

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOSSISTEMAS

LEIDE DAIANE DO NASCIMENTO MASCARELLO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae), EM SOLOS SOB CULTIVO ORGÂNICO

DISSERTAÇÃO

DOIS VIZINHOS

2017

LEIDE DAIANE DO NASCIMENTO MASCARELLO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae), EM SOLOS SOB CULTIVO ORGÂNICO

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas - Área de Concentração: Genética de Conservação.
Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
Co-orientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi

DOIS VIZINHOS

2017

M395i Mascarello, Leide Daiane do Nascimento
Isolamento e caracterização molecular do *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae), em solos sob cultivo orgânico /
Leide Daiane do Nascimento Mascarello – Dois Vizinhos, 2017
76f.:il

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cintra Maniglia
Coorientador: Prof. Dr. Everton Ricardi Lozano da Silva
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Nédia de Castilhos Ghisi
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Programa de Pós- graduação em
Agroecossistemas, Dois Vizinhos, 2017.
Bibliografia p. 56-68

1. Pragas – Controle biológico 2. Proteínas 3. Entomologia I.
Maniglia, Thiago Cintra, orient. II. Silva, Everton Ricardi Lozano
da, coorient. III. Ghisi, Nédia de Castilhos, coorient. IV.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Dois Vizinhos
V.Título

CDD: 632.96

Ficha catalográfica elaborada por Rosana da Silva CRB: 9/1745

Biblioteca da UTFPR-Dois Vizinhos



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Dois Vizinhos
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação nº 014

**Isolamento e caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* (Bt)
(Bacillaceae) em solos sob cultivo orgânico**

Leide Daiane do Nascimento Mascarello

Dissertação apresentada às treze horas e trinta minutos do dia trinta de outubro de dois mil e dezessete, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGROECOSSISTEMAS, Linha de Pesquisa – Manejo e Conservação de Agroecossistemas, Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Agroecossistemas), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho

Banca examinadora:

Dr. Thiago Cintra Maniglia
UTFPR-TD

Dra. Samara Ernandes
UTFPR-DV

Dra. Suzana Costa Wrublack
UNIOESTE

Reservado à Coordenação

*A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Dedico à minha mãe, Mariza Terezinha Zuchello e ao meu pai, Gilson Dias do Nascimento (*in memoriam*). Sou grata a eles pela vida, pelo amor que me deram, por sua dedicação aos filhos e por todo incentivo e sustentação que sempre deram aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS por tudo que sou e tenho conquistado.

À minha família sempre presentes em minha vida.

Ao meu esposo Cléverson Mascarello pela paciência e companheirismo enquanto me dedicava ao programa de mestrado. Também ao cuidado e carinho a nossa filha Bianca Caroline em minha ausência.

Ao Colégio Sesi unidade Dois Vizinhos pelo apoio e incentivo em meu aperfeiçoamento profissional.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), que contribuiu para realização deste curso.

Ao professor Dr. Thiago Cintra Maniglia por ter me aceito como orientada e pelo apoio profissional.

A professora Dra. Nédia de Castilhos Ghisi pela amizade, apoio, co-orientação e aprendizado na realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Everton Lozano pela co-orientação, apoio e amizade.

A professora a Dra. Samara Ernandes pela presteza e competência profissional, amizade, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (PPGSIS), pela contribuição na minha formação profissional.

As estagiárias Amanda Sampaio e Lucimara Ascari pelo apoio no desenvolvimento do trabalho de isolamento e caracterização molecular.

Também as empresas Gebana Brasil, Cataratas do Iguaçu Produtos Orgânicos Ltda e a Biorgânica Comércio de Produtos Orgânicos Ltda, pelo apoio nas coletas de solo.

Meu muito obrigada!

RESUMO

MASCARELLO, Leide D. N. Isolamento e caracterização molecular do *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae) em solos sob cultivo orgânico 76 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas (Área de Concentração: Genética de Conservação), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

O *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram positiva, esporulante, que se caracteriza por apresentar cristais proteicos em sua estrutura. Possui alta toxicidade a várias ordens de insetos, o que desperta o interesse em pesquisas nesse setor em busca do controle de espécies-praga que acometem a produção agrícola e florestal. Os produtos sob regime de cultivo orgânico também já se beneficiam dos resultados no controle biológico de pragas utilizando-se de estipes comerciais. Nesse contexto, os estudos nesse setor assumem o papel estratégico de promoção do desenvolvimento sustentável no uso do solo, podendo proporcionar qualidade e segurança alimentar. Com o objetivo de reunir dados de publicações nas áreas de ciências agrárias sobre toxicidade, isolamento, ecologia e caracterização molecular dessa bactéria, foi realizado uma análise cienciométrica de produções científicas com data até abril de 2017, agrupando-os de acordo com o idioma, país de publicação, ano e área de concentração das pesquisas. Foram encontrados um total de 14.098 artigos. No decorrer do estudo pode-se perceber que o país que mais publicou artigos sobre *Bacillus thuringiensis* foi os EUA, que também é um grande produtor agrícola mundial, o que justifica tantas pesquisas nesta área. O Brasil ficou em nono lugar no ranking, entre o México e Alemanha, mas sendo o primeiro dentro da América do Sul em publicações. Além disso, observou-se um aumento constante de publicações envolvendo este método alternativo de controle de pragas, principalmente a partir de 1960. Essa década se destaca pela expansão de fronteiras agrícolas, utilização de técnicas e manejos de produção agrícola intensiva e uso indiscriminado de agrotóxicos. Como consequência, houve aparecimento de espécies-praga resistentes às formulações químicas. Este resultado evidencia de forma clara a crescente conscientização da comunidade científica quanto à necessidade de sustentabilidade e redução de agroquímicos lançados ao ambiente. Com relação à pesquisa aplicada durante os meses de abril e maio de 2016, foram realizadas coletas de solo em sistemas de plantio orgânico certificados, e isolamentos do Bt. Posteriormente, foi realizada a identificação da presença dos genes *cry1*, *cry2*, *cry3* e *cry11* nos isolados. As amostras foram obtidas em áreas sob cultivo agrícola, Área de Preservação Permanente (APP) e Reserva Legal (RL) de cada propriedade. Para as análises morfológicas foram preparadas lâminas e observadas em microscopia de contraste de fase (1000 ×), para a verificação da presença de corpos de inclusões parasporais (cristais). Observou-se resultado positivo em 17 amostras. A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura, seguido de eletroforese em gel de agarose para quantificação do DNA variando de 10ng a 40ng. Para a amplificação dos genes *cry* foram realizados testes preliminares através de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguidos de eletroforese em gel de agarose. Obteve-se padrão satisfatório com temperatura de anelamento em 50°C para o gene *cry11*. A maior frequência desses isolados que apresentavam o gene de interesse foram identificadas em amostras coletadas em áreas de Reserva Legal.

Palavras-chave: Proteínas Cry, entomopatogênicos, bioinseticidas.

ABSTRACT

MASCARELLO, Leide D. N. Isolation and molecular characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Bacillaceae) in organic soil 76 f. Dissertation (Master in Agroecosystems) - Graduate Program in Agroecosystems (Concentration Area conservation genetics:), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2017.

Bacillus thuringiensis (Bt) is a Gram-positive, sporulating bacterium, characterized by presenting protein crystals in its structure. It has high toxicity to several orders of insects, which arouses the interest in researches in this sector in search of the control of pest species that affect agricultural and forestry production. The products under organic cultivation regime also already benefit from the results in the biological control of pests using commercial spores. In this context, studies in this sector assume the strategic role of promoting sustainable development in land use, with food quality and safety. With the objective of collecting data of publications on this bacterium, a scientific scientiometric analysis was carried out until April 2017, grouping them according to the language, country of publication, year and area of concentration of the researches. In a total of 14.098 articles were found. In the course of the study we can see that the country that most published articles on *Bacillus thuringiensis* was the USA, which is also a major agricultural producer worldwide, which justifies so much research in this area. Brazil was in ninth place in the ranking, between Mexico and Germany, but being the first in South America in publications. In addition, there has been a steady increase in publications involving this alternative method of pest control, especially since 1960. This decade stands out for the expansion of agricultural frontiers, the use of techniques and management of intensive agricultural production, and the indiscriminate use of agrochemicals. As a consequence, there were appearance of pests' resistant to chemical formulas. This result clearly shows the growing awareness of the scientific community regarding the need for sustainability and reduction of agrochemicals released to the environment. Regarding the applied research during the months of April and May 2016, soil samples were collected in certified organic planting systems and Bt isolates. Subsequently, the presence of the *cry1*, *cry2*, *cry3* and *cry11* genes in the isolates was performed. The samples were obtained in the agricultural crop, Permanent Preservation Area (APP) and Legal Reserve (RL) of each property. For the morphological analyzes slides were prepared and observed in phase contrast microscopy (1000 ×), to verify the presence of bodies of parasporal inclusions (crystals). A positive result was observed in 17 samples. DNA extraction was performed by the boiling method, followed by agarose gel electrophoresis for DNA quantification ranging from 10ng to 40ng. For the amplification of the *cry* genes, preliminary tests were performed through polymerase chain reaction (PCR) followed by agarose gel electrophoresis. A satisfactory standard with annealing temperature at 50°C was obtained for the *cry11* gene. The highest frequency of these isolates that presented the gene of interest was in Legal Reserve areas.

Key words: Cry proteins, entomopathogenic, bioinsecticides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Imagem do banco de dados "ISIWebofScience™"	26
Figura 2 Mapa localização das propriedades.....	30
Figura 3 - Imagens das Amostras de solo coletados nas propriedades estudadas	31
Figura 4 - Isolamento das amostras solo das propriedades analisadas	32
Figura 5 - Técnica de coloração diferenciada para Bt (Benz & Borusiewicz 1963).....	34
Figura 6 - Extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e Eletroforese.....	35
Figura 7 - Placas com crescimento de colônias com aspecto Bt.	43
Figura 8- Colônias das duplicatas.....	44
Figura 9 - Duplicatas com crescimento Bacteriano.....	45
Figura 10 - Morfologia dos isolados.....	47
Figura 11 - Resultado eletroforese em gel <i>cry1</i>	48
Figura 12 - Resultado eletroforese em gel para o <i>cry2</i>	49
Figura 13 – Resultado genes <i>cry3</i>	49
Figura 14 - Resultado da eletroforese em gel <i>cry11</i>	53
Figura 15 - Dados coletados Simepar referente a temperatura.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de publicações por países: levando em consideração os países que tiveram acima de 20 publicações.....	36
Gráfico 2 - Número de publicações por ano: dados coletados na plataforma webofsciense de 1954 a abril de 2017, referente a publicações no mundo sobre Bt.....	37
Gráfico 3 - Número de publicações por área do conhecimento: levando em consideração as revistas que tiveram acima de 30 publicações, entre os anos de 1954 a abril de 2017.	38
Gráfico 4 - Número de publicações de artigos sobre Bt por idiomas.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades (município e estado), rotação de culturas, insumos e outros produtos utilizados para o controle de insetos-praga, conduzida sob cultivo orgânico	27
Tabela 2: Relação dos meios de cultura com crescimento bacteriano.	411
Tabela 3: Relação ao número de isolados por propriedades estudadas, relacionando o tipo de vegetação e o número de pares de bases obtidos em cada banda analisada em eletroforese em gem de agarose.	511

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

µL- Microlitros

APP- Área de Preservação Permanente

Bti - *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses*

Btk - *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

Cry – Crystal

Cyt – Cytolytic

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etileno DiaminoTetra-Acético

FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo

IFOMAM- Federação Internacional dos Movimentos de Agricultura Orgânica

Kda- Kilo Dalton

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – Miligrama

mg/L- Miligrama por litro

min – Minuto

MIP - Manejo Integrado de Pragas

mM – Milimolar

nm – Nanômetro

OGMs – Organismos Geneticamente Modificados

Pb- pares de bases

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PFT – Toxinas Formadoras de Poros

pH – Potencial Hidrogeniônico

RL- Reserva Legal

RNA – Ácido Ribonucleico

SIMEPAR - Sistema Meteorológico do Paraná

TBE – Tris/Borato/EDTA

Vips – Vegetative Isecticidal Proteins

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 <i>Geral</i>	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 <i>PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O CONTROLE BIOLÓGICO</i>	16
3.2 <i>ESPÉCIE ESTUDADA</i>	19
3.3 <i>ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA</i>	22
3.4 <i>MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR</i>	23
3.4.1 <i>Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	23
3.4.2 <i>Eletroforese</i>	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 <i>ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA</i>	25
4.1.1 <i>Análise dos dados</i>	26
4.2 <i>ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Bt</i>	26
4.2.1 <i>Coleta do Solo</i>	26
4.2.2 <i>Isolamento e cultivo das cepas</i>	31
4.2.3 <i>Análise Morfológica por Microscopia</i>	33
4.2.4 <i>Extração de DNA, PCR e Eletroforese</i>	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 <i>ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA</i>	35
5.2 <i>ISOLAMENTO E ANÁLISE MORFOLÓGICA</i>	40
5.3 <i>CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR</i>	48
6. CONCLUSÃO.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

Concomitante ao crescimento populacional constante humano está a busca de uma maior produtividade de alimentos. Durante a década de 1960, na chamada *revolução verde*, iniciou-se a prática do uso intensivo de fertilizantes, irrigação, sementes melhoradas e produtos fitossanitários, bem como, derrubadas de florestas, dando lugar à produção e expansão de fronteiras agrícolas (SCOLARI, 2007).

Em virtude da crescente problemática ambiental oriunda de práticas intensivas de produção agrícola convencional, viu-se a necessidade de um meio de produção que fosse economicamente viável, justo e ambientalmente correto (MAZZOLENI et al., 2006). Segundo Ricci (2006) a agricultura orgânica é um sistema de manejo sustentável destinada à aplicação de meios de produção através do conhecimento de ecologia, com substituição de insumos químicos por orgânicos/biológicos/ecológicos.

O mercado de produtos orgânicos começou a ganhar espaço na Europa em 1970, mediante ao crescimento e comercialização desses produtos. Em 1972 foi criada a Federação Internacional do Movimento a Agricultura Orgânica, a qual acolheu organizações já existentes, linhas de pesquisas e estabeleceu regras e normas de produção de orgânicos a aproximadamente 112 países (ALVES et al., 2012).

Ainda segundo Alves et al. (2012), em decorrência ao crescente mercado desses produtos, para garantir uma norma de comercialização internacional foi publicado por meio do programa instituído pelo Council Regulation da Comunidade Econômica Européia (CEE), o documento 2092/91, que estabelece e que define a forma de se comercializar esses produtos.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu em 1999 a Instrução Normativa 007, a qual estabelece os meios de produção de alimentos, processamento, identificação, distribuição e certificação da qualidade para produtos orgânicos de origem vegetal e animal. Em 2003, foi sancionada a Lei n. 10.831, a qual prevê como produção agropecuária orgânica todo aquele sistema em que se adotam técnicas específicas, otimizando o uso dos recursos naturais e objetivando a sustentabilidade, bem como, forma de comercialização e certificação desses produtos (BRASIL, 1999; 2003).

Para atender a demanda mundial de alimentos, é necessário o monitoramento dos fatores climáticos e nutricionais, bem como, o controle de insetos-praga (BONATO, 2000). Entre os insetos-praga que acometem a soja, uma das culturas mais produzidas no mundo, destacam-se os percevejos e complexos de lagartas. Citam-se ainda doenças causadas por fungos, nematoides e pela competição com as plantas daninhas (CHRISTOFOLETTI, 2009).

De acordo com Simonato (2014), em agroecossistemas de plantio orgânico o controle de insetos-praga é realizado através da liberação, incremento e conservação de inimigos naturais (parasitoides, predadores e microrganismos), dessa maneira proporcionando a redução do uso de agrotóxicos na cultura da soja. Contudo, justifica-se a importância de conhecer a população de insetos em diferentes ecossistemas e, sobretudo a variabilidade genética dessa população para manejo e técnica adequada de controle biológico.

O referido controle de pragas utilizando o *Bacillus thuringiensis* (Bt), se deve ao fato de que é extremamente vantajoso em relação as fórmulas químicas, pois sua ação é rápida, e o custo na produção é baixo. Ressalta ainda Lacey et al. (2015), que ao contrário das fórmulas químicas, o Bt é seletivo, havendo neste sentido, grande investimento em pesquisas sobre a ação molecular das toxinas produzidas.

A bactéria Bt, corresponde a 95% do mercado mundial de bioinseticidas, que tem seu destaque por apresentar atividade tóxica a diversas espécies de pragas agrícolas e urbanas (GRECCO et al., 2010; ANGELO et al., 2010; BRAVO et al., 2011). Contudo, hoje devido a grande variedade de bioinseticidas no mercado do controle biológico, o uso exclusivo de Bt reduziu significativamente. Todavia esse mercado ainda representa 60% das vendas, com estimativas de aumento considerável (SIEGWART et al., 2015).

Destaca ainda Siegwart et al. (2015), que a utilização de bioinseticidas teve um aumento de 9,9% entre 2005 e 2010. Dos produtos comercializados, 74% são à base de bactérias, 10% de fungos, 5% de vírus, 8% de predadores e 3% outros bioinseticidas. Nesse mesmo período houve diminuição de 1,5% ao uso de agrotóxicos.

Segundo Guidelli-Thuler et al. (2008), a bactéria Bt, possui grande importância ecológica, pois tem a capacidade de originar compostos em seu metabolismo celular. Sua principal característica, que a distingue de outras espécies do mesmo gênero, é a presença intracelular de proteínas Cry e Cyt, que durante a esporulação liberam cristais com toxicidade a insetos. Assim, é evidente o interesse em pesquisas sobre Bt, pois, trata-se de uma bactéria com atividade entomopatogênica para várias ordens de insetos como lepidópteros, dípteros e coleópteros (ANGELO et al., 2010).

Outras toxinas de interesse podem ser produzidas por vários isolados de Bt. Uma dessas toxinas é da classe (Vip), produzida na fase vegetativa (SANCHIS & BOUGUET, 2007). Menciona Lima (2010), que além dessas toxinas há também a α -exotoxina (com atividade citolítica que age sobre os fosfolipídios presentes nas membranas celulares); β -exotoxina (produzida na fase vegetativa); exoenzimas (provocam ruptura da membrana

peritrófica do inseto). Essas variedades têm capacidade entomopatogênicas úteis no controle biológico.

O presente estudo objetivou coletar, isolar e caracterizar molecularmente bactérias Bt em solos de propriedades sob diferentes cultivos agrícolas. Buscando identificar a presença de isolados em uma mesma propriedade rural quando coletados em pontos sob diferentes coberturas vegetais.

Ainda, foi realizada análise cienciométrica de publicações nas áreas de controle biológico, agricultura, microrganismos, biologia molecular, zoologia, entomologia relacionadas ao *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas. Buscou-se também, reunir dados sobre países, idiomas e ano com maior número de publicações sobre o Bt. Dessa forma, foi possível reunir informações para contribuir nos avanços em pesquisas nesse setor.

Com os resultados obtidos pretendemos auxiliar no manejo dos agroecossistemas e contribuir para manipulação de novas fórmulas comerciais de bioinseticidas auxiliando no controle biológico, e também em estudos sobre biotecnologia dos transgênicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Isolar populações de Bt em solos de propriedades rurais sob cultivo orgânico e realizar sua caracterização molecular. Realizar também análise cienciométrica sobre o *Bacillus thuringiensis* com intuito de reunir informações sobre a mesma e identificar lacunas no conhecimento.

2.2 Específicos

- Isolar colônias do *Bacillus thuringiensis* das amostras de solo com Plantio Orgânico (área agrícola), Área de Preservação Permanente e Reserva Legal da mesma propriedade.
- Identificar a presença dos genes *cry1 e cry2, cry3 e cry11* em populações de *Bacillus thuringiensis*.
- Reunir dados de publicações sobre o *Bacillus thuringiensis* e realizar análise cienciométrica de produções científicas relacionadas ao controle de pragas.
- Analisar e identificar as produções científicas veiculadas em periódicos indexados nos bancos de dados “ISIWebofScienceTM”.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA E O CONTROLE BIOLÓGICO

A partir da “revolução verde” a produção agrícola no Brasil foi estimulada por técnicas, pesquisas e extensão no setor agrícola da soja e conseqüentemente ganha aumento na produção e transformação dos produtos originados da agricultura (BERNO & SCHNEIDER, 2007). De acordo com Corrêa-Ferreira (2003), esses movimentos pela “agricultura alternativa” têm por objetivo conscientizar para uma produção que respeite o ambiente.

Seguindo o contexto, Bordera (2014) questiona por que muitas das formas de vida tradicionais que ocorrem na Terra estão em crise? A explicação vem pelo êxodo rural e o processo de urbanização, causando conseqüências como a transformação na economia de serviços, surgimento de doenças e alterações climáticas. Ainda como conseqüência, tem-se a deterioração de áreas naturais, empobrecimento das populações, resultando em fome e desigualdades sociais.

Paralelo à expansão territorial agrícola brasileira surge a preocupação com os recursos ambientais e qualidade dos alimentos. É crescente a demanda por produtos de qualidade, não só no que se refere ao sabor, mas também pela qualidade biológica, física, nutricional, aliando a manejos e técnicas de produção sustentáveis à segurança alimentar (PORTOCARRERO, 2008).

Um dos problemas mundiais da atualidade está focado na origem da produção dos alimentos. À medida que se produz mais, surgem impactos ambientais oriundos de práticas inadequadas com substâncias não biodegradáveis ou precursoras de resíduos tóxicos no ambiente (CÂMARA et al., 2014). Desta forma, cresceu a procura por produtos orgânicos na década de 1980. Com relação a este contexto, compreende-se como agricultura orgânica aquela que promove a qualidade dos alimentos de forma sustentável, que respeite a capacidade natural das plantas, animais e ao ambiente (FONSECA, 2009).

Parra (2014) destaca que os crescentes estudos relacionados ao controle biológico de pragas podem ser atribuídos aos problemas gerados pelo uso abusivo de agrotóxicos, ocasionando desequilíbrios ambientais como: resíduos químicos em alimentos e na água; desaparecimentos de espécies não alvo; desenvolvimento de insetos resistentes; ressurgimento de pragas e surtos de pragas secundárias.

Em 1972 o setor orgânico no Brasil foi impulsionado com a criação da IFOMAM-Federação Internacional dos Movimentos de agricultura Orgânica e, em 1994 foram regulamentados as técnicas para produção orgânica (FONSECA, 2009). Em 1999 foi estabelecida pelo Ministério da Agricultura a Instrução Normativa n. 007, de 17 de maio de 1999, com objetivo de mostrar como os agricultores de orgânicos do Brasil fariam para produzir tais produtos de maneira que respeitem as regras de produção e estabeleçam os processos adotados, forma de distribuição e certificação do produto final (BRASIL, 1999).

Com a regulamentação da Lei n. 831/2003, em 2007, tem início a consolidação da agricultura orgânica no Brasil, o que estabelece a oficial certificação de produtos no país e prevê o funcionamento do sistema de produção desde a propriedade rural até os pontos de venda (RIBEIRO, 2011). Em 2008, foi publicada a instrução normativa de produção animal e vegetal, que orienta sobre a agricultura orgânica e estabelece a aplicação de técnicas e manejos responsáveis com a qualidade do alimento, como também ao ambiente (BRASIL, 2008).

Completa ainda Salvador (2011) que a expressiva expansão mundial das áreas em agricultura orgânica ocorreu a partir da virada do milênio. Ainda segundo o autor, entre 2000 e 2008 houve um crescimento na área de aproximadamente 20 milhões de hectares, passando de 15 milhões para 35 milhões de hectares, observando-se aumento nos índices de crescimento do mercado de alimentos orgânicos. Em sistemas agrícolas orgânicos uma estratégia muito utilizada para Manejo Integrado de Pragas (MIP) é o controle biológico, ao qual vem sendo enfatizado por pesquisadores como uma alternativa promissora ao uso de inseticidas químicos, podendo auxiliar na redução dos impactos da agricultura intensiva (SILVA et al., 2015; BUENO et al., 2011).

