

ROSIANE DE FÁTIMA SILVA

**EFEITOS SUBLETAIS EM *Chrysodeixis includens* (NOCTUIDAE: PLUSIINAE)
PELO USO DE CEPAS DE *Bacillus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

Orientadora: Liliane Evangelista Visôto

Coorientadores: Carlos Marcelo Soares
Luanda Medeiros Santana

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Universidade Federal de
Viçosa - Campus Rio Paranaíba**

T

S586e
2021
Silva, Rosiane de Fátima, 1985-
Efeitos subletais em *Chrysodeixis includens* (Noctuidae:
Plusiinae) pelo uso de cepas de *Bacillus* spp. / Rosiane de Fátima
Silva. – Rio Paranaíba, MG, 2021.
43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Liliane Evangelista Visôto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: 32-39.

1. Controle biológico. 2. Falsa-medideira.
3. Fitossanidade. I. Universidade Federal de Viçosa. Instituto de
Ciências Agrárias. Mestrado em Agronomia (Produção Vegetal).
II. Título.

632.9

ROSIANE DE FÁTIMA SILVA

**EFEITOS SUBLETAIS EM *Chrysodeixis includens* (NOCTUIDAE: PLUSIINAE)
PELO USO DE CEPAS DE *Bacillus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Campus Rio Paranaíba como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de fevereiro de 2021.

Assentimento:



Rosiane de Fátima Silva
Autora



Liliane Evangelista Visotto
Orientadora

*A Deus e Nossa Senhora
Ao meu amor André
Aos meus filhos João Pedro e
Maria Clara
A minha maravilhosa família,
papai, mamãe,
irmãs, irmãos,
cunhadas, cunhados,
sobrinhãs, sobrinhos*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que sou, pela vida, por todas as graças recebidas, por todas as provações permitidas, por todas as bênçãos, por me iluminar sempre, por permitir que seja sua filha, Deus é meu começo e meu fim. Faça em mim a sua vontade Senhor!

A Nossa Senhora por me cobrir com seu manto protetor intercedendo sempre a Deus em todos os momentos de alegrias e tristeza.

Ao meu André por acreditar em mim, pela disponibilidade em mudar completamente de vida para não ficarmos distantes, sou muito grata por tudo, pelo apoio material, psicológico, espiritual por me apoiar nas decisões. Meu amor, obrigada te amo muito!

A cada um dos meus familiares, papai Pedro, mamãe Maria de Lourdes, irmãs, irmãos, cunhadas, cunhados, sobrinhas, sobrinhos por torcerem por mim, pelo auxílio psicológico e material, pelas visitas em Rio Paranaíba, por serem o meu porto seguro. Por deixarem claro que somos uma família com a certeza de que, podemos ir onde for, estaremos levando cada um dentro de nós e, sempre teremos para quem voltar. Obrigada eu amo vocês!

Ao nosso João Pedro perdão pelas ausências, pelas impaciências e obrigada por ser esse anjo inocente em minha vida mostrando-me sempre que posso ser uma pessoa melhor, te amo!

À nossa Maria Clara que em meu ventre suportou momentos complicados nessa fase final de mestrado, te amo!

Aos meus sogros, cunhados, cunhadas e sobrinhos!

Aos meus tios, tias, primas, primos, madrinhas, padrinhos!

À orientadora Liliane, por aceitar orientar com um tempo reduzido para desenvolvermos a pesquisa, por todos ensinamentos, muito obrigada por acreditar em mim, pela parceria e principalmente pela humanidade!

À coorientadora Luanda, pela disponibilidade, por todo conhecimento transmitido, pelo apoio, pela contribuição científica!

Ao coorientador Marcelo, por todo auxílio e suporte, sempre prestativo e acessível, seus conhecimentos contribuíram muito!

As participantes da banca Camila e Carla Caixeta pelas contribuições nessa pesquisa, com toda certeza aprendi muito com vocês.

Ao professor Pedro Ivo, ao colega Enrique, à “Zô” pelas valiosas ajudas nas análises estatísticas realizadas nessa pesquisa.

A todos professores da pós graduação que tive oportunidade de compartilhar das aulas e aqueles que encontrei nesses dois anos de mestrado com certeza direta ou indiretamente contribuíram para meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Aos colegas da pós-graduação em Produção Vegetal com os quais compartilhei histórias, vidas diferentes, momentos de angústia, de desespero, de comemorações, de vitórias.

À toda equipe do laboratório NOOA, em especial ao “Léo”, “Zô” e Carla Caixeta pelos ensinamentos, auxílios no desenvolvimento dos experimentos com certeza vocês contribuíram muito com essa pesquisa e ao Cícero por ter sido elo de ligação com a empresa.

A Universidade Federal de Viçosa campus Rio Paranaíba por acreditar que as pessoas podem evoluir através do conhecimento.

Ao UNIPAM principalmente ao professor Walter por fornecer as cepas de *Bacillus* e ao Thaigoru pelos auxílios no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo – Código de Financiamento 001.

Aqueles que rezaram, torceram, acreditaram em mim, sou grata!

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para concretização dessa pesquisa.

Muito obrigada!

*“Os que semeiam entre lágrimas, recolherão com alegria.
Na ida, caminham chorando os que levam a semente a
aspergir. Na volta, virão com alegria, quando trouxerem
os seus feixes.”*

(Salmo 125)

RESUMO

SILVA, Rosiane de Fátima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, fevereiro de 2021. **Controle de *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Noctuidae: Plusiinae) por cepas de *Bacillus* spp.** Orientadora: Liliane Evangelista Visôto. Coorientadores: Carlos Marcelo Soares e Luanda Medeiros Santana.

A lagarta falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* é uma praga polífaga que ataca diversas culturas de importância econômica. O controle desse inseto é realizado basicamente com a aplicação de agroquímicos convencionais, o que vem acarretando o aumento da ocorrência de populações resistentes e de danos à saúde e ao meio ambiente. Dessa forma, o uso do controle biológico no manejo integrado dessa praga faz-se necessário. Nesse estudo foi avaliado o potencial de doze isolados de *Bacillus* spp. para o controle de *C. includens*. Bioensaio seletivo foi realizado para averiguar qual(s) o(s) isolado(s) acarretaram maior mortalidade de *C. includens*. A concentração letal média (CL₅₀) e os efeitos subletais dos isolados sobre os insetos sobreviventes foram avaliados através de bioensaio dose-resposta. Também foi avaliado o efeito dos *Bacillus* spp. nas atividades de proteases digestivas de *C. includens*. Os resultados demonstram que apenas a cepa GB10 ocasionou 100 % de mortalidade das lagartas de 2º instar, e portanto, foi selecionada para os testes posteriores. Concentrações abaixo de 10⁻³ UFC mL⁻¹ provocaram 100 % de mortalidade dos insetos, portanto, os efeitos subletais foram avaliados com concentrações de GB10 e a cepa referência S1450 variando entre 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ UFC mL⁻¹. GB10 apresentou menor CL₅₀ em relação a cepa referência e ambos reduziram significativamente o peso larval com o aumento da concentração testada, quando comparado ao controle. As cepas GB10 e S1450 também diminuíram significativamente as atividades de serino protease, cisteíno protease e de proteases totais. Esse estudo sugere que o isolado GB10 foi mais eficiente em relação a cepa S1450 e é promissor para o desenvolvimento de bioprodutos que podem ser integrados ao manejo de *C. includens*.

Palavras-chave: Controle biológico. Falsa-medideira. Fitossanidade

ABSTRACT

SILVA, Rosiane de Fátima, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, February, 2021. **Control of *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Noctuidae: Plusiinae) by strains of *Bacillus* spp.** Adviser: Liliane Evangelista Visôto. Co-advisers: Carlos Marcelo Soares and Luanda Medeiros Santana.

The false medideira caterpillar, *Chrysodeixis includens* is a polyphagous pest, that attacks diverse cultures of economic importance. The control of this insect is carried out the application of conventional agrochemicals, which has led to an increase in the occurrence of resistant populations and damage to health and the environment. Thus, the use of biological control is necessary for the integrated management of this pest. In this study, was evaluated the potential of twelve isolates of *Bacillus* spp. for the control of *C. includens*. Selective bioassay was performed to identify the isolated that cause the highest mortality of *C. includens*. The mean lethal concentration (LC₅₀) and sublethal effects of the isolates on the surviving insects were evaluated using a dose-response bioassay. The effect of *Bacillus* spp. was also evaluated in the digestive proteases activities of *C. includens*. The results show that only tem GB10 strain caused 100 % mortality of caterpillars of 2nd instar, and therefore, it was selected for further tests. Concentrations below 10⁻³ UFC mL⁻¹ caused 100 % insect mortality, therefore, sublethal effects were evaluated with concentrations of GB10 and the reference strain S1450 ranging from 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ UFC mL⁻¹. GB10 showed a lower CL₅₀ compared to the reference strain, and both significantly reduced the larval weight with the increase of the tested concentration, when compared to the control. The strains GB10 and S1450 also significantly decreased the activities of the serine, cysteine proteases and total proteases. This study suggests that the GB10 isolate was more eficiente in relation to the strain S1450 and is promising for the development of bioproducts that can be used in integrated manegement of *C. includens*.

