

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) PARA AS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (FABR.) E *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

LILIANE MARQUES DA SILVA

(Sob Orientação do Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

RESUMO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) apresenta características essenciais no controle de insetos-praga, tais como seu modo de ação, especificidade e seletividade. Dessa forma, esta pesquisa objetivou avaliar a atividade tóxica de isolados de *B. thuringiensis* em larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) e caracterizar quanto à presença de gene de toxinas os isolados tóxicos. Estas pragas foram mantidas em dieta artificial. Foram utilizados 24 isolados, preservados em meio LB, glicerol a 15% e SDS a 0,02% e mantidos a -80°C. Para caracterização molecular foram utilizados iniciadores gerais e específicos. Nos testes de patogenicidade com *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, 16 e 18 isolados mostraram-se ativos, respectivamente. Os valores de CL₅₀ entre os isolados para a população de *D. saccharalis* variaram entre 0,08 x 10⁵ (LIIT-0105) e 4104 x 10⁵ (LIIT-2707) esporos + cristais/mL. O isolado LIIT-0105 foi 18,59 e 4382 vezes mais tóxico que o *Btk* e *Btt*, respectivamente. Para *D. flavipennella*, os valores de CL₅₀ entre os isolados variaram entre 0,40 x 10⁵ (LIIT-2707) e 542,75 x 10⁵ (LIIT-2109) esporos + cristais/mL. O isolado LIIT-2707 foi 11,52 e 1137 vezes mais tóxico que o *Btk* e *Btt*, respectivamente. O isolado LIIT-0105 que teve a menor CL₅₀ para *D. saccharalis* apresentou os genes *cry1*, *cry2*, *cry8*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1*, *cry2Ab2* e *cry9C* e para *D. flavipennella* o isolado LIIT-2707 apresentou a menor CL₅₀ amplificando para os genes

cry1, *cry2*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2*. Os resultados sugerem que isolados de *B. thuringiensis* apresentam grande potencial e variabilidade para bioprospecção desta bactéria, para o desenvolvimento de produtos ou transformação de plantas que expressem genes de *Bt* para o controle de *D. saccharalis* e *D. flavipennella*.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinseticida, patogenicidade, isolados, bactéria, inseto, Lepidoptera, broca da cana-de-açúcar.

ACTIVITY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis*
(BERLINER) ISOLATES TO THE SUGARCANE BORERS *Diatraea saccharalis* (FABR.)
AND *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

by

LILIANE MARQUES DA SILVA

(Under the direction of Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

ABSTRACT

The bacterium *Bacillus thuringiensis* (Berliner) presents remarkable aspects for the control of insect pests, such as its mode of action, specificity and selectivity. Thus, this study aimed to evaluate the toxic activity of *B. thuringiensis* isolates in larvae of *Diatraea saccharalis* (Fabr.) and *Diatraea flavipennella* (Box) and determine the toxin gene contents for the very active isolates. The insects were maintained on artificial diet. Twenty four isolates were used, which were preserved in LB medium, 15% glycerol and 0.02% SDS and kept at -80 ° C. General and specific primers were used to survey for toxin genes. In pathogenicity tests with *D. saccharalis* and *D. flavipennella*, 16 and 18 isolates showed activity toward borers, respectively. The LC₅₀ values among isolates for the population of *D. saccharalis* ranged from 0.08 x 10⁵ (LIIT-0105) and 4104 x 10⁵ (LIIT-2707) crystals + spores/mL. The isolated LIIT-0105 was 4,382 and 18.59 times more toxic than *Btk* and *Btt*, respectively. For *D. flavipennella*, the LC₅₀ values between isolates ranged from 0.40 x 10⁵ (LIIT-2707) and 542.75 x 10⁵ (LIIT-2109) crystals + spores/mL. The isolate LIIT-2707 was 1,137 and 11.52 times more toxic than *Btk* and *Btt*, respectively. The isolate LIIT-0105 presented the lowest LC₅₀ for *D. saccharalis* that harbored the genes *cry1*, *cry2*, *cry8*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1*, *cry2Ab2*, *cry9C*. For the borer *D.*

flavipennella, the isolated LIIT-2707 presented the lowest LC₅₀ and the following genes *cry1*, *cry2*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1* and *cry2Ab2* were amplified. The results suggest that *B. thuringiensis* isolates present a great variability of genes for bioprospection, and thus potential for developing new products and insertion on plants to express *Bt* genes for the control of *D. saccharalis* and *D. flavipennella*.

KEY WORDS: Bioinsecticide, pathogenicity, isolates, bacteria, insect, Lepidoptera, sugarcane borer.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) PARA AS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (FABR.) E *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

LILIANE MARQUES DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro - 2013

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) PARA AS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (FABR.) E *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

LILIANE MARQUES DA SILVA

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) PARA AS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (FABR.) E *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

LILIANE MARQUES DA SILVA

Orientador:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

Examinadores:

Maria Cleoneide da Silva - UEMA

Edmilson Jacinto Marques - UFRPE

Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Lucinéa Maria e Everaldo Marques, que sempre se esforçaram para proporcionar a melhor formação para mim, ao meu marido Filipe Nunes, pelo amor, carinho, paciência e compreensão, as minhas irmãs, Leila Marques e Leilane Marques, a minha tia Célia Maria Correia, a minha sobrinha Maria Cecília, aos meus primos Davi Correia, Barbara Correia e Brenda Correia pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada é possível.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), que contribuiu para realização deste curso.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A Fiocruz/RJ pelo material de trabalho cedido utilizado nos experimentos.

Ao professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira, pela orientação e por ter acreditado e abraçado essa idéia.

Ao professor Edmilson Jacinto Marques pela coorientação, apoio e amizade.

Ao professor José Vargas de Oliveira, pela amizade, ensinamentos e momentos de descontração.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, pela contribuição na minha formação profissional.

À Professora Rosa Mariano pela confiança no uso do Laboratório de Fitopatologia Molecular (UFRPE).

Ao meu amigo de graduação Josué Buarque que sempre esteve ao meu lado me dando força e apoio em todas as minhas decisões.

A minha grande amiga Nicolle Ribeiro pelo companheirismo e amizade.

A Suzana Maria, Rebeka Alves e Flávia Gomes pela amizade e ajuda imensurável durante a realização dos experimentos.

A Maria Cleoneide da Silva pela amizade e por tudo que me ensinou.

Às amigas Cinthia Matias, Ana Paula Fonseca, Eliana Passos, Ellen Valente, Jennifer Guimarães, Glaucilane Cruz, pelo apoio e momentos de descontração no laboratório.

Aos Amigos de turma Auridete Oliveira, Mauricéia Fidelis, Cynara Moura, Paulo Roberto, Wagner Melo, Débora Lima, Itílio Pontes, Jefferson Elias, Wellington Marques, Mariana Oliveira, Douglas Barbosa, Mateus Campos, Cleiton Araújo.

Aos Amigos Martin Duarte, Agna Rita, Eduardo Barros, Felipe Colares, Alice Maria, Alberto Belo, Tadeu Martins, Flávia Born, Mário Jorge, Lucas Souza, Maurício Silva, Andresa Cristina, Lílian Ribeiro, Solange Maria, Aline Nascimento, Sérgio Alves, Carlos Henrique.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Características gerais de <i>Bacillus thuringiensis</i>	02
1.2 Modo de ação das proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> a insetos.....	04
1.3 A utilização de <i>Bacillus thuringiensis</i> na agricultura.....	08
1.4 Cultura de cana-de-açúcar	09
1.5 <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.) e <i>Diatraea flavipennella</i> (Box).....	11
1.6 Manejo das brocas comuns da cana-de-açúcar	13
LITERATURA CITADA	15
2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE DE ISOLADOS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> (BERLINER) PARA AS BROCAS DA CANA-DE- AÇÚCAR <i>Diatraea saccharalis</i> (FABR.) E <i>Diatraea flavipennella</i> (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)	23
RESUMO	24
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO.....	37
AGRADECIMENTOS.....	41
LITERATURA CITADA.....	41

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) como bioinseticida e a transgenia com suas toxinas tem sido uma alternativa viável e econômica para o controle de insetos na agricultura, este bioinseticida é facilmente obtido em larga escala e de fabricação menos onerosa que a dos inseticidas químicos tradicionais (Schnepf *et al.* 1998). Essa bactéria *B. thuringiensis* apresenta características essenciais no controle de insetos-praga, tais como seu modo de ação, especificidade e seletividade (Glare & O'Callaghan 2000, Karim *et al.* 2000, Bobrowski *et al.* 2003, Polanczyk & Alves 2003, Bravo *et al.* 2007). Entretanto, assim como os inseticidas convencionais, que comumente são aplicados de maneira inadequada propiciando a ocorrência de resistência dos insetos, os bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* e as plantas geneticamente modificadas com essa bactéria, devem ser manejados corretamente para evitar a ocorrência de novos casos de resistência e efeitos indesejáveis aos inimigos naturais (Gould *et al.* 2002, Tabashnik *et al.* 2008).