Na atualidade já temos comprovação de que o uso de inseticidas não afeta apenas a saúde da população, mas o próprio ambiente. Aponta Pacheco et al. (2012), que de acordo com Ibama, 88% dos pesticidas comercializados no Brasil em 2009 são classificados como perigosos, muito perigosos ou altamente perigosos e apenas 12% são classificados como pouco perigoso. O principal agravante além do comprometimento dos solos e do ar, é que também atinge nascentes e aquíferos.

Por fim, juntamente com a Revolução Tecnológica no século XX, a responsabilidade social e ambiental se torna evidente, pois tecnologias aplicadas à agricultura buscam reduzir impactos ambientais. No entanto, de acordo com Zamberlan et al. (2014), é importante buscar alternativas que viabilizem a produção sustentável em várias regiões, sendo capaz de assegurar a capacidade de satisfazer as necessidades das futuras gerações, ou seja, a

sustentabilidade. Desse modo, busca-se através desse diferencial sustentável, que agricultores obtenham valor agregado em suas produções, incentivando a adesão de mais produtores a uma boa prática de manejo e qualidade nos alimentos.

Para garantir a disponibilidade de alimentos, o Brasil vem desenvolvendo programas de fomento a agricultura familiar e a produção orgânica de alimentos. Nos últimos anos a agricultura familiar foi responsável por 70% dos alimentos consumidos pela população brasileira. Além disso, o fortalecimento da agricultura familiar, aliado à execução de programas de inclusão social contribuíram para que o Brasil fosse retirado do Mapa da Fome da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) (PORTAL BRASIL, 2015).

No que se refere ao controle biológico, as técnicas utilizadas incluem o clássico, natural e o aplicado. Segundo Silva & Brito (2015) o controle clássico, consiste em liberar pequeno número de insetos na cultura; o natural se destaca por conservar os inimigos naturais presentes ou quando se utilizam agrotóxicos seletivos no manejo integrado de pragas (MIP); a técnica aplicada baseia-se liberações inundativas de parasitoides ou predadores, após a criação em laboratório, visando à redução rápida da população da praga.

Através do controle biológico é possível regular populações de organismos vivos indesejados nas culturas (pragas), com utilização de inimigos naturais. Dependendo da espécie praga alvo utilizam-se vírus, bactérias, fungos, parasitoides ou predadores (MENDES et al., 2005). Também recebe destaque o uso mais recente dos semiquímicos que induzem a comunicação entre os insetos diferentes fazendo com que os predadores ou parasitoides percebam a presença do inseto a ser predado e façam o seu controle naturalmente (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; SIMONATO, 2014).

Pode-se ainda, estimular a permanência de parasitoides e predadores no local (controle biológico natural) e realizar liberações em grandes quantidades (inundativas) de parasitoides (controle biológico aplicado) ou pulverizações com fungos entomopatogênicos, ou de cristais proteicos da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) ou mesmo através de vírus (EMBRAPA, 2007).

No Brasil, através de formulação comercial, o controle biológico das lagartas desfolhadoras (Lepidoptera), é a base da utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (PRAÇA, 2007). Lacey et al. (2015) destaca que em relação aos bioinseticidas, o *B. thuringiensis* var. *kurstaki* é o mais amplamente usado para o controle de insetos-praga das culturas e florestas, e *B. thuringiensis* var. *israelensis* para o controle de pragas de importância médica, incluindo vetores dípteros.

Sendo a *Bacillus thuringiensis* (Bt) uma bactéria de interesse para o controle de espécies pragas e uma das mais usadas no mundo, se faz necessário o estudo de sua ecologia, pois se trata de um microrganismo que pode ou não estar presente em solos, em ambientes aquáticos, em produtos armazenados ou ainda em plantas e detritos (AZAMBUJA et al., 2010). Segundo Capalbo et al. (2005) o esporo da Bt pode permanecer em solo por diversos anos, porém sua multiplicação apenas ocorrerá em insetos aos quais realizam controle biológico.

Menciona ainda Azambuja et al. (2010) que segundo Meadown (1993), são quatro as possíveis explicações para a existência de Bt no solo: a primeira relaciona seu depositado no solo através de folhas e insetos entre outros; a segunda à ação patogênica da Bt a insetos de solo que não causam prejuízos econômicos; a terceira que essa bactéria se desenvolve no solo pela presença de nutrientes da decomposição; e a quarta hipótese menciona a afinidade da *Bacillus thuringiensis* com o *Bacillus cereus* que podem estar trocando material genético .

Conclui Bernardo et al. (2011) que, sendo o solo um ambiente rico e diversificado de microrganismos, se apresenta como uma importante fonte para estudos em isolamento e caracterização molecular, principalmente para pesquisa de Bt, os quais são de grande importância no controle biológico. A bactéria, por apresentar produção de cristais proteicos com atividade em insetos-alvo despertou interesse entomopatogênico, devido à característica de resistência a ambientes adversos, possibilitando assim sua produção em escala comercial (HABIB et al., 1998).

A grande variabilidade genética encontrada em Bt vem incentivando constantemente estudos e análises na tentativa de descoberta de novos isolados mais eficientes. Dessa forma, pesquisas em agroecossistemas são de extrema importância, pois esta bactéria poderá contribuir, no que se refere à busca alternativa de manejo e controle de insetos-pragas de forma sustentável (SANTOS-JUNIOR, 2009).

3.2 ESPÉCIE ESTUDADA

O Bt é uma bactéria pertencente à família das Bacillaceae, esporulante, Gram-positiva, aeróbia, tendo sua faixa de temperatura ideal entre 10° C e 45° C, com presença intracelular de um cristal proteico descoberto em 1953 (ANGELO et al., 2010). Durante a esporulação bacteriana são produzidos pelos genes denominados *cry* as proteínas Cry, as quais produzem cristais que tem como alvo o intestino médio de larvas de insetos de várias ordens como

Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Orthoptera e alguns Nematoda, Protozoa e Acari (PINTO et al., 2010; HONDA et al., 2017).

Ainda segundo Angelo et al. (2010) a célula vegetativa desse bacilo apresenta de 1,0 a 1,2 μm de largura por 3,0 a 5,0 μm de comprimento. Os genes responsáveis pela produção de proteínas Cry são geralmente localizados em plasmídeos e, com menor frequência no cromossomo bacteriano. Assim, uma linhagem de Bt pode conter uma ou várias cópias desse mesmo gene, com isso facilitando a manipulação em processos biotecnológicos e contribuindo para o controle biológico do mesmo (BRAVO et al., 2007).

O mecanismo de ação da proteína Cry consiste em solubilização do cristal no meio alcalino presente no intestino médio do inseto, com a ação de proteases sobre as δ -endotoxinas e “convertendo” pro-toxinas em toxinas ativas que se ligam aos receptores do intestino e permite sua inserção a membrana apical. Essa inserção cria canais de íons ou poros interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana provocando a hipertrofia das células e lise celular, levando a morte do inseto (FIUZA, 2010; GUIDELLI-THULER et al., 2008).

A bactéria Bt pode ser encontrada em diversos ambientes como solos, resíduos de grãos, água, matéria vegetal e insetos, sendo muito utilizada na produção de bioinseticidas e também no mercado da transgenia, a partir de linhagens de Bt. Como exemplo encontramos milho Bt, algodão Bt e soja Bt, os quais foram inseridos genes *cry* responsáveis para formação de proteínas Cry no controle de insetos pragas, assim possibilitando a produção de toxinas Cry por outros organismos (CAPALBO et al., 2005; CARNEIRO et al., 2009). Há várias subespécies de Bt já conhecidas que possuem genes *cry* diversos (TANG et al., 2006). Dentre essas subespécies pode-se citar o *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk), *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (Bti), *Bacillus thuringiensis* Berliner (ABDOARRAHEM et al., 2009).

A bactéria Bt produz ainda, além da Cry, várias toxinas com atividade inseticida. Dentre elas a α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas - VIPs (do inglês – “Vegetative Insecticidal Proteins”) que podem atuar aumentando a toxicidade das δ -endotoxinas (LIMA, 2010).

As proteínas Cry têm pesos moleculares entre 40 e 140 kDa e tornam-se tóxicas quando solubilizadas no intestino médio do inseto (SILVA et al., 2015). Bactérias semelhantes a Bt, produzem proteínas Cyt (*cytolytic*) a qual juntamente com as Cry (do inglês *crystal*) pertencem a uma classe de toxinas formadoras de poros, ou seja, são segregadas

como proteínas solúveis em água que sofrem alterações na membrana de seus hospedeiros (BRAVO et al., 2011).

Esta toxina não apresenta registros de toxicidade a animais vertebrados, possibilitando o desenvolvimento de novos bioinseticidas que se tornaram uma alternativa segura em se tratando de agronegócios com foco na produção sustentável (ARAUJO et al., 2007). Em todo o mundo o Bt é a espécie mais estudada e utilizada como princípio ativo de bioinseticidas, sendo o mais produzido e vendido para o controle de lagartas desfolhadoras (PRAÇA et al., 2007).

Quanto à morfologia dos cristais, já foram observados cristais bipiramidais, esféricos e cuboídes, sendo o bipiramidal o mais frequentemente relacionados à presença de proteínas do tipo Cry1 (CONSTANSK et al., 2015). Ainda a respeito da morfologia dos cristais, Ricieto et al. (2013), ao isolar Bt em solos de cultura, pomar e floresta, encontraram na maior parte dos isolados cristais redondos e alguns desses cristais apresentaram borda mais manchada do que a área central quando analisados com microscopia óptica. Também verificaram a presença de cristais quadrados ou irregulares com colocação atípica.

Na atual taxonomia, o grupo bacilos inclui sete espécies reconhecidas: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides* e *B. citototoxicus*, que compartilham um parente próximo em nível genético e bioquímico (GILLIS & MAHILLON, 2014). Menciona ainda Galzer & Azevedo Filho (2016) que todas as espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* produzem endósporos (*B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides* e *B. weihenstephanensis*), e são muito semelhantes, sendo a principal característica que distingue *B. thuringiensis* dos outros táxons do mesmo gênero é a presença intracelular de um cristal proteico.

As Bts são estudadas e usadas desde 1950 como bioinseticida para controle natural de espécies que acometem a agricultura. A inserção de genes *cry* em plantas se deu no final da década de 1980, protegendo-as contra ataques de várias pragas altamente prejudiciais (SANCHIS & BOURGUET, 2007).

Contudo, devido a evolução da resistência das pragas às formulas comerciais, e em virtude do Bt possuir diferentes genes *cry*, cresce o interesse da comunidade científica em pesquisas tanto na produção de bioinseticidas como também na descoberta de novas cepas para uso na área de transgenia (SHAUKAT et al., 2010). Na tentativa de descoberta de novos isolados mais eficientes no controle de espécies pragas, atualmente são conhecidos 74 diferentes grupos de toxinas Cry com mais de 770 sequências de genes já descritos (HORTA et al., 2017).

Destaca Mendes et al. (2009) que, para padronizar publicações referente ao gene *cry*, foram adotados os números arábicos: *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4* até *cry60*. Em 1993 foi estabelecido um Comitê de Nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* para facilitar a atualização das constantes pesquisas relacionadas ao Bt em todo o mundo. Foi criado o site <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html>, para que possam manter atualizadas as pesquisas de cepas de *B. thuringiensis* em todo mundo.

De acordo com essa nova nomenclatura, Horta et al. (2017) ressaltam que, dos isolados já conhecidos no mercado de bioinseticidas estão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD1, que expressa proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, e HD73, que produz proteína Cry1Ac; *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, que produz as toxinas Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca e Cry1Da; *B. thuringiensis* var. *san diego* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, que produzem a toxina Cry3Aa, e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, contendo as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1A.

3. 3 ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A cienciometria, como é conhecida a pesquisa quantitativa da produção científica, foi iniciada na década de 1960 como metodologia para a avaliação da atividade científica e tecnológica (BITTENCOURT & PAULA, 2012). Considera-se importantíssima, pois através dessa pode-se analisar publicações de um tema específico. Assim, fornece informações quanto as tendências, produtividade científica e ainda ajuda para identificar lacunas em áreas onde é necessária uma maior atenção (PADIAL et al., 2008).

O estudo cienciométrico deve ser encarado como uma ferramenta de análise e avaliação da produção científica, mediante indicadores numéricos e uso de técnicas e análises estatísticas a serem discutidas e validadas. Pode-se avaliar a importância de determinado assunto, autor e/ou trabalho, além de evidenciar as tendências e contribuições de uma determinada disciplina, pesquisador ou grupo de pesquisadores, instituição ou país em relação ao avanço científico e tecnológico mundial (LIMA-RIBEIRO et al., 2007).

Também, é uma ferramenta que permite observar através da produção da literatura científica a produção de um país em relação ao mundo, uma instituição em relação ao seu país e, até mesmo, cientistas em relação à sua própria comunidade científica (BIANCHI, SANT'ANA & MIRANDA NETO, 2015).

Dessa forma, enfatiza Cabral Netto & Laurindo (2013) que através da análise cienciométrica espera-se facilitar e alocar futuros trabalhos em grupos de pesquisa e, com

isso, contribuir para o desenvolvimento da literatura científica. Ainda, medir o crescimento de determinadas áreas e o surgimento de novos temas, tanto entre diversos campos científicos quanto em um único campo de estudo.

3.4 MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

3.4.1 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir de estudos de James Watson e Francis Crick em 1953, foi descoberto como os ácidos nucleicos são formados a partir dos nucleotídeos (SNUSTAD, 2010). O modelo evidenciado na atualidade é composto por dupla fita de DNA (ácido desoxirribonucleico), a qual se mantém inalterada em várias condições (SCHEID et al., 2005). É composta por eixo desoxirribose e fósforo ligado pelas bases nitrogenadas – citosina, guanina, adenina e timina que se encaixam (OLBY, 1994; MAYR, 1998).

A extração de ácido nucleico de diversos seres vivos é uma etapa fundamental para se obter alta eficiência de amplificação nos protocolos que usam Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (OLIVEIRA et al., 2007). Dessa maneira, para que se possa utilizar as técnicas da Biologia Molecular é necessário que se obtenha uma quantidade de DNA de boa qualidade que possibilite o emprego da técnica desejada (WALDSCHIMIDT, 1999).

Os procedimentos utilizados na extração do DNA podem influenciar a quantidade e a qualidade estabelecida desse material, assim dependendo da espécie em estudos e das condições laboratoriais, para obtenção de melhores resultados é necessário realizar modificações e adaptações no protocolo (FALEIRO et al., 2003).

Segundo Costa et al. (2001), em relação aos protocolos de extração de DNA os componentes normalmente variam. No entanto, cada solução deve conter uma substância tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNAses, cuja função é proteger o DNA genômico.

Em 1983, Kary Banks Mullis desenvolveu o método de amplificação *in vitro* da Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e em 1993 graças a essa descoberta foi agraciado com o Prêmio Nobel de Química (BESNARD, 2015). A técnica possibilita o estudo das diversidades nos mais diferentes ambientes, pois apropria-se de diferentes estratégias de ampliação do material genético para diferentes espécies (JUNIOR et al., 2002).

Diversas técnicas da Biologia Molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) abriram caminho para análise genética da variação na sequência de DNA (FERREIRA et al., 1998). Besnard (2015) evidencia que a utilização da técnica de PCR tem crescido exponencialmente desde a sua implantação comercial em 1987. Os produtos da PCR são de extrema importância para os estudos moleculares, tendo em vista que, pode ser útil como um marcador de diagnóstico para separar espécies morfológicamente semelhantes (LUQUE et al., 2002).

Segundo Saiki et al., 1985 (in JUNIOR et al., 2002), o método molecular de PCR permite amplificar pequenos e específicos segmentos do DNA, através de desnaturação, anelamento de *primers* e extensão do DNA. As amostras são alocadas em um termociclador que permite o aquecimento e o resfriamento rápido das amostras, repetindo várias vezes as etapas de desnaturação, anelamento e polimerização (20 a 30 ciclos), obtendo-se milhões de cópias do DNA molde (ZAHA, 2012).

Bergamasco et al. (2009) enfatiza que, a PCR tem sido usada para caracterização de genes que codificam a proteína Cry, técnica essa já utilizada anteriormente por Carozzi et al. (1991). Dessa forma, essa técnica é destaque por ser uma eficiente estratégia para identificar sequências de genes *cry* presentes nos isolados de *B. thuringiensis*, por amplificar fragmentos de DNA por meio de iniciadores específicos ou gerais. Assim, aumentando as chances de identificar novos isolados de *B. thuringiensis* com potencialidades entomopatogênicas diferentes que podem ser utilizados para geração de bioinseticidas mais efetivos no controle de pragas.

3.4.2 Eletroforese

A eletroforese em gel é usada para separar por tamanho uma mistura de segmentos de DNA ou RNA (COX, 2012). De acordo com Avise (1979), após PCR com utilização de *primers*, a eletroforese em gel de agarose utiliza de forma simples o uso de correntes elétrica para averiguar a presença de isolados de interesse. A eletroforese consiste em uma camada semi-sólida de gel com poros pelos quais passa o DNA que possui carga negativa, a caminho de um polo positivo, assim devido ao tamanho vai parando e formando as bandas. Os ácidos nucleicos migram através da rede de poros do gel com velocidade diferentes (de acordo com seus tamanhos) e são visualizados utilizando corantes específicos que podem ser: brometo de etídeo, gel red, e sybr safe, transiluminados por luz ultravioleta (UV) (ZAHA, 2012).

A técnica de eletroforese utiliza-se do material da extração ou da PCR e pode ser feita em gel de agarose ou poliacrilamida. Este último dispõe de alta resolução capazes de visualizar oligonucleótidos de cadeia simples até 800 bases de comprimento que diferem em tamanho por um único desoxirribonucleotídeo (AUSUBEL, 2003).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA

Neste trabalho foi realizado um estudo cienciométrico da literatura científica nacional e internacional sobre a relação do *Bacillus thuringiensis* ao desenvolvimento da agricultura no que se refere ao controle de pragas. Também foram relacionados artigos referentes ao controle de dípteros vetores de doenças. A análise foi baseada em resumos de artigos publicados entre 1945 a abril de 2017. O objeto da análise foi identificar a produção científica veiculada em periódicos indexados nos bancos de dados do “ISIWebofScience™” (<http://apps.webofknowledge.com/>) como mostra a figura 1. A busca por artigos científicos foi realizada nos meses de fevereiro, março e abril de 2017. Para isso foi utilizada a palavra-chave: “*Bacillus thuringiensis*”. Dos 14.098 artigos, 10.793 foram selecionados a partir da adesão ao assunto. Os dados foram classificados de acordo com o idioma, país de publicação, ano e área de concentração das pesquisas.

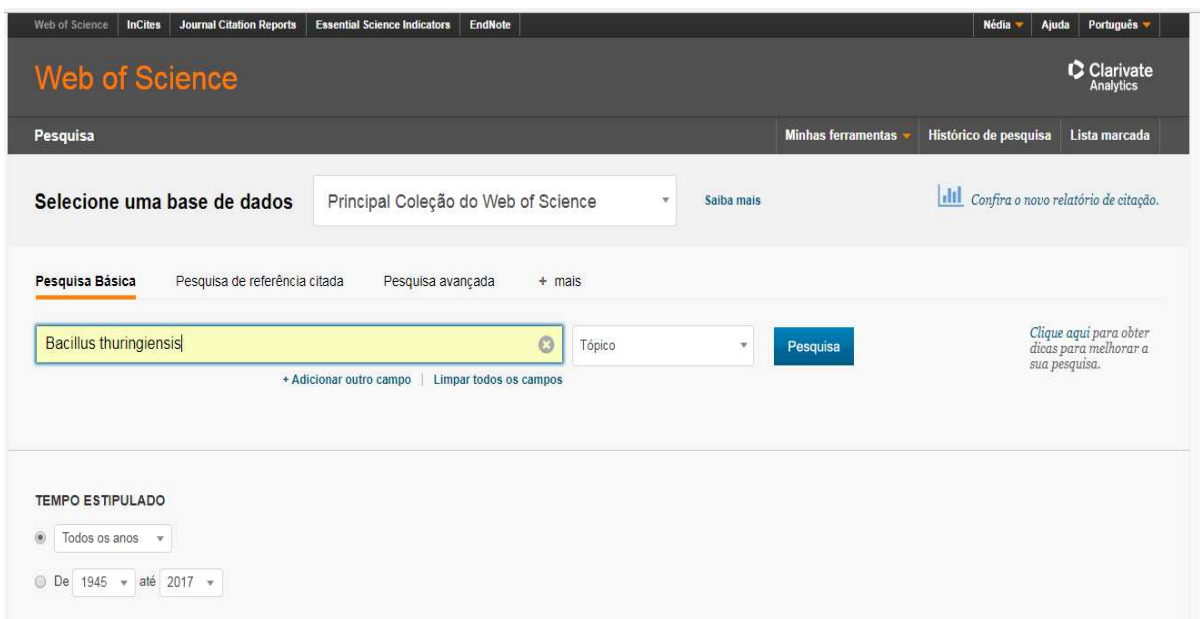


Figura 1- Imagem do banco de dados "ISIWebofScience™", utilizado para análise ciênciométrica das produções científicas referente ao Bt.

Fonte: Mascarello (2017)

4.1.1. Análise dos dados

Os resultados foram analisados de forma a quantificar as produções científicas vinculadas à agricultura e controle biológico. Foram elaborados tabelas e gráficos com os dados obtidos, possibilitando assim a análise comparativa. Os dados foram previamente organizados no próprio programa "ISIWebofScience™" e optou-se em reorganizá-los utilizando as ferramentas do programa Microsoft Excel 2010 (Microsoft Office 14).

4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE Bt

4.2.1 Coleta do Solo

As coletas foram realizadas em parceria entre a UTFPR-DV e as empresas Gebana Brasil, Cataratas do Iguaçu Produtos Orgânicos Ltda e a Biorgânica Comércio de Produtos Orgânicos Ltda.

Nesse estudo foram coletadas amostras de solo, em áreas de vegetação (cultura agrícola, APP e RL) obtendo um total de 26 amostras em oito propriedades, conforme descritas na tabela 1.

Tabela 1: Propriedades (município e estado), rotação de culturas, insumos e outros produtos utilizados para o controle de insetos-praga, conduzida sob cultivo orgânico, nos estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul.