Keywords: Biological control. False medideira. Phytossanitty.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mortalidade de lagartas de segundo instar de <i>Chrysodeixis includens</i> submetidas a dieta artificial com diferentes isolados bacterianos.....	24
Figura 2 – Mortalidade (A) e peso larval (B) de <i>Chrysodeixis includens</i> submetidas a diferentes concentrações de S1450 (Controle +) e GB10.....	26
Figura 3 – Atividades enzimáticas do intestino de lagartas de 5º instar de <i>Chrysodeixis includens</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Componentes de dieta artificial para alimentação de <i>Chrysodeixis includens</i>	19
Tabela 2 – Mortalidade larval de <i>Chrysodeixis includens</i> submetidas a dieta artificial com GB10 cultivado em diferentes meios, para avaliação da atividade de β -exotoxina.....	25
Tabela 3 – Concentração letal média (CL50) e intervalos de confiança (IC 95%) de S1450 (controle +) e GB10 contra lagartas de segundo ínstar de <i>Chrysodeixis includens</i>	26
Tabela 4 – Parâmetros biológicos de <i>Chrysodeixis includens</i> submetidas a diferentes concentrações das suspensões de S1450 e GB10.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AN	Ágar nutriente.
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio.
BSA	Albumina serica bovina.
CL	Concentração letal.
CV	Coeficiente de variação.
kDA	Quilodalton.
LB	Lúria Bertani.
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
MIP	Manejo Integrado de Pragas.
MLG	Modelo linear generalizado.
NaCl	Cloreto de sódio.
pH	Potencial de hidrogênio.
RPM	Rotação por minuto.
UFC	Unidade formadora de colônia.

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor.
-	Menos.
%	Porcentagem.
%	Porcentagem.
~	Aproximadamente.
+	Mais.
±	Mais ou menos.
≤	Menor ou igual.
μl	Microlitro.
μm	Micromolar.
g	Gramas.
mg	Miligramas.
mL	Mililitro.
nm	Nanômetro.
°C	Graus Celsius.
α	Alfa.
β	Beta.
δ	Delta.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
	2.1 Microrganismos.....	18
	2.2 Insetos.....	19
	2.3 Bioensaio seletivo de toxicidade das cepas de <i>Bacillus</i> spp. à <i>Chrysodeixis includens</i>	19
	2.4 Bioensaio de produção de β -exotoxinas pelas estirpes.....	20
	2.5 Bioensaio de CL ₅₀ e efeitos subletais.....	21
	2.6 Teor de proteínas e atividade de proteases do intestino de larvas de <i>Chrysodeixis includens</i>	22
	2.7 Análises estatísticas.....	22
3.	RESULTADOS.....	24
	3.1. Isolado GB10 não produtor de β -exotoxinas acarretou 100 % de mortalidade de lagartas de <i>Chrysodeixis includens</i>	24
	3.2. O isolado GB10 apresentou uma CL ₅₀ menor do que a cepa referência e não causou alterações significativas nos parâmetros de desenvolvimento de <i>Chrysodeixis includens</i>	25
	3.3 O isolado GB10 reduz as atividades proteolíticas do intestino de <i>C. includens</i>	28
4.	DISCUSSÃO.....	29
5.	CONCLUSÕES.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	APÊNDICE A – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
	ANEXO A.....	41
	ANEXO B.....	42
	ANEXO C.....	43

1. INTRODUÇÃO

A lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Noctuidae: Plusiinae) é uma espécie de lepidóptera polífaga, desfolhadora tendo como hospedeiros diversas espécies de plantas de relevância econômica, como algodão, soja, feijão, repolho, tomate, entre outras, totalizando mais de 70 hospedeiros, pertencentes a 29 famílias (Bueno et al., 2007; Bernardi et al., 2012; Specht et al., 2015).

Este inseto praga apresenta ciclo completo compreendendo as fases de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos da *C. includens*, são globulares e possuem diâmetro de 0,50 mm a 0,53 mm e são depositados na parte abaxial da folha de forma isolada. O desenvolvimento embrionário deste inseto se completa em torno de 2,5 dias (Peterson, 1964; Andrade, 2014).

As lagartas ao eclodirem são de coloração verde-clara, com listras longitudinais brancas e pontuações pretas atingindo 4 a 4,5 cm de comprimento. Possuem dois pares de falsas pernas abdominais, por isso vulgarmente chamadas de mede-palmo (Sosa-Gómez et al., 2010; Andrade, 2014). A cor da lagarta passa de verde marrom-clara para verde-limão translúcida (Smilowitz, 1973), sendo que a fase larval pode durar 15 dias (Bueno et al., 2011). As lagartas transformam-se em pupa, que ocorre sob uma teia, geralmente na parte abaxial das folhas. No início as pupas são de cor amarelo-pálido a verde-clara com o tempo as pupas tornam-se mais escuras. Esse período de pupa tem duração de 7 a 9 dias até a emergência dos adultos (Vazquez, 1988). Os adultos da *C. includens* são mariposas, possuem cerca de 3,5 cm de envergadura, as asas anteriores possuem duas manchas prateadas brilhantes na parte central, essas como também as asas posteriores possuem coloração marrom, com brilho cúpreo (Gallo et al., 2002; Sosa-Gómez et al., 2010).

A longevidade das mariposas de *C. includens* é de aproximadamente 15 dias. O acasalamento ocorre normalmente no período noturno entre 22:00 e 4:00 (Lingren et al., 1977), sendo de grande importância nesse processo a emissão do feromônio sexual pelas fêmeas (Tumlinson et al., 1972). As fêmeas ovipositam em média 700 ovos, que são depositados na face abaxial das folhas e nos dois terços superiores do dossel das plantas (Jost, Pitre, 2002).

Sendo um inseto desfolhador, as injúrias causadas nas plantas reduzem a taxa fotossintética e, conseqüentemente a produtividade (Oliveira, 2014). O controle de *C.*

inclusens é feito principalmente através de agroquímicos, o que aumenta muito o custo de produção, podendo ser prejudicial ao meio ambiente, incluindo a comunidade de insetos predadores e parasitoides, que podem auxiliar também no controle da praga (Sena et al., 2013; Borges, 2016; Alvarenga et al., 2017). Além disso, o uso frequente e indiscriminado de agroquímicos pode selecionar populações de insetos resistentes, como os casos já registrados de resistência de *C. inclusens* aos ingredientes ativos acefato, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, metomil, paration-metil, permetrina e tiodicarbe (IRAC, 2020).

Devido a esses motivos, têm-se destacado o manejo integrado de pragas utilizando o controle biológico como alternativa ao uso exclusivo de inseticidas químicos para o controle de pragas agrícolas (Kogan e Bajwa, 1999; Stenberg, 2017; Baker et al., 2020). Os bioinseticidas à base de microrganismos, sobretudo bactérias, fungos e vírus são menos agressivos ao ser humano, ao meio ambiente, tem menor pressão de seleção para resistência e também tem custo reduzido comparado aos agroquímicos convencionais (Glare et al., 2012; Lacey et al., 2015; Morán-Diez e Glare, 2016; Damalas e Koutroubas, 2018; Butu et al., 2020).

Dentre as bactérias, as aeróbias formadoras de esporos são excelentes candidatas a agentes de controle biológico, principalmente espécies do gênero *Bacillus*, que vêm se destacando devido à capacidade de sintetizar toxinas ou substâncias inseticidas (Schünemann et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado a eficiência desses microrganismos, com ênfase na espécie *Bacillus thuringiensis* (Bt), no controle de pragas, incluindo lepidópteros como *Palpita quadristigmalis* (Victoriano et al., 2019), *Plutella xylostella* (Baragamaarachchi et al., 2019), *Anticarsia gemmatalis* (Bel et al., 2017), *Spodoptera frugiperda* (Monnerat et al., 2007) e *C. inclusens* (Rodrigues et al., 2018). O uso de formulações a base de Bt foi relatado por Rodrigues et al. (2018) que observaram menor valor de CL₅₀ comparado aos químicos Indoxacarb e Teflubenzuron, sendo considerado mais efetivo no controle de *C. inclusens*. A pulverização de 350 mL ha⁻¹ de um produto a base de *B. thuringiensis* var. *Kurkaki* cepa HD-1 proporcionou uma redução de 96,2% da população de *C. inclusens* comparado a testemunha (6,70%) (Borges, 2016).