O controle de pragas na agricultura é um fator limitante e resulta no aumento do custo de produção, trazendo problemas tanto para o produtor quanto para o consumidor e o ambiente (de Maagd *et al.* 2001). O custo para o desenvolvimento de inseticidas químicos é alto e tem aumentado ao longo dos anos devido à necessidade de novas moléculas e formulações mais adequadas, o que tem feito crescer o interesse por inseticidas alternativos, como os bioinseticidas que são mais baratos no desenvolvimento, mais específicos e menos poluentes (Almeida & Batista Filho 2001).

1.1 Características gerais de *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *Bacillus thuringiensis* foi descoberta no início do século XX e a partir da década de 20 começou a ser produzida em grandes quantidades visando o controle de insetos (Federici 2005). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica facultativa, mesófila e quimioheterotrófica (Arantes *et al.* 2002). Esta possui forma de bastonete de aproximadamente 1,1 µm de largura por 4,0 µm de comprimento, sendo capaz de se movimentar devido à presença de flagelos peritríquios (Habib & Andrade 1998, Bobrowski *et al.* 2003).

A distribuição dessa bactéria é bem ampla, ocorrendo em locais como solo, produtos estocados, plantas, alguns lugares mais raros como pássaros, morcegos e lagos (Bernhard *et al.* 1997), insetos mortos e vivos (Villas-Bôas *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 2004).

Durante seu desenvolvimento, *B. thuringiensis* passa por duas fases, a fase vegetativa e a estacionária, semelhantes ao desenvolvimento de *Bacillus subtilis*. A primeira fase caracteriza-se pelo crescimento exponencial das células de *B. thuringiensis*, momento em que há grande disponibilidade de nutrientes no meio, já a fase estacionária ocorre quando o meio se torna hostil e a bactéria adapta-se à diminuição de nutrientes através de mecanismos genéticos. A expressão dos genes *cry* de *B. thuringiensis* geralmente ocorre na fase estacionária da célula, acumulando seu produto na célula mãe, a qual é liberada no meio ao final da esporulação (Lereclus *et al.* 2000). Simultaneamente ao processo de esporulação, ocorre a produção de uma inclusão cristalina, também chamada de cristal protéico, constituído de proteínas Cry, “mnemônico” do inglês “Crystal”. Esta inclusão pode representar cerca de 25% do peso seco de células já esporuladas (Agaisse & Lereclus 1995). Esses autores relataram que apesar da expressão dos genes *cry* estarem estreitamente relacionada ao evento da esporulação, existem genes *cry* que são expressos independentemente da esporulação (Pinto *et al.* 2009).

Estes polipeptídios são denominados de δ -endotoxina e característicos de cada variedade de *B. thuringiensis*, que podem apresentar peso molecular entre 40 e 140 kDa. Silva *et al.* (2012) analisaram o perfil protéico de vinte isolados de *B. thuringiensis* ativos contra *Plutella xylostella* (L.) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e a maioria dos isolados (85%) apresentou bandas próxima a 130 kDa similar aos padrões *Bt* var. *kurstaki* e *Bt* var. *aizawai*, observando ainda em 50% dos isolados bandas entre 65 e 70 kDa.

Além das toxinas “Cry”, que apresentam toxicidade a fase jovem de coleóptera, díptera, lepidóptera, ortóptera, nematóides, ácaros e protozoários (Feitelson *et al.* 1992, Souza *et al.* 1999, de Maagd *et al.* 2003), outras toxinas como as VIP (*Vegetative Insecticidal Proteins*) que são secretadas para o meio durante a fase vegetativa de crescimento (Estruch *et al.* 1996) e Cyt (citólíticas) também apresentam atividades a insetos da ordem Lepidoptera e Diptera, respectivamente (Höfte & Whiteley 1989, de Maagd *et al.* 2003, Kurtz *et al.* 2007). As proteínas Cyt podem interagir com as proteínas Cry para sinergizar os seus efeitos, contra determinadas espécies de mosquitos e borrachudos (Butko 2003, Soberón *et al.* 2007, Federici *et al.* 2010).

Mais de 700 genes de proteínas Cry foram sequenciados e as proteínas Cry classificadas em 72 grupos (*cry* 1-*cry* 72), a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.* 2013). Esse entomopatógeno também produz outros fatores de virulência, como as β -exotoxinas, α -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Habib & Andrade 1998, Hansen & Salamiou 2000, Liu *et al.* 2002, Arora *et al.* 2003).

Estudos detalhados sobre estas proteínas e modo de ação permitiram identificar que cada uma pode apresentar atividade contra uma determinada ordem de insetos (Crickmore *et al.* 1998, Silva-Werneck *et al.* 2000). As proteínas tóxicas para lepidópteros em geral pertencem ao grupo Cry1, Cry2 e Cry9, as proteínas ativas a coleópteros são Cry3, Cry7 e Cry8, assim

como Cry1B e Cry1I, a qual tem dupla atividade. As proteínas Cry5, Cry12, Cry13 e Cry14 possuem atividade nematocida e as proteínas Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 e Cyt são tóxicas para dípteros (Crickmore *et al.* 2013). Essa caracterização foi baseada em bioensaios contra diferentes larvas de insetos (Bravo *et al.* 1998).

1.2 Modo de ação das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* a insetos

A grande atividade inseticida de *B. thuringiensis* deve-se às δ -endotoxinas, situadas em corpos paraesporais (cristais), essas proteínas tornam-se tóxicas a insetos, após sua ingestão e solubilização, no intestino médio das larvas (Bravo 1997). Eles são produzidos no segundo estágio de esporulação, durante a formação de esporos. Após a ingestão por insetos suscetíveis, os cristais são dissolvidos em meio levemente ácido (coleópteros) ou alcalino (lepidópteros e dípteros) do intestino médio do inseto e as protoxinas são liberadas. As proteases do intestino desdobram as protoxinas, produzindo uma proteína ativada de tamanho menor. A principal protease digestiva de lepidópteros e dípteros é a serino-protease, enquanto nos coleópteros ocorre principalmente cisteíno-protease e aspartato-proteases (de Maagd *et al.* 2001).

Após ativação pelas proteases, a toxina usualmente atravessa a matriz peritrófica e liga-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais das células epiteliais do intestino médio (Schnepf *et al.* 1998). Após a ligação com o receptor, a toxina forma poros que interferem no transporte de íons pela membrana das células, causando a lise do epitélio do intestino médio. Isto, conseqüentemente, interrompe a osmoregularidade das células, levando o pH do lúmen até a neutralidade, favorecendo a germinação dos esporos que acarretará em septicemia e morte do inseto (Schnepf *et al.* 1998). A inibição da alimentação pode ocorrer logo após a ingestão do esporo e da toxina de *B. thuringiensis*, levando ao desencadeamento

mais rápido do processo de intoxicação do inseto (Schnepf *et al.* 1998, Monnerat & Bravo 2000, de Maagd *et al.* 2003).