	Empresa	Propriedade	Sigla utilizada	Vegetação/cultivar	Data da coleta	Rotação	Insumos para o Controle de Pragas	Outros produtos
A1	GEBANA	Pérola do Oeste/Pr	PO11A	APP	20/04/2016	APP	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A1	GEBANA	Pérola do Oeste/Pr	PO11R	RL	21/04/2016	RL	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A1	GEBANA	Pérola do Oeste/Pr	PO11L	Lavoura	22/04/2016	Soja/Trigo/Soja	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica
A2	GEBANA	Santa Helena/Pr	SH31R	RL	13/05/2016	RL	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A2	GEBANA	Santa Helena/Pr	SH31P	Pastagem	13/05/2016	Soja/ Milho/Aveia/ Trigo/Soja	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica e Super Magro
A2	GEBANA	Santa Helena/Pr	SH31T	Talhão	13/05/2016	Soja/ Milho/Aveia/ Trigo/Soja	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica e Super Magro
A3	GEBANA	Marechal Candido Rondon/Pr	MCR41G	Glebas	14/05/2016	Soja/Trigo/ centeio/Soja	Homeopatia, <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica e Bordaleza
A3	GEBANA	Marechal Candido Rondon/Pr	MCR41P	Pastagem	15/05/2016	Soja/Trigo/ centeio/Soja	Homeopatia, <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica e Bordaleza
A3	GEBANA	Marechal Candido Rondon/Pr	MCR41R	RL	16/05/2016	RL	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A4	GEBANA	Capanema/Pr 1 (Elso)	C21A	APP	24/05/2016	APP	Não se Aplica	Não se Aplica

							produto	produto
A4	GEBANA	Capanema/Pr 1 (Elso)	C21P	Pastagem	25/05/2016	não informado pela empresa	não informado pela empresa	não informado pela empresa
A4	GEBANA	Capanema/Pr 1 (Elso)	C21G	Glebas	26/05/2016	Soja/Trigo/Soja	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica, Bordaleza e SuperMagro
A5	GEBANA	Capinzal/SC	CZ51P	Pastagem	Sem descrição de data no rótulo	não informado pela empresa	não informado pela empresa	não informado pela empresa
A5	GEBANA	Capinzal/SC	CZ51E	Erva Mate	Sem descrição de data no rótulo	não informado pela empresa	não informado pela empresa	não informado pela empresa
A5	GEBANA	Capinzal/SC	CZ51A	APP	Sem descrição de data no rótulo	não informado pela empresa	não informado pela empresa	não informado pela empresa
A6	GEBANA	Capanema/Pr (Elso) 2	CE71L	Lavoura	21/07/2016	Soja/Trigo/Soja	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica, Bordaleza e SuperMagro
A6	GEBANA	Capanema/Pr (Elso) 2	CE71R	RL	21/07/2016	RL	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A6	GEBANA	Capanema/Pr (Elso) 2	CE71A	APP	21/07/2016	APP	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A7	BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81M	Mandioca	02/08/2016	Milho	Oleo de Neen, Calda Bordalesa, <i>Bacillus thuringiensis</i>	Não se Aplica produto
A7	BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81R	RL	02/08/2016	RL	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto

A7	BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81A	APP	02/08/2016	APP	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A7	BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81T1	Trigo	02/08/2016	Soja	Oleo de Neen, Calda Bordalesa, <i>Bacillus thuringiensis</i>	Não se Aplica produto
A7	BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO8T2	Trigo	02/08/2016	Soja	Oleo de Neen, Calda Bordalesa, <i>Bacillus thuringiensis</i>	Não se Aplica produto
A8	GEBANA	Capanema/Pr (Mario)	CM61L	Lavoura	11/08/2016	Soja/Trigo/Soja	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	Sílica, Caldas Sulfocálcica, Bordaleza e SuperMagro
A8	GEBANA	Capanema/Pr (Mario)	CM61R	RL	11/08/2016	RL	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto
A8	GEBANA	Capanema/Pr (Mario)	CM61A	APP	11/08/2016	APP	Não se Aplica produto	Não se Aplica produto

As coletas foram realizadas em propriedades agrícolas de sistema orgânico de produção, sendo seis propriedades credenciadas pela Gebana: cinco no estado do Paraná, nas cidades de Capanema (duas propriedades), Pérola do Oeste, Marechal Cândido do Rondon e em Santa Helena (uma propriedade em cada município) e uma no estado de Santa Catarina no município de Capinzal. Já as coletas nas propriedades credenciadas da Biorgânica, foram em duas propriedades no estado do Paraná no município de Realeza, conforme apresentadas na figura 2.

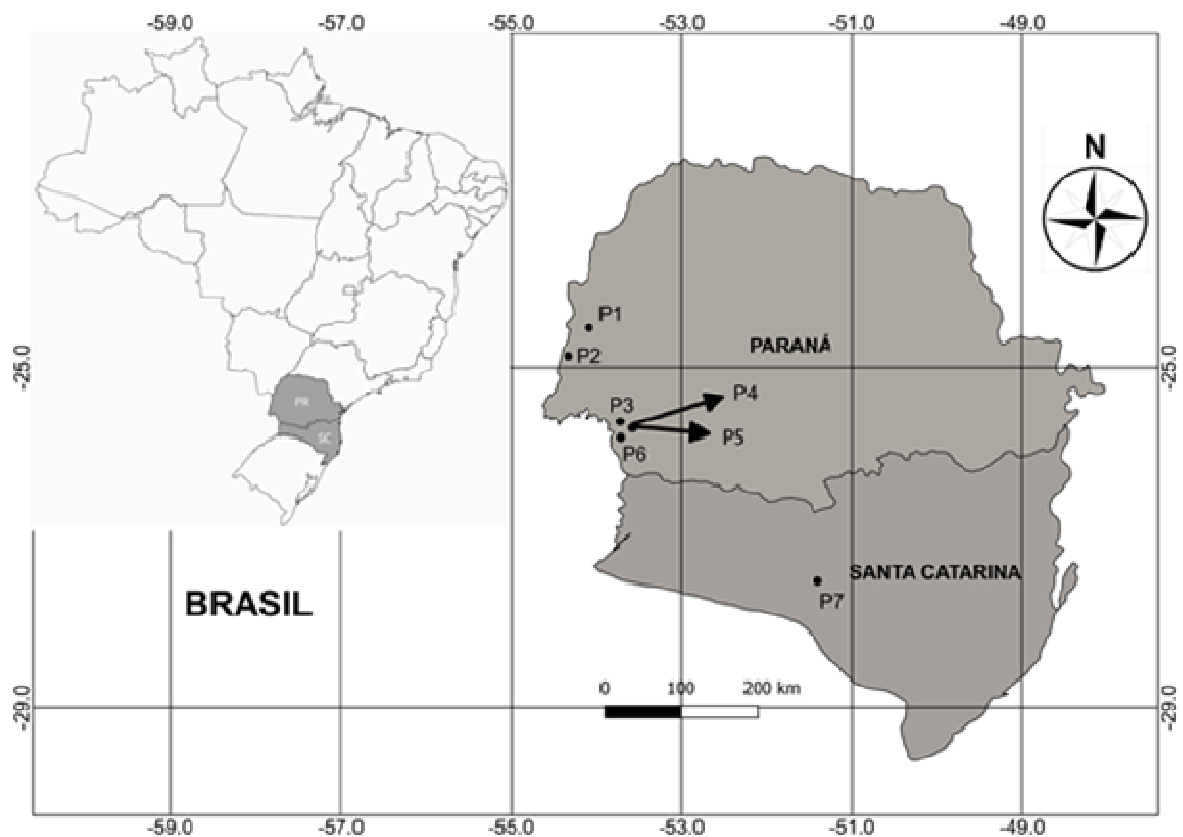


Figura 2 Mapa localização das propriedades: (P1) Marechal Cândido Rondon/PR; (P2) Santa Helena/PR; (P3) Capanema/PR; (P4 e P5) Realeza/PR; (P6) Pérola do Oeste/PR; (P7) Capinzal/SC.

Fonte: Mascarello, 2016.

O solo foi coletado seco, retirado uma pequena quantidade superficial e o material coletado estava entre 5-10 cm de profundidade. Foram marcados os pontos de coletas utilizando o GPS e também foram feitas fotos da paisagem. Em cada propriedade foram realizadas coletas em diversos locais, tais como solo de agricultura, da área de preservação permanente (APP) e reserva legal (RL), possibilitando assim a avaliação da presença do *Bacillus thuringiensis* em diferentes paisagens das propriedades para identificar isolados

como mostra a figura 3. O solo coletado encaminhado para o laboratório da UTFPR campus Dois Vizinhos.

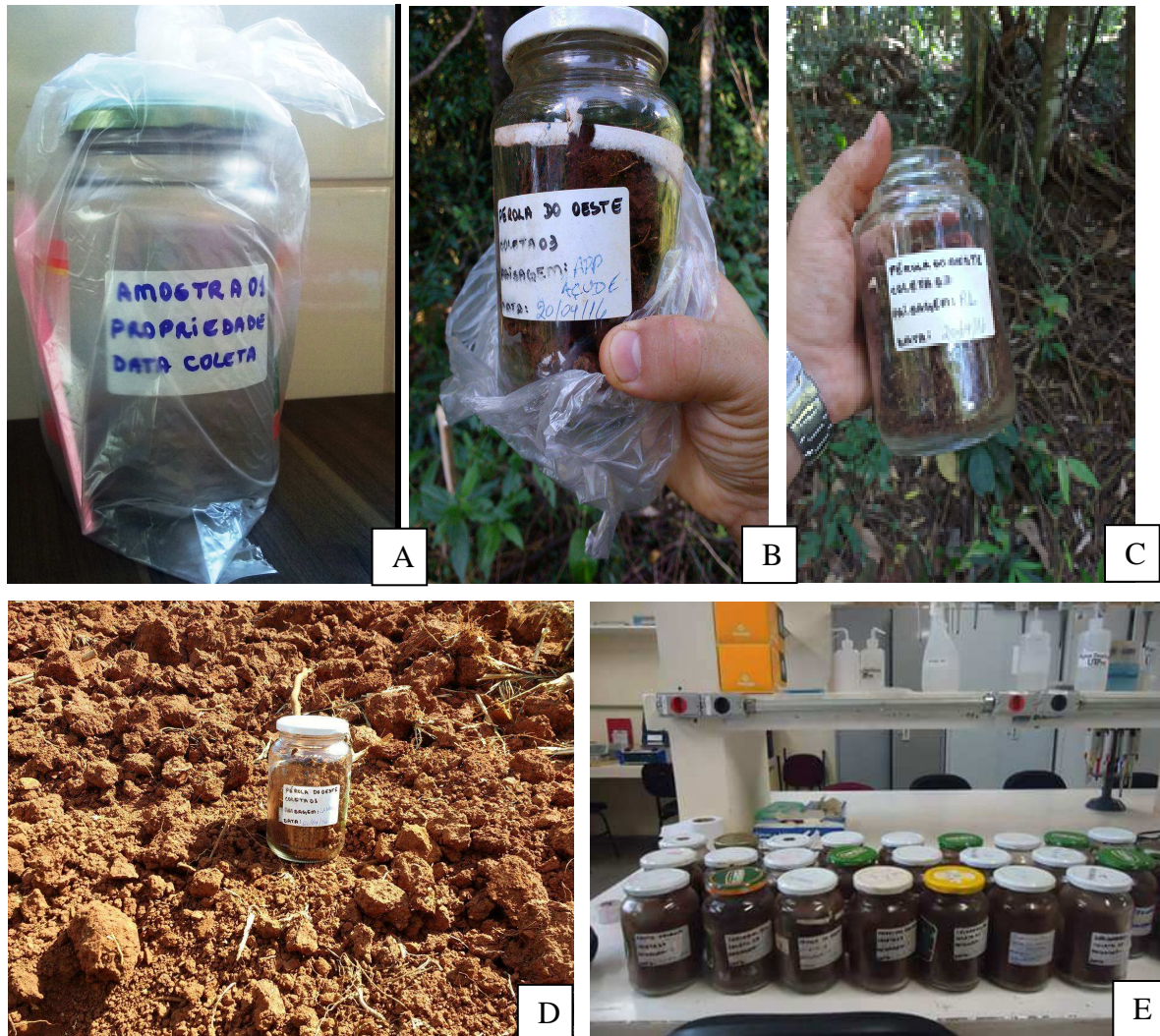


Figura 3- Imagens das Amostras de solo coletados nas propriedades estudadas: (A) Kit para coleta de solo. (B) coleta de solo em APP. (C) coleta de solo em RL. (D) amostra de solo de cultura agrícola após colheita; (E) 26 amostras de solos coletados.

Fonte: Mascarello (2016).

4.2.2 Isolamento e cultivo das cepas

No laboratório de Controle Biológico da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, foi adicionado 1g do solo em um tudo de ensaio e acrescentados 10 mL de solução água destilada. As soluções foram homogeneizadas e submetidas a choque térmico (70°C por 30 minutos / gelo por 5 minutos). Em seguida foram plaqueadas em meio Agar Nutritivo com ampicilina diluída, mesmo protocolo utilizado por Ricieto et al. (2013), e com duplicata sem antibiótico, incubadas em BOD a 30°C. Após 48 horas, as colônias crescidas com tamanho

médio de aproximadamente de 0,5 cm, cores esbranquiçadas, opacas e bordas irregulares, foram identificadas como típicas de *B. thuringiensis* ou *B. cereus* as quais foram observadas e fotografadas, como mostra a figura 4. Após completa esporulação, as cepas foram visualizadas em microscópio óptico para observação da presença de células vegetativas, esporos e cristais.

Em microtubo foi preparado 2 mL de meio líquido contendo Nutrient Broth, onde em cada tubo foi semeado as colônias que cresceram com aspecto de colônia de Bt e colocadas para crescer a 30°C por 19 horas. Após crescimento bacteriano, as amostras foram retiradas, centrifugadas e armazenadas para posteriores análises moleculares.

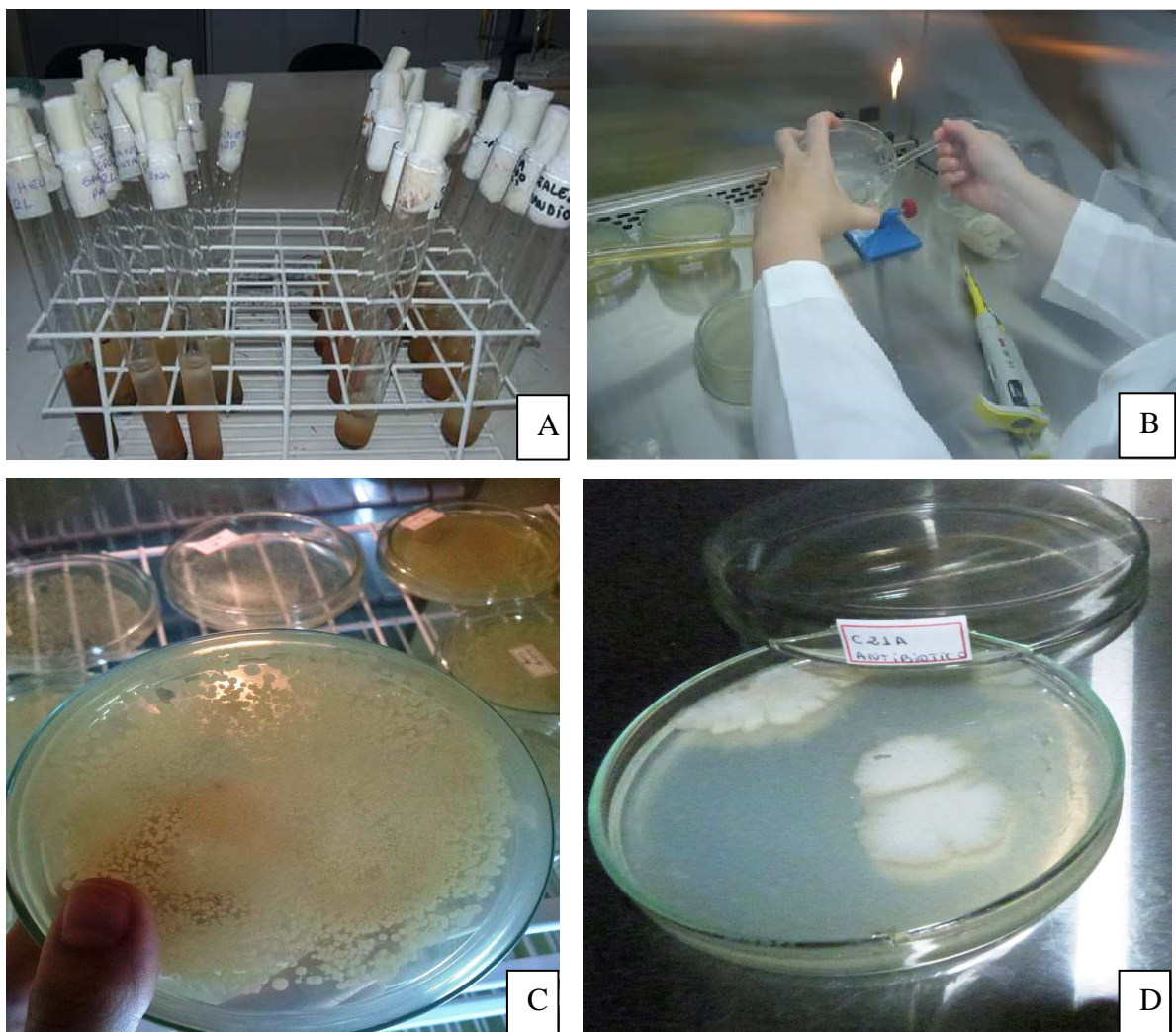
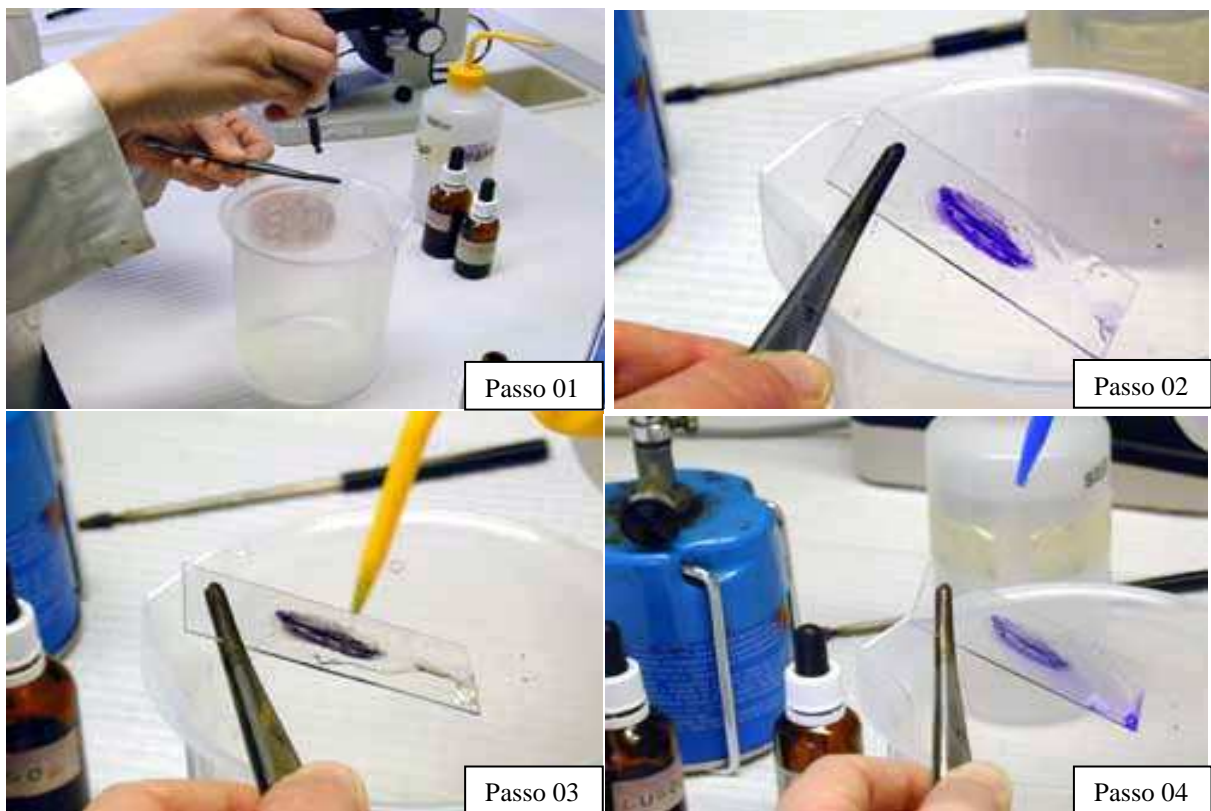


Figura 4 - Isolamento das amostras solo das propriedades analisadas: (A) diluição das amostras solo. (B) amostras plaqueadas em meio Agar Nutritivo com ampicilina diluída. (C) placas em BOD a 30°C. (D) placas com uso de penicilina que apresentaram colônia com aspecto Bt.

Fonte: Mascarello (2016).

4.2.3 Análise Morfológica por Microscopia

Para facilitar a visualização utilizou-se o método de coloração diferenciada para *B. thuringiensis* (Benz & Borusiewicz 1963), onde as estruturas adquirem cores diferenciadas, podendo constatar a presença de esporos, cristais e células. Para isso, preparou-se uma mistura de Amido Black, metanol, água destilada e ácido acético determinado como “solução A” e outra com fucsina básica, etanol, fenol e água destilada, conhecida como “solução B”. A técnica de coloração consistiu em realizar um esfregaço das bactérias em lâmina limpa, em seguida as lâminas foram deixadas secar ao ar e fixadas no calor. Com a lâmina ainda quente, o esfregaço foi coberto com a solução A por 70 segundos, em seguida foi lavado em água corrente e logo após o esfregaço foi coberto com a solução B por 20 segundos, seguidas de lavagem e secagem (Figura 5).



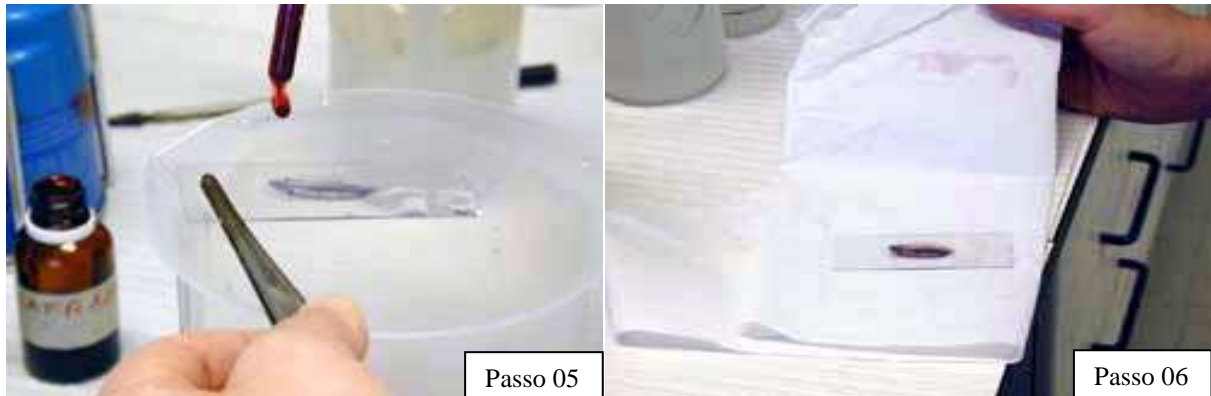


Figura 5 - Técnica de coloração diferenciada para Bt (Benz & Borusiewicz 1963)

Fonte: <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=306&ordem=5> (2017)

4.2.4 Extração de DNA, PCR e Eletroforese

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura descrito por Hansen e Hendriksen (2001), seguidos por método de quantificação do DNA em gel de agarose 1,0% em tampão TBE, corados com Gel Red®. A amplificação foi processada em termociclador Ampliterm® e as condições de amplificação foram: 95° C por 1 min, 50° C por 1 min, 72° C por 1 min (35 ciclos), e uma extensão extra de 72° C por 5 min. Para as amplificações foram utilizados pares de *primers* para amplificação de genes *cry*. Cada par de *primer* tem uma temperatura de anelamento específica e portanto, essa etapa teve alterada a temperatura específica para cada *primer* (Figura 6).

Através da técnica de PCR foi realizado um teste de *primers* para diversos genes *cry*, com amplificação dos genes *cry1* (f) CTGGATTTACAGGTGGGGATAT (r) TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT; *cry2* (f) GAGTTTAATCGACAAGTAGATAATTT (r) GGAAAAGAGAATATAAAAATGGCCAG; *cry11* (f) CGCTTACAGGATGGATAGG (r) GCTGAAACGGCACGAATATAAATA, sendo os mesmos *primers* utilizado por Bravo et al. (1998) e Ibarra et al. (2003) e *cry3* (f) CGTTATCGCAGAGATGACATTAC (r) CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT; usado por Ben-Von et al. (1997).