Substâncias inseticidas e toxinas com potencial uso no Manejo Integrado de Pragas - MIP também são comumente associadas aos *Bacillus* spp.. A susceptibilidade, a resistência e o mecanismo de ação das diferentes toxinas Bt sobre insetos-praga tem sido extensivamente explorado (Rahman et al., 2007; Schünemann

et al., 2014; Bel et al., 2017; Mushtaq et al., 2017; Grizanova et al., 2019 e Konecka et al., 2020). Sabe-se que o mecanismo de ação do *B. thuringiensis* no controle de pragas, incluindo lepidópteros, pode variar e está associado a presença de esporo, ao tipo de proteína expressa pela cepa e a ordem e/ou espécie do inseto alvo (Heimpel e Angus, 1959; Graf, 2011; Cornforth et al., 2015; Chackraborty et al., 2016).

Durante a fase de esporulação, o Bt sintetiza inclusões cristalinas proteicas paraesporais, compostas por uma ou várias proteínas Cry, denominadas também de δ -endotoxinas ou *Insecticidal Crystal Proteins* (ICPs) (Bobrowski et al., 2003). Estas toxinas são ingeridas pelos insetos na forma de protoxina (~ 135 kDa) e são proteoliticamente convertidas em polipeptídeos menores e ativos (~ 65 kDa), resistentes à proteólise. Na forma ativa, os polipeptídeos associam-se a receptores específicos localizados na superfície das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio do inseto, atravessam a membrana e criam poros que proporcionam o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele, redução do pH do intestino do inseto permitindo a entrada de água e cátions para o interior celular, provocando o turgor e lise. O resultado deste processo é uma rápida interrupção da alimentação e eventual morte do inseto (Copping e Menn, 2000; Bobrowski et al., 2003; Heckel, 2020). De acordo com Vachon et al. (2012) os eventos que resultam na formação de poros no intestino médio e que levam o inseto a morte são bem conhecidos, no entanto o que acontece anteriormente a formação desses poros, após a ligação da proteína inseticida aos receptores ainda precisa ser mais elucidado. As diferentes classes de proteases que atuam no intestino dos insetos em ambiente alcalino são essenciais para a toxicidade das proteínas Cry e também são responsáveis pela especificidade (Aronson et al., 1991; Bobrowski et al., 2003; Hernández-Martínez et al., 2013).

Uma maneira de se estudar os efeitos dos *Bacillus* sp. nos insetos alvos é, inicialmente, avaliar a mortalidade dos insetos infectados e determinar a concentração letal, como CL₅₀ (concentração mediana letal), tanto em laboratório quanto em campo (Mashtoly et al., 2009). Além disso, as avaliações das alterações nos parâmetros biológicos durante o ciclo de vida dos insetos alvo, como longevidade, duração dos estágios larval e pupal, produção de ovos, entre outros fatores, são importantes para o entendimento da ação dos *Bacillus* spp. na fisiologia e recuperação das populações de insetos, quando doses subletais são utilizadas. Efeitos subletais são definidos como efeitos não letais do agente de controle que resultam em alterações biológicas, demográficas, fisiológicas e comportamentais nos indivíduos sobreviventes (Dexneus

et al. 2007; De França et al. 2017). Estudos descreveram efeitos subletais com bioinseticidas Bt ou toxinas Cry utilizados no controle de pragas na agricultura (Gujar et al., 2001; Sedaratian et al., 2013; Fite et al., 2019; Rabelo et al., 2020).

Diante do exposto este estudo teve como objetivo verificar o potencial inseticida de doze isolados de *Bacillus* spp. no controle de *C. includens*, verificar a CL₅₀ e seus efeitos subletais no inseto. O efeito dessas cepas foi observado sobre a mortalidade, o desenvolvimento larval e pupal, emergência em adultos e atividades de proteases digestivas a fim de correlacionar os possíveis danos teciduais provocados pelas bactérias no desenvolvimento do inseto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Pesquisa da Empresa Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola, localizado em Patos de Minas e no Laboratório de Pesquisa em Bioquímica e Genética Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa – Campus Rio Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. As cepas de *Bacillus* spp. foram gentilmente cedidas pelo Dr. Walter Vieira da Cunha responsável pelo laboratório GENE B (Genética e Biotecnologia – UNIPAM). Foram selecionadas 12 cepas de *Bacillus* spp. do acervo e uma cepa padrão usada como controle positivo (Isolado S1450 – estirpe HD-1 de *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki*) proveniente do Laboratório de Bactérias para Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Esses isolados foram pré-selecionados levando em consideração a toxicidade apresentada contra *S. frugiperda* em bioensaios seletivos realizados no laboratório GENE B.

2.1. Microrganismos

Para verificar a pureza dos isolados, as bactérias foram descongeladas a temperatura ambiente, em seguida transferidas para o meio ágar nutriente (AN) e mantidas em estufa do tipo BOD a 30 °C por 72 h. A pureza da cultura foi avaliada por meio da morfologia da colônia após 24, 48 e 72 h de incubação, sendo consideradas puras as colônias com morfologia semelhante. Os meios contendo as colônias bacterianas foram analisadas em estereomicroscópio e aqueles que apresentaram mais de um morfotipo foram submetidos ao isolamento através da técnica de estriamento e mantidos em estufa do tipo BOD a 30 °C por 72 h.

Em seguida, uma unidade formadora de colônia (UFC) de cada isolado foi transferida para 40 mL de meio de cultura padronizado para *Bacillus* spp. (NOOA) e mantida a 28 °C por 72 h, sob agitação contínua de 200 rpm. Posteriormente, foram verificados pureza, crescimento, esporulação e presença de cristais através de microscopia.

Para a quantificação do número de UFC mL⁻¹ foi realizada diluição seriada (10⁻¹ a 10⁻⁶) para cada colônia bacteriana, utilizando solução de NaCl 0,85 % como diluente. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foi transferida para o meio AN sólido através da técnica de espalhamento e as culturas foram incubadas em estufa BOD a

30°C. A contagem do número de UFC foi realizada após 24 e 48 h de crescimento, segundo metodologia adaptada com base no MAPA-IN30 (2010).

2.2. Insetos

Ovos de *C. includens* foram adquiridos da empresa Promip e após o recebimento, foram mantidos em sala climatizada a temperatura de 24 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotoperíodo de 12 h até a eclosão. As lagartas de *C. includens* até o segundo instar foram mantidas em dieta artificial, conforme descrito por Grenne et al. (1976) com modificações (Tabela 1).

Tabela 1. Componentes de dieta artificial para alimentação de *Chrysodeixis includens*.

<i>Componentes autoclaváveis</i>	<i>Quantidades ajustadas para 638,4 g de dieta</i>
Feijão-branco	37,5 g
Gérmen de trigo	30,0 g
Proteína de soja	15,0 g
Caseína	15,0 g
Levedo de cerveja	18,75 g
Ágar	11,5 g
Água deionizada	500,0 mL
<i>Componentes não-autoclaváveis</i>	<i>Quantidades ajustadas para 638,4 g de dieta</i>
Ácido ascórbico	1,8 g
Ácido sórbico	0,9 g
Metil parahidroxibenzoato (Nipagin)	1,5 g
Formaldeído 37%	1,8 mL
Solução vitamínica*	4,5 mL

*Componentes solução vitamínica: 0,02 mg de biotina, 0,25 mg de piridoxina, 0,5 mg de riboflavina, 1,0 mg de niacinamida, 20,0 mg de inositol, 0,25 mg de ácido fólico, 0,25 mg de tiamina, 1,0 mg de pantotenato de cálcio, 0,002 mg de vitamina B12 e 1000 mL de água ultrapura.

2.3. Bioensaio seletivo de toxicidade das cepas de *Bacillus* spp. à *Chrysodeixis includens*

A toxicidade dos doze isolados de *Bacillus* spp. às lagartas de 2º instar de *C. includens* foi analisada através da técnica de tratamento superficial de dieta artificial modificada (com ausência de formaldeído e ácido sórbico). Foram utilizados copos plásticos com tampa (cada pote com área total de 12,56 cm² Galvanotec) e aplicado na superfície da dieta 160 µL da suspensão de *Bacillus* spp. contendo esporos e cristais na concentração total de UFC de cada uma das cepas selecionadas. Foram transferidas 10 lagartas de segundo instar para cada pote. Como controle negativo foi utilizada dieta sem acréscimo da suspensão bacteriana e no controle positivo usada a suspensão da cepa S1450 também na concentração total. Os potes foram fechados e mantidos em sala climatizada a temperatura de 24 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotoperíodo de 12 h. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma contendo dez lagartas de 2º instar, totalizando 30 lagartas por tratamento. O experimento foi realizado 3 vezes.