Perda do apetite, abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte (Aronson *et al.* 1986) são sintomas observados a partir do momento em que insetos suscetíveis ingerem os cristais e esporos de *B. thuringiensis*. Perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escura. Após a morte, o tegumento apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib & Andrade 1998, Monnerat & Bravo 2000). Em geral, as endotoxinas possuem alto grau de similaridade e apresentam três domínios: I, II e III, sugerindo similar modo de ação. O domínio I (terminal-N) é constituído por um feixe de sete α -hélices, em que a α -hélice 5 é hidrofóbica e circundada por 6 hélices anfipáticas. O domínio II é formado por três folhas β -antiparalelas e o domínio III (terminal-C) consiste de duas folhas β -antiparalelas formando um β -sanduíche. O domínio I está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro, enquanto que os domínios II e III estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor (de Maagd *et al.* 2001, Bravo *et al.* 2007). Acredita-se que o domínio III esteja também fortemente envolvido na formação de poros (Schnepf *et al.* 1998).

Até o final do século passado, a sequência de eventos que leva à morte do inseto a partir da ingestão de toxinas Cry pareceu relativamente simples e bem compreendida, pelo menos em termos gerais (Rajamohan *et al.* 1998, Schnepf *et al.* 1998). A presença de tais poros na membrana plasmática interfere com a fisiologia da célula por eliminar gradientes iônicos transmembranares e pode conduzir a lise das células devido ao influxo massivo de solutos a partir do lúmen do intestino médio (Knowles & Ellar 1987).

Segundo Vachon *et al.* (2012), muitos detalhes deste esquema, o que pode ser considerado como o modelo "clássico" de modo de ação de *Bt*, no entanto, permanecem sem

solução. Por exemplo, a estrutura dos poros formados pelas toxinas e os mecanismos pelos quais eles se agregam na membrana não foram completamente elucidados.

A pesquisa sobre o modo de ação de toxinas Cry tem sido dominado nos últimos anos por dois modelos, o modelo sequencial de ligação, que propõe uma sequência complexa de eventos que envolvem receptores múltiplos, numa tentativa de explicar o mecanismo de formação de poros (Gómez *et al.* 2002, Bravo *et al.* 2004, Pacheco *et al.* 2009) e o modelo via de sinalização, sugerindo que a formação de poros não desempenha um papel essencial (Zhang *et al.* 2005, 2006).

Segundo a versão inicial do modelo sequencial de ligação, uma vez ativado por proteases intestinais, a toxina se liga ao receptor caderina. Isto provoca uma alteração conformacional que favorece uma clivagem proteolítica, no nível do resíduo F50, localizado dentro do ciclo ligando as hélices α -1 e α -2, as primeiras hélices na extremidade N-terminal do domínio de formação de poros da molécula de toxina (Gómez *et al.* 2002). Subsequentemente, a remoção da hélice α -1 permite a oligomerização do resto da toxina e a formação de uma estrutura chamada de pré-poro (Gómez *et al.* 2002). Este oligômero, em seguida, liga-se ao receptor aminopeptidase (Bravo *et al.* 2004). Finalmente, a ligação à aminopeptidase favorece a inserção da estrutura pré-poro na membrana resultando na formação do poro (Vachon *et al.* 2012).

Foram feitos estudos com toxinas Cry selvagens e modificadas (sem a hélice α -1) em lepidópteros e verificaram que não houve diferença nas etapas secundárias do modo de ação, e o que ocorrem após a interação com os receptores da caderina como oligomerização, ligação ao receptor e a formação de poros são semelhantes na Cry1AbMod e Cry1Ab do tipo selvagem, como mostrado no trabalho de Muñoz-Garay *et al.* (2009), onde essas foram igualmente tóxicas a larvas suscetíveis de *Manduca sexta* (L.).

Um estudo recente (Tabashnik *et al.* 2011) forneceu uma demonstração convincente de que a diferença entre a atividade destas toxinas modificadas e do tipo selvagem não é simplesmente atribuível para a possibilidade das toxinas modificadas (sem a hélice α -1), poderem funcionar sem a necessidade de interagir com o receptor caderina. Neste estudo, Cry1AbMod e Cry1AcMod foram testadas contra diversos insetos resistentes a Cry1Ab e Cry1Ac e verificou-se ter uma atividade melhorada, em relação às toxinas do tipo selvagem, contra alguns insetos em que a resistência não está relacionada a uma mutação que afeta o receptor de caderina. Além disso, essas toxinas modificadas e selvagens tiveram potências comparáveis contra os insetos de linhagens resistentes com os receptores de caderina alterados.

De acordo com o modelo via de sinalização, a citotoxicidade é mediada pela ligação específica da toxina de *Bt* com os seus receptores de caderina. A ligação específica de uma toxina ativa com os receptores caderina é suficiente para matar a célula, ressaltando o fato de que a interação das toxinas com células sensíveis, sem dúvida, tem consequências importantes no metabolismo celular e sua regulação (Zhang *et al.* 2005, 2006).

O modelo de via de sinalização não é facilmente sustentável, especialmente por eliminar a formação de poros no mecanismo de ação de toxinas *Bt* o qual demonstra capacidade para permeabilizar eficientemente a membrana alvo no epitélio do intestino médio de insetos (Vachon *et al.* 2012).

Durante os últimos anos, o modelo de via de sinalização e, mais importante, o modelo sequencial de ligação atraíram considerável atenção. No entanto, uma avaliação cuidadosa dos dados disponíveis revela que infelizmente ambos os modelos são suportados por pouca evidência experimental (Vachon *et al.* 2012).

Por outro lado, com relação à sinalização intracelular, vários caminhos parecem ser ativados em células suscetíveis às toxinas Cry, mas os mecanismos pelos quais estas vias

contribuem para a patogênese ou proteção contra os efeitos prejudiciais das toxinas permanecem praticamente inexplorados. Por fim, o modelo clássico proposto nas décadas de 80 e 90 continua a ser o quadro disponível mais válido para orientar estudos futuros visando a elucidação do modo de ação das toxinas e de ação do *B. thuringiensis* (Vachon *et al.* 2012).

1.3 A utilização de *Bacillus thuringiensis* na agricultura

Os inseticidas biológicos, utilizados há mais de 50 anos, são alternativas práticas para o controle mais seletivo de insetos pragas, que inclui, principalmente, o emprego de microrganismos (Monnerat & Bravo 2000, Cardénas *et al.* 2001, Bobrowski *et al.* 2003). São conhecidos muitos microrganismos entomopatogênicos, especialmente fungos, vírus e bactérias, que podem ser empregados no controle biológico de insetos pragas (Valadares-Inglis *et al.* 1998).

Dentre os organismos entomopatogênicos, o *B. thuringiensis* tem sido considerado o principal agente. Ele é o inseticida biológico mais produzido e comercializado no mundo, usado como agente de controle de pragas (Vega 1999, Alam 2000). A eficácia e a especificidade das cepas dessa bactéria e suas toxinas no controle de insetos pragas possibilitaram o desenvolvimento de formulações de biopesticidas à base deste patógeno. Atualmente, mais de 200 formulações têm sido colocadas no mercado mundial, sendo responsáveis por mais de 97% do faturamento dos bioinseticidas (Polanczyk *et al.* 2008).

Apesar do extenso uso de *B. thuringiensis*, algumas características ainda limitam a sua aplicação, como à perda de estabilidade, à ausência de translocação nas plantas, o espectro limitado de ação, a degradação rápida pela ação da luz ultravioleta (Navon 2000) e a incapacidade de controlar pragas que se alojam no interior das plantas (Sales & Baldani 1998), como as brocas da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* e *Diatraea flavipennella*.

A seleção de novos isolados de *B. thuringiensis* e, conseqüentemente, a descoberta de novas proteínas com atividade inseticida é uma forma de incrementar o manejo da resistência, pois possibilita o desenvolvimento de bioinseticidas e cultivares com maior potencial de resistência através dos avanços na engenharia genética, com a introdução de genes codificadores das proteínas tóxicas aos insetos-praga no genoma da planta (Stewart *et al.* 2001, Bobrowski *et al.* 2003, Escudero *et al.* 2004).

