos copos e alocadas em caixas plásticas de 50 litros adaptadas com uma abertura coberta com uma tela, permitindo a circulação de ar para as futuras mariposas e impedindo sua fuga. A caixa com pupas foi revestida com folhas de papel sulfite para a oviposição dos adultos e continham dieta (solução de mel 10%) como alimento para as futuras mariposas que emergiram. Alguns dias após a emergência das mariposas, ocorre a cópula. Porém, para que isso ocorra, as mariposas receberam luz artificial de uma lâmpada fluorescente, criando uma condição de penumbra, semelhante à luz do luar. Depois de copuladas, as fêmeas ovipositaram nas folhas de sulfite que foram trocadas diariamente. Os papéis contendo os ovos foram cortados em tiras e colocados nos copos de dieta para eclodirem novas lagartas e assim dar continuidade à criação e obter insetos suficientes para a realização dos bioensaios, conforme metodologia adaptada de Hoffman-Campo (1985).

A seguir se encontra a tabela 1 com a dieta utilizada na criação dos insetos na fase larval.

Tabela 1 - Componentes da dieta para *C. includens* para diferentes volumes preparados. Os ingredientes seguidos pela letra A são cozidos juntos, os ingredientes seguidos pela letra B são misturados à dieta já cozida, triturada e com temperatura inferior a 45°C.

Ingredientes	300 mL	400 mL	500 mL	600 mL	800 mL	1000 mL	1500 mL
<b>Feijão A (g)</b>	18,9	24,96	31,2	37,44	50	62,5	93,75
<b>Germe de trigo A (g)</b>	15	20	25	30	40	50	75
<b>Proteína de Soja A (g)</b>	7,5	10	12,5	15	20	25	37,5
<b>Caseína A (g)</b>	7,5	10	12,5	15	20	25	37,5
<b>Levedura A (g)</b>	9,36	12,48	15,6	18,7	25	31,2	46,8
<b>Agar A (g)</b>	6	8	10	12	16	20	30
<b>Ácido Ascórbico B (g)</b>	0,9	1,2	1,5	1,8	2,4	3,5	4,5
<b>Ácido Sórbico B (g)</b>	0,45	0,6	0,75	0,9	1,2	1,5	2,25
<b>Metil (Nipagin) B (g)</b>	0,75	1	1,25	1,5	2	2,5	3,75
<b>Antibiótico B (g)</b>	0,0375	0,05	0,0625	0,075	0,1	0,125	0,188
<b>Complexo vitamínico B (ml)</b>	2,25	3	3,75	4,5	6	7,5	11,25
<b>Água destilada A (ml)</b>	300	400	500	600	800	1000	1500
<b>Formol B (ml)</b>	0,09	1,2	1,5	1,8	2,4	3	4,5

Fonte: Hoffman-Campo (1985) adaptado de Greene et al. (1976)

#### 4.3.2 Bioensaio: avaliação das linhagens de *Bacillus thuringiensis* sobre *Chrysodeixis includens*

Os bioensaios foram realizados micropipetando-se 50 µL do cultivo de cada isolado de *B. thuringiensis*, contendo tanto esporos quanto cristais, sobre superfície da dieta artificial para *C. includens*, previamente distribuída em placas de cultivo de células com 12 poços até aproximadamente um centímetro de altura (Figura 4) e, em seguida, agitando-as para que toda a dieta ficasse encoberta da suspensão bacteriana. Foram utilizadas cinco placas (repetições) com 12 insetos em cada totalizando 60 insetos por tratamento. Após a absorção da mistura bacteriana pela dieta, lagartas de segundo ínstar de *C. includens* foram adicionadas às placas,

sendo colocada uma lagarta para cada poço. As placas com os insetos foram acondicionados em câmara climatizada à temperatura de  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ , UR de  $60 \pm 10\%$  e fotofase de 14h. Para a testemunha foi aplicada água destilada esterilizada e para o controle positivo foi utilizado o produto comercial Dipel WP conforme a bula do fabricante em volume equivalente aos demais tratamentos conforme metodologia adaptada de Menezes et al., (2010). A avaliação foi realizada com 12, 24, 48 e 72 horas após o início do bioensaio, quantificando-se as lagartas mortas.