A primeira avaliação da mortalidade foi realizada 48 h após a exposição dos insetos à dieta e foi considerada morta a lagarta que não apresentou movimentos coordenados quando tocada com auxílio de um pincel de cerdas macias (Nunes et al., 2019). As lagartas sobreviventes foram transferidas para potes plásticos contendo dieta artificial sem a adição da suspensão bacteriana. No sétimo dia após o início do bioensaio foi realizada a segunda e última avaliação de mortalidade.

2.4. Bioensaio de produção de β-exotoxinas pelas estirpes

O(s) isolado(s) que provocaram 100 % de mortalidade no bioensaio seletivo foram submetidos a análise de produção de β-exotoxinas, de forma semelhante a metodologia descrita no item 2.3. A bactéria foi cultivada separadamente nas condições:

1. Meio Luria Bertani com sais (Pinheiro e Valicente, 2013), autoclavado por 20 min. a 121 °C e filtrado em membrana de 0,22 µm (Tratamento LB não centrifugado).
2. Meio LB com sais (Pinheiro e Valicente, 2013), centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, o sobrenadante autoclavado por 20 min. a 121 °C e filtrado em membrana de 0,22 µm (Tratamento LB centrifugado).

3. Meio Bt centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, o sobrenadante autoclavado por 20 min. a 121 °C e filtrado em membrana de 0,22 µm (Tratamento Bt centrifugado).

Após o preparo 160 µL de cada suspensão foi aplicado na superfície da dieta. Um tratamento controle, constituído apenas de dieta artificial, também foi realizado. A avaliação da mortalidade larval foi realizada 48 h e 7 dias após a exposição dos insetos a dieta com os tratamentos e foi considerada morta a larva que não apresentou movimentos coordenados quando tocada com auxílio de um pincel fino. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma com dez lagartas de 2º instar, totalizando 30 lagartas por tratamento. O experimento foi realizado 3 vezes.

2.5. Bioensaio de CL₅₀ e efeitos subletais

A determinação da concentração letal média (CL₅₀) foi realizada apenas com os isolados bacterianos S1450 – cepa referência (controle positivo) e GB10, que acarretaram 100 % de mortalidade das lagartas de *C. includens* no bioensaio seletivo. Diluição seriada e contagem de UFC foram realizadas para determinar a concentração bacteriana. Dez lagartas de segundo instar foram transferidas para pote plástico de 50 mL com tampa contendo dieta com diferentes concentrações bacterianas (10^{-1} a 10^{-10} UFC mL⁻¹). Foi aplicado na superfície da dieta, 160 µL de cada uma das 10 diluições de cada cepa, e como controle negativo foi utilizado dieta sem acréscimo de suspensão bacteriana. A avaliação da mortalidade larval foi realizada com 48 h e 7 dias após instalação dos bioensaios. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições, cada uma contendo dez lagartas de 2º instar, totalizando 30 lagartas por tratamento. O experimento foi realizado 3 vezes.

Afim de verificar os efeitos de doses subletais, após 48 h de exposição as bactérias, as lagartas sobreviventes de cada tratamento foram individualizadas e transferidas para potes com dieta artificial sem solução bacteriana que foi oferecida *ad libitum*. A cada três dias a dieta foi substituída e os parâmetros biológicos dos insetos foram avaliados diariamente até a emergência dos adultos. Os parâmetros biológicos avaliados na fase larval foram duração da fase e peso de lagartas aos 10 dias. Após o término do ciclo larval, as pupas de cada tratamento foram separadas e transferidas para potes plásticos limpos de 100 mL, o peso das pupas após 24 h e

duração da fase pupal foram determinados. Também foi contabilizada a porcentagem de emergência de adultos. A determinação da porcentagem de emergência em adultos foi feita pela razão entre o número de adultos obtidos pelo número de pupas multiplicado por 100.

2.6. Teor de proteínas e atividade de proteases do intestino de larvas de *Chrysodeixis includens*

Foram coletados 0,5 g de intestinos de lagartas de quinto instar alimentadas durante o segundo instar por 48 h com dieta artificial sem adição de bactéria (controle negativo) e contendo dose subletal das cepas S1450 (controle positivo) e GB10. Os intestinos foram transferidos para microtubos contendo 1 mL de solução HCl 10^{-3} M e mantidos a -20 °C até o momento das análises. O extrato enzimático foi obtido por maceração em cadinho a 4 °C, centrifugado por 5 min. a 12.000 rpm e mantido em gelo até o final das análises.

A concentração de proteínas foi determinada segundo o método proposto por Bradford (1976), utilizando como padrão albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações 0 a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. A atividade amidásica de serino protease foi determinada utilizando N- α -Benzoyl-D, L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride (L-BApNA) como substrato na concentração final de 0,5 mM em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,2, 25 °C), contendo 20 mM de CaCl_2 e dimetilformamida (DMF v/v) (Erlanger et al., 1961). A atividade de cisteíno protease foi determinada conforme descrito para a atividade amidásica com adição de inibidor de serino protease, benzamidina na concentração 1,0 mM. A atividade de protease total foi realizada usando como substrato a azocaseína a 2 % (m/v). O tempo de incubação do substrato com a enzima foi de 30 min, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 10 % (m/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas por 5 min. a 8000 rpm para remoção da proteína precipitada. Solução de NaOH 0,1 M foi adicionado ao sobrenadante e a atividade enzimática determinada pela leitura 440 nm em espectrofotômetro segundo Kunitz (1947), modificado por Oliveira et al. (1993).

2.7. Análises estatísticas

Considerando que a variável mortalidade é obtida por meio de contagem e não atendeu os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, foi utilizado o modelo linear generalizado (MLG) de Poisson. Após o ajuste do modelo, realizou-se o teste Tukey ($\alpha = 0,05$) para comparar as médias dos tratamentos, utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2008).

Os resultados dos bioensaios de concentração-letalidade (CL_{50}) foram submetidos à análise de Probit pelo programa Polo Plus 1.0 ($p \leq 0,05$) (LeOra Software, 2008).

Dados de dose resposta (mortalidade e peso larval) foram submetidos a análise de regressão utilizando o programa Sigma Plot. As atividades enzimáticas foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey utilizando o programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM 2008).

3. RESULTADOS

3.1. Isolado GB10 não produtor de β -exotoxinas acarretou 100 % de mortalidade de lagartas de *Chrysodeixis includens*

A mortalidade de *C. includens*, submetidas à diferentes cepas bacterianas, variou de 3 a 100%. Pela análise de MLG de Poisson e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) é possível observar a porcentagem de insetos mortos e a diferença estatística entre os tratamentos (Figura 1A). Apenas o isolado GB10 na concentração total, dentre os doze testados, foi o único que ocasionou 100 % de mortalidade das lagartas de 2º instar, semelhantemente a cepa referência S1450, usada como controle positivo (Figura 1B).

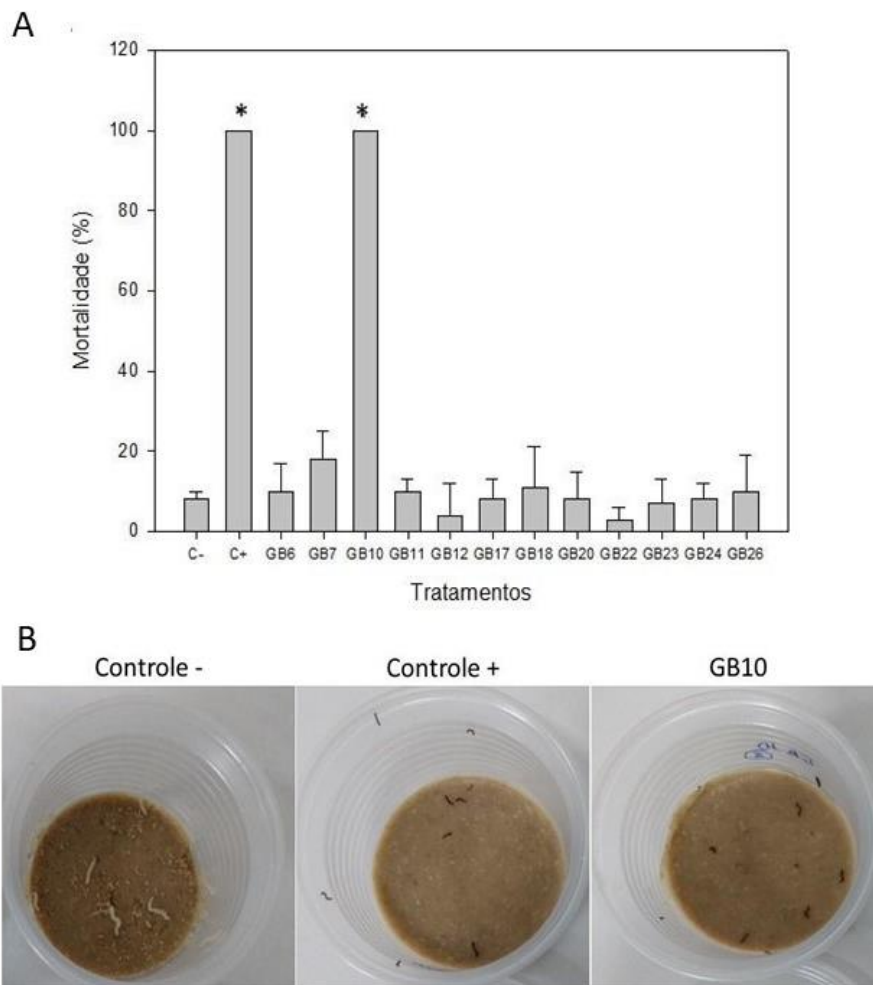


Figura 1- Mortalidade de lagartas de segundo instar de *Chrysodeixis includens* submetidas a dieta artificial com diferentes isolados bacterianos. A) Comparação das médias percentuais de mortalidade entre os tratamentos. B) Fotos das lagartas dos