1.4 Cultura de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, *Saccharum* spp. (L.) é uma monocotiledônea de origem asiática pertencente à família Poaceae. A teoria mais aceita é que ela tenha origem na Polinésia. Desde os tempos mais remotos ela vem sendo utilizada como alimento. Essa cultura foi introduzida no Brasil em 1502, sendo considerada de grande importância no âmbito socioeconômico, devido a sua matéria prima na produção de alimento (Mendonça 1996).

No Brasil, com a colonização portuguesa, caracterizou-se como umas das primeiras culturas introduzidas no país com fins lucrativos (Lucchesi 2001). A cana-de-açúcar hoje é cultivada nos dois hemisférios.

Atualmente, o Brasil destaca-se como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo seguido da Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Filipinas, Austrália, EUA e Argentina (FAOSTAT 2013).

A ação de pragas causa grande redução dos rendimentos agroindustriais da cultura de cana-de-açúcar. A produção está concentrada principalmente no Centro-Sul do país e o Estado de São Paulo é o principal centro de produção com 51,87% (4.419,46 mil hectares), seguido por Goiás com 8,52% (725,91 mil hectares), Minas Gerais com 8,47% (721,86 mil hectares), Paraná com 7,17% (610,83 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 6,37% (542,70 mil

hectares), Alagoas com 5,23% (445,71 mil hectares) e Pernambuco com 3,84% (327,61 mil hectares). Nos demais estados produtores as áreas são menores, com representações abaixo de 3% (CONAB 2013).

Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2013), a previsão do total de cana moída na safra 2012/13 é de 595,13 milhões de toneladas, com aumento de 6,2% em relação à safra 2011/12, que foi de 560,36 milhões de toneladas, significando que a quantidade que será moída deve ser 34,76 milhões de toneladas a mais que na safra anterior. A produção de cana-de-açúcar da Região Centro-Sul deve ser de 535,43 milhões de toneladas, 8,2% maior que a produção da safra anterior. A produção total de açúcar está estimada em 37,66 milhões de toneladas, 4,72% a mais que na safra anterior. A produção de etanol é estimada em 23,62 bilhões de litros, 5,22% menor que a produção da safra 2011/12. Deste total, 9,66 bilhões de litros serão de etanol anidro e 13,96 bilhões de litros serão de etanol hidratado.

Um dos fatores que limita a produtividade da cana-de-açúcar é a ocorrência de pragas que ocasionam perdas, quer pela redução de cana disponível para moagem, quer pela diminuição de açúcar por tonelada de cana. Entre as pragas de maior importância nos canaviais de Pernambuco destacam-se a broca gigante *Telchin (Castnia) licus licus* (Drury), as brocas *Diatraea* spp. e a cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal.) (Lima & Marques 1985, Mendonça 1996).

No Brasil, *D. saccharalis* e *D. flavipennella* infestam a cana-de-açúcar, sendo a primeira de distribuição generalizada em todo o país, enquanto a segunda restringe-se apenas aos canaviais dos Estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, e no Norte e Nordeste do país (Mendonça *et al.* 1996, Pinto 2006).

1.5 *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box)

Vinte e uma espécies desse inseto estão distribuídas nos canaviais do Continente americano. A cana-de-açúcar apresenta-se vulnerável as espécies de *Diatraea*, durante todo o seu desenvolvimento, ocorrendo uma menor incidência quando a cana é jovem, aumentando consideravelmente o seu ataque com o crescimento da planta (Macedo & Botelho 1988).

A espécie *D. saccharalis* é considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar nas Américas e *D. flavipennella* no Brasil, cujas lagartas provocam injúrias diretas devido ao hábito de perfurar a cana jovem, causando a morte da gema apical, conhecido como “coração morto”, enquanto que na cana adulta provoca brotações laterais, enraizamento aéreo, atrofiamento dos entrenós e tombamento, reduzindo assim, a produção agrícola e industrial (Mendonça 1996). As injúrias indiretas são consideráveis, pois ao penetrar no colmo, as lagartas formam galerias por onde penetram fungos que causam a podridão vermelha - *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon). Estes fungos invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e o rendimento em açúcar (Botelho & Macedo 2002, Gallo *et al.* 2002).

As brocas da cana-de-açúcar apresentam desenvolvimento holometabólico, ou seja, passam pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Botelho & Macedo 2002).

Em campo, as fêmeas ovipositam em média 430 ovos, sendo frequentemente depositados nas folhas ainda verdes, tanto na face superior como inferior do limbo foliar e, ocasionalmente, na bainha. São de formato oval e achatado, sendo depositados em grupos de forma imbricada e se assemelha a escama de peixe ou couro de cobra. Quando os embriões estão desenvolvidos, os ovos adquirem forma elíptica e coloração amarelada, tornando-se escuros, quando são visíveis as cápsulas cefálicas das lagartas no interior dos mesmos (Botelho 2007, Freitas *et al.* 2007). Após a eclosão, as lagartas neonatas se deslocam de uma folha a

outra, penduradas por fio de seda, alimentando-se inicialmente do parênquima foliar, fazendo galerias na nervura central. Depois de efetuarem as primeiras ecdises, penetram no colmo, procurando as partes mais moles, na base do cartucho ou na região das gemas (Mendonça *et al.* 1996, Freitas *et al.* 2007).

A lagarta de *D. saccharalis* apresenta coloração branca leitosa com pontuações marrons dispostas uniformemente formando linhas no dorso e sua cápsula cefálica é marrom-escura, enquanto que a *D. flavipennella* apresenta coloração amarelada com manchas castanhas dispostas de forma desuniforme, sem formação de linhas no dorso e sua cápsula cefálica possui cor amarelada ou marrom amarelada (Mendonça 1996). Possuem três pares de pernas torácicas, quatro pares de falsas pernas abdominais e um par de falsas pernas anais. Quando completamente desenvolvida, mede cerca de 25 mm (Botelho & Macedo 2002).

Próximo à pupação, a lagarta abre um orifício na casca e o fecha parcialmente com fios de seda e os restos de sua alimentação e, assim protegida, passa à fase de pupa. A pupa livre é inicialmente de coloração marrom-claro, escurecendo à medida que se aproxima do estágio adulto. Quando emerge o adulto, este é de coloração amarelo-palha com manchas escuras nas asas anteriores, lembrando dois “Vs” invertidos quando fechadas para *D. saccharalis* e totalmente parda para *D. flavipennella*. As asas posteriores são brancas. Há diferenças entre sexo, sendo a fêmea maior, normalmente, apresentando abdome volumoso, o macho apresenta como característica principal a presença de uma concentração de cerdas no último par de pernas, ausentes na fêmea (Botelho & Macedo 2002).

O seu ciclo biológico em laboratório tem duração média de 65 dias, no qual o período de maturação dos ovos tem a duração média de 8,35 dias, o período de larva 34,87 dias, de pupa 12,75 e adultos 9,17 dias. Neste caso, os ovos, as pupas e os adultos foram mantidos a uma

temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h e as larvas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h (Freitas *et al.* 2007).

1.6 Manejo das brocas comuns da cana-de-açúcar

O manejo integrado das brocas da cana-de-açúcar vem sendo realizado, utilizando-se principalmente o controle biológico, com parasitoides multiplicados em laboratório e liberados no campo. Os parasitoides larvais das brocas são os mais utilizados como método de controle no Brasil e no mundo (Pinto *et al.* 2006).

O controle biológico de *Diatraea* spp. com o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) tem sido empregado desde 1974 no Brasil através da criação e liberações inundativas em canaviais infestados (Mendonça *et al.* 1996). Apesar da ampla utilização deste parasitoide para o controle de *Diatraea* spp. observa-se nos canaviais nordestinos uma predominância da espécie *D. flavipennella* (Freitas *et al.* 2006). Geralmente, este método apresenta custos iniciais muito altos, além da necessidade de estrutura para produção dos agentes de controle. Com o advento de tecnologias como a transgenia, particularmente com toxinas de *B. thuringiensis*, a possibilidade de um controle mais efetivo é uma realidade.