Os dados de mortalidade foram previamente transformados pela fórmula de arco seno da raiz quadrada e analisados quanto à distribuição normal, utilizando-se o teste de Shapiro-Wilk. Como não houve distribuição normal foi utilizada a estatística não paramétrica, através de teste de *Kruskal-Wallis* a 5%, ambos com auxílio do programa estatístico Assisat (SILVA & AZEVEDO, 2006).



Figura 4 - Inoculação de *Bacillus thuringiensis* sobre dieta artificial de *Chrysodeixis includens* previamente distribuída em placas de 12 poços.

Fonte: A Autora, 2017

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE *Bacillus thuringiensis* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PCR

A análise de PCR foi realizada para as 14 linhagens de *Bacillus thuringiensis* isoladas do solo da UTFPR, fazendo uso de primers *cry*-específicos para as classes gerais de genes *cry1* e *cry2*. Destas, 79% apresentaram amplificação para o iniciador *cry2* confirmando a presença do gene através do fragmento de, aproximadamente 526 pb (CÁRDENAS, et al., 2001)(Figura 5), porém, apenas 35% das linhagens apresentaram amplificação para o iniciador *cry1* com tamanho esperado de 558 pb (FATORETTO, et al., 2007) (Figura 6) (Tabela 2).

As cinco linhagens (35%) que apresentaram os genes *cry1* e *cry2*, simultaneamente, foram utilizadas nos bioensaios, pois as proteínas pertencentes às famílias *Cry1* e *Cry2* são conhecidas pela toxicidade para lepidópteros, assim como *Cry9*. O gene *cry2* ainda é ativo contra dípteros, junto com *cry4A*, *cry10*, *cry11*, *cry17*, *cry19*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39* e *cry40*. Contra os coleópteros, há os genes *cry3*, *cry7* e *cry8*, enquanto *cry5*, *cry12*, *cry13* e *cry14* são ativos contra nematoides (CARNEIRO et al., 2009).

A preferência por linhagens com as duas toxinas combinadas se deve, além da sua especificidade, à grande chance de seu efeito ser potencializado. Foi o que aconteceu no trabalho de Bergamasco, et al. (2013) que obtiveram menores doses de CL<sub>50</sub> quando utilizaram as proteínas Vip3Aa e *Cry11a10* combinadas, do que quando separadas, concluindo que possa haver uma atividade sinérgica entre essas proteínas em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), *Spodoptera albula* (Walker, 1857) e *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae).

Ao contrário dos resultados encontrados neste trabalho, Wang (2003) obteve frequência de 76,5% amostras positivas para *cry1* e cerca de 70% dos isolados com amplificação para o gene *cry2*, além de demonstrar uma alta tendência em aparecerem em conjunto, pois 99,1% dos isolados com *cry2* abrigavam também um gene *cry1* e 90,7% dos isolados que continham o gene *cry1* também abrigavam um gene *cry2*.

Porém, resultados semelhantes foram encontrados por Carvalho (2017) que obteve 57,5% de frequência de amostras que amplificaram o gene *cry2* e 37% de amostras positivas para *cry1*.