tratamentos sem adição de suspensão bacteriana (controle -), com adição da suspensão da cepa referência S1450 (controle +) e com adição da suspensão de GB10 (GB10). C-: controle negativo. C+: controle positivo (cepa S1450). Barras com * indicam diferença estatística significativa comparado aos demais tratamentos, segundo análise MLG e teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

Devido ao seu potencial inseticida, o isolado GB10 foi analisado quanto a capacidade de produzir β -exotoxinas. Lagartas foram alimentadas com dietas acrescentadas superficialmente com meios distintos, segundo os tratamentos descritos no item 2.4. A porcentagem média de mortalidade larval de insetos submetidos a esses tratamentos está apresentada na tabela 2. Por esse ensaio pode-se observar que a mortalidade média variou entre 2,33 a 5,66 %, indicando que GB10 não é capaz de produzir β -exotoxinas. Com base nos resultados de mortalidade e da produção de β -exotoxinas, o isolado GB10 foi selecionado para as análises subsequentes.

Tabela 2- Mortalidade larval de *Chrysodeixis includens* submetidas a dieta artificial com GB10 cultivado em diferentes meios, para avaliação da atividade de β -exotoxina.

Tratamentos	Mortalidade larval (%)
Controle negativo (-)	4,333 \pm 7,50
GB10 em meio LB acrescido de sais não-centrifugado	2,333 \pm 4,04
GB10 em meio LB acrescido de sais centrifugado	2,666 \pm 4,04
GB10 em meio BT centrifugado	5,333 \pm 4,04

3.2. O isolado GB10 apresentou uma CL_{50} menor do que a cepa referência e não causou alterações significativas nos parâmetros de desenvolvimento de *Chrysodeixis includens*

Valores da CL_{50} determinados (Tabela 3) sugerem que a cepa GB10 apresentou atividade inseticida melhor contra lagartas de *C. includens* do que a cepa referência S1450. Concentrações 3 a 4 vezes menores de GB10 são necessárias para causar a mortalidade de 50 % dos insetos, quando comparada a cepa S1450.

Tabela 3- Concentração letal média (CL₅₀) e intervalos de confiança (IC 95%) de S1450 (controle +) e GB10 contra lagartas de segundo ínstar de *Chrysodeixis includens* (obtida na análise Probit).

Tratamentos	CL ₅₀ (UFC mL ⁻¹)	IC (95%)
Controle +	4,8 x 10 ⁸	5,7 x 10 ⁷ – 6,7 x 10 ⁹
Controle +	7,9 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁴ – 1,8 x 10 ¹⁰
GB10	6,7 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁴ – 4,6 x 10 ⁷
GB10	4,2 x 10 ⁴	9,0 x 10 ³ – 2,6 x 10 ⁷

Diluições até 10⁻³ UFC mL⁻¹ de S1450 (controle +) e GB10 provocaram de 74 a 100% e 71 a 100% de mortalidade, respectivamente (Figura 2). Dessa forma, os efeitos subletais foram analisados acompanhando-se a biologia de *C. includens* sobreviventes, submetidas aos tratamentos das diluições 10⁻⁴ a 10⁻¹⁰ dos isolados bacterianos até a emergência dos adultos. Pela análise de regressão foi possível observar que as lagartas submetidas aos tratamentos com as bactérias apresentaram um menor peso comparado ao controle negativo (dieta sem adição de bactérias) (Figura 2).

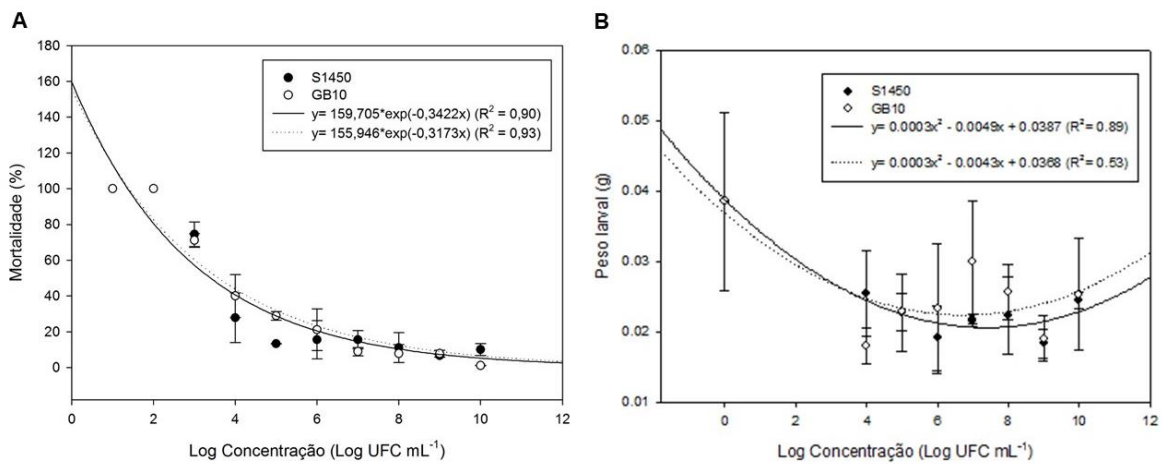


Figura 2- Mortalidade (A) e peso larval (B) de *Chrysodeixis includens* submetidas a diferentes concentrações de S1450 (Controle +) e GB10.

Houve diferença significativa entre os tratamentos no parâmetro emergência em adultos (Tabela 4). No entanto, não foram observadas diferenças significativas nos demais parâmetros biológicos avaliados (Tabela 4). O tempo médio de duração do ciclo larval e pupal de todos os tratamentos foi de $22,223 \pm 0,10$ e $7,91 \pm 0,15$ dias

respectivamente. Enquanto, o peso médio pupal foi de $0,230\text{g} \pm 0,01$ nos três tratamentos avaliados.

Tabela 4- Parâmetros biológicos de *Chrysodeixis includens* submetidas a diferentes concentrações das suspensões de S1450 e GB10

Tratamentos	Parâmetros				
	Peso larval (g)	Duração fase larval (dias)	Peso pupal (g)	Duração fase pupal (dias)	Emergência em adultos (%)
Controle -	0,04±0,01	22,21±0,13	0,21±0,00	7,94±0,15	75,13±8,77b
S1450 (10 ⁻⁴)	0,02±0,00	22,33±0,88	0,25±0,02	8,00±0,88	100,00±0,00a
S1450 (10 ⁻⁵)	0,02±0,00	22,04±0,78	0,25±0,01	8,08±0,61	73,21±11,70b
S1450 (10 ⁻⁶)	0,01±0,00	21,66±1,15	0,25±0,01	8,33±0,28	69,44±4,81b
S1450 (10 ⁻⁷)	0,02±0,00	21,79±0,32	0,23±0,00	7,80±0,17	74,81±7,14b
S1450 (10 ⁻⁸)	0,02±0,00	22,26±0,55	0,23±0,01	7,97±0,67	85,00±13,22ab
S1450 (10 ⁻⁹)	0,01±0,00	22,35±0,77	0,23±0,01	8,40±0,24	96,66±5,77a
S1450 (10 ⁻¹⁰)	0,02±0,00	22,34±0,28	0,24±0,00	7,78±0,60	75,16±2,52b
GB10(10 ⁻⁴)	0,01±0,00	23,13±0,95	0,24±0,00	7,76±0,30	100,00±0,00a
GB10(10 ⁻⁵)	0,02±0,00	22,48±0,61	0,24±0,00	7,78±0,44	100,00±0,00a
GB10(10 ⁻⁶)	0,02±0,00	22,00±0,49	0,23±0,02	7,77±0,54	87,40±3,57ab
GB10(10 ⁻⁷)	0,02±0,00	22,06±0,39	0,22±0,00	7,59±1,24	88,61±2,67ab
GB10(10 ⁻⁸)	0,02±0,00	22,56±0,75	0,23±0,01	7,84±0,33	88,33±4,40ab
GB10(10 ⁻⁹)	0,02±0,00	22,34±0,25	0,23±0,01	7,69±0,54	86,46±13,63ab
GB10(10 ⁻¹⁰)	0,02±0,00	21,61±0,10	0,23±0,01	7,74±0,75	80,83±6,29ab
CV (%)	37,22	3,07	6,72	7,73	8,38

Médias ± DP apresentadas pelos tratamentos nos parâmetros peso de lagartas aos 10 dias, duração da fase larval, peso das pupas após 24 h, duração da fase pupa e emergência de adultos. Controle -: tratamento sem adição de suspensão bacteriana. Diluições seriadas das suspensões das cepas referência S1450 e GB10. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de tukey a 5 % de probabilidade. CV (%): coeficiente de variação.