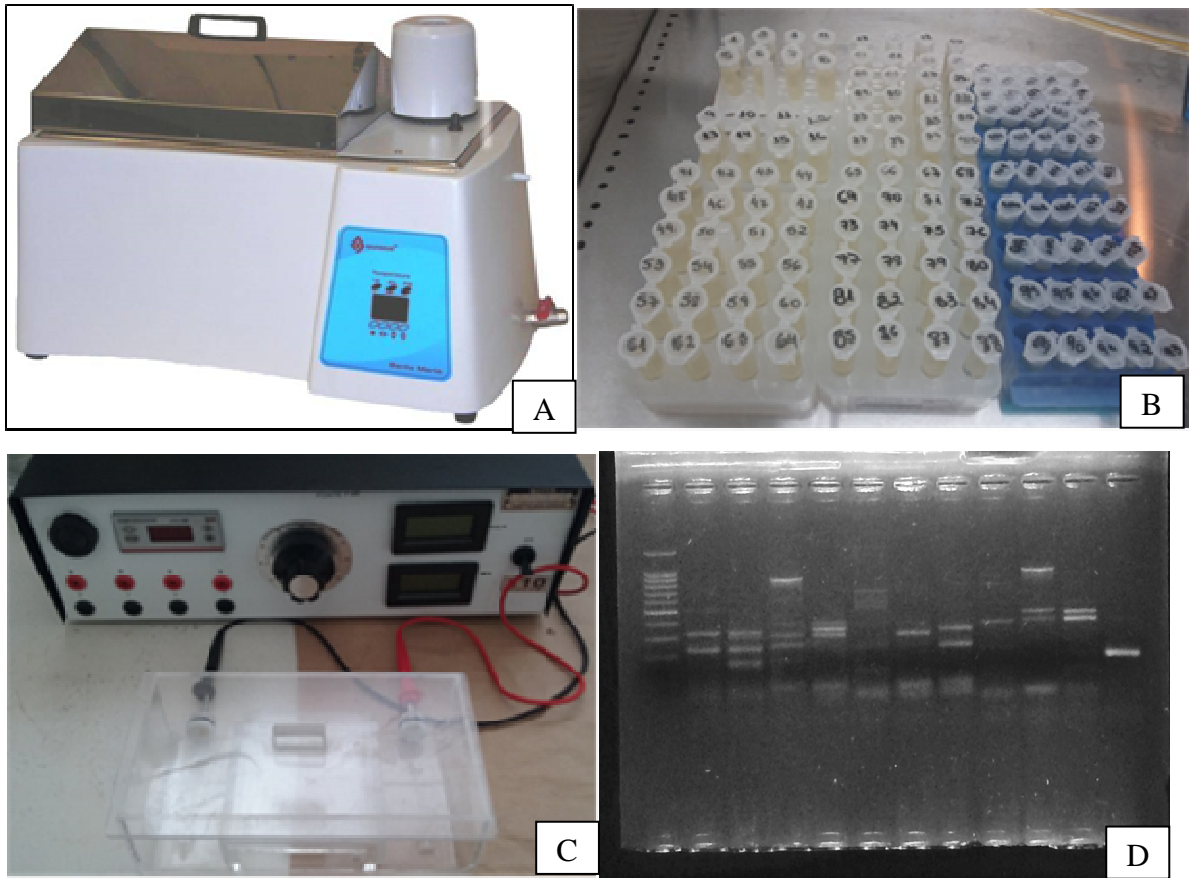


Figura 6 - Extração de DNA, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e Eletroforese: (A) banho maria; (B) Extração das amostras de DNA; (C) aparelho de eletroforese; (D) eletroforese em gel a 1,2%.

Fonte: Mascarello (2016)

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE, corados com Gel Red® e os resultados visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em sistema de fotodocumentação Locus®. Para a comparação do peso molecular das bandas de amplificação, foi utilizado o marcador de 100pb DNA Ladder.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE CIENCIOMÉTRICA

Foi possível identificar os países que mais investiram em pesquisas relacionadas ao *Bacillus thuringiensis*. Foram observadas publicações de artigos de pesquisas desenvolvidos em 143 países, sendo que 51 países atingiram o mínimo de 20 publicações. Os três primeiros países que mais tiveram publicações referentes ao *Bacillus thuringiensis* foram: os Estados

Unidos (EUA) com 3535 publicações, seguidos de China, com 1227 e Índia, com 681 (Gráfico 1).

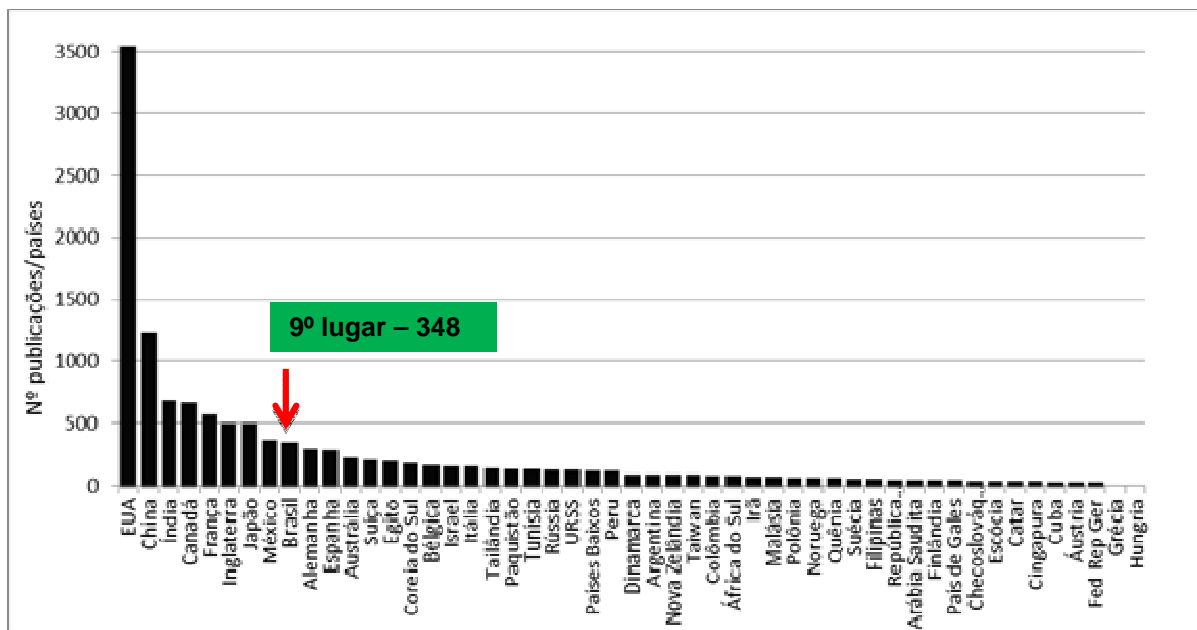


Gráfico 1 - Número de publicações por países: levando em consideração os países que tiveram acima de 20 publicações.

Fonte: Mascarello (2017)

Os EUA se destacam como uma das maiores potências mundiais no ramo agrícola, sendo a soja um dos grãos mais produzidos. Assim para atender o mercado mundial, são necessárias pesquisas nos setores de controle de pragas, em especial o controle biológico que acometem as produções agrícolas (KIST et al., 2014). Ainda de acordo com a publicação da Revista Exame (2013) por Giuliana Napolitano, “os Estados Unidos e China disputam o posto de maior produtor global de grãos, mas não há dúvida de quem é mais eficiente. Apenas 1,7% da população americana trabalha no campo — na China, a proporção é de um para três” (<http://exame.abril.com.br/ciencia/o-apogeu-da-agricultura>). Dessa forma fica evidente o elevado número de publicações e pesquisas desses países relacionado ao setor produtivo agrícola. É crescente a busca de conhecimentos relacionados ao *Bacillus thuringiensis* (Bt), bactéria essa que corresponde a 90% do mercado mundial de bioinseticidas, destacando-se por apresentar atividade tóxica a diversas espécies de pragas agrícolas e urbanas (ANGELO et al., 2010).

O Brasil ficou em 9º lugar no ranking, entre o México e Alemanha, mas sendo o primeiro dentro da América do Sul com 348 publicações, seguido da Argentina que ocupa 27º lugar com 84 publicações. Esses são os únicos países da América do Sul a apresentarem resultados nessa pesquisa. Vargas (2014), evidencia que a produção científica nacional

brasileira em Ciências Agrárias, representa de 2000-2011 um expressivo crescimento de 344% em publicações. De acordo com o Boletim n. 3, nov. (2011) da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) “O Brasil lidera a produção de artigos científicos em relação aos principais países da América Latina, tendo publicado 94.622 trabalhos em periódicos científicos internacionais indexados pelo Web of Science no período 2008 a 2010”, esses dados reforçam os resultados obtidos nesse estudo.

O primeiro registro referente ao Bt ocorreu no ano de 1954, seguido de quatro registros em 1955. Não houveram registros em 1956. De 1957 aos dias atuais todos os anos, novos artigos sobre o assunto foram publicados em uma escala crescente (Gráfico 2). O ano que mais se obtiveram registros de publicações foi em 2013: dos 10.793 artigos selecionados, 485 publicações foram nesse ano.

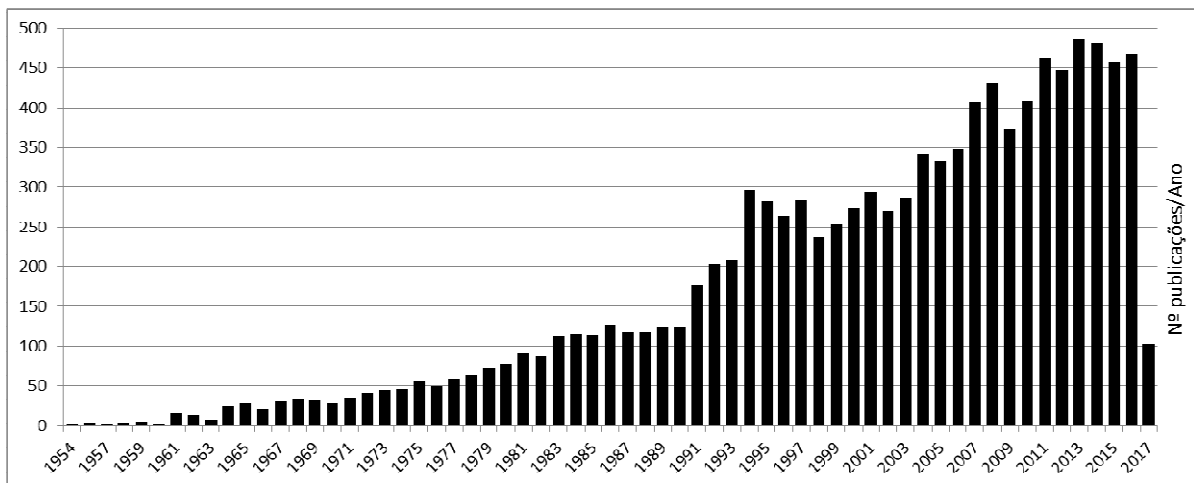


Gráfico 2 - Número de publicações por ano: dados coletados na plataforma webofsciense de 1954 a abril de 2017, referente a publicações no mundo sobre Bt.

Fonte: Mascarello (2017).

O grande marco do crescimento ocorreu no início da década de 1990 na chamada “Revolução Transgênica”, com a ascensão de pesquisas referentes aos Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). Os OGMs são seres vivos que tiveram sua sequência manipulada para alteração do seu genótipo, geralmente por interesse comercial. Já um organismo transgênico se refere a um ser vivo ao qual foi inserido um gene ou uma sequência gênica de um ser vivo de espécie diferente alterando também seu genótipo (ALVES, 2004).

As plantas transgênicas tiveram sua primeira variedade comercializada a partir de 1994. Contudo, juntamente com a explosão de vendas no setor de sementes geneticamente modificadas, cresceram os registros de resistência ao herbicida glifosato, como também a resistência por insetos da ordem Lepidóptera (ALBRECHT et al., 2013).

Uma evidente expansão no interesse por pesquisas relacionadas ao Bt ocorreu nos anos de 2011 e 2013. Foram 463 publicações em 2011, com 485 em 2013, ano este com maior número de publicações registradas. Este aumento significativo refere-se aos estudos relacionados à resistência de insetos. No ano de 2014 tivemos 481 publicações.

No que se refere ao número de publicações por área do conhecimento (Gráfico 3), obteve-se 99 áreas do conhecimento com publicações referente ao Bt. Todavia foram levados em consideração as revistas que tiveram acima de 30 publicações, sendo analisadas 33 áreas com maior número de publicações.

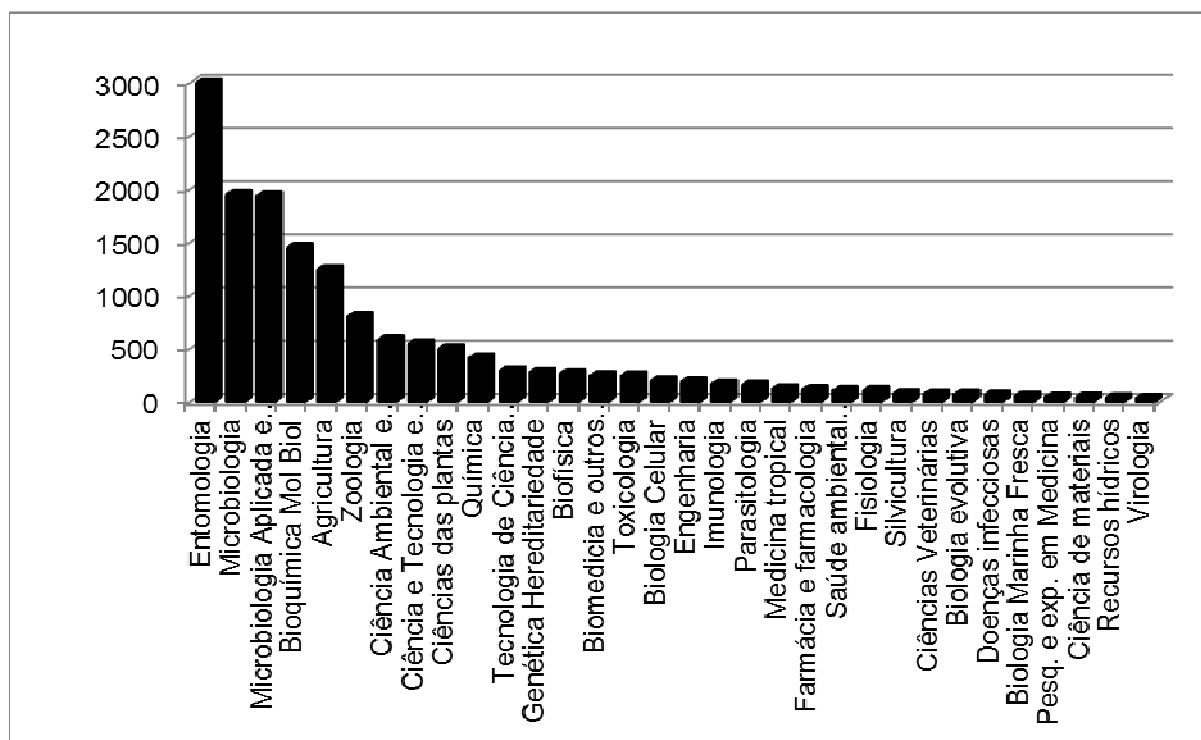


Gráfico 3 - Número de publicações por área do conhecimento: levando em consideração as revistas que tiveram acima de 30 publicações, entre os anos de 1954 a abril de 2017.

Fonte: Mascarello (2017).

Evidencia-se a área de “Entomologia” com 2.995 artigos, com relevantes pesquisas sobre toxicidade de bacilos no controle de espécies pragas, resistência natural e transgenia. A área da “Microbiologia” são 1.935 e na “Biologia Molecular” 1.450 publicações. Estas estão associadas ao isolamento e caracterização de novas cepas; meios de cultura; toxicidades a insetos pragas e estudos moleculares sobre as toxinas e enzimas atuantes nesse processo.

Incluem-se ainda nessa pesquisa, área citada como “Agricultura” são 1.240 produções, associados a áreas de resistência de pragas, controle de pragas e organismos geneticamente

modificados. Na área referente a “Zoologia”, foram 801 referências também relacionadas a toxicidade de Bt a espécies pragas, controle biológico e resistência de pragas.

No que se refere à biodiversidade de espécies de Bt destacam-se as publicações na área da “Ecologia” com 583 publicações e na área de “Ciência, Tecnologia e outros tópicos” são 542 publicações. Esse elevado número de publicações na área da Entomologia deve ao fato de que mais de 500 espécies pragas já foram identificadas. Destacando-se pela resistência ao uso de agroquímicos, ocorrência de surtos de pragas secundárias, ressurgimento de pragas relacionados ao uso indiscriminado de produtos químicos nas produções agrícolas (PARRA, 2014).

Segundo a Revista “Microbiologia em foco” (2013), o significativo número de publicações nas áreas de Microbiologia, Biologia Molecular e Bioquímica, se dão em virtude dos avanços em estudos com Biotecnologia, desempenhando importante papel no isolamento e modificação de genes (PAKER & MENEGHINI, 2013). Contudo, é necessário ressaltar ainda, que desde 1960 vem se buscando uma agricultura mais sustentável, com aplicação e desenvolvimento de técnicas como manejo integrado de pragas, tendo assim apoio da comunidade científica com pesquisas no setor agrícola, sendo a Agricultura a quinta área com mais publicações de artigos no mundo.

Em relação aos dados coletados sobre o idioma (Gráfico 4), o inglês lidera o ranking com percentual de 96% das publicações sobre Bt. Isso se deve pelo fato de que esse idioma é universal no meio científico, e, portanto, os artigos científicos em inglês têm chances de ser visto por pessoas do mundo todo. Em seguida aparecem outros idiomas com frequências muito pequenas. O francês com 1%, e outros países com menos de 1% da publicação cada: o Russo, Alemão, Japonês, Português, Espanhol, Chinês, com acima de 10 publicações cada.

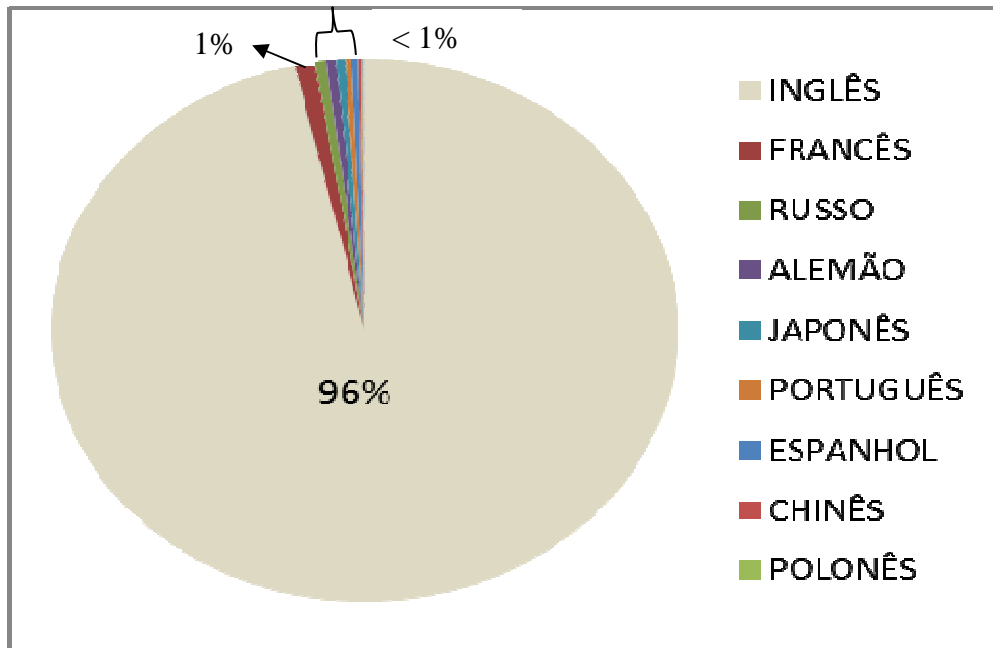


Gráfico 4 - Número de publicações de artigos sobre Bt por idiomas.

Fonte: Mascarello (2017).

5.2 ISOLAMENTO E ANÁLISE MORFOLÓGICA

Das 26 amostras de solos, observou-se crescimento bacteriano em 10 placas com meio de cultura contendo ampicilina (Figura 7). Foram obtidos cinco amostras em solo agrícola, três em RL e duas em APP, descritos resultados na tabela 2.

Tabela 2: Relação dos meios de cultura com crescimento bacteriano. Placas que apresentaram crescimento de 3, 2, 1 colônias

Empresa	Propriedade	Sigla utilizada	Vegetação/cultivar	Resultados	Número de Colônias (Isolados)
GEBANA	Pérola do Oeste/Pr	PO11A	APP	Negativo	Ausente
GEBANA	Pérola do Oeste/Pr	PO11R	RL	Negativo	Ausente
GEBANA	Pérola do Oeste/Pr	PO11L	Lavoura	Positivo	1 (uma) colônia
GEBANA	Santa Helena/Pr	SH31R	RL	Negativo	Ausente
GEBANA	Santa Helena/Pr	SH31P	Pastagem	Negativo	Ausente
GEBANA	Santa Helena/Pr	SH31T	Talhão	Positivo	1 (uma) colônia
GEBANA	Marechal Candido Rondon/Pr	MCR41G	Glebas	Negativo	Ausente
GEBANA	Marechal Candido Rondon/Pr	MCR41P	Pastagem	Negativo	Ausente
GEBANA	Marechal Candido Rondon/Pr	MCR41R	RL	Positivo	2 (duas) colônias
GEBANA	Capanema/Pr 1 (Elso)	C21A	APP	Positivo	3 (três) colônias
GEBANA	Capanema/Pr 1 (Elso)	C21P	Pastagem	Negativo	Ausente
GEBANA	Capanema/Pr 1 (Elso)	C21G	Glebas	Positivo	3 (três) colônias
GEBANA	Capinzal/SC	CZ51P	Pastagem	Negativo	Ausente
GEBANA	Capinzal/SC	CZ51E	Erva Mate	Negativo	Ausente
GEBANA	Capinzal/SC	CZ51A	APP	Negativo	Ausente
GEBANA	Capanema/Pr (Elso) 2	CE71L	Lavoura	Negativo	Ausente
GEBANA	Capanema/Pr (Elso) 2	CE71R	RL	Negativo	Ausente
GEBANA	Capanema/Pr (Elso) 2	CE71A	APP	Negativo	Ausente
BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81M	Mandioca	Positivo	1 (uma) colônia
BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81R	RL	Positivo	1 (uma) colônia
BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81A	APP	Negativo	Ausente
BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO81T1	Trigo	Negativo	Ausente
BIORGÂNICA	Realeza /PR	RBIO8T2	Trigo	Positivo	2 (duas) colônias

GEBANA	Capanema/Pr (Mario)	CM61L	Lavoura	Negativo	Ausente
GEBANA	Capanema/Pr (Mario)	CM61R	RL	Positivo	1 (uma) colônia
GEBANA	Capanema/Pr (Mario)	CM61A	APP	Positivo	1 (uma) colônia

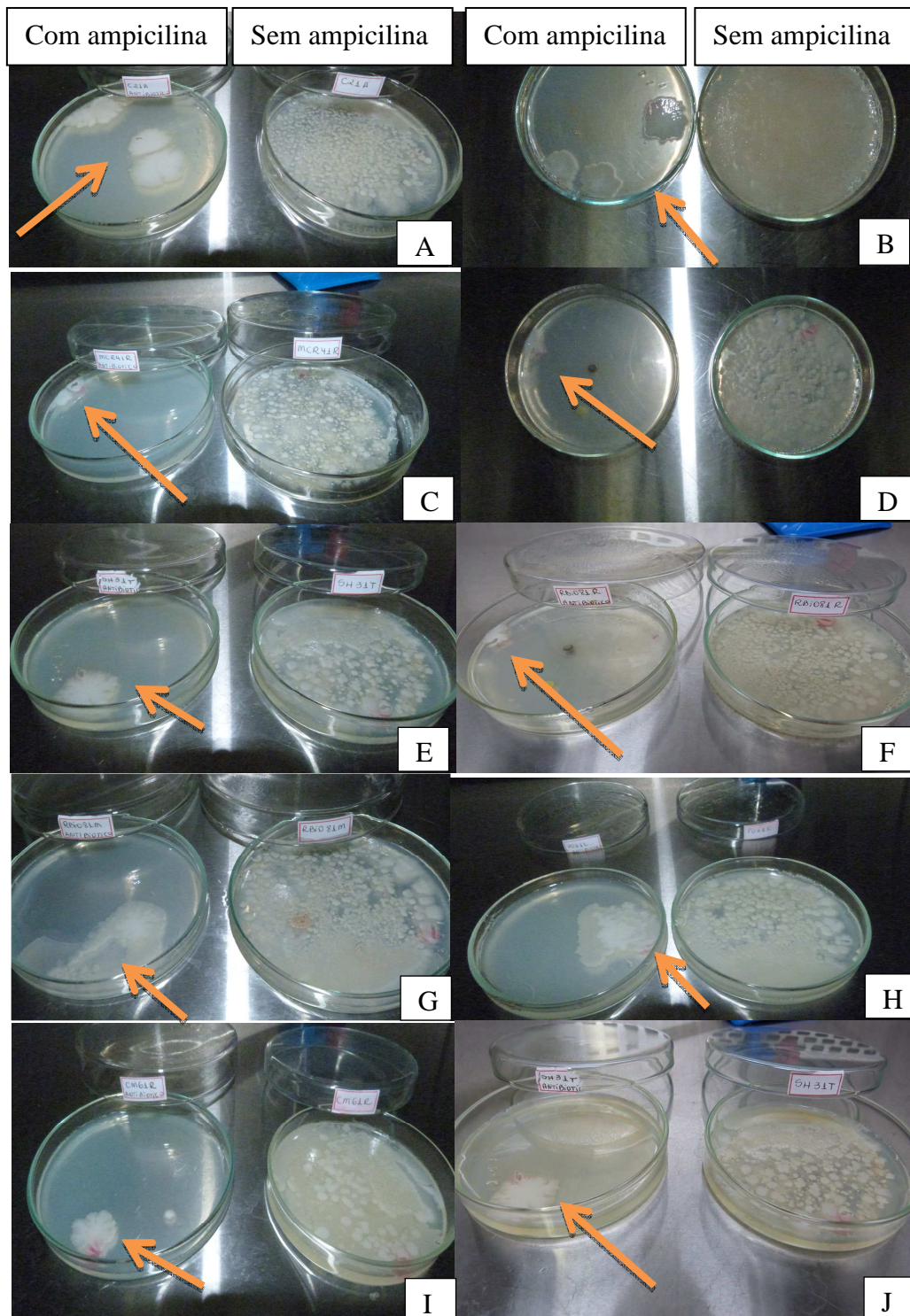


Figura 7 - Placas com crescimento de colônias com aspecto Bt.