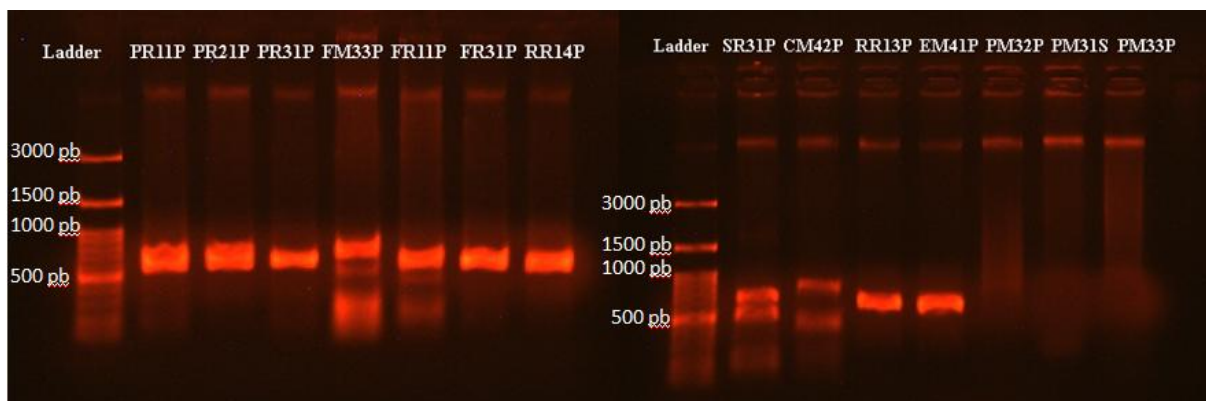


Figura 5 - Resultado da PCR para amplificação de DNA do gene *cry2*. Gel de agarose 1,2%.

Fonte: A autora, 2017.

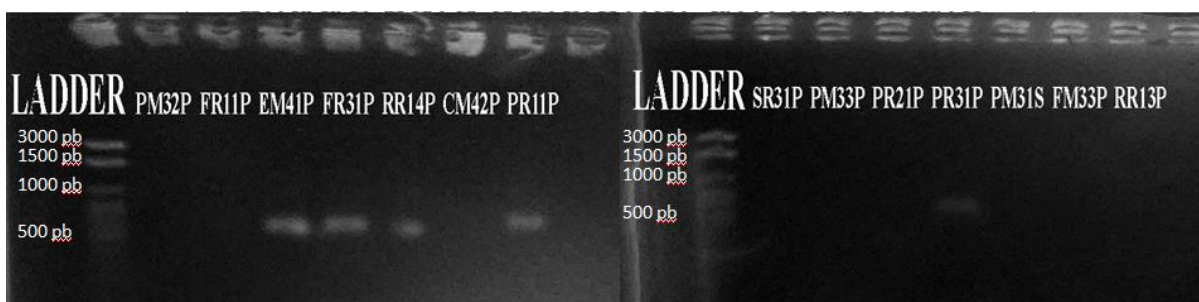


Figura 6 - Resultado da PCR para amplificação de DNA do gene *cry1*. Gel de agarose 1,2%.

Fonte: A autora, 2017.

É importante salientar que para determinar a atividade inseticida de uma espécie, não se deve levar em consideração somente a presença de genes *cry* específicos. Constanski et al. (2015) estudando a toxicidade de *Bacillus thuringiensis* em *Spodoptera eridania* e *Spodoptera frugiperda* constatou a mortalidade de ambas as espécies com a utilização de um isolado que não continha genes relacionados à toxicidade para Lepidoptera, pois havia apenas *cry4*, *cry10*, *cry11* e *cyt1*.

Tabela 2: Linhagens de *Bacillus thuringiensis* utilizados, locais de coleta e resultado resumido para a amplificação dos genes *cry2* e *cry1*.

Isolado	Local de coleta	Amplificação para o gene <i>cry 2</i>	Amplificação para o gene <i>cry 1</i>
PR11P	Solo com cultivo de pastagem	(+)	(+)
PR21P	Solo com cultivo de pastagem	(+)	(-)
PR31P	Solo com cultivo de pastagem	(+)	(+)
FM33P	Solo de área florestal	(+)	(-)
FR11P	Solo de área florestal	(+)	(-)
FR31P	Solo de área florestal	(+)	(+)
RR14P	Solo de área em restauração	(+)	(+)
SR31P	Solo com cultivo de soja	(+)	(-)
CM42P	Solo de criação de caprinos	(+)	(-)
RR13P	Solo de área em restauração	(+)	(-)
EM41P	Solo com cultivo de erva-mate	(+)	(+)
PM32P	Solo com cultivo de pastagem	(-)	(-)
PM31S	Solo com cultivo de pastagem	(-)	(-)
PM33P	Solo com cultivo de pastagem	(-)	(-)

## 5.2 EFEITO DAS LINHAGENS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Chrysodeixis includens*, EM LABORATÓRIO

Para a averiguação do encontrado nas análises moleculares, foi feita a avaliação da patogenicidade das linhagens por meio dos bioensaios que, por sua vez, confirmaram a toxicidade para *C. includens*.