3.3. O isolado GB10 reduz as atividades proteolíticas do intestino de *C. includens*

Insetos de 5^o instar alimentados durante 48 h, com dieta adicionadas com as bactérias S1450 e GB10 apresentaram redução significativa nas atividades de serino protease, cisteíno protease e proteases totais, comparadas ao controle (Figura 4).

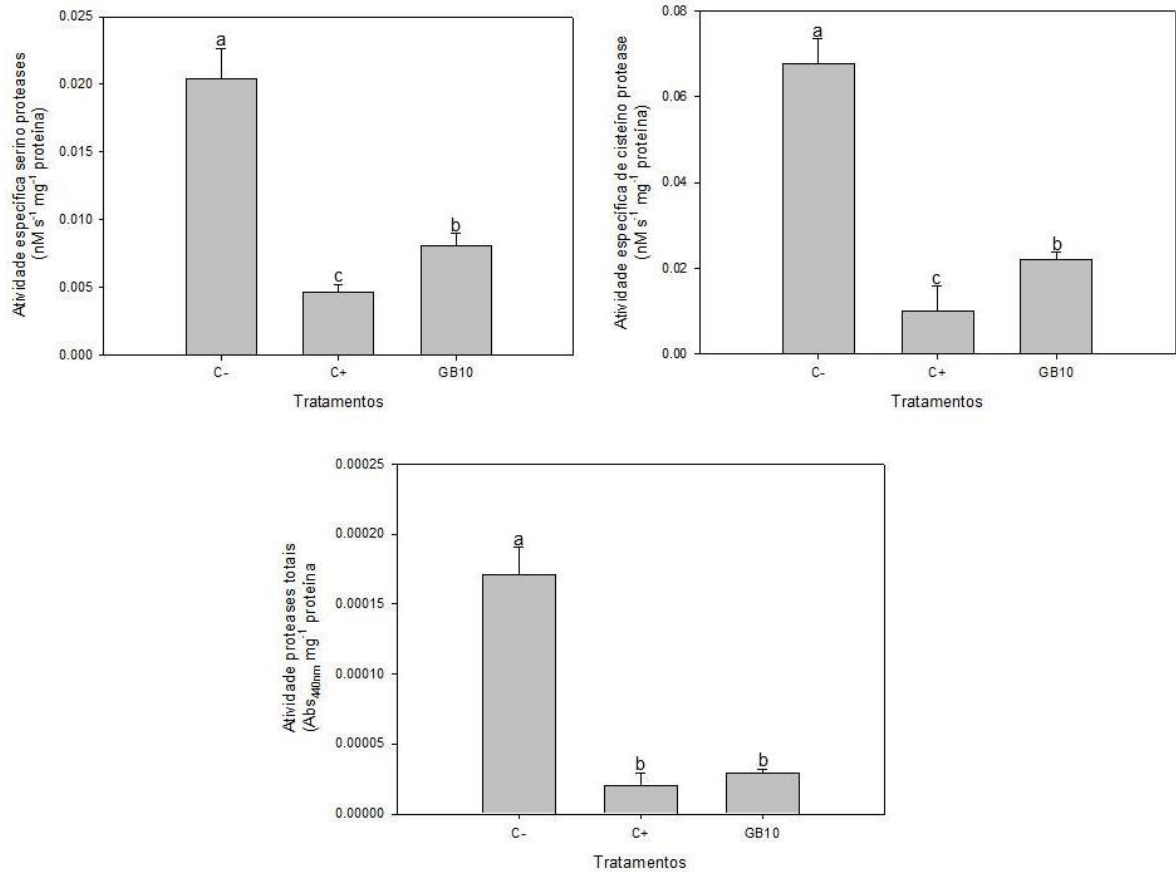


Figura 3- Atividades enzimáticas do intestino de lagartas de 5^o instar de *C. includens*. C-: controle negativo. C+: controle positivo (cepa S1450). As barras representam as médias de três repetições. Barras com letras diferentes apresentaram diferença significativa ($P < 0,001$) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. DISCUSSÃO

Dentre as doze cepas de *Bacillus* spp. avaliadas, somente a cepa GB10 mostrou-se eficaz no controle *C. includens*, acarretando 100 % mortalidade de lagartas de 2^o instar. Resultados semelhantes, utilizando cepas de *B. thuringiensis*, foram reportados em estudos realizados com outras lagartas desfolhadoras entre elas *A. gemmatilis* (Castro et al. 2019), e *Euprosterina elaeasa* (Plata-Rueda et al., 2020). Victoriano et al. (2019) analisando em laboratório o efeito de três concentrações de *B. thuringiensis*

(1,0, 2,5 e 5,0 g/L) em larvas de *P. quadristigmalis*, verificaram que a mortalidade aumentou em resposta ao aumento das concentrações de Bt, variando de 65 a 97,5%.

Como no bioensaio seletivo apenas o isolado GB10 provocou mortalidade larval acima de 80 %, este foi selecionado para os ensaios subsequentes. Quando as médias de CL₅₀ foram comparadas, observou-se que a cepa GB10 apresentou menor valor CL₅₀ contra lagartas de *C. includens* em comparação a cepa S1450, utilizada como referência de toxicidade contra lepidópteros. Essa diferença pode estar relacionada a variação da quantidade de esporos contendo cristal secretados no meio de cultivo ou ainda devido aos componentes do meio, que podem potencializar ou reduzir o efeito de determinados isolados. Além disso, os isolados GB10 e S1450 provavelmente expressam toxinas distintas e as do isolado GB10 possivelmente apresentam maior toxicidade para *C. includens*. Conseqüentemente, estudos de caracterização dos genes codificadores de toxinas presentes nesses *Bacillus* é crucial para elucidar as diferenças nos mecanismos de ação dessas estirpes. Outra questão interessante que deve ser considerada é o estudo que correlacione a composição de meios de cultura para desenvolvimento de *Bacillus* sp. e a eficiência no controle de larvas de *C. includens*. Essas respostas são necessárias para o avanço no desenvolvimento de bioprodutos a base de S1450 e GB10.

Ornelas-Pérez et al. (2016) comparando a toxidez de cepas nativas (GM-IB-90, GM-IB-92, GM-IB-94, GM-IB-96 E GM-IB-98) e cepas referência (GM-7, IB-7, IB-62 E HD-1) contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa zea* constataram que das cinco cepas nativas testadas, a GM-IB-92 apresentou CL₅₀ significativamente menor contra *T. ni* em comparação a cepa referência, HD-1.

A maioria dos estudos toxicológicos focam na sobrevivência e mortalidade dos insetos. No entanto, tem-se aumentado a preocupação em compreender os efeitos subletais provocados pelo agente utilizado no biocontrole. Os resultados de doses subletais de *Bacillus* spp. na biologia de *C. includens* é pouco reportado, e os efeitos podem ser altamente variáveis devido a variabilidade genética das cepas e a polifagia desse inseto. Neste trabalho não foram constatados efeitos significativos de subdoses na duração da fase larval, peso das pupas e duração da fase pupa. No entanto, análises de regressão sugerem que lagartas que consumiram dieta artificial adicionada de *Bacillus* spp. apresentaram menor peso e maior mortalidade comparada as lagartas do tratamento controle. A diminuição do peso larval e das atividades de serino proteases, cisteíno proteases e proteases totais provocadas por

concentrações subletais dos *Bacillus* spp. provavelmente é atribuída aos danos teciduais decorrentes da ação de toxinas ativas que são responsáveis pela criação de poros e extravasamento do conteúdo intestinal.