C21G; (B) C21A; (C) MCR41R; (D) RBIO81T; (E) SH31RL; (F) RBIO81M; (G) RBIO81R; (H) PO11L; (I) CM61RL; (J) SH31T.

Fonte: Mascarello (2016).

Nas colônias que obtiveram resistência a ampicilina, seus aspectos apresentaram-se esbranquiçadas e irregulares, característico de Bt. Nas duplicatas sem uso de antibiótico

observamos crescimento de 41 isolados com formas semelhantes. As amostras que não obtiveram crescimento em meio com antibióticos foram descartadas e das suas duplicadas foram selecionadas 81 colônias com crescimento semelhante ao Bt (Figura 8).

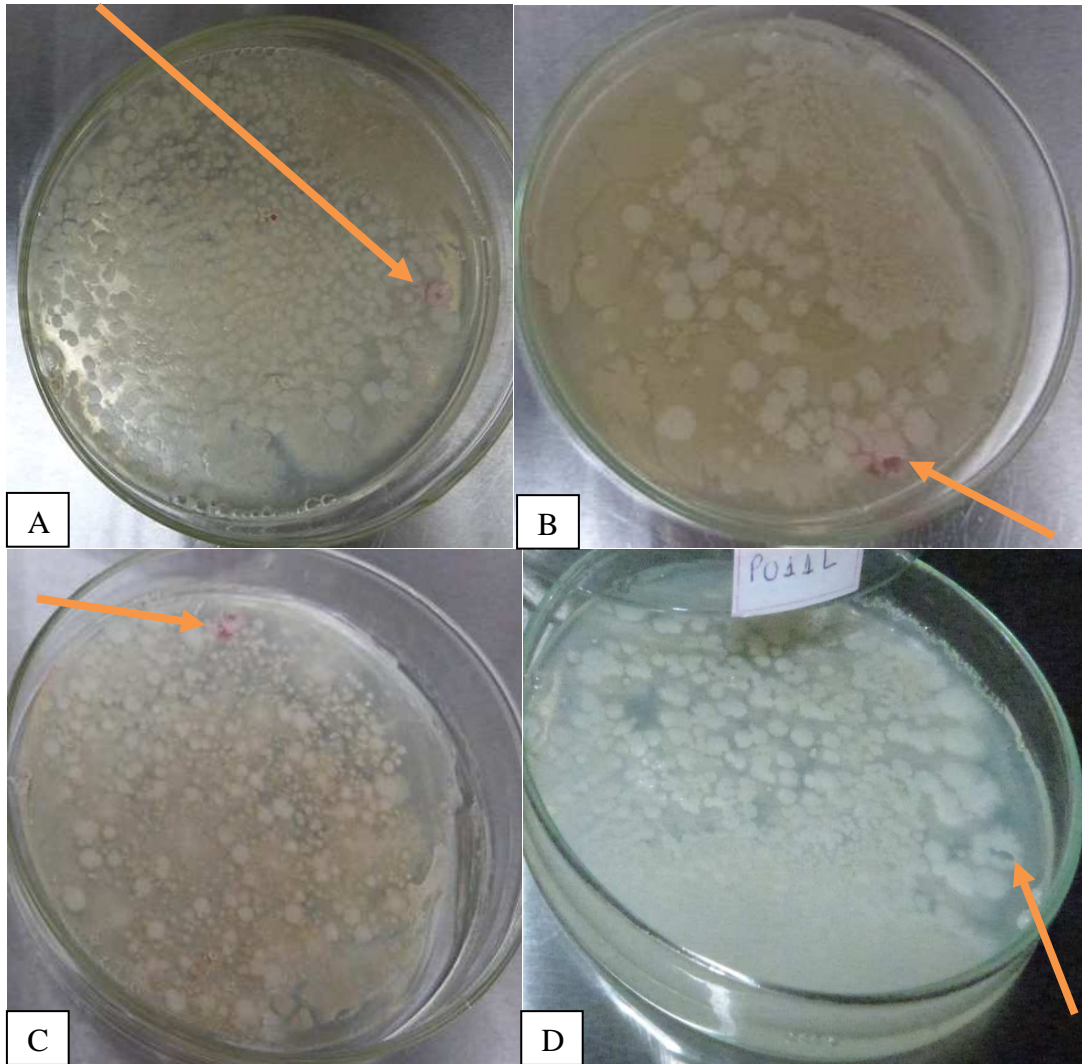


Figura 8- Colônias das duplicatas. (A) C21 agricultura- duplicata; (B) CM61 RL duplicata; (C) MCR41 RL- duplicata; (D) Pérola do Oeste (PO11) agricultura
Fonte: Mascarello (2016).

Dessa forma, considerou-se cada uma das 138 colônias obtidos como um isolado de Bt distinto para análise morfológica em microscopia e análise molecular. Foram extraídos DNAs de 138 isolados, sendo 16 amostras provenientes de placas com a presença de ampicilina e 41 isolados de suas duplicatas (sem uso de ampicilina).

As 10 placas restantes preparadas com uso de antibiótico e que não apresentaram crescimento foram descartadas e com as suas duplicatas foram selecionados 81 isolados com aspectos semelhantes as colônias de Bt (Figura 9).

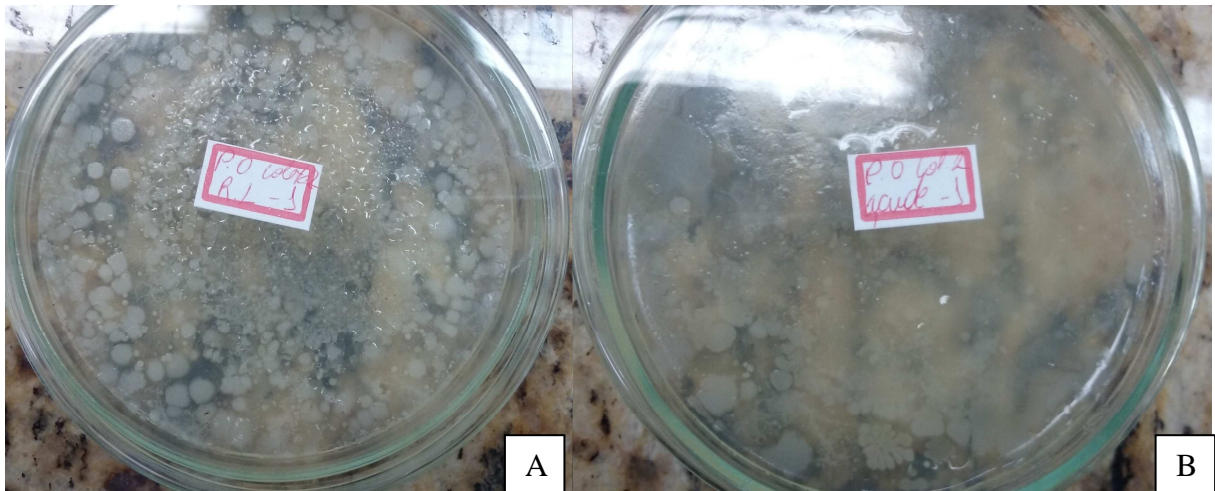
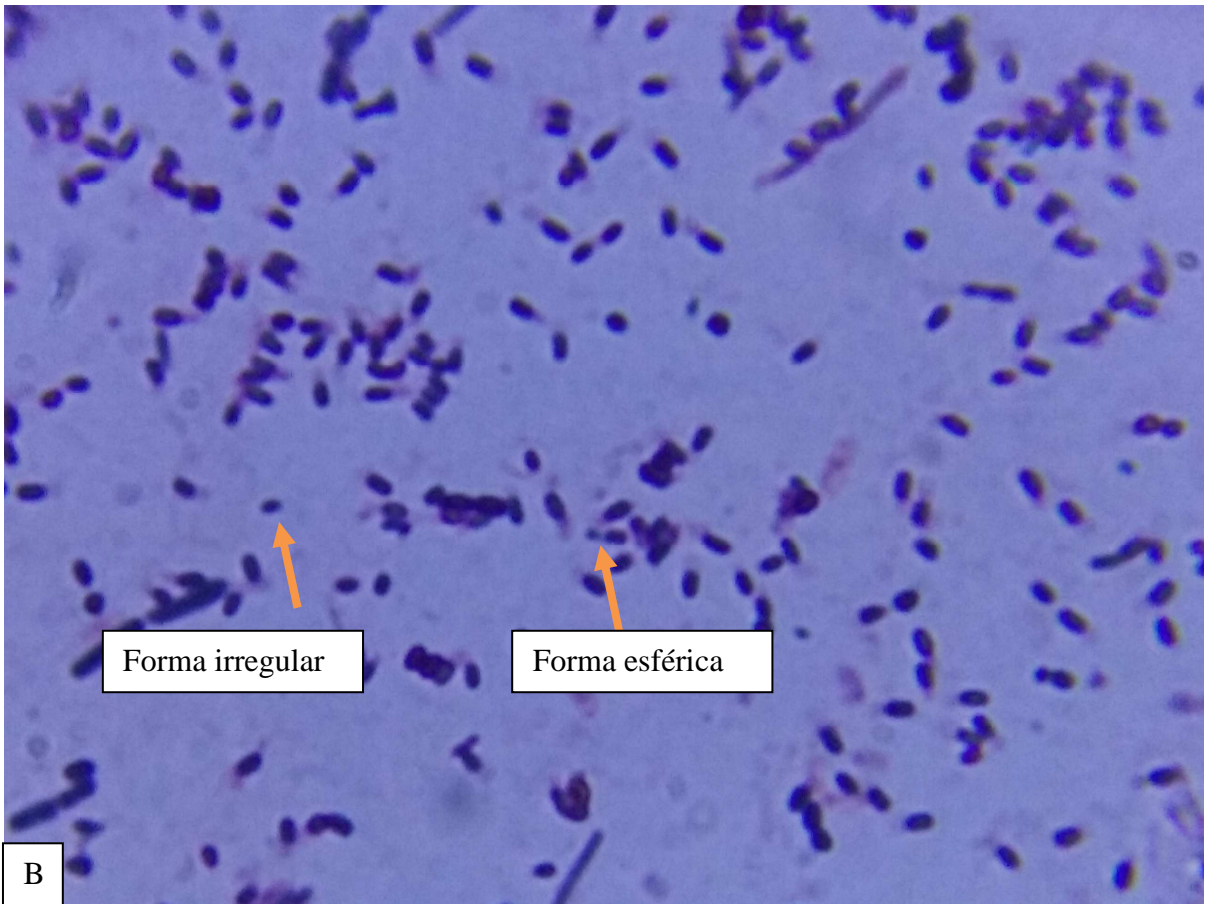
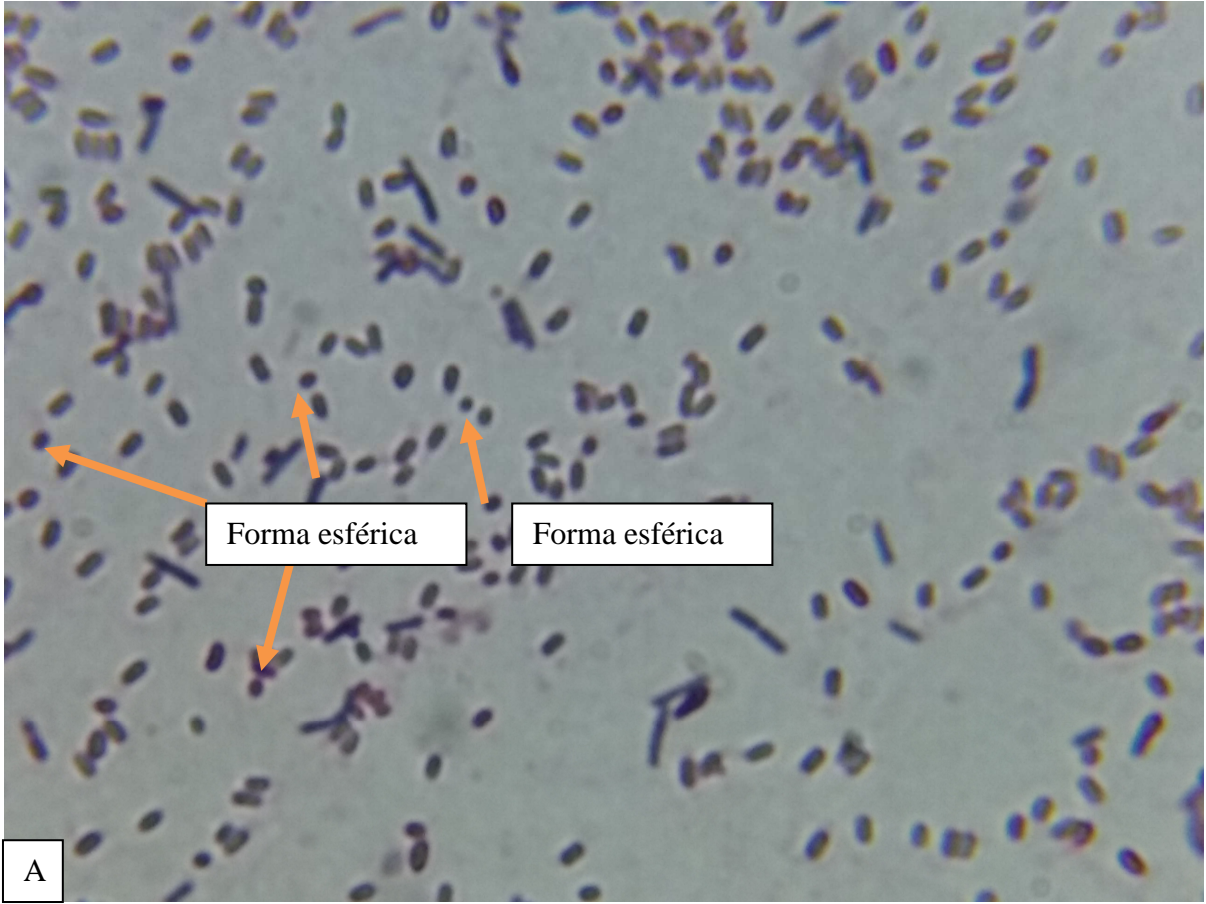


Figura 9 - Duplicatas com crescimento Bacteriano. Placas da propriedade de Pérola do Oeste em RL (A) e APP (B), duplicatas com crescimento bacteriano sem uso de antibiótico. Fonte: Mascarello (2016).

As colônias foram observadas ao microscópico óptico em lente objetiva de 40X e 100X. Verificou-se a presença de cristais esféricos e irregulares, com células vegetativas em forma de bacilo e presença de esporulação (Figura 10). Essa descrição é muito característica da espécie *Bacillus thuringiensis*. Segundo Ibarra et al. (2003), cepas com pequenas inclusões de cristais ovoides, são muito semelhantes aos já encontrados em *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Já o *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* apresenta cristais em forma bipiramidal, cuboide e esférico (BATISTA et al., 2005). A forma bipiramidal não foi visualizada quando analisado a morfologia da bactéria.

A ausência de cristais bipiramidais, e as diferenças na distribuição da morfologia do organismo parasporal podem ser devido à variação genética associada a diferenças nas condições ambientais ou nos efeitos do habitat (MAHALAKSHMI et al., 2012). Todavia não se pode afirmar com precisão que se trata de Bt. Seria necessária a visualização em microscopia eletrônica de varredura para maior nitidez e confirmação dos resultados ou confirmação molecular através da identificação de genes *cry*.



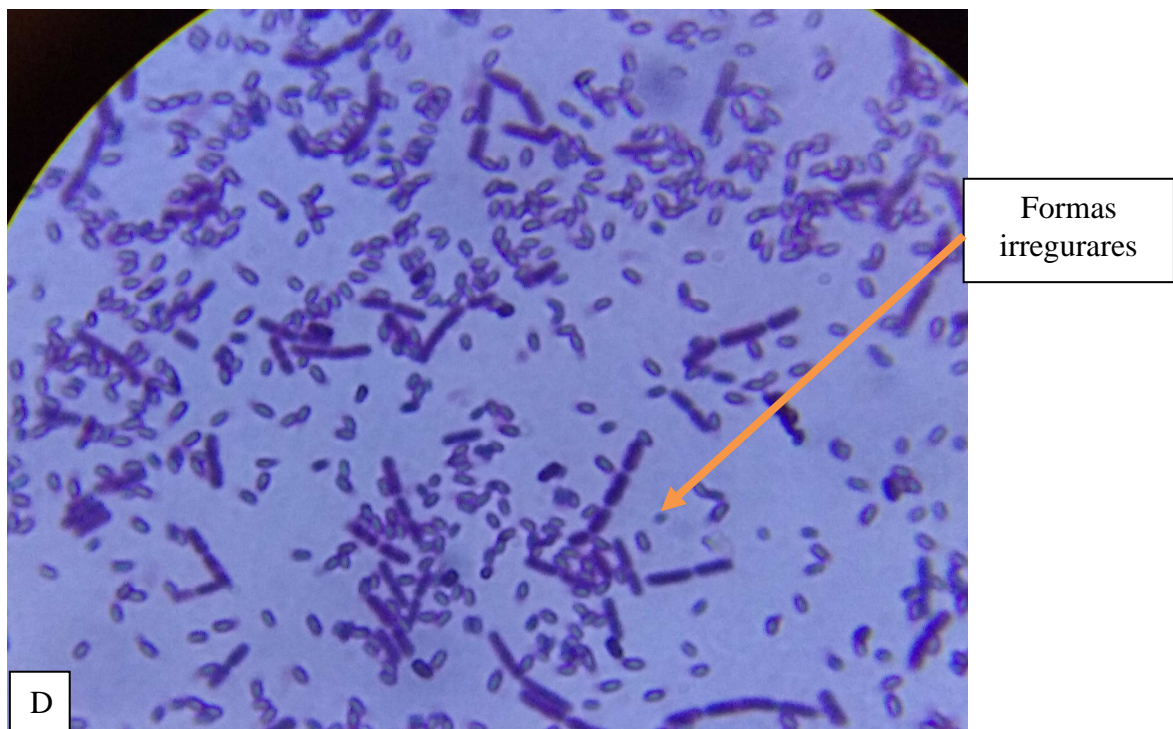
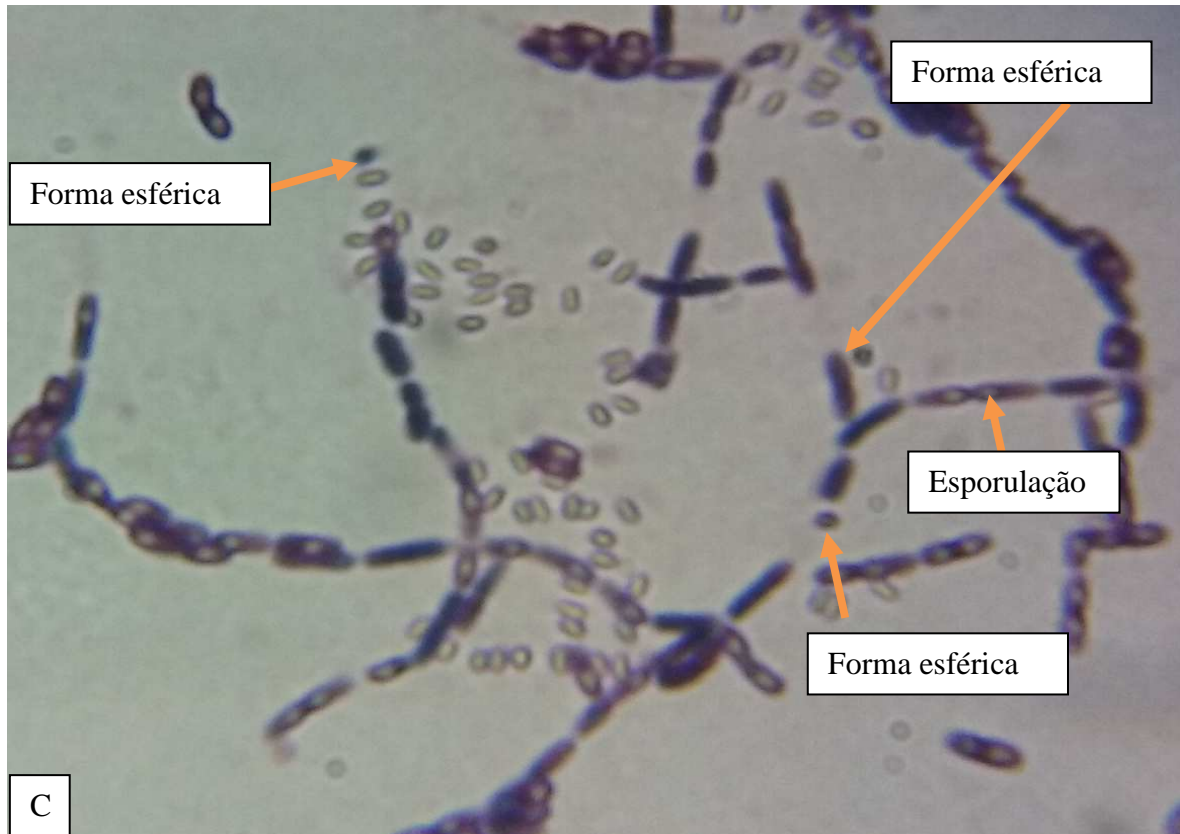


Figura 10 - Morfologia dos isolados. (A) SH31R – presença de células vegetativas, esporulação e esporos esféricos; (B) MCR61 sem antibiótico – com aspecto esférico e irregular; (C) RBIOR- muita esporulação e presença de esporos esféricos, bordas bem escurecidas; (D) RBIO81T- formas irregulares.

Fonte: Mascarello (2016).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Para confirmação específica dos isolados procedeu-se à extração de DNA genômico total. Após a extração, o DNA foi aplicado em gel de agarose para quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído. De acordo com os resultados da eletroforese foi possível constatar que as amostras de DNA apresentaram quantidade e qualidade adequadas para as reações de amplificação variando de 10 a 40nm em UV, sem nenhum sinal de degradação do DNA na reação.

Nas amostras analisadas do *cryI* as bandas produzidas apresentaram tamanhos muito variáveis (menos de 200 pb a aproximadamente 900 pb) e com mais de uma banda para um mesmo indivíduo, indicando pareamento inespecífico do *primer* (Figura 11).