A utilização de inseticidas químicos para o controle das brocas da cana-de-açúcar não é recomendada devido aos prejuízos ambientais provocados, e pela forma de aplicação dos mesmos na lavoura, que torna difícil sua penetração no interior dos colmos onde as lagartas provocam os maiores prejuízos. Devido a essas restrições e a necessidade de alternativas seguras aos inseticidas químicos, tem ocorrido um aumento no interesse pelos inseticidas biológicos para o controle dessas pragas (Gitahy *et al.* 2006).

Com a clonagem e a caracterização de um gene de *B. thuringiensis* codificador de uma proteína responsável pela atividade tóxica a insetos (Schnepf & Whiteley 1981), novas

perspectivas do uso desta bactéria e de suas proteínas inseticidas foram vislumbradas. A possibilidade de se introduzir os genes de *B. thuringiensis* codificadores das toxinas nos genomas dos vegetais, tem permitido a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta e atingindo, assim, apenas os insetos pragas que se alimentam dos tecidos (de Maagd *et al.* 1999).

A importância de se identificar novas toxinas de *B. thuringiensis* é devida a um significativo número de pragas ainda não controladas por proteínas Cry (Bravo *et al.* 1998), bem como pela possibilidade do aparecimento de populações resistentes a essa proteína em produtos formulados.

Aplicações intensivas destes produtos de *B. thuringiensis* têm exercido forte pressão de seleção, resultando no aparecimento de populações de insetos resistentes em diversos locais do mundo (Ferré *et al.* 1991, Wright *et al.* 1997, Frutos *et al.* 1999, Sayyed & Wright 2001, Ferré & Van Rie 2002, Heckel *et al.* 2007), levando à perda da efetividade das estirpes de *B. thuringiensis* existentes no mercado em alguns locais. A *D. saccharalis* é particularmente muito suscetível a algumas delta-endotoxinas. Contudo, população resistente de *D. saccharalis* a toxina Cry1Ab tem sido selecionada após identificação de pais carreando gene de resistência através da geração F₂ (Huang *et al.* 2007). Isto mostra que a evolução da resistência em campo nesta espécie é provável em campo de transgênicos, se não forem estabelecidos programas de manejo.

No Brasil, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter isolados de *B. thuringiensis* de várias regiões (Valicente & Barretos *et al.* 2003, Polanczyk *et al.* 2004, Gobatto *et al.* 2010, Silva *et al.* 2012). No Nordeste, porém, os levantamentos têm sido muito restritos aos *Bacillus* com atividade ao grupo dos insetos vetores de doenças ou poucas amostras têm sido testadas a pragas agrícolas (Silva-Werneck *et al.* 2000, Vilas-Bôas & Lemos

2004, Gobatto *et al.* 2010). A descoberta de novas toxinas podem ainda representar novas fontes de recursos genéticos para o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas em engenharia genética com os genes de toxinas de *B. thuringiensis*, através da inserção destes em plantas de interesse agrícola. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a patogenicidade a lepidópteros de interesse local e caracterizar os isolados de *B. thuringiensis*, para aplicação em programas de controle de insetos pragas de importância agrícola.

Literatura Citada

- Agaisse, H. & D. Lereclus. 1995.** How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032.
- Almeida, J.E.M. & A. Batista Filho. 2001.** Banco de microrganismos entomopatogênicos: biodiversidade para o controle microbiano de pragas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 20: 30-33.
- Alam, G. 2000.** A study of biopesticides and biofertilisers in Haryana, India. London Gatekeeper. Series 93: 27p.
- Arantes, O.M.N., L.A. Villas-Bôas & G.T. Villas-Bôas. 2002.** *Bacillus thuringiensis* estratégias no controle biológico, p. 271-291. In L.A. Serafini, N.M. Barros & J.L. Azevedo (eds.), *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul, EDUCS, 433p.
- Aronson, A.I., W. Beckman & P. Dunn. 1986.** *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
- Arora, N., A. Selvapandiyar, N. Agrawal & R.K. Bhatnagar. 2003.** Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 158-162.
- Bernhard, K., P. Jarrett, M. Meadows, J. Butt, D. J. Ellis, G.M. Roberts, S. Pauli, P. Rodgers & H.D. Burges. 1997.** Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *J. Invertebr. Pathol.* 70: 59-68.
- Bravo, A., S.S. Gill & M. Soberón. 2007.** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.

- Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S.S. Gill & M. Soberón. 2004.** Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* 1667: 38–46.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villa Lobos, G. Pena, M.E. Nuñez-Valdez, M. Soberón & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.
- Bravo, A. 1997.** Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis* σ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793–2801.
- Bobrowski, V.L., L.M. Fiuza, G. Pasquali & M.H. Bodanese-Zanettini. 2003.** Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural.* 33: 843-850.
- Botelho, P.S.M. 2007.** Controle biológico e controle químico de pragas em cana-de-açúcar. Workshop tecnológico sobre pragas da cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 76p.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 477-494. In J.R.P Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, 635p.
- Butko, P. 2003.** Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2415-2422.
- Cárdenas, M.I., L. Galán-Wong, J. Ferré-Manzanero & B. Pereyra-Alferez. 2001.** Selección de toxinas Cry contra *Trichoplusia ni*. *Ciencia UANL* 4: 51-62.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2013.** Levantamento de safra da cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso em 20/02/2013.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo & D.H. Dean. 2013.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Nil_Crickmore/Bt/. Acesso em 20/02/2013.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum & D.H. Dean. 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- de Maagd, R.A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore & H.E. Schnepf. 2003.** Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-433.

- de Maagd, R.A., A. Bravo & N. Crickmore. 2001.** How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet. 17:193-199.
- de Maagd, R.A., D. Bosch & W. Stiekema. 1999.** *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. Trends Pl. Sci. 4: 9-13.
- Escudero, I.R., I. Ibáñez, M.A. Padilla, A. Carnero & P. Caballero. 2004.** Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. Bol. San. Veg. Plagas 30: 703-712.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig & M.G. Koziel, 1996.** Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 5389–5394.
- FAOSTAT. 2013.** Sugarcane production. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 20/02/2013.
- Federici, B.A., H.W. Park & D.K. Bideshi. 2010.** Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. Open Toxinol. J. 3: 83–100.
- Federici, B.A. 2005.** Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology. J. Invertebr. Pathol. 89: 30-38.
- Feitelson, J.S., J. Payne & L. Kim. 1992.** *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. Nat. Biotechnol. 10: 271-275.
- Ferré, J. & J. Van Rie. 2002.** Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 47:501–33.
- Ferré, J., M.D. Real, J. Van Rie, S. Jansens & M. Peferoen. 1991.** Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5119-5123.
- Freitas, M.R.T., E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.P.P. Fonseca, A.L. Mendonça, J.S.Santos, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'ana. 2007.** The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Fl. Entomol. 90: 309-313.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Santana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the states of Alagoas, Brazil. Fl. Entomol. 89: 539-540.
- Frutos, R., C. Rang & M. Royer. 1999.** Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Crit. Rev. Biotechnol. 19: 227–276.

- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gitahy, P.M., P.G. Galvao, J.L.S. Araujo & J.I. Baldani. 2006.** Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de açúcar *Diatraea saccharalis*. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 44p. (Documento 214)
- Glare, T.R. & M. O’Callaghan. 2000.** *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester, John Wiley & Sons, 350p.
- Gobatto, V., S. Giani, M. Camassola, A. Dillon, A. Specht & N. Barros. 2010.** *Bacillus thuringiensis* isolates entomopathogenic for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Braz. J. Biol. 70: 1039-1046.
- Gómez, I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo & M. Soberón. 2002.** Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett. 513: 242–246.
- Gould, F., N. Blair, M. Reid, T.L. Rennie, J. Lopez & S. Micinski. 2002.** *Bacillus thuringiensis*-toxin resistance management: Stable isotope assessment of alternate host use by *Helicoverpa zea*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 16581-16586.
- Habib, M.E.M. & C.E.S. Andrade. 1998.** Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- Hansen, B.M. & S. Salamitou. 2000.** Virulence of *Bacillus thuringiensis*, p. 41-64. In J.F. Charles, A. Delécluse & C. Nielsenle-Roux (eds.), Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 529p.
- Heckel, D.G., L.J. Gahan, S.W. Baxter, J.Z. Zhao, A.M. Shelton, F. Gould & B.E. Tabashnik. 2007.** The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. J. Invertebr. Pathol. 95: 192-197.
- Höfte, H. & H.R. Whiteley. 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-255.
- Huang, F, B.R Leonard & X Wu. 2007.** Resistance of sugarcane borer to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. Entomol. Exp. Appl. 124: 117-123.
- Karim, S., S. Riazuddin, F. Gould & D.H. Dean. 2000.** Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. Pestic. Biochem. Physiol. 67: 198–216.