Das cinco linhagens de *B. thuringiensis* avaliadas, todas foram responsáveis por mortalidade superior a 85% decorridos 72 horas do início do experimento, sendo que quatro linhagens causaram 100%, ao final de três dias, não se diferindo significativamente da testemunha positiva, o produto comercial Dipel WP (Tabela 2). Durante todo o período de avaliação as linhagens causaram mortalidades semelhantes ao Dipel WP, não diferindo significativamente deste, com exceção da linhagem PR11P, que na avaliação de mortalidade realizada com 12 horas obteve diferença significativa inferior quando comparada ao Dipel WP (Tabela 2).



Tabela 2 - Porcentagem média ( $\pm$  EP) da mortalidade, em diferentes tempos e acumulada, de lagartas de segundo ínstar de *Chrysodeixis includens* causada por linhagens de *Bacillus thuringiensis*.

Tratamento	Tempo (h)				p valor	MORTALIDADE ACUMULADA
	12	24	48	72		
Testemunha	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	0 $\pm$ 0 b	>0,05	0 $\pm$ 0 b
Dipel WP	55,0 $\pm$ 6,5 aA	11,6 $\pm$ 1,3 abB	21,6 $\pm$ 3,2 abAB	8,3 $\pm$ 2,5 bB	<0,05	96,6 $\pm$ 1,3 a
EM41P	25 $\pm$ 3,8 abAB	33,3 $\pm$ 4,5 aAB	41,6 $\pm$ 3,4 abA	0 $\pm$ 0 bB	<0,05	100 $\pm$ 0 a
PR11P	1,6 $\pm$ 1,1 bB	26,6 $\pm$ 4,4 abAB	68,3 $\pm$ 5,2 aA	3,3 $\pm$ 1,3 bB	<0,05	100 $\pm$ 0 a
PR31P	25 $\pm$ 3,8 abAB	43,3 $\pm$ 4,6 aA	31,6 $\pm$ 6,2 abA	0 $\pm$ 0 bB	<0,05	100 $\pm$ 0 a
FR31P	10 $\pm$ 3,1 abB	25,0 $\pm$ 1,7 abAB	65,0 $\pm$ 3,1 aA	0 $\pm$ 0 bB	<0,05	100 $\pm$ 0 a
RR14P	10 $\pm$ 3,9 abB	26,6 $\pm$ 3,9 abAB	43,3 $\pm$ 3,1 abA	6,6 $\pm$ 2,0 bB	<0,05	86,6 $\pm$ 2,7 a
<b>p-valor</b>	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05		<0,05

\*Médias ( $\pm$ EP) seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e, maiúscula na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal Wallis.

Apesar da concentração reduzida de FR31P quando comparado com os demais, este não diferiu significativamente de nenhuma das outras linhagens nem do controle positivo nos tempos. Foram observados, em todos os tratamentos, sintomas bem característicos da infecção por *B. thuringiensis* como perda de mobilidade, coloração marrom-escura e amolecimento nos tegumentos devido à infecção generalizada (Figura 7).

A parada alimentar foi rápida, não havendo mais sinais de alimentação dos insetos na dieta oferecida, sendo essa uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* como agente de controle biológico em lavouras, reduzindo a alimentação dos insetos em até 95% algumas horas depois de infectados (MOSCARDI, 2003).