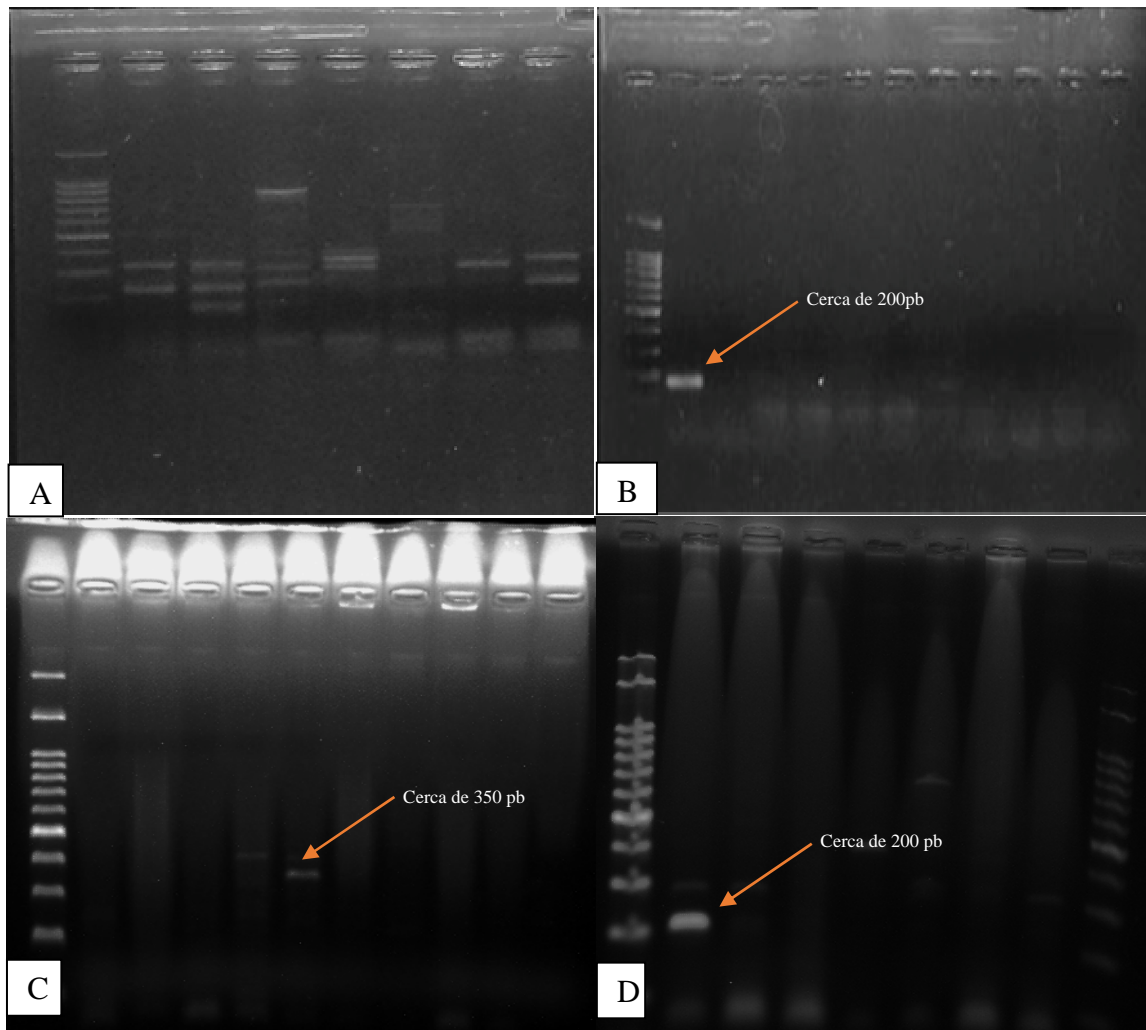


Figura 11 - Resultado eletroforese em gel *cryI*. (A e B) *cryI* em eletroforese em gel de agarose 1,2%, com temperatura de anelamento de 48°C; (C e D) resultado gel de eletroforese *cryI* com temperatura de anelamento a 50°C.

Fonte: Maniglia (2017).

Para os genes para o *cry2*, não foram obtidos bandas nítidas. É possível visualizar no gel a presença do DNA genômico, na margem superior da figura 12, também há excesso de *primer* na parte inferior da figura, com ausência de bandas.

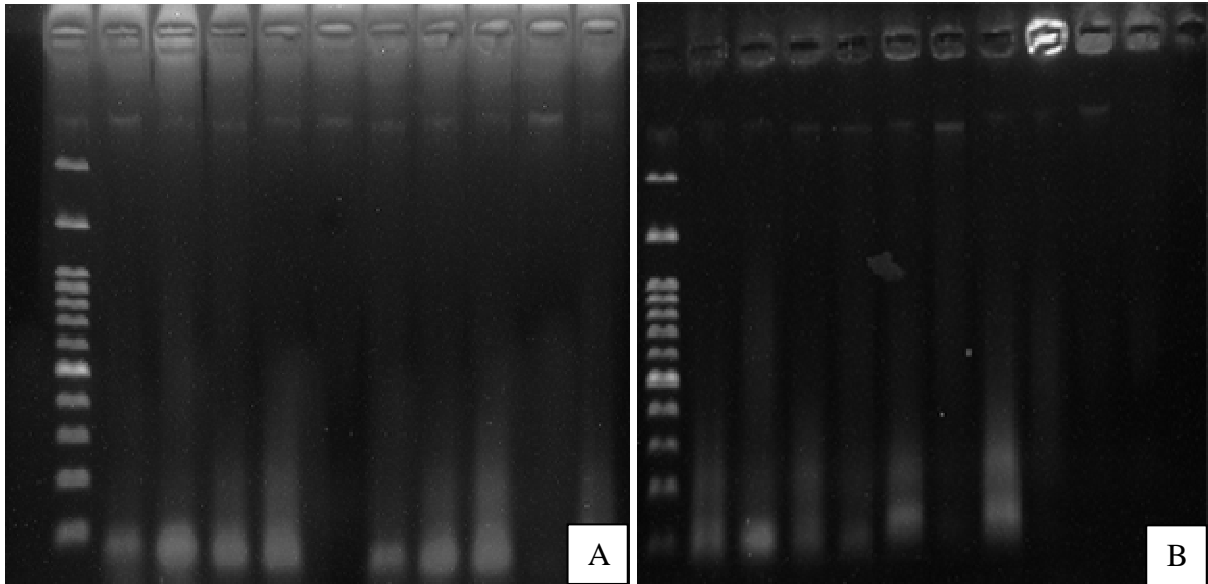


Figura 12 - Resultado eletroforese em gel para o *cry2*. (A e B) Resultado *cry2* em eletroforese em gel de agarose a 1,2% com temperatura de anelamento a 50°C com ausência de bandas.

Fonte: Mascarello (2017).

Para os genes para o *cry3*, as bandas obtidas foram de 850 a 1300 pb, com bandas múltiplas para alguns indivíduos, sugerindo também o pareamento inespecífico dos *primers* (Figura 13). Foram feitos testes de PCR com temperaturas de anelamento diferentes para tentar solucionar o problema, mas não se obteve sucesso.

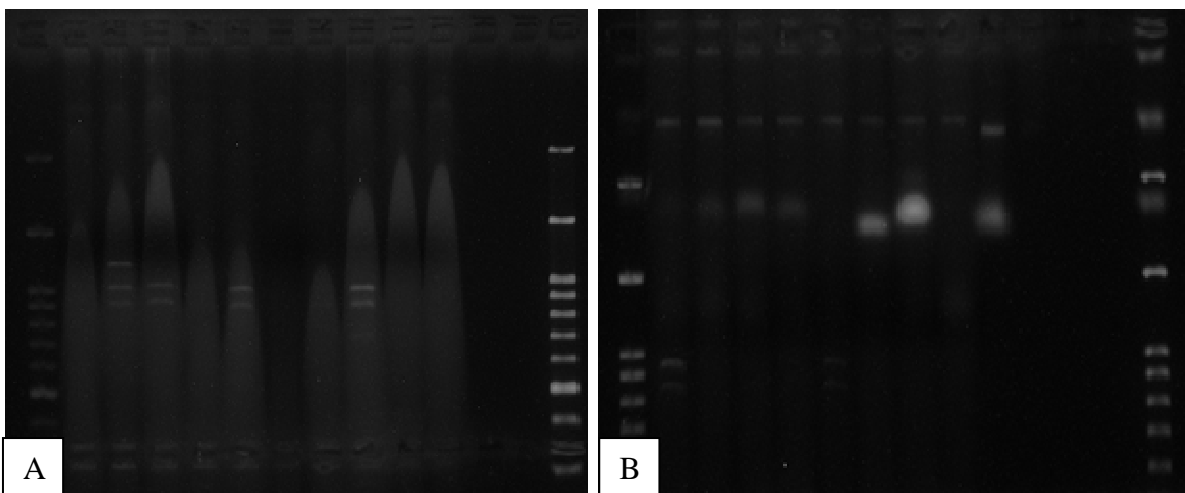


Figura 13 – Resultado genes *cry3*. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% com temperatura de anelamento a 55°C. (A) bandas múltiplas para alguns indivíduos. (B) Bandas de 850 a 1300 pb, com bandas múltiplas para alguns indivíduos

Fonte: Maniglia (2017)

A caracterização molecular (amplificação via PCR) para os genes *cry1*, *cry2* e *cry3* apresentou resultados incompatíveis com o esperado segundo a literatura. De acordo com Bravo et al. (1998), Ibarra et al. (2003); Ricieto et al. (2013) a banda produzida com o par de primer para o gene *cry1* deve apresentar tamanho de 558 pb, para o *cry2* 526 pb. E segundo Ben-Dov et al. (1997) o *cry3* deve apresentar 589-604 pb.

Portanto, os resultados foram inconclusivos e necessitam ser repetidos para confirmação da presença desses genes. O fato das bactérias apresentarem multiplicidade dos genes *cry*, pode estar relacionado ao processo de conjugação bacteriana, pois é comum microrganismos trazerem de seus ancestrais características evolutivas e adaptativas para a espécie (ABREU et al., 2008). Este fato pode estar relacionado a variações no tamanho do fragmento amplificado com o mesmo *primer* para cepas diferentes, principalmente se forem de locais geográficos distintos. Seria necessário também, o sequenciamento do DNA dos fragmentos amplificados para confirmação da presença desses genes. Trabalhos futuros devem ser realizados com esta técnica.

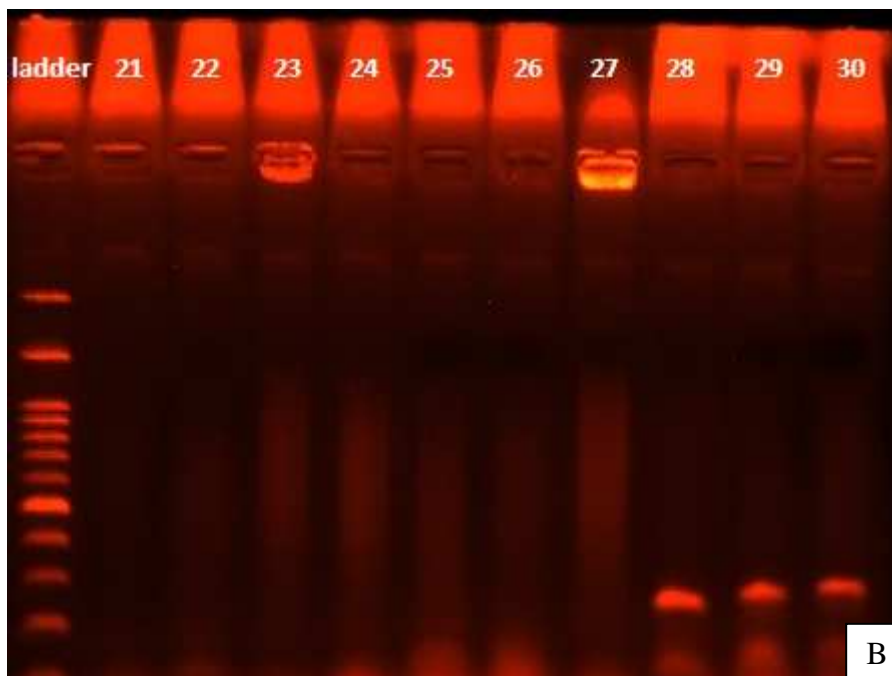
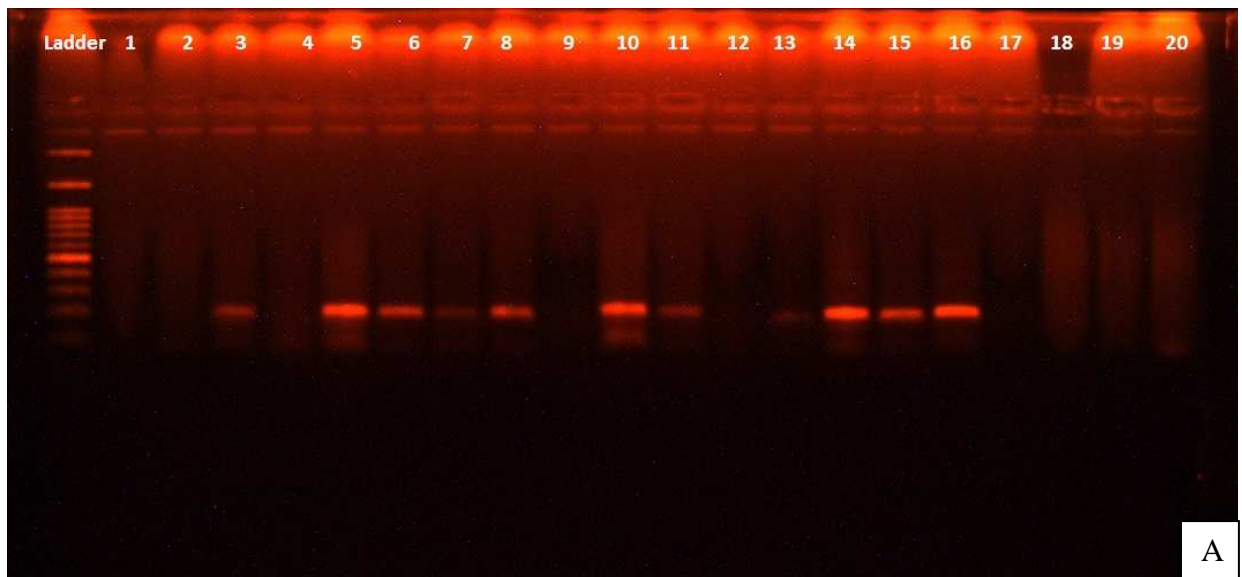
Em comparação com as bandas do *ladder* 100 pb, foi possível verificar que as bandas amplificadas com o par de *primers* para o gene *cry11* produziram bandas em torno de 350pb. Também foram obtidos fragmentos de 200 a 250 pb que não era o esperado, mas como houve um padrão de banda entre vários indivíduos, é improvável que seja um pareamento inespecífico do *primer*, podendo estar associado esse resultado a variação genética em bactérias.

Em relação ao gene *cry11* foi possível verificar bandas amplificadas em torno de 200pb, 300pb e 350pb. De acordo com Ibarra et al. (2003) o tamanho das bandas para esse *cry11* pode variar de 342-353pb. Foram obtidos resultados positivos em um total de 17 amostras, conforme indicados na tabela 3.

Tabela 3: Relação ao número de isolados por propriedades estudadas, relacionando o tipo de vegetação e o número de pares de bases obtidos em cada banda analisada em eletroforese em gem de agarose a 1,2%.

Sigla utilizada para as propriedades/amostras	Vegetação/cultivar	Isolados / Colônias	Resultado Molecular (Gene <i>cryI</i>)	Amostra	pb
SH31R (1)	RL	Negativo	Positivo <i>cryI1</i>	11	200pb
SH31P	Pastagem	Negativo	-----	-----	-----
SH31T (1)	Talhão	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	3	200pb
MCR41G	Glebas	Negativo	-----	-----	-----
MCR41P	Pastagem	Negativo	-----	-----	-----
MCR41R (1)	RL	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	16	200pb
				13	200pb
				14	200pb
C21A (1), (2) e (3)	APP	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	15	200pb
C21P	Pastagem	Negativo	-----	-----	-----
				5	200pb
C21G (2) e (3)	Glebas	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	6	200pb
				10	200pb
RBIO81M (com antibiótico 1) (duplicata 1, 2, 3)	Mandioca	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	34	350pb
				36	350pb
				37	350pb
RBIO81R (1), duplicata (1), duplicata (3)	RL	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	8	200pb
				30	300pb
				32	350pb
CM61R (1), duplicata (1), duplicata (2)	RL	Positivo	Positivo <i>cryI1</i>	7	200pb
				28	300pb
				29	300pb
Total = 17 isolados					

Dessa forma, verifica-se na (Figura 14), confirmação de sete amostras positivas pertencentes a cultura agrícola, sendo, uma localizada no município de Santa Helena/Pr, duas em Capanema/Pr e quatro amostras em Realeza/Pr. Em APP foram obtidos resultados positivos em duas amostras de Capanema/Pr. Em RL, foram obtidos resultados positivos em oito amostras, sendo, três de Capanema, três de Realeza/Pr, uma de Santa Helena/Pr e uma de Marechal Cândido Rondon/Pr.



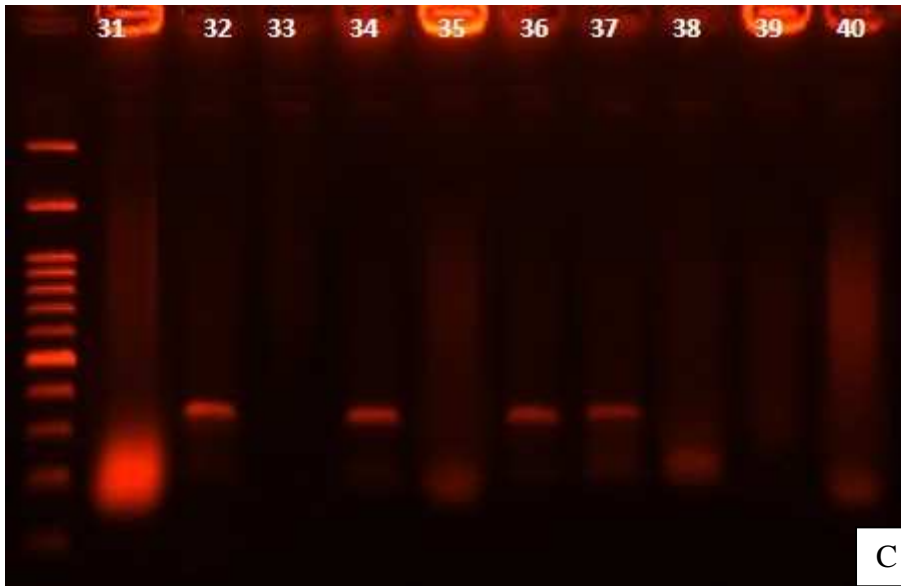


Figura 14 - Resultado da eletroforese em gel *cryII*. Com confirmação de bandas entre (A) 200 pb (B e C) 350 pb.

Fonte: Mascarello, 2017.

Os isolados que possuem o gene *cryII* estão relacionados com controle de dípteras. A confirmação da presença do gene *cryII* foi baseada no tamanho da banda produzida após eletroforese em gel de agarose. É importante ressaltar ainda, que a confirmação deve ser realizada com o sequenciamento desses fragmentos e comparação com sequências disponíveis em bancos de dados genéticos. Infelizmente não foi possível realizar o sequenciamento do gene *cryII* no presente estudo.

As cepas de Bt com genes *cry* foram isoladas em diferentes regiões e habitats das propriedades estudadas. A maior quantidade estava presente na Reserva Legal das propriedades. Em experimentos anteriores, foram verificados que amostras recolhidas na mesma região, apresentaram menor frequência de *B. thuringiensis* em solo das florestas que nos solos do que outros tipos de vegetação (RICIETO et al.,2013). Ainda segundo o autor, pode-se verificar que a vegetação não é um fator relevante quando se trata de isolados de Bt.

Para Azambuja et al. (2010), quando nos referimos a microrganismos em ambientes não controlados, devemos considerar os fatores abióticos como temperatura, umidade, aeração, bem como, variações geográficas, atividades agrícolas, tipos de solos e método de isolamento como fatores relevante para crescimento e composição microbiana de determinada vegetação. Dessa forma, pode-se compreender a diferença nos resultados encontrados nas amostras analisadas no presente estudo.

O Código Florestal, Lei n.12.651, de 2012, estabelece como RL, área localizada no interior de uma propriedade rural com a função de assegurar o uso econômico, de modo

sustentável dos recursos naturais, auxiliar a conservação e a reabilitação dos processos ecológicos e promover a conservação da biodiversidade e proteção de fauna silvestre e da flora nativa. Já a APP é área protegida, com a função ambiental de preservar os recursos hídricos, a paisagem, a estabilidade geológica, a biodiversidade e facilitar o fluxo gênico de fauna e flora, proteger o solo e assegurar o bem-estar das populações humanas.

Sistemas agroecológicos procuram estabelecer agroecossistemas o mais próximo do natural, investem a maior parte de sua produtividade na manutenção da estrutura física, química e biológica necessária para garantir a fertilidade do solo e estabilidade dos microrganismos presentes (ASSIS & ROMEIRO, 2002). Provavelmente esse fato explique a presença de mais isolados com a presença do gene *cryII* nesse local. Sua rápida dispersão através de esporos permite que esses bacilos permaneçam por mais tempo em solos úmidos e com grande quantidade de nutrientes. No entanto, sua frequência pode ser alterada devido alguma interferência química, física ou biológica, inibindo ou favorecendo a presença desses bacilos (AZAMBUJA et al., 2010).

Os organismos encontrados nos solos florestais são muito semelhantes aos encontrados em outros solos, porém em quantidades muitas vezes superiores. Isto está relacionada a presença de uma espessa camada de serapilheira, a qual estimula a proliferação de enorme quantidade de seres como coleópteros, miriápodes, formigas, nematoides e microrganismos (SCHUMACHER & HOPPE, 1999).

Em relação ao número de isolados por paisagem foi encontrado 3,62% isolados em área de cultivo agrícola, 5,79% em área de RL e 1,44% em área de APP. Em relação a dados anteriores publicados por Ricieto et al. (2013), o qual analisou 38 amostras de solo de três diferentes locais e vegetação e pertencentes a mesma região, foi encontrado Bt em 9% das amostras coletado em mata ciliar, em 26% do campo de soja, e em 41% de pomar.

No que diz respeito ao número de isolados por propriedades, foram obtidos seis isolados em Realeza e Capanema, dois isolados em Santa Helena e um em Marechal Cândido Rondon. Esta diferença nos resultados dos isolados de Bt nas propriedades estudadas, pode estar intimamente relacionada ao fator clima, mais do que ao tipo de vegetação presente no ambiente. Respinis et al. (2006); Silva et al. (2015) relacionam a radiação solar, temperatura e pH fatores que exercem influência na presença de diversidade microbiana no solo, em especial o Bt.

As amostras de solos coletados nesse estudo ocorreram nos meses de abril e primeira quinzena de maio de 2016. Segundo dados publicados pela Sistema Meteorológico do Paraná – SIMEPAR Boletim Climático (2017), nesse período ocorreram concentração de elevadas

temperaturas na primeira semana e na segunda quinzena de abril, motivo esse que pode ser justificada a presença de baixa umidade nos solos coletados e também baixa diversidade de isolados comparados com estudos anteriores (Figura 15). Já em relação a propriedade de Santa Catarina, nas amostras coletadas não foram possíveis estabelecer a relação do fator clima nos resultados, pois a empresa Gebana não registrou a data da coleta do solo.