- Knowles, B.H. & D.J. Ellar. 1987.** Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. *Biochim. Biophys. Acta* 924: 509–518.
- Kurtz, R.W., A. McCaffery & D. O'Reilly. 2007.** Insect resistance management for Syngenta's VipCotTM transgenic cotton. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 227-230.
- Lereclus, D., H. Agaisse, C. Grandvalet, S. Slamitou, & M. Gominet. 2000.** Regulation of toxin virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290: 295-299.
- Lima, R.O.R. & E.J. Marques. 1985.** Controle biológico das pragas da cana-de-açúcar no Nordeste. Boletim técnico. Piracicaba, MIC-Instituto do açúcar e do álcool, 8p.
- Liu, M., Q. Cai, H. Liu, B. Zhang, J. Yan & Z. Yuan. 2002.** Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *J. Appl. Microbiol.* 93: 374-379.
- Lucchesi, A.A. 2001.** Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), p. 13-45. In P.R.C. Castro & R.A. Kluge (eds.), *Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar; seringueira; coqueiro; dendezeiro e oliveira*. Cosmópolis, Stoller do Brasil, 138p.
- Macedo, N. & P.S.M. Botelho. 1988.** Controle integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). *Brasil Açuc. 106:* 1-12.
- Mendonça, A.F., A.S. Seregatte, F.A. Moraes & W.H. Oliveira. 1996.** Manejo integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep.: Pyralidae) na Agroserra, Maranhão, Brasil, p. 219-225. In A. F. Mendonça (ed.), *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, Insetos & Cia, 200p.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Mendonça (ed.), *Pragas da cana-de-açúcar*. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Monnerat, R. & A. Bravo. 2000.** Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência, p.163-200. In I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.), *Controle biológico*. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 308p.
- Muñoz-Garay, C., L. Portugal, L. Pardo-López, N. Jiménez-Juárez, I. Arenas, I. Gómez, R. Sánchez-López, R. Arroyo, A. Holzenburg, C.G. Savva, M. Soberón & A. Bravo, 2009.** Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 2229–2237.
- Navon, A. 2000.** *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection - reality and prospects. *Crop Prot.* 19: 669-676.

- Pacheco, S., I. Gómez, I. Arenas, G. Saab-Rincon, C. Rodríguez-Almazán, S.S. Gill, A. Bravo & M. Soberón. 2009.** Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* 284: 32750–32757.
- Pinto, L.M.N., D.L. Berlitz, R. Castilhos-Fortes & L.M. Fiuza. 2009.** Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Ciênc. Desenvol.* 38: 24-31.
- Pinto, A.S. 2006.** Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho, Biocontrol, 64p.
- Pinto, A.S., J.F. Garcia & P.S.M. Botelho. 2006.** Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (Org.). Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba, FEALQ, 287p.
- Polanczyk, R.A., F.H. Valicente & M.R. Barreto. 2008.** Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina, p. 111-136. In S.B. Alves & R.B. Lopes. Controle microbiano de pragas na América Latina- Avanços e desafios. Piracicaba, FEALQ, 414p.
- Polanczyk, R.A., R.F.P. Silva & L.M. Fiuza. 2004.** Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solos e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *R. Bras. Agric.* 10: 209-214.
- Polanczyk, R. & S. Alves. 2003.** *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. *Agrociências* 7: 1-10.
- Rajamohan, F., M.K. Lee & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins: molecular mode of action. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 60: 1–27.
- Salles, J. F. & J.I. Baldani. 1998.** *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br>. (Documento 54). Acesso em 20/12/2012.
- Sayed, A. & D.J. Wright. 2001.** Fitness costs and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in a field population of the diamondback moth *Plutella xylostella* L. *Ecol. Entomol.* 26: 502-508.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rien, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Schnepf, H.E. & H.R. Whiteley. 1981.** Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 2893-2897.
- Silva, M.C., H.A.A. Siqueira, E.J. Marques, L.M. Silva, R. Barros, J.V.M. Lima Filho & S.M.F.A. Silva. 2012.** *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Biocontrol Sci. Technol.* 22:5, 583-599.

- Silva-Werneck, J.O., J.R.M.V. Abreu, A.N. Tostes, L.O. Faria & J.M.C.S. Dias. 2000.** Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta-do-cartucho. Pesqu. Agropecu. Bras. 35: 221-227.
- Soberón, M., L.E. Fernández, C. Pérez, S.S. Gill. & A. Bravo. 2007.** Mode of action of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* toxins. Toxicon 49: 597–600.
- Souza, M.T., M.I. Lima, J.O. Silva-Werneck, J.C.S. Dias & B.M. Ribeiro. 1999.** Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. Biocell 23: 43-49.
- Stewart, S.D., J.J. Adamczyk Jr., K.S. Knighten & F.M. Davis. 2001.** Impact of *Bt* cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. J. Econ. Entomol. 94: 752-760.
- Suzuki, M.T., D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 2004.** Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. Can. J. Microbiol. 50: 973-975.
- Tabashnik, B.E., F.N. Huang, M.N. Ghimire, B.R. Leonard, B.D. Siegfried, M. Rangasamy, Y.J. Yang, Y.D. Wu, L.J. Gahan, D.G. Heckel, A. Bravo & M. Soberón. 2011.** Efficacy of genetically modified *Bt* toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. Nat. Biotechnol. 29: 1128–1131.
- Tabashnik, B.E., A.J. Gassmann, D.W. Crowder & Y. Carrière. 2008.** Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. Nat. Biotechnol. 26: 199-202.
- Valadares-Inglis, M.C.C., M.T. Souza & W. Shiler. 1998.** Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico, p.102-225. In I.S. Melo & J.L. Azevedo. Controle biológico. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 262p.
- Valicente, F.H. & M.R. Barreto. 2003.** *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Neotrop. Entomol. 32: 639-644.
- Vachon, V., R. Laprade & J.L. Schwartz. 2012.** Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. J. Invertebr. Pathol. 111: 1–12.
- Vega, O.F.L. 1999.** A review of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) production and use in Cuba. Biocontrol News Inf. 20: 47N–48N.
- Vilas-Bôas, G.T. & M.V.F. Lemos. 2004.** Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. Can. J. Microbiol. 50: 605-613.

- Vilas-Bôas, G.F.L.T, L.A. Vilas-Bôas, D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 1998.** *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. FEMS Microbiol. Ecol. 25: 369-374.
- Wright, D. J., M. Iqbal, F. Granero & J. Ferré. 1997.** A change in a single midgut receptor in the diamondback moth (*Plutella xylostella*) is only in part responsible for field resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*. Appl. Environ. Microbiol. 63:1814–1819.
- Zhang, X., M. Candas, N.B. Griko, R. Taussig & L.A. Bulla. 2006.** A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 9897–9902.
- Zhang, X., M. Candas, N.B. Griko, L. Rose-Young & L.A. Bulla. 2005.** Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor *BT-R1* expressed in insect cells. Cell Death Differ. 12: 1407–1416.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ATIVIDADE DE ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) PARA AS BROCAS DA CANA-DE-AÇÚCAR *Diatraea saccharalis* (FABR.) E *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)¹

LILIANE M. SILVA¹, HERBERT A.A. SIQUEIRA¹, EDMILSON J. MARQUES¹, MARIA C. SILVA²,
SUZANA M.F.A. SILVA¹ & REBEKA C. ALVES¹.

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Química e Biologia – Universidade Estadual do Maranhão, Praça Duque de Caxias, s/n, Morro do Alecrim, 65604-090, Caxias, MA, Brasil.