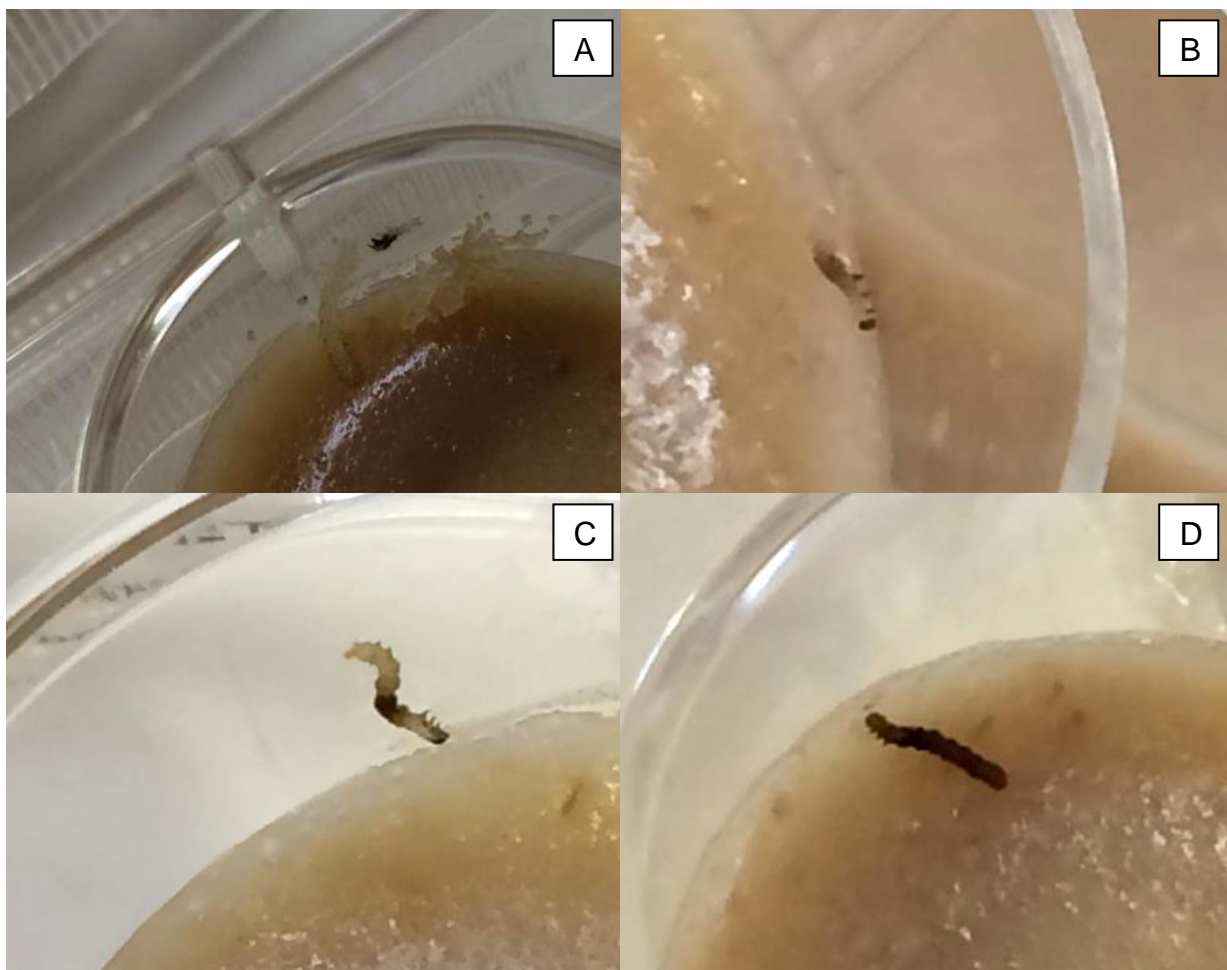


Figura 7 – Lagartas de *C. includens* apresentando características da infecção por *B. thuringiensis*: A) Lagarta saudável, sem contaminação por Bt.; B) Início da contaminação, percebendo-se o escurecimento da região intestinal da lagarta; C) Lagarta contaminada, visível contaminação da região intestinal; D) Lagarta totalmente contaminada, percebe-se que a bactéria já se espalhou por todo o inseto, o que além de escura, também a deixa mole.