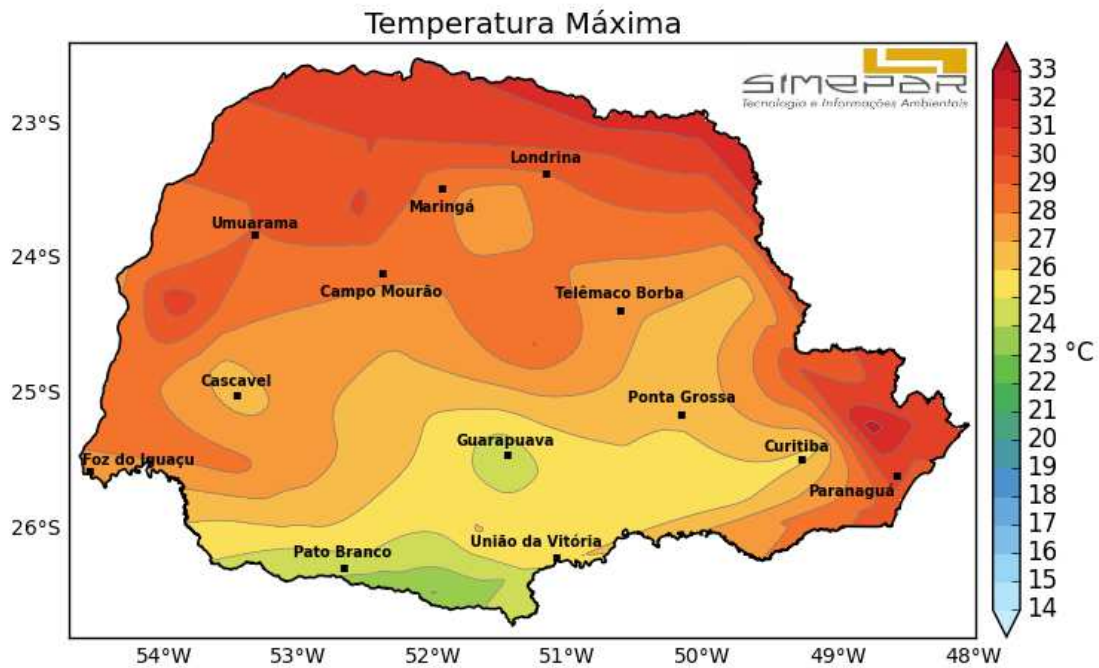


Figura 15 - Dados coletados Simepar referente a temperatura. Temperatura média máxima no período de 15 a 30/04/2016.
Fonte: SIMEPAR .

Outro fato interessante foi observado em estudos anteriores realizados por Zothansanga et al. (2016). Das suas 29 amostras de solo analisadas, a mais alta frequência de Bt foi registrada em amostras de solo de agricultura com 58 isolados, seguidos de 24 isolados em florestas e 19 isolados em ambiente aquático. No entanto, em estudos realizados por Quesada-Moraga et al. (2004), não foram observadas diferenças significativas na porcentagem de isolados de amostras de solos em diferentes habitats da Espanha, mas sim a relação como a localização geográfica de cada amostra.

Dessa forma, no que se refere a agroecossistemas de produção, quando há presença de um microclima favorável, com umidade relativa do solo adequada, a diversidade em Reserva Legal deverá apresentar um fator significativo para a presença de Bt, como foi observado nas amostras analisadas.

6. CONCLUSÃO

A metodologia aplicada nesse estudo referente ao isolamento de cepas de Bt em solo sob cultivo orgânico, apresentaram resultados positivos tanto em meios de cultura com a presença ou ausência de antibiótico. As placas de culturas analisadas, exibiram colônias com aspecto semelhantes ao Bt quando comparadas com a literatura científica.

Em relação a caracterização molecular, os resultados foram parcialmente bem sucedidos. Com confirmação para a presença dos genes *cry11* em 17 amostras das 138 analisadas. Os resultados foram inconclusivos com variação no tamanho das bandas para o genes de *cry1* e *cry 3* e ausência de bandas para os genes *cry2*. Dessa forma, sugere-se que novos estudos sejam realizados para confirmar a presença dos genes *cry* através do sequenciamento.

Ao analisar e identificar as produções científicas veiculada em periódicos indexados nos bancos de dados “ISIWebofScience™”, indicam dados significativos no que se refere ao controle biológico de pragas. Percebe-se que as publicações vinculadas as áreas das ciências agrárias vem ganhando destaque contribuindo para identificação, seleção e utilização de novas cepas com toxidades a espécies pragas.

Contudo, é importante salientar ainda, o quanto é necessário investir em estudos como esse que possibilitem a identificação de novos bioinseticidas, os quais venham auxiliar em melhores resultados em agroecossistemas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOARRAHEM, M. M.; GAMMON K; DANCER, B. N. et al. Genetic Basis for Alkaline Activation of Germination in *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, (19): 6410–6413, 2009.

ABREU, I. L. THULER, A M. G, LEMOS, M. V. F. Análise da diversidade genética de isolados de *Bacillus thuringiensis* por fAFLP1. *Científica*, Jaboticabal, v.36, n.1, p.41 - 47, 2008.

ADANG, M. J., STAVER M. J., ROCHELEAUS T. A. et al. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene*. 1985; 36 (3): 289-300. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3000881>>. Acesso em 22 de maio de 2017.

ALBRECHT, L. P.; MISSIO R. F. Manejo de cultivos transgênicos. UTFPR, Palotina. pag.139, 2013.

ALVES, A. C. O.; SANTOS, A. L. S.; AZEVEDO, R. M. M. C. Agricultura orgânica no Brasil: sua trajetória para certificação compulsória. *Revista Brasileira de Agroecologia*: v. 7, n.2, p. 19-27, 2012.

ALVES, G. S. A biotecnologia dos Transgênicos: Precaução é a palavra de ordem. HOLOS, Ano 20, outubro/2004. Disponível em <https://www.agrolink.com.br/downloads/91692.pdf>. Acesso em 31 de maio de 2017.

ANGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T.; CASTRO-GOMÊZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. In: Seminário: Ciências Agrárias, v.31, n. 4, p.945-958, outubro/dezembro, Londrina/Pr, 2010.

ARAUJO, A. P.; MELO-SANTOS, M. A. V.; CARLOS. S. O. et al. Evaluation of an experimental product based on *Bacillus thuringiensis sorovar. israelensis* against *Aedes aegypti* larvae (Diptera:Culicidae). *Biological Control*, v. 41, p.339-347, 2007.

ASSIS, R. L. & ROMEIRO, A R. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, n. 6, p. 67-S0, jul.-dez., 2002.

AUSUBEL, F. M.; Brent, R.; Kingston R.E. et al. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley, 2003.

ÁVILA, C. J.; FERREIRA, B. S. C. ; SILVA, M. T. B. Pragas da soja – Especial. Caderno Técnico Embrapa. Circular encartado na revista Cultivar Grandes Culturas n. 57 - Dezembro/03 e Janeiro/04.

AVISE, J. C.; GIBLIN-DAVIDSON, C; LAERM, J et al. Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. Vol. 76, n. 12, p. 6694-6698, Population Biology, December, 1979.

AZAMBUJA, A. O.; ALLES, G. C.; FRITZ, L. L.; RECHE, M. H. R.; FIUZA, L. M. Ecologia de *Bacillus* entomopatogênicos. Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento. Edição especial: Ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. Ano XI – número 38, 2009/2010.

BATISTA, M. F; GIBLIN-DAVIDSON, C; LAERM, J. et al. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmantalis*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 82. EMBRAPA, junho, 2005.

BEN-DOV, E.; ZARITSKY, A; DAHAN, E. et al. Extended Screening by PCR for Seven cry-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 63 , 4883– 4890, 1997.

BENNO, B. K. et al. Anuário Brasileiro da Soja. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2014.

BERGAMASCO, V. B.; CORDEIRO, J. X.; GONÇALVES, J. F. et al. Variabilidade genética e análise de genes *cry1* em isolados de *Bacillus thuringiensis* nocivos à Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae). Boletín de sanidad vegetal, 35: p. 329-341, 2009.

BERNARDO, G. R. B.; LIMA, G. M. S. Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus thuringiensis* isoladas do solo. XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC CTG - UFPE, 2011.

BERNO, M. L.; SCHNEIDER, C. I. Modernização e mecanização agrícola em Palotina - PR: a ideia de desenvolvimento econômico e social no período de 1970 – 1983. Akropolis, Umuarama, 15: 217-227, 2007. Disponível em <http://revistas.unipar.br/akropolis/article/view/2083/1808>. Acesso em 09 de novembro, 2015.

BESNARD, G.; HERNANDEZ, P; DORADO, G; UNVER, T. Polymerase Chain Reaction (PCR). Elsevier Reference Module in Biomedical Sciences. Research Gate, 2015.

BIANCHI, L. R. SANT'ANA, D. M. S. & MIRANDA NETO, M. H. Análise Cienciométrica de artigos publicados na Scielo sobre o tema Cronobiologia e Depressão Sazonal. Arquivos do MUDI, v19, n2-3, p. 18-22, 2015.

BITTENCOURT, L. A. F. & PAULA, A. Análise Cienciométrica de Produção Científica em Unidades de Conservação Federais do Brasil. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. 2 0 4 4, 2012.

BONATO, E. R. Estresses em soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/820371/estresses-em-soja>. Acesso em 01 de novembro de 2015.

BORDERA, P. J. M. Las contradicciones de un mundo globalizado: grandes políticas agrícolas y derecho a la soberanía alimentaria. **GeoGraphos**, vol. 5, nº 66, p. 266-282. Março, 2014.

BRASIL. Lei 12.651/2012. Código Florestal Brasileiro. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm. Acesso em 11 de setembro, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 7 de 17/05/1999. Estabelece as normas de produção, tipificação, processamento, distribuição, identificação e de certificação da qualidade para os produtos orgânicos de origem vegetal e animal.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 64 de 18/12/2008. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. Publicado no Diário Oficial de União, Brasília, 19 de dezembro de 2008. Seção 1, p. 21.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Lei Nº 10831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003. Publicado no Diário Oficial da União de 24/12/2003, Seção 1, Página 8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

BRAVO, A. SARABIA, S.; LOPEZ, L. et. al. Characterization of *cry* Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Applied and Environmental Microbiology*, Volume 64, n. 12, p. 4965–4972, 1998.

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, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 423 e 431, 2011.

BUENO, A. F.; BATISTELA, M. J., BUENO, R. C. O. F. et al. Effects of integrated pest management, biological control and prophylactic use of insecticides on the management and sustainability of soybean. *Crop Protection* v.30, 937-945, 2011.

CABRAL NETTO, O. V. & LAURINDO, F. J. B. Uma análise cienciométrica da literatura de inteligência competitiva. *Production*, v. 25, n. 4, p. 764-778, out./dez., 2015.

CÂMARA, F. M.; GOMES, C. B.; MATUK, T. T. et al. Caracterização dos resíduos gerados na Ceasa paulistana sob a ótica da saúde ambiental e segurança alimentar. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, 21(1), p.395-403, 2014.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G.T.; SUZUKI, M.T. *Bacillus thuringiensis*. *Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento*. n. 34, 2005.

CAROZZI, N. B.; KRAMER, V. C.; WARREN, G. W. et al. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (11): 3057-3061, 1991.

CARNEIRO, A.; GUIMARÃES, C. T.; VALICENTE, F. H. et al. Milho Bt: Teoria e prática da Produção de Plantas Transgênicas Resistentes a Insetos-Praga. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Circular Técnica 135. Embrapa, Sete Lagoas/MG, 2009.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciência Rural*, v.40, n.3, Santa Maria, 2010.

Cérón, J., Ortíz, A., Quintero, R., Güereca, L., and Bravo, A. 1995. Specific PCR

CHEN, J; AIMANOVA, K. G.; FERNANDEZ, L. E. et al. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*. *Biochemical Journal*, p.191–200, 2009.

CHRISTOFOLETTI, J. C. A produção de alimentos, 2009 Disponível em: <http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1058.pdf>. Acesso em 26 outubro, 2015.

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the Genetic Base of Soybean: A Multidisciplinary Approach. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v. 27, n.5, p. 295-341, 2008.

CONSTANSKI, K. C.; ZORZETTI, J; VILAS BOAS, G.T. et al. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera spp.* Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 50, n. 8, p. 730–733, 2015.

CORRÊA-FERREIRA, B. Soja Orgânica: alternativas para o manejo dos Insetos-pragas. Embrapa Soja, Londrina-Pr, 2003.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. Manual de extração de DNA. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001.

COX, M.; DOUDNA, J. A. Biologia Molecular: princípios e técnicas. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CRICKMORE, N. et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, 2015. Disponível em : <<http://www.btnomenclature.info/>>. Acesso em 14 Jan. 2015.

DIAS, J. M. C. S. Produção e utilização de bioinseticidas bacterianos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.27, p.59- 76, 1992.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. Controle Biológico. Recursos Genéticos e Biotecnológicos, Documentos 250. Simpósio de Controle Biológico - Brasília, DF, 2007.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. Brasília, DF, 2003. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBrasil2003/importancia.htm>. Acesso em 27 out., 2015.

FALEIRO, F. G., FALEIRO, A. S. G.; CORDEIRO, M. C. R. et al. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do Cerrado visando a análises moleculares. Ministério da Agricultura e abastecimento. Comunicado técnico 92, Planaltina, DF, 2003.

FERREIRA, M. E. NETO BORGES, C. R. A importância da Pesquisa Genômica e o Sequenciamento de DNA. Embrapa, Comunicado Técnico 91, 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genéticas. 3º Ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998.

FIUZA, L. M.. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento. Edição especial: Ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. Ano XI – n. 38, 2009/2010.

FONSECA, M. F. A. C. Agricultura orgânica. Manual técnico, 19. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária, Pesca e Abastecimento Superintendência de Desenvolvimento Sustentável - Programa Rio Rural, Niterói/RJ, 2009.

GALZER, E. C. W.AZEVEDO FILHO, W. S. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. Revista Interdisciplinar de Ciências aplicadas. Volume 01, 2016.

GILLIS, A. & MAHILLON, J. Phages Preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future. Viruses V. 6, p. 2623-2672, 2014.

GRECCO, E. D.; POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D. Seleção e caracterização Molecular de *Bacillus thuringiensis* beliner com atividade tóxica para *Trichoplusia ni huebner* (Lepidoptera: Noctuidae). Arquivo Instituto Biologia, v.77, n.4, p.685-692, out/dez., São Paulo, 2010.

GUIDELLI-THULER, A. M.; SENA, J.A.D.; ABREU, I.L. et al. *Bacillus thuringiensis*: Diversidade Gênica em isolados Lepidoptera-específicos. Arquivo Instituto Biologia, v.75, n.4, p. 405-414, out/dez, São Paulo, 2008.

HABIB, M. E. M. et al. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, Sergio B (Coord.). Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleotid and Acids. Symp. Ser. v. 41, p. 95-98, 1999.

HANSEN, B. M.; HENDRIKSEN, N. B. Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Applied Environmental Microbiology, v.67, p.185-189, 2001.

HERNÁNDEZ, P.; DORADO, G.; CABRERA, A. et al. Rapid verification of wheat-Hordeum introgressions by direct staining of SCAR, STS, and SSR amplicons. Genome, v. 45, p. 198–203, 2002.

HERRERO, S.; BORJA, M.; FERRÉ, J. Extent of variation of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir: the case of the geranium bronze, *Cacyreusmarshalli* Butler (Lepidoptera:

Lycaenidae). *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.4090-4094, 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.8.4090-4094, 2002.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIR, B. S. et al. Pragas da Soja no Brasil e seu manejo Integrado. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.30) Londrina: Embrapa Soja, 2000.

HONDA, S.; KUNII, T.; NOHARA, K. et al. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* chitinase that binds to cellulose and chitin. *AMB Expr.* 7:51, 2017.

HORTA, A. B.; PANNUTI, L. E. R.; Baldin, E. L. L. et al. Toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis*. In book: *Biotechnology Aplicada à Agro&Indústria - Fundamentos e Aplicações*, Publisher: Blucher, Editors: Rodrigo Ribeiro Resende, pp.737-774, fev. 2017.

IBARRA, J. E.; DEL RINCÓN, M. C.; ORDÚZ, S. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5269–5274, 2003.

JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S. et al. Uso de Ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Embrapa Cerrados, Planaltina, DF, 2002.

KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C. et al. Anuário Brasileiro da Soja. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2014.

LACEY, L. A. GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN D. et al. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology.* p. 1-41, n.132, 2015.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. Program DistPCoA. Montréal: Université de Montréal, p. 10, 1998.

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

LIMA, L. M. Conceitos Básicos de Técnicas em Biologia Molecular. Embrapa, Documento 191, 2008.

LIMA-RIBEIRO, M. S.; NABOUT, J. C.; PINTO, M. P. et al. Análise cienciométrica em ecologia de populações: importância e tendências dos últimos 60 anos. *Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá*, v. 29, n. 1, p. 39-47, 2007.

LUQUE, C.; LEGAL, L.; HEIDI, S. et al. ISSR (Inter Simple Sequence Repets) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). *Hereditas*, v. 136, p.251-253, 2002.

MAHALAKSHMI, A.; SUJATHA, K.; KANI, P. et al. Distribution of *cry* and *cyt* Genes among Indigenous *Bacillus thuringiensis* Isolates with Mosquitocidal Activity. *Advances in Microbiology*, Vol. 2, p. 216-226, 2012.

MALACINSKI, G. M. Fundamentos de Biologia Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MAYR, E. O. Desenvolvimento do pensamento biológico: diversidade, evolução e herança. Tradução de Ivo Martinazzo. Brasília: UNB, 1998.

MAZZOLENI, E. M.; NOGUEIRA, J. M. Agricultura orgânica: características básicas do seu produtor. *Revista Economia e Sociologia Rural*, v. 44, n. 22, p. 263-293: Rio de Janeiro, 2006.

MENDES, L. S.; CARVALHO, L. A.; NAKAO, A. M. et al. Seleção de cepas de *Bacillus thuringiensis*, na região do Alto Paranaíba, para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). *Perquirere - Revista do Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão do UNIPAM (ISSN 1806-6399) Patos de Minas: UNIPAM*, v. 6, p. 09-16, out., 2009.

MENDES, S. M.; BUENO, V. H. P.; CARVALHO, L. M. et al. Production cost of *Orius insidiosus* as biological control agent. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Entomologia*, vol.40 n.5, Brasília, 2005.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. *Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais*, v. 3, n.1 - p.7-15, jan./jun. 2006.

NAPOLITANO, G. Os americanos criaram a agricultura mais produtiva do mundo. *REVISTA EXAME*. Dez., 2013. Disponível em <http://exame.abril.com.br/ciencia/o-apogeu-da-agricultura/>. Acesso em 11 de setembro, 2017.

OLBY, Robert. The path to the Double Helix: the discovery of DNA. New York: Dover Publications, 1994.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D. et al. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e amplificação. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudoeste, 2007.

ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE. Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of biocontrol agents of disease vectors. Genebra, 1987. Disponível em <https://extranet.who.int/iris/restricted/handle/10665/61915>. Acesso em 16 mar., 2016.

PACHECO, M. E. L. et al. Os impactos dos Agrotóxicos na Segurança Alimentar e Nutricional: contribuição da Consea. Brasília Set. 2012.

PADIAL, A. A., BINI, L. M. and THOMAZ, S. M. The study of aquatic macrophytes in Neotropics: a scientometrical view of the main trends and gaps. *Brazilian Journal of Biology*, 68 (4, Suppl.): 1051-1059, 2008.

PAKER, A. L.; MENEGHINI, R. Dossiê da Produção científica em Microbiologia no Brasil em 2009 e seu impacto Medido pelas citações em 2010 na base Web of science. *Revista Microbiologia in foco*, p. 6-20, informativo sbm, ano 5, 2013.

PARRA, J. R. P. Biological Control in Brazil: An overview. *Scientia Agricola*, v.71, n.5, p.345-355, September/October, 2014.

PEREIRA, G. L.; ROSA, K. O.; CURI, R. A. et al. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. Status of the art sequencing genome on livestock. *Ars Veterinária*, v. 29, Jaboticabal/SP, p. 190-199, 2003.

PINTO, L. M. N.; BERLITZ, D. L.; CASTILHOS-FORTES, R. et al. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Edição especial: Ecotoxicologia de *Bacillus thuringiensis*. Ano XI – n. 38, 2010.

PORTAL BRASIL. Agricultura familiar produz 70% dos alimentos consumidos por brasileiro (2015). *Economia e Emprego*. Disponível em <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/07/agricultura-familiar-produz-70-dos-alimentos-consumidos-por-brasileiro>. Acesso em 11 de set. 2017.

PORTOCARRERO, M. A. et al. “Alimentos seguros – uma política de governo.” In *PRODUÇÃO INTEGRADA NO BRASIL*. 1ª edição, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Produ%C3%A7%C3%A3o%20Integrada/PI_Brasil.pdf>. Acesso em 15 de outubro de 2015.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v.14, p.817-818, 1998.

PRAÇA, L. B.; SOARES, E. M.; MELATTI, V. M. et al. *Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubactériaes: Bacielaes). Aspectos Gerais, modo de ação e utilização. Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia. Documento 239: Brasília-DF, 2007.

QUESADA-MORAGA, E.; GARCIA-TÓVAR, E.; VALVERDE-GARCIA, P. et al. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. *Microbiological Research*, 2004.

RESPINIS, S. D.; DEMARTA, A.; PATOCCHI, N. et al. Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Journal compilation. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology* 43 p. 495–501, 2006.

RIBEIRO, B. C.; FERREIRA, L. S.; PALHARES, V. L. Distribuição espacial dos produtos orgânicos no estado de Minas Gerais. *Portal Orgânico*, 2011.

RICCI, M. S. R.; NEVES, M. C. P. Cultivo do Café orgânico. Embrapa Agrobiologia. *Sistemas de produção*. v. 2, 2ª Ed., 2006. Disponível em <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 20 de fev, 2016.

RICIETO, A. P. S.; FAZION, F. A. P.; CARVALHO FILHO, C. D. et al. Effect of vegetation on the presence and genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* in soil. *Canadian Journal of Microbiology*. 59: 28-33, 2013. Disponível: <http://www.nrcresearchpress.com/journal/cjm>. Acesso em 16 de junho de 2017.

SAEZ, C. R. N.; VISACRE, P. H. M.; GOUVEIA, F. S. et al. Sequenciamento automático de parte da Região 3' do gene C3-22 de *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae). IV Mostra Interna de Trabalhos de iniciação Científica do Cesumar, 2008.

SALVADOR, C. A. Agricultura orgânica. Análise da Conjuntura Agropecuária Safra 2011/2012, 2011. Disponível em <http://www.agricultura.pr.gov.br>. Acesso em 23 jan. 2016.

SANCHIS, V. & BOURGUET, D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, p. 11–20, nov. 2007.

SANTOS-JUNIOR, H. J. G. Seleção de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) e populações de *Trichogramma* spp (Westwood) (Hym.: Trichogrammatidae) para controle de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lep.: Noctuidade). Tese de doutorado do Programa de Pós graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural. Recife/Pe, 2009.

SCHEID, N. M. J., FERRARI, N., DELIZOICOV, D. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. The collective scientific knowledge production on the dna structure. *Ciência & Educação*, v. 11, n. 2, p. 223-233, 2005.

SCHUMACHER, M. V., HOPPE, J. M. A floresta e o solo. [s.l.]: Associação de Fumicultores do Brasil, [s.d.]. (Série Ecologia, v.3). Disponível em: <http://issuu.com/afubra/docs/livro3_br/1>. Acesso em: 03 set. 2017.

SCOLARI, D. Produção agrícola mundial: O potencial do Brasil. Embrapa Roraima, 2006. Disponível em www.cpafr.embrapa.br. Acesso em 26 outubro, 2015.

SHAUKAT, A; YUSUF, Z.; GHULAN, A. M. et al. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9(14), pp. 2022-2031, 2010.

SHOTARO, H. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* chitinase that binds to cellulose and chitin. *AMB Expr* 7:51, 2017.

SIEGWART, M.; GRAILLOT, B.; LOPEZ, C. B. et al. Resistance to bio-insecticides or how to enhance their sustainability: a review. *Frontiers in Plant Science*, vol. 6, Articles 381, 2015.

SILVA, A B. & BRITO, J. M. Controle biológico de insetos-pragas e suas perspectivas para o futuro. *Agropecuária Técnica*, Volume 36 (1): 248-258, 2015.

SILVA, D. M.; BUENO, A. F. Organic products selectivity for *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Agricultural Entomology/Scientif Article*. Arquivo Instituto Biologia, São Paulo, v.XX, p.1-8, 2015.