Nesse estudo verificou-se uma diminuição significativa das atividades de serino proteases, cisteíno proteases e proteases totais no intestino de lagartas de *C. includens* alimentadas com dieta adicionada com GB10 e S1450. Esses resultados provavelmente estão associados aos danos causados por esses *Bacillus* as células epiteliais do intestino. O trato gastrointestinal de lepidópteras é o principal sítio de produção de enzimas, em particular de serino e cisteíno proteases (Chavéz, 2016). Fathipour et al. (2019) observaram que as atividades de proteases totais do intestino de *H. armigera* foram significativamente afetadas por doses subletais de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* de modo que o aumento da concentração de Btk diminuiu a atividade enzimática. Do mesmo modo, Mendonça et al. (2011), constataram diferentes picos de atividade de cisteíno proteases em intestino médio da *A. gemmatalis*. O comprometimento das atividades proteolíticas afeta diretamente o desenvolvimento do inseto e provavelmente está associado a diminuição do ganho de biomassa em lagartas de *C. includens* submetidas ao tratamento com os *Bacillus* spp..

5. CONCLUSÕES

O isolado GB10 possui potencial inseticida para controle de *C. includens*.

A cepa GB10 diminuiu as atividades de serino protease, cisteíno protease e proteases totais no intestino de *C. includens*.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, R. P.; QUEIROZ, T. R.; NADAE, J. Toxic risk and potential environmental hazard at the life cycle of the corn production. **Espacios**, v. 38, p. 12, 2017.
- ANDRADE, K. **Aspectos bioecológicos de *Chrysodeixis includens* (Walker, (1858)) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2014.
- ARONSON, A. I.; HAN, E.; MCGAUGHEY, W.; JOHNSON, D. The solubility of the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor of toxicity to insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 981-986, 1991.
- BAKER B. P.; GREEN T. A.; LOKER A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 1-9, 2020.
- BARAGAMAARACHCHI, R. Y.; SAMARASEKERA, J. K. R. R.; WEERASENA, O. V. D. S. J.; LAMOUR, K.; JURAT-FUENTES, J. L. Identification of a native *Bacillus thuringiensis* strain from Sri Lanka active against Dipel-resistant *Plutella xylostella*. **PeerJ**:e7535, 2019.
- BEL, Y.; SHEETS, J. J.; TAN, S. Y.; NARVA, K.; ESCRICHEA, B. Toxicity and binding studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac, Cry1F, Cry1C, and Cry2A proteins in the soybean pests *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, e00326-17, p. 1-13, 2017.
- BERNARDI, O.; MALVESTITI, G. S.; DOURADO, P. M.; OLIVEIRA, W. S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G. U.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1083-1091, 2012.
- BOBROWSKI, V. L.; FIUZA, L. M.; PASQUALI, G.; ZANETTINI, M. H. B.; Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. **Ciência Rural**, v. 34, p. 843-850, 2003.

- BORGES, F. S. P. **Produtos fitossanitários no controle de lagartas *Chrysodeixis includens* Walker (1858) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja**. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Chapadão do Sul, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.
- BUENO, R. C. O. F.; PARRA, J. R. P.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; OLIVEIRA, J. R. G.; CAMILLO, M. F. Sem barreira. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 55, p. 12-55, 2007.
- BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; PARRA, J. R. P.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Lepidoptera larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, p. 170-174, 2011.
- BUTU, M.; STEF, R.; GROZEA, I.; CORNEANU, M.; BUTNARIU, M. Biopesticides: clean and viable technology for healthy environment. In: Hakeem K, Bhat R, Qadri H. (Eds.) **Bioremediation and Biotechnology**. Cham: Springer, p. 107-151, 2020.
- CASTRO, B. M. C.; MARTINEZ, L. C.; BARBOSA, S. G.; SERRÃO, J. E.; WILCKEN, C. F.; SOARES, M. A.; SILVA, A. A.; CARVALHO, A. G.; ZANUNCIO, J. C. Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports**, 2019. doi.org/10.1038/s41598-019-43074-0
- CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329-350, 2016.
- CHÁVEZ, C. Y. L. **Efeito dos inibidores de proteases benzamidinas nas respostas bioquímico-fisiológicas de *Coffea arabica* e da cochonilha *Coccus viridi***. 2016. 78 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, v. 56, p. 651-676, 2000.

- CORNFORTH, D.; MATTEWS, A.; BROWN, S.; RAYMOND, B. Bacterial Cooperation Causes Systematic Errors in Pathogen Risk Assessment due to the Failure of the Independent Action Hypothesis. **Plos Pathogens**, v. 4, p. 1-13, 2015.
- DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current status and recent developments in biopesticide use. **Agriculture**, 2018. doi:10.3390/agriculture8010013.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J. M. The sub-lethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 81-106, 2007.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysic**, v. 95, p. 271-278, 1961.
- FATHIPOUR, Y.; SEDARATIAN, A.; BAGHERI, A.; TALAEI-HASSANLOUEI, R. Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology**, p. 1-9, 2019.
- FRANÇA, S. M.; BREDA, M. O.; BARBOSA, D. R. S.; ARAUJO, A. M. N.; GUEDES, C. A. The sublethal effects of insecticides in insects. In: Shields, VDC (Org.). **Biological Control of Pest and Vector Insects**, 2017. doi:10.5772/66461
- FITE, T.; TEFERA, T.; NEGERI, M.; DAMTE, T.; SORI, W. Evaluation of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Bacillus thuringiensis* for the management of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) under laboratory and field conditions. **Biocontrol Science and Technology**, v. 30, p. 1–18, 2019.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agricola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GLARE, T.; CARADUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KOHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30, p. 250–258, 2012.
- GRAF, J. Shifting paradigm on *Bacillus thuringiensis* toxin and a natural model for *Enterococcus faecalis* septicemia. **mBio**, v. 2, p. 1-2, 2011.
- GREENE, G.L. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n.4, p. 487-488, 1976.

- GRIZANOVA, E. V.; KRYTSYNA, T. I.; SURCOVA, V. S.; DUBOVSKIY, I. M. The role of midgut nonspecific esterase in the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 166, 107208, 2019.
- GUJAR, G. T.; KALIA V.; KUMARI, A. Effect of sublethal concentration of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* on food and developmental needs of the American Bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, p. 1130-1135, 2001.
- HECKEL, D. G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, e21673, p. 1-12, 2020.
- HEIMPEL, A. M.; ANGUS, T. A. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **Journal of Insect Pathology**, v. 1, p. 152-170, 1959.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 78-81, 2013.
- IRAC - Arthropod Pesticide Resistance Database. Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=248>>. Acesso em: 2020.
- JOST, D. J.; PITRE, H. N. Soybean looper and cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) populations in cotton and soybean cropping systems in Mississippi. **Journal of Entomological Science**, Tifton, v. 37, p. 227-235, 2002.
- KOGAN M.; BAJWA W. I. Integrated Pest Management: A global reality? **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 1-15, 1999.
- KONECKA, E.; KAZNOWSKI, A.; GRZESIEK, W.; NOWICKI, P.; CZARNIEWSKA, E.; BARANEK, J. Synergistic interaction between carvacrol and *Bacillus thuringiensis* crystalline proteins against *Cydia pomonella* and *Spodoptera exigua*. **Biocontrol**, <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10011-4>, 2020.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor II - General Properties. **Journal of Genetic and Physiology**, v. 30, p. 291-310, 1947.
- LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

- LEORA SOFTWARE COMPANY. LeOra software. Petaluma, CA, 2008.
- LINGREN, P. D.; GREENE, G. L.; DAVIS, D. R.; BAUMHOVER, A. H.; HENNEBERRY, T. J. Nocturnal behavior of four lepidopteran pest that attack tobacco and other crops. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 70, p. 161-167, 1977.
- MAPA, 2010. Disponível em: <http://antigo.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-30-2010-dou-17-11-10-metodo-inoculantes.pdf>. Acesso em: julho 2020.
- MASHTOLY, T. A.; EL-ZEMAITY, M. E.; HUSSIEN, M. I.; ALM, S. R. LC and LD50 values of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain buibui toxin to oriental beetle and northern masked chafer larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 102 (5), p. 1891-1895, 2009.
- MENDONÇA, E. G.; VISÔTTO, L. E.; COSTA, N. C. S.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteíno protease de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818), **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 446-454, 2011.
- MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E. S.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A. C. M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C. B.; WERNECK, J. O. S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291–295, 2007.
- MORÁN-DIEZ, M. E.; GLARE, T. R. What are microbial-based biopesticides? In: Morán-Diez ME, Glare TR (Eds). **Microbial-based biopesticides**, v. 1477, p. 1–10, 2016.
- MUSHTAQ, R.; BEHLE, R.; LIU, R.; NIU, L.; SONG, P.; SHAKOORI, A. R.; FUENTES, J. L. J. Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie2, Cry2Ac7, Vip3Aa11 and Cry7Ab3 proteins against *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* and *Ceratoma trifurcata*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 150, p. 70–72, 2017.
- NUNES, N. R.; FERREIRA, F. T. R.; THIESEN, L. V. CORASSA, J. N.; PITTA, R. M. Linha Básica de Suscetibilidade de *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) a Benzoato de Emamectina. **Entomological Communications**, 1, 2019.

- OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of substrate activation binding site. **The Journal Biological Chemistry**, v. 268, p. 26893-26903, 1993.
- OLIVEIRA, T. C. **Flutuação populacional de lagartas desfolhadoras e distribuição espacial de Plusiinae na cultura da soja [*Glycine max* (L) Merrill]**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.
- ORNELAS-PÉREZ, J. F.; MALDONADO-BLANCO, M. G.; ELÍAS-SANTOS, M.; FLORES-GONZÁLES, M. S.; LOZANO-CONTRERAS, M. G.; WONG, L. J. G. Evaluación de la mortalidad causada por cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y formulados preparados contra *Trichoplusia ni*, *Spodoptera exigua*, y *Helicoverpa zea* **Southwestern Entomologist**, v. 41, p. 1095-1110, 2016.
- PETERSON, A. Egg types among moths of the Noctuidae. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 47, p. 71-100, 1964.
- PINHEIRO, D. H.; VALICENTE, F. H. Influência do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina por cepas de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 91, p. 1-17, 2013.
- PLATA-RUEDA, A.; QUINTERO, H. A.; SERRÃO, J. E.; MARTÍNEZ, L. C. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains on the Nettle Caterpillar, *Euprosterina elaeasa* (Lepidoptera: Limacodidae). **Insects**, 2020. doi:10.3390/insects11050310
- R Development Core Team. (2008): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em janeiro 2021.
- RABELO, M. M.; MATOS, J. M. L.; OROZCO-RESTREPO, S. M.; PAULA-MORAES, S. V.; PEREIRA, E. J. G. Like parents, like offspring? susceptibility to Bt toxins, development on dual-gene bt cotton, and parental effect of cry1ac on a nontarget lepidopteran pest. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, p. 1234-1232, 2020.
- RAHMAN, M. M.; ROBERTS, H. L. S.; SCHMIDT, O. Tolerance to *Bacillus thuringiensis* endotoxin in immune-suppressed larvae of the flour moth *Ephesia kuehniella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 96, p. 125–132, 2007.
- RODRIGUES, R. H. F.; SILVA, L. B.; RODRIGUES, T. F.; LOPES, G. N.; CARNEIRO, E.; PAVAN, B. E. Sublethal Doses of Insecticides Affect the Fecundity and

- Fertility of the *Chrysodeixis includens*? **American Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 483-494, 2018.
- SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, N., FIUZA, L. M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1-12, 2014.
- SEDARATIAN, A.; FATHIPOUR, Y. R.; TALAEI-HASSANLOUI, R.; JURAT-FUENTES, J. L. Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology**, v. 137, p. 540-549, 2013.
- SENA, T. R. R.; VARGAS, M. M.; OLIVEIRA, C. C. C. Saúde auditiva e qualidade de vida em trabalhadores expostos a agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 18, n. 6, p. 1753–1762, 2013.
- SMILOWITZ, Z. Electrophoretic patterns in hemolymph protein of cabbage looper during development of the parasitoid *Hyposoter exiguae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, p. 93-99, 1973.
- SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 2010. 90 p. (Embrapa – CNPSo. Documentos, 269).
- SPECHT, A.; MORAES, S. V. P.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) Lepidoptera, Noctuidae, Plussiinae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 343-345, 2015.
- STENBERG S. A. A conceptual framework for Integrated Pest Management. **Trends in Plant Science**, v. 22, p. 759-769, 2017.
- TUMLINSON, J. H.; MITCHELL, E. R.; BROWNER, S. M.; LINDQUIST, D. A. A sex pheromone for the soybean looper. **Environmental Entomology**, v. 1, p. 466-468, 1972.
- VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, p. 1–12, 2012.
- VAZQUEZ, W. R. C. **Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua 8 mortalidade e no consumo de área foliar da**

soja. 1988. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo. Piracicaba. 1988.

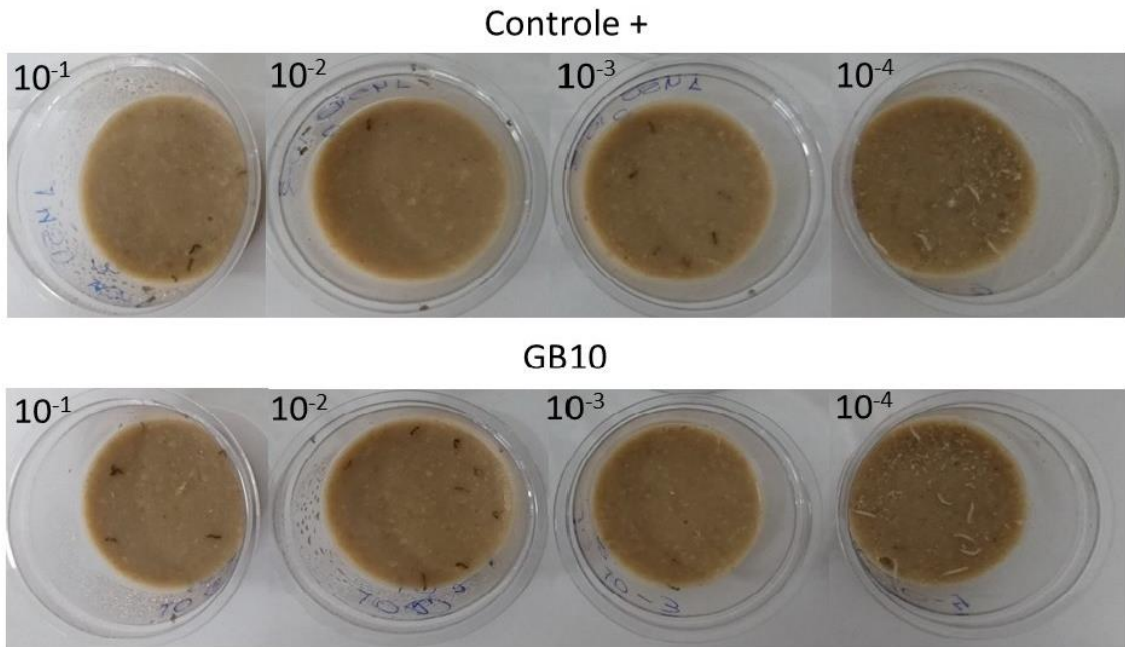
VICTORIANO, M. F.; LUJÁN, R. V.; PENA, S. R. S. Interaction of insect size and *Bacillus thuringiensis* on larval mortality of *Palpita quadristigmalis* and endoparasitoid emergence. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 91, n. 3, p. 242-247, 2019.

APÊNDICE A – Considerações finais

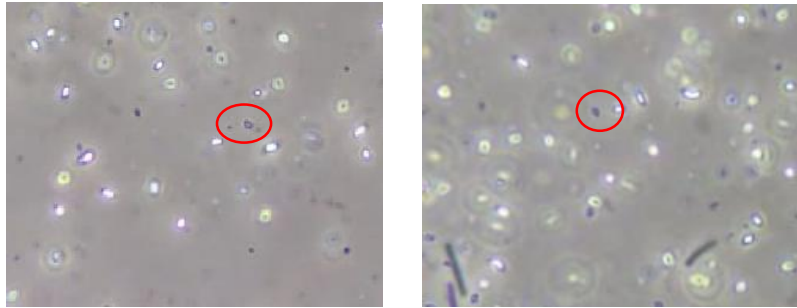
Embora apresentem semelhanças na morfologia do cristal proteico, os isolados GB10 e S1450 podem expressar diferentes toxinas. Assim, a caracterização molecular das principais toxinas presentes em GB10 e as análises microscópicas que reforcem o efeito dessas toxinas sobre as células das microvilosidades intestinais são essenciais para complementar o estudo.

O isolado GB10 para ser usado no desenvolvimento de produtos de biocontrole, deve ter sua eficácia confirmada através de outros estudos em laboratório e em campo com diferentes plantas hospedeiras de *C. includens*.

ANEXO A - Mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *Chrysodeixis includens* submetidas a diluições 10-1 a 10-4 de S1450 (Controle +) e GB10.



ANEXO B - - Microscopia de isolados GB10 e S1450 respectivamente após 72 horas de agitação a 200 rpm 28°C



ANEXO C - Curva padrão do ensaio da concentração de proteínas pelo método de Bradford (1976)