¹Silva, L.M., H.A.A. Siqueira, E.J. Marques, M.C. Silva, S.M.F.A. Silva & R.C. Alves. Caracterização molecular e atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para as brocas da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae). A ser submetido.

RESUMO - A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) apresenta características essenciais no controle de insetos-praga, tais como seu modo de ação, especificidade e seletividade. Isolados de *Bt* foram avaliados quanto ao conteúdo gênico e as suas atividades inseticidas contra *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box). Bioensaios na concentração 10^8 (esporos + cristais/mL) de *B. thuringiensis* foram conduzidos com 24 isolados para *D. saccharalis* e 23 isolados *D. flavipennella* e estes analisados por PCR, utilizando-se pares de iniciadores gerais e específicos para identificação de toxinas. Para *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, 16 e 18 isolados mostraram-se ativos, respectivamente. Os valores de CL_{50} para a população de *D. saccharalis* variaram entre $0,08 \times 10^5$ (LIIT-0105) e 4104×10^5 (LIIT-2707) esporos + cristais/mL. Para *D. flavipennella*, os valores de CL_{50} variaram entre $0,40 \times 10^5$ (LIIT-2707) e $542,75 \times 10^5$ (LIIT-2109) esporos + cristais/mL. O isolado LIIT-0105 que teve a menor CL_{50} para *D. saccharalis* apresentou os genes *cry1*, *cry2*, *cry8*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1*, *cry2Ab2* e *cry9C* foram amplificados e para *D. flavipennella* o isolado LIIT-2707 que apresentou a menor CL_{50} , amplificou os genes *cry1*, *cry2*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2*. A atividade e conteúdo gênico de toxinas nesses isolados de *B. thuringiensis* sugerem uma grande variabilidade com potencial para serem utilizados no desenvolvimento de novos biopesticidas ou transformação de plantas que expressem genes de *Bt* para o controle destas pragas.

PALAVRAS-CHAVE: Patogenicidade, controle microbiano, proteínas Cry, inseto, Lepidoptera, broca da cana-de-açúcar

ACTIVITY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis*
(BERLINER) ISOLATES TO SUGARCANE BORER *Diatraea saccharalis* (FABR.) AND
Diatraea flavipennella (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ABSTRACT – The bacterium *Bacillus thuringiensis* (Berliner) presents remarkable aspects for the control of insect pests, such as its mode of action, specificity and selectivity. *Bt* isolates were evaluated for their gene content and insecticide activities against *Diatraea saccharalis* (Fabr.) and *Diatraea flavipennella* (Box). Bioassays concentration at 10^8 (spore + crystals/ml) of *Bt* were conducted with 24 isolates to *D. saccharalis* and 23 isolates to *D. flavipennella* and further analyzed by PCR, using general and specific pairs of primers to identify toxins. Sixteen and eighteen isolates were respectively active to *D. saccharalis* and *D. flavipennella*. The LC_{50} values for *D. saccharalis* ranged from 0.08×10^5 (LIIT-0105) and $4,104 \times 10^5$ (LIIT-2707) crystals + spores/mL. The LC_{50} values ranged from 0.40×10^5 (LIIT-2707) and 542.75×10^5 (LIIT-2109) crystals + spores/mL for *D. flavipennella*. The isolate LIIT-0105 presented the lowest LC_{50} for *D. saccharalis* that harbored the genes *cry1*, *cry2*, *cry8*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1*, *cry2Ab2*, *cry9C*. For the borer *D. flavipennella*, the isolated LIIT-2707 presented the lowest LC_{50} and the following genes *cry1*, *cry2*, *cry9*, *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1* and *cry2Ab2* were amplified. The results suggest that *B. thuringiensis* isolates present a great variability of genes for bioprospection, and thus potential for developing new products and insertion on plants to express *Bt* genes for the control of these pests.

KEY WORDS: Pathogenicity, microbial control, cry proteins, insect, Lepidoptera, sugarcane borer

Introdução

Atualmente, o Brasil destaca-se como o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo (FAOSTAT 2013). A produção está concentrada principalmente no Centro-Sul do país e o Estado de São Paulo é o principal centro de produção com 51,87% (4.419,46 mil hectares), seguido por Goiás com 8,52% (725,91 mil hectares), Minas Gerais com 8,47% (721,86 mil hectares), Paraná com 7,17% (610,83 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 6,37% (542,70 mil hectares), Alagoas com 5,23% (445,71 mil hectares) e Pernambuco com 3,84% (327,61 mil hectares). Nos demais estados produtores as áreas são menores, com representações abaixo de 3% (CONAB 2013).

Dentre os fatores bióticos que limitam o desenvolvimento fisiológico da cana-de-açúcar, destacam-se a incidência de insetos-praga, dos quais estão a cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* Stal., cigarrinha-da-raiz *Mahanarva fimbriolata* Stal., a broca gigante *Telchin licus licus* (Drury) e as brocas do gênero *Diatraea* spp. (Castro & Christoffoletti 2005, Marques *et al.* 2009). A espécie *Diatraea saccharalis* (Fabr.) é considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar nas Américas e *Diatraea flavipennella* (Box) no Brasil.

Os parasitoides larvais das brocas são os mais utilizados como método de controle no Brasil e no mundo (Pinto *et al.* 2006), sendo o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) amplamente utilizado em canaviais nordestinos, onde há uma predominância da espécie *D. flavipennella* (Freitas *et al.* 2006). No entanto, este método apresenta custos iniciais muito altos, além da necessidade de estrutura para produção dos agentes de controle.

A utilização de inseticidas químicos para o controle das brocas da cana-de-açúcar não é recomendada devido aos prejuízos ambientais provocados e pela forma de aplicação dos mesmos na lavoura, que torna difícil sua penetração no interior dos colmos onde as lagartas provocam os maiores prejuízos. Devido a essas restrições e a necessidade de alternativas

menos onerosas e seguras ao controle biológico e aos inseticidas químicos, tem ocorrido um aumento no interesse pelos inseticidas biológicos para o controle dessas pragas (Gitahy *et al.* 2006).

Dentre os bioinseticidas para o controle de lepidópteros-praga, o mais utilizado mundialmente é a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Berliner), considerada uma boa alternativa para minimizar os danos causados por *D. saccharalis* e *D. flavipennella*.

No Brasil, o bioinseticida Dipel[®] WP é um dos produtos a base de *B. thuringiensis*, indicado para o controle da *D. saccharalis* (Agrofit 2013). No entanto, algumas características limitam a aplicação desse produto, como a incapacidade de controlar pragas que se alojam no interior das plantas (Sales & Baldani 1998), como as brocas da cana-de-açúcar de *D. saccharalis* e *D. flavipennella*.

Com os avanços das pesquisas na área biotecnológica, novas estratégias para uso de *B. thuringiensis* foram desenvolvidas. A clonagem e expressão dos genes *cry* para codificar as δ -endotoxinas em plantas e outros microrganismos, aumentou as possibilidades do uso desse agente de biocontrole, visando inclusive, controlar pragas que se alimentam dos tecidos internos das plantas, constituindo-se, portanto, de uma estratégia para o controle das brocas da cana-de-açúcar (Gitahy *et al.* 2006).

Dessa forma este trabalho tem com objetivo avaliar a atividade tóxica de isolados de *B. thuringiensis*, armazenados no banco de *Bacillus* do Laboratório de Interação Insetos Tóxicos/UFRPE em *D. saccharalis* e *D. flavipennella* e caracterizar o conteúdo gênico dos isolados que apresentarem toxicidade, para serem aplicados em programas de controle desses insetos.

Material e Métodos

Origem e Manutenção dos Isolados de *Bacillus thuringiensis*. Os 24 isolados utilizados neste estudo foram provenientes do banco de *Bacillus* do LIIT-Laboratório de Interações Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia da UFRPE, onde são mantidos em glicerol a 15% e SDS a 0,01% a -80°C (Braun 2000). Estes 24 isolados já foram testados em outros lepidópteros pragas de importância agrícola (Silva *et al.* 2012). Os padrões *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo H3a3b3c) (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* (Sorotipo H:9) (*Btt*), utilizados como controle positivo, foram gentilmente fornecidos pela Fiocruz/RJ.