Fonte: A Autora, 2017

Viana (2014), utilizando cultivares transgênicos de algodoeiro obteve resultados de 100% de mortalidade em lagartas ainda em primeiro ínstar, provavelmente devido a cultivar FM 975 (WideStrike) conter as proteínas *Cry1F* e *Cry1Ac*.

O Dipel WP apresentou uma alta eficiência na mortalidade das lagartas logo nas primeiras horas, o que não foi encontrada por Gonçalves (2015) em outro inseto, que obteve mortalidade de aproximadamente 20% usando o produto para o controle de *Spodoptera albula* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae).

Estudando o controle de *C. includens*, Borges (2016) testou a campo um produto químico (Flubendiamida), duas doses diferentes de *B. thuringiensis* (200 e 350 mL/ha) e duas doses do fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi* (2 e 5 Kg/ha), encontrando os melhores resultados para ambas doses de *B. thuringiensis* e a dose mais alta de *N. rileyi*.

Outro autor que obteve resultados semelhantes foi Carvalho (2017) que após três dias obteve mortalidade de 100% de lagartas *C. includens* neonatas para quatro linhagens de *B. thuringiensis* selecionados do Banco de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo que apresentavam genes de classe *cry1* e *cry2* simultaneamente.

As linhagens estudadas isoladas do solo da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos se mostraram promissoras no controle biológico, alcançando um elevado índice de controle da praga. Pode-se explorar ainda muito mais dessas linhagens, levando-as a campo, fazendo testes em outros insetos, testes de toxicidade, e até mesmo estudando a possibilidade de haver efeitos adversos em espécies não-alvo. Além disso, é de grande importância o estudo de novas linhagens, pois a partir delas há chances de se obter novos produtos que possam ser rotacionados com os demais e que diminuam as chances de resistência de insetos, favorecendo a agricultura.

## 6 CONCLUSÕES

- Onze das quatorze linhagens isoladas do solo da UTFPR - Câmpus Dois Vizinhos possuem o gene cry2. Cinco delas também tiveram resultado positivo para a amplificação do gene cry1.

- As cinco linhagens testadas em bioensaios mostraram elevado potencial no controle de *Chrysodeixis includens*.

## REFERÊNCIAS

ALVES, S. B., et al., **Utilização de fórmulas para correção de mortalidade**. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lea/cm/>> Acesso em: 05 jul. 2016.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ, **Pesquisa de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=387>> Acesso em: 06 nov. 2017

ANDRADE JUNIOR, E. R.; VILELA, P. A. Avaliação de inseticidas no controle de lagarta falsa-medideira no algodoeiro em Campo Verde-MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7, 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura brasileira e expansão dos mercados. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, out/dez. 2010.

BERGAMASCO, V.B.; MENDES, D.R.P.; FERNANDES, O.A.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus thuringiensis Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in Spodoptera spp. (Lepidoptera)*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.112, p. 152-158, 2013.

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012. 116 p. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BORGES, F. da S. P. **Produtos fitossanitários no controle de lagartas Chrysodeixis includens Walker (1858) (Lepidoptera: noctuidae) na cultura da soja**. 2016. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Chapadão do Sul, 2016.

BUENO, R. C. O. de F. et al. Sem barreira. **Cultivar**, Pelotas, v. 9, n. 93, p. 12-15, fev. 2007.

CAPALBO, D. M. F. et al. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. **Biociência** **Ciência & Desenvolvimento**: Folha de Viçosa, Viçosa, n. 34, p. 309-350, jan./jun. 2005.

CÁRDENAS, M.I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas cry contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, v.4, p.51-62, 2001.

CARNEIRO, A. A. Milho Bt: Teoria e Prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga. **Circular Técnica, Embrapa**, Sete Lagoas, n. 135, 26 p., dez. 2009.

CARVALHO, K. S. **Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra lagarta falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*)**. 2017. 77p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

CARVALHO, L. C.; FERREIRA, F. M.; BUENO N. M. Importância econômica e generalidades para o controle da lagarta falsa-medideira na cultura da soja. **Enciclopédia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1021-1034, nov. 2012. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012b/ciencias%20agrarias/importancia%20economica.pdf>> Acesso em: 09 abr. 2016.