SILVA, J. S.; PINHEIRO, V. C. S.; LITAIFF-ABREU, E. et al. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia* n. 59, p.1-6, 2015.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. Controle Biológico de Insetos-praga na Soja. In: *Controle Biológico. Tecnologia e Produção Soja 2013/2014*.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. Fundamentos de genética. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010.

STATSOFT INC. Statistica7: data analysis software system. Tulsa, 2005. Disponível em <http://www.statsoft.com/textbook/stathome.html>. Acesso em: 15, setembro, 2015.

SWOFFORD, D. L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods version 4. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599, 2007.

TANG, M.; BIDESHI, D.K.; PARK, H. et al. Minireplicon from pBtoxis of *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* Applied and Environmental Microbioloy, Vol. 72, No. 11, p. 6948–6954, 2006.

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 98, n. 2, p. 121–126, 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Reseach*, v. 22, p.4673-4680, 1994.

WALDSCHIMIDT, A. M. Análises Genética e Morfométrica de populações de *Melipona quadrifasciata* Lepidoptera. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1999.

WOLFE, A. D.; LISTON, A. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*. Boston: Kluwer, 1998. p. 43-86. Disponível em http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5419-6_2#page-1. Acesso em 01 de novembro de 2015.

VARGAS, R. A. A produção científica brasileira em Ciências Agrárias indexada na Web of Science: características e redes de colaboração (2000-2011). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Biblioteconomia e Comunicação. Programa de Pós-Graduação em Comunicação e Informação, 2014. Disponível em <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/102304/000934241.pdf?sequence=1>.

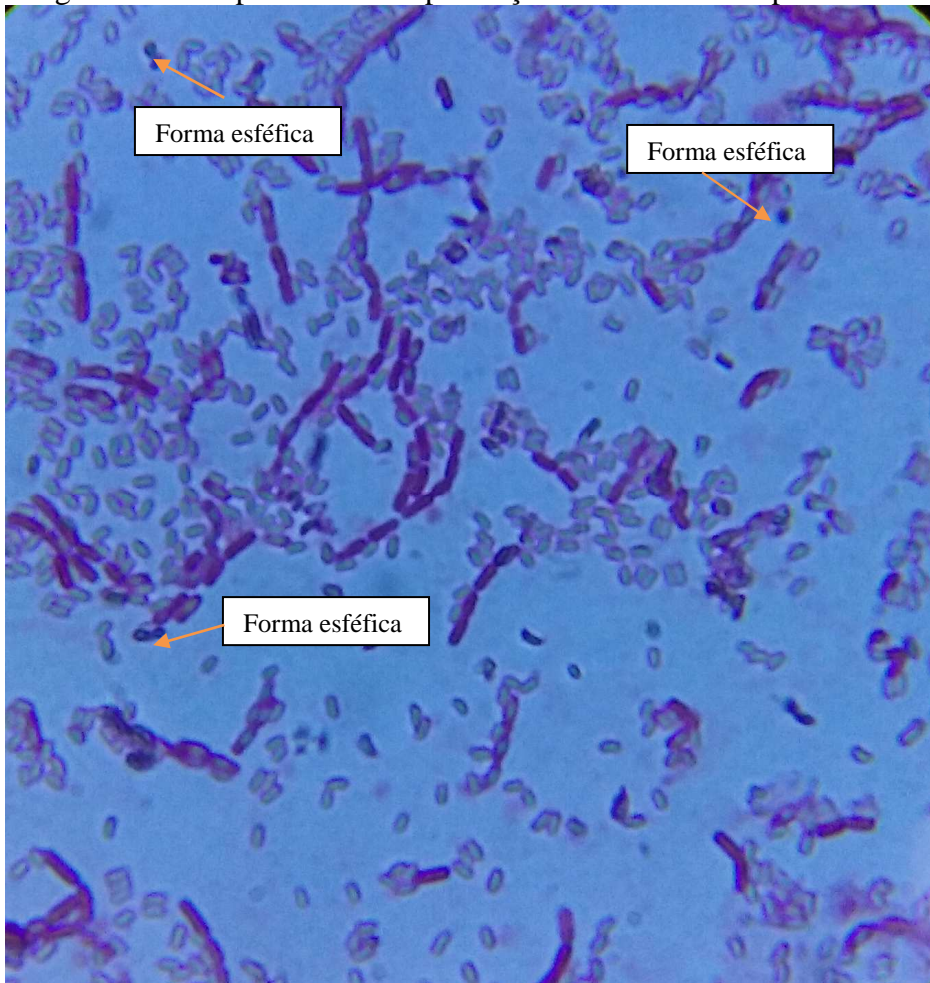
ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. *Biologia Molecular básica*. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZAMBERLAN, J. F.; ZAMBERLAN, C. O.; SCHUCH JR, V. F. et al. Produção e manejo agrícola: impactos e desafios para sustentabilidade ambiental. Agricultural production and management: impacts and challenges for environmental sustainability. *Biologia Molecular básica*. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZOTHANSANGA, R., SENTHILKUMAR, N. and GURUSUBRAMANIAN, G. Diversity and Toxicity of *Bacillus thuringiensis* from Shifting Cultivation (Jhum) Habitat. *Biocontrol Science*, Vol. 21, No. 2, P. 99-111, 2016.

ANEXOS

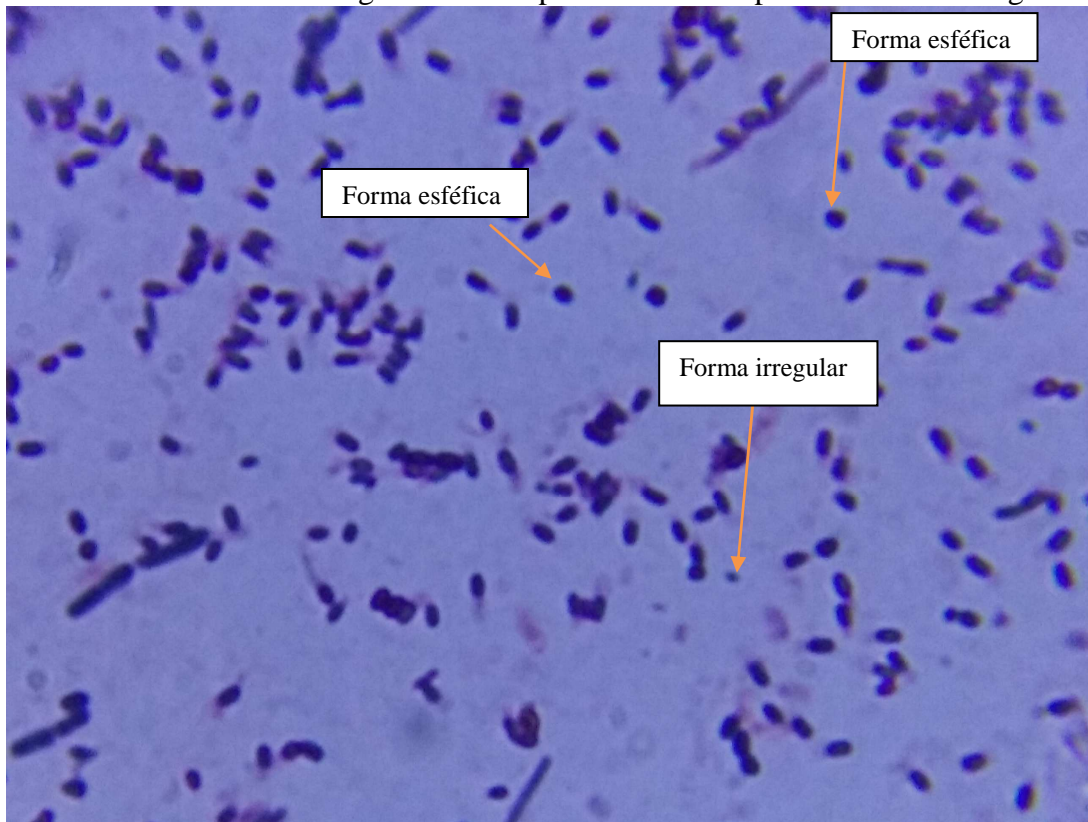
ANEXO A – Isolados de Capanema/Pr em solo de Reserva Legal com uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X com presença de cristais com aspecto esférico.



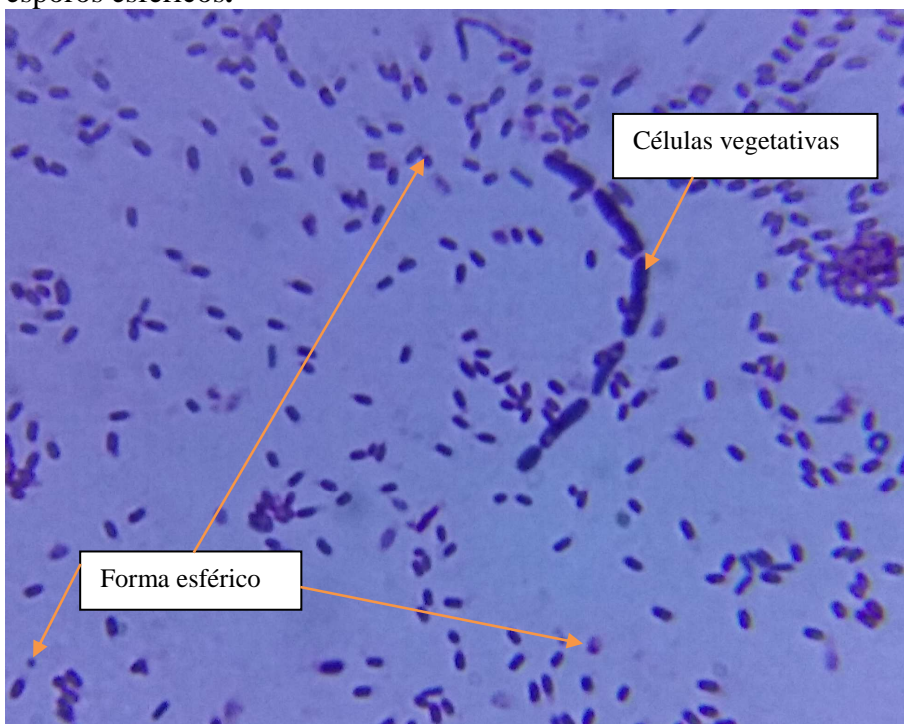
ANEXO B – Isolados de Marechal Cândido Rondon/Pr em solo de Reserva Legal com uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X presença de muitas células vegetativas sem presença de cristais corados.



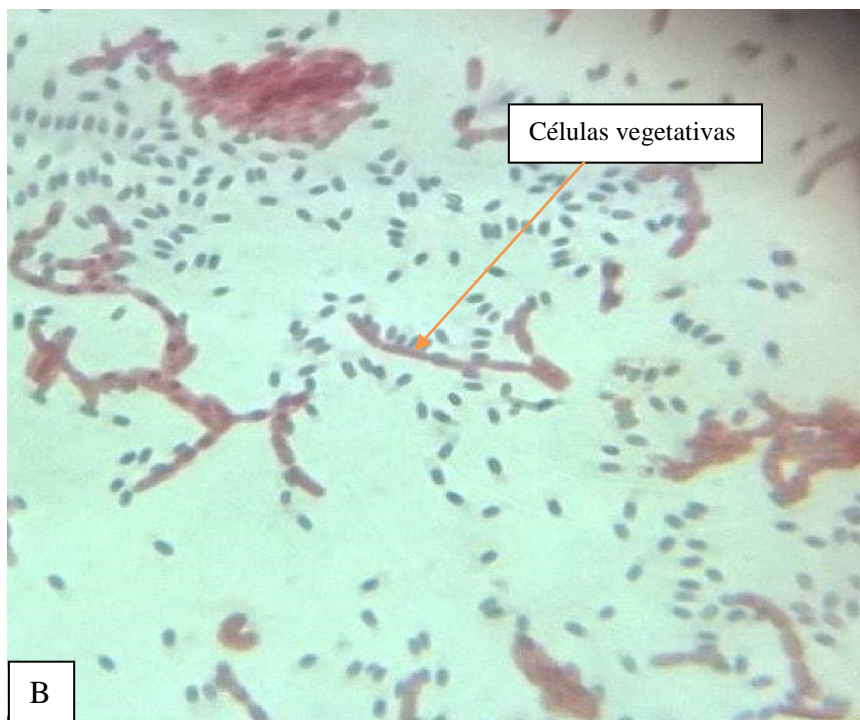
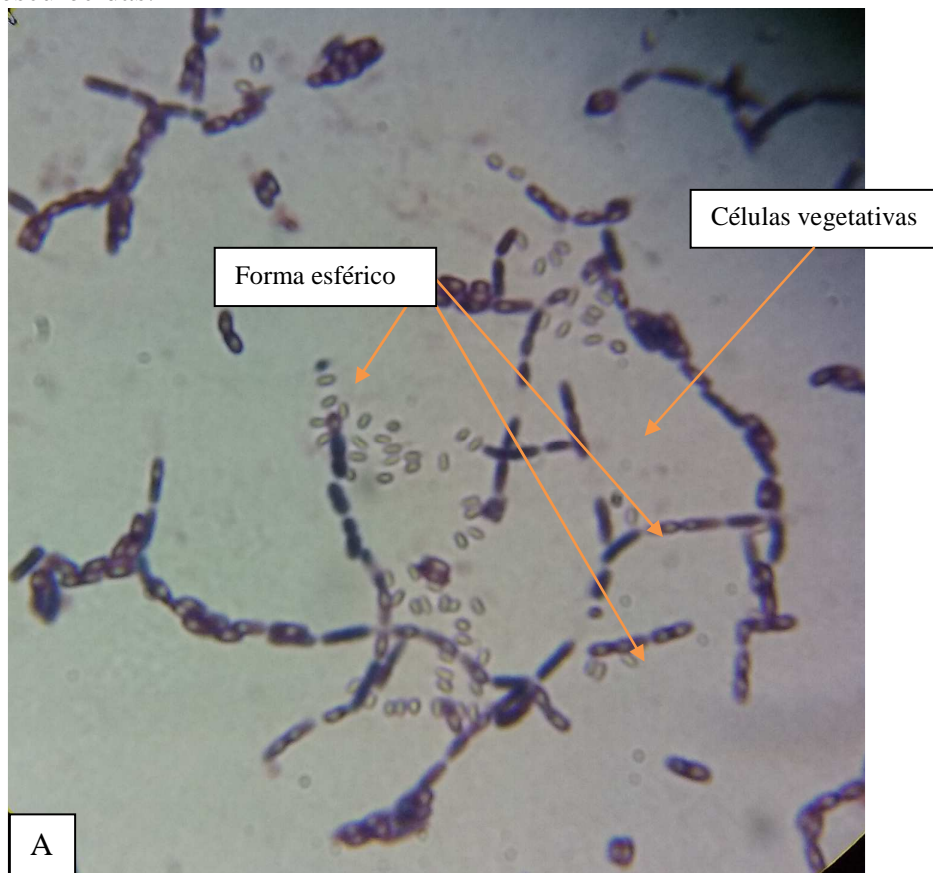
ANEXO C – Isolados de Marechal Cândido Rondon/Pr em solo de Reserva Legal sem uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X com aspecto esférico e irregular.



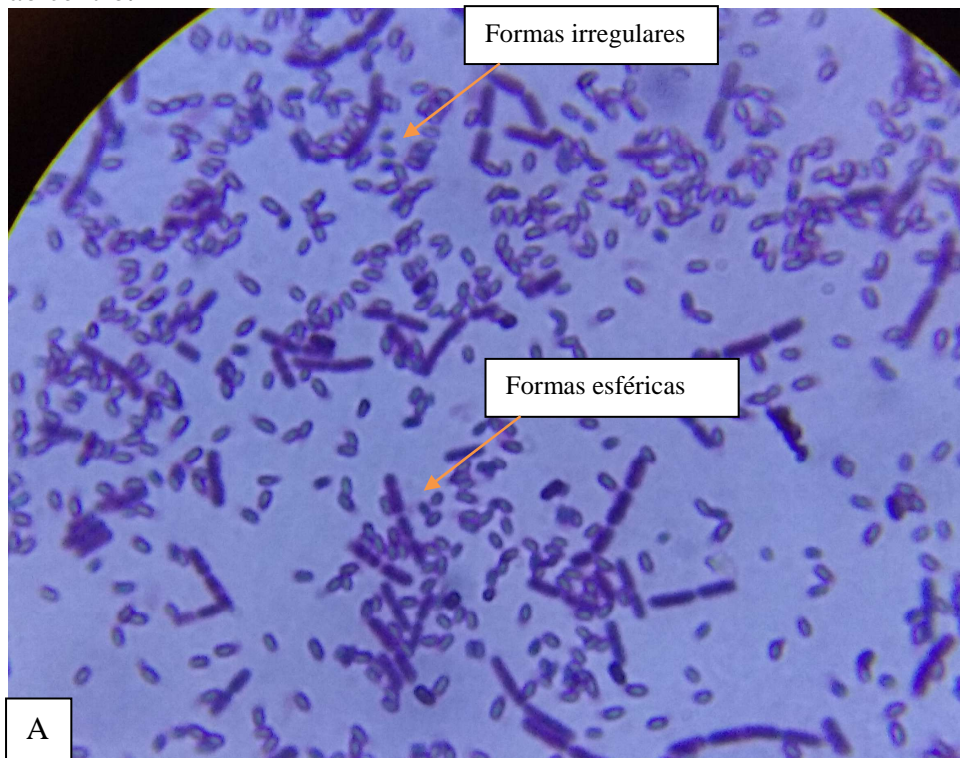
ANEXO D - Isolados de Realeza/Pr em cultura agrícola com uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X, com presença de células vegetativas e possíveis esporos esféricos.



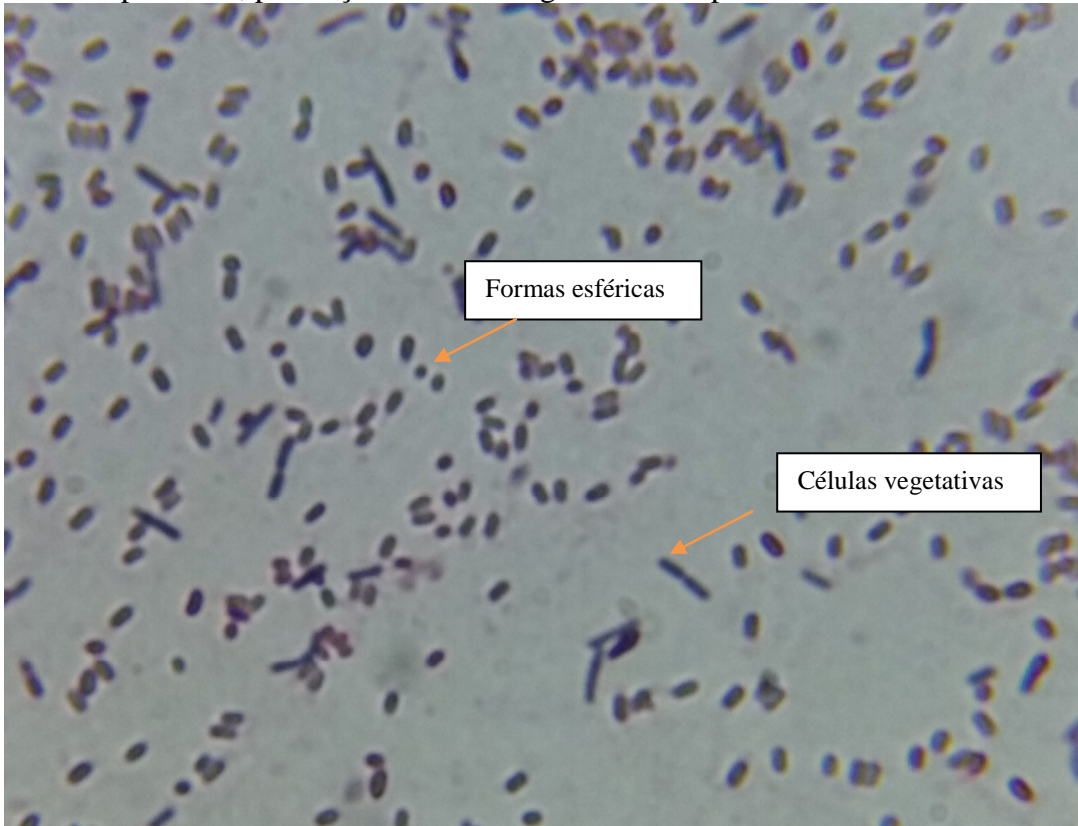
ANEXO E - Isolados de Realeza/Pr em Reserva Legal com uso de antibiótico. Imagem (A e B) microscopia 100X, muita esporulação e talvez presença de esporos esféricos, bordas bem escurecidas.



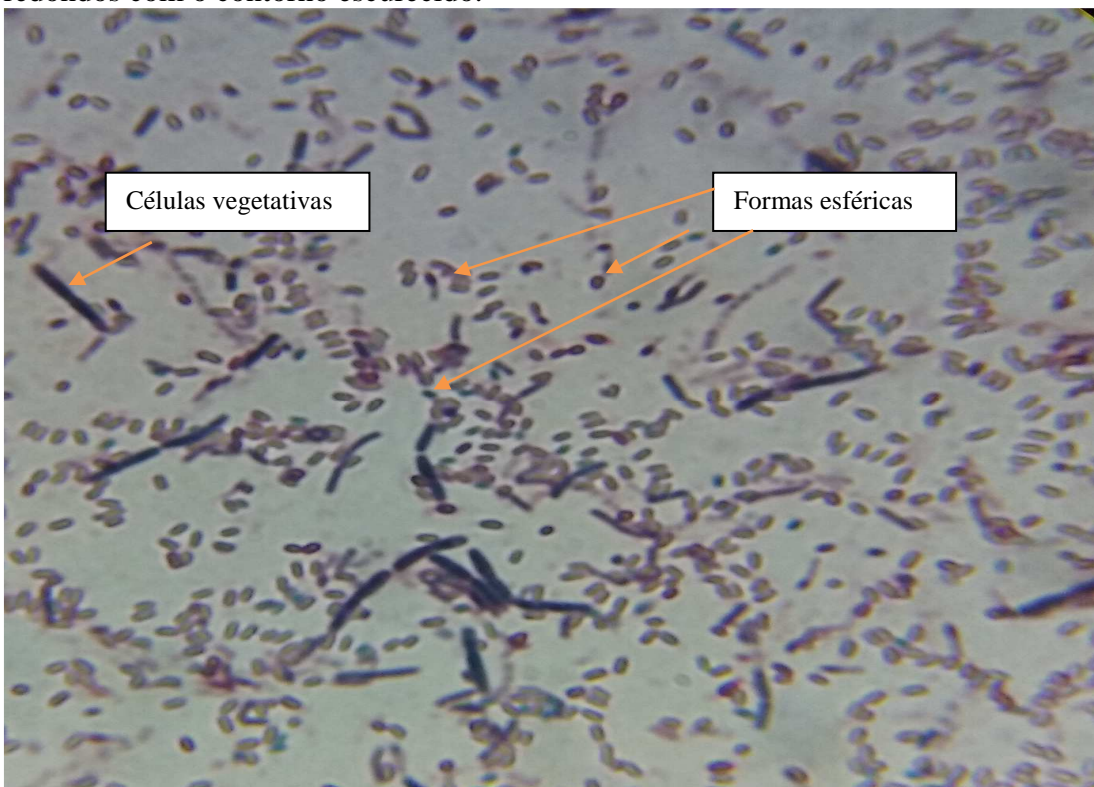
ANEXO F - Isolados de Realeza/Pr em Cultura com uso de antibiótico. Imagem (A e B) microscopia 100X, muita esporulação e talvez presença talvez formas irregulares ou esféricas ao centro.



ANEXO G - Isolados de Santa Helena/Pr em Reserva Legal com uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X, presença de células vegetativas e esporos esféricos



ANEXO H - Isolados de Santa Helena/Pr em Cultura agrícola com uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X, presença de células vegetativas e esporos redondos com o contorno escurecido.



ANEXO I - Isolados de Capinza/SC em Cultura agrícola duplicata sem uso de antibiótico. Imagem microscopia 100X.