CONSTANSKI, et al. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera spp.*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.50, n.8, p.730-733, ago. 2015.

FATORETTO, J.C.; SENA, J.A.D.; BARRETO, M.R.; LEMOS, M.V.F.; BOIÇA JÚNIOR, A.L. Associação de bioensaios e caracterização molecular para seleção de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* efetivos contra *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.36, p.737-745, 2007.

FINKLER, C. L. L. et al. Produção de biolarvicidas à base de *Bacillus sphaericus* e *Bacillus thuringiensis var. israelensis* para o controle de insetos. In: FIGUEIREDO, M. do V. B. et al. **Biociência Aplicada à Agricultura**: Textos de Apoio e Protocolos Experimentais. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, cap. 1, p. 609 - 622, 2010.

FREITAS, M. C. M. A cultura da soja no Brasil: o crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola. **Enciclopédia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.7, n.12, p. 1-12, mai. 2011. Disponível em: <

<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/a%20cultura%20da%20soja.pdf>  
> Acesso em: 16 abr. 2016.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAN, M. *Bacillus thuringiensis* **Biology, Ecology and safety**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 350, 2000.

GOATER, B.; RONKAY, L.; FIBIGER, M. **Noctuidae Europeae**. Soro: Entomological Press, v.10, 452 p, 2003.

GONÇALVES, K. C. **Mortalidade e efeitos subletais de *Bacillus thuringiensis* Berliner em *Spodoptera albula* (Walker, 1857)**. 2015. 41p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal - SP, 2015.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.H.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. Londrina: Embrapa, CNPSo, (Documentos, 10). p 23. 1985.

LIMA, G. M. de S. Proteínas bioinseticidas produzidas por *Bacillus thuringiensis*. In: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 119 - 137, 2010.

LOBO, K. dos S. **Isolamento, caracterização molecular e avaliação da toxicidade de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 do Cerrado Maranhense em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae)**. 2015. 107 p. Dissertação (Mestrado em Saúde do Adulto e da Criança). Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2015.

MENEZES, R.S. et al. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Agrotis ipsilon*. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 8, n. 2, p. 1-13, jul./dez. 2010.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F.; ARRUDA, R. O. M. Produção de bioinseticidas. In: LIMA, U.A. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Porto Alegre: Edgar Blücher, v. 3, cap. 11, p. 245-265, 2001.

MOSCARDI, F. Uso de baculovírus e *Bacillus thuringiensis* no controle da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis*. In: CÔRREA-FERREIRA, B. S. **Soja orgânica : alternativas para o manejo dos insetos-pragas**. Londrina: Embrapa Soja, cap. 2, p. 15-25, 2003.

MOSCARDI, F. et al. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C.B. et al. **Soja - manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa. cap. 4, p. 213-334, 2012.

PALLINI, A. Controle Biológico de pragas e seu uso em cultivos protegidos. **Espaço do Produtor**, 2009. Disponível em: <<https://www2.cead.ufv.br/espacoProdutor/scripts/verArtigo.php?codigo=21&acao=exibir#>> Acesso em: 06 nov. 2017.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: Uma breve revisão. **Agrociência**, Montevideu, v. 7, p. 1-10, 2003.

RAMOS, F. R. **Avaliação a campo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica a Lepidoptera e seu possível efeito adverso sobre organismos não-alvo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília Brasília, DF, 2008.

SILVA, F. de A. S. e. e AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, p.71-78, 2006.

SILVA, I. W., **índices de tomada de decisão para *Chrysodeixis includens* e monitoramento para o manejo de pragas em *Solanum tuberosum***. 2016. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Paranaíba, MG, 2016.

SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 2 ed., Londrina: Embrapa-Soja, 100 p., 2014.

VIANA, D de L. et al. Parâmetros biológicos da lagarta falsa-medideira em cultivares de algodoeiro com as proteínas *Cry1Ac* e *Cry1F*. **Pesq. agropec. bras.** vol. 49, n.7, Brasília, DF, 2014.

WANG, Jinhong et al. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.