Crescimento de Isolados para Testes com a *Diatraea saccharalis* e *Diatraea flavipennella*. Cada isolado foi transferido para meio Ágar nutriente (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo penicilina G na concentração de 100 mg/L, incubados a 30°C por 24h para germinação. Após esse período, os isolados foram transferidos para Erlenmeyer (300 mL), contendo 200 mL de meio T3 líquido (Bacto-triptona, 1,5 g; bacto-triptose, 1 g; extrato de levedura, 0,75 g; MnCl₂, 0,0025 g; e tampão fosfato 50 mM, pH 6,8; 0,5 L), incubados a 30°C, 200 rpm, por 72 h (Travers *et al.* 1987, Martin & Travers 1989) para produção de esporos e cristais. Em seguida foram centrifugados a 1700 ×g por 15 min a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os “pellets” lavados em 10 mL de água ultrapura esterilizada, este procedimento foi repetido por três vezes, e ao final foram adicionados 5 mL de solução de NaCl a 0,9% aos “pellets” e estocados a 4°C. Posteriormente foram quantificados para preparo das suspensões de trabalho e utilizados em bioensaios. Diluições de 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ em água ultrapura esterilizada foram preparadas determinando-se o número de células bacterianas conforme metodologia descrita por Alves *et al.* (1998). A quantificação de esporos foi conduzida em microscópio de contraste de fase usando câmara de Neubauer.

Criação e Manutenção dos Insetos. As criações de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* foram estabelecidas a partir de ovos obtidos junto à criação-estoque mantida no Laboratório de Patologia de Insetos/UFRPE, onde as lagartas foram alimentadas em dieta artificial de Hensley & Hammond (1968) modificada pelo PLANALSUCAR (Araújo 1985). As lagartas a partir do 3º instar foram transferidas para caixas (30 x 18 x 04 cm) contendo pedaços da dieta e ao atingirem o estágio de pupa, as mesmas foram transferidas para recipientes plásticos (26 x 17 x 08 cm), contendo no fundo papel filtro mais algodão umedecido, até a emergência dos adultos. Estes foram confinados em gaiolas de PVC (21 x 15 cm), cujo interior foi revestido com papel sulfite, como substrato para a postura, e adicionada solução glicosada a 10% para alimentação dos adultos. Os ovos coletados diariamente foram esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), e posteriormente armazenados em placas de Petri (15 x 02 cm) com pedaço de algodão umedecido, por aproximadamente seis dias. Após eclosão das neonatas, estas foram distribuídas em tubos de fundo chato contendo 20 mL de dieta. Os adultos mantidos a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR, lagartas, pupas e ovos a $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h E. Dos ovos coletados de *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, cerca de 10% foram utilizados para a manutenção da criação e o restante para a realização dos bioensaios.

Patogenicidade. Para os bioensaios com *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, uma alíquota de 30 μL de suspensão de *B. thuringiensis*, na concentração de 10^8 esporos + cristais/mL com Triton X-100 a 0,01%, foi aplicada na superfície da dieta artificial previamente distribuída em bandejas de bioensaios de 128 células (Bio-Serv Frenchtown, NJ). Após a evaporação do excesso de umidade, para cada tratamento, foram feitas 48 replicações por isolado, onde lagartas neonatas de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* foram acondicionadas individualmente e as bandejas fechadas com tampas transparentes e ventiladas (Bio-Serv Frenchtown, NJ). Para acondicionamento do material, foi utilizada câmara incubadora (BOD), regulada para 28 ± 1

°C, 70 ± 10% de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h E. A testemunha consistia de NaCl (0,9%) e Triton X-100 (0,01%), que foi aplicada em volume equivalente aos lotes tratados com *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo H3a3b3c) (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* (Sorotipo H:9) (*Btt*) que foram usados como controle positivo. Duas repetições foram realizadas e os tratamentos avaliados ao 3º, 5º e 7º dia após a aplicação da bactéria. O critério de mortalidade foi baseado na ausência de locomoção das larvas após o toque com pincel de cerdas macias.

Toxicidade. A toxicidade de *B. thuringiensis* contra lagartas neonatas de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* foi realizada com os isolados que apresentaram mortalidade igual ou superior a 30%, verificadas nos testes de patogenicidade. Os bioensaios de toxicidade foram feitos da mesma forma que os de patogenicidade, exceto pelo número de concentrações. Sete concentrações foram usadas para os bioensaios, que variaram de isolado para isolado, baseadas em número de esporos + cristais /mL, as mesmas determinadas a partir dos ensaios preliminares (utilizando concentrações de fator 5). Como padrão foram utilizadas *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo H3a3b3c) (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *tolworthi* (Sorotipo H:9) (*Btt*). Para acondicionamento do material, foi utilizada câmara incubadora (BOD), regulada para 28 ± 1 °C, 70 ± 10% de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h E. A testemunha consistia de NaCl (0,9%) e Triton X-100 (0,01%), que foi aplicada em volume equivalente aos lotes tratados. Duas repetições foram realizadas e os tratamentos avaliados ao 3º, 5º e 7º dia após a aplicação da bactéria. O critério de mortalidade foi baseado na ausência de locomoção das larvas após o toque com pincel de cerdas macias. Os valores de CL₅₀ foram estimados para *D. saccharalis* e *D. flavipennella* para permitir comparações entre os isolados.

Análises Estatísticas. Os dados de mortalidade foram corrigidos com a mortalidade do tratamento testemunha (Abbott 1925). Percentagens corrigidas de mortalidade das larvas para os isolados que causaram mortalidade acima de 30% foram sujeitos a uma análise de variância

(PROC GLM) usando o pacote estatístico SAS versão 9.0 (SAS Institute 1999), após serem testados para normalidade e homocedasticidade (testes de Kolmogorov e Bartlett), respectivamente. Dados que não assumiram normalidade foram transformados em arco seno $\sqrt{M/100}$, onde M é a taxa de mortalidade obtida a partir da proporção entre o número de larvas mortas e o número total de larvas utilizadas no bioensaio. A mortalidade média dos isolados foi comparada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de Probit em $P > 0,05$ (Finney 1971), após a correção pela mortalidade de controle (Abbott 1925) usando POLO – PLUS 2.0. As respostas dos isolados de *B. thuringiensis* testados nos bioensaios de concentração-mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas e estimativas das CL_{50} s e CL_{90} s para *D. saccharalis* e *D. flavipennella*. Os índices de toxicidade relativa para os isolados de *B. thuringiensis* foram calculados em relação a ambos *Btk* e *Btt* pelo “teste da razão letal” (Robertson & Preisler 1992), sendo considerados significativos quando o intervalo de confiança a 95% (IC) não incluíram o valor 1,0.

Caracterização dos Isolados quanto ao Conteúdo de Toxinas. Iniciadores (primers) universais (gerais) foram usados para a detecção de genes *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cyt* e *vip* (Ben-Dov *et al.* 1997, Bravo *et al.* 1998) e iniciadores específicos *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1*, *cry2Ab2*, *cry8A*, *cry8B* e *cry9C* (Kalman *et al.* 1993, Ben-Dov *et al.* 1997, Juárez-Pérez *et al.* 1997, Bravo *et al.* 1998, Porcar & Juárez-Pérez 2003), sendo as sequências dos genes *cry9* e *vip* delineados a partir de alinhamentos das sequências conduzidos usando o programa AlignX (VectorNTI, Invitrogen) (Tabela 1). A identificação de genes *cry3* e *cry8*, proteínas usualmente tóxicas a coleópteros, foram considerados por razões de caracterização adicional dos isolados.

Preparação da Amostra e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para caracterização do conteúdo gênico os isolados foram previamente cultivados em placas contendo meio Luria Bertani (LB) sólido, por 12 h a 30°C. Para cada isolado uma colônia foi ressuspensa em 1 mL de água ultrapura estéril em tubos de microcentrífuga estéreis e levados à centrifugação por 1 min, a 15000 ×g a 20°C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado, sendo adicionados 200 µL da Matriz InstaGene Matrix (Bio-Rad) e, em seguida, o material foi incubado em banho maria a 56°C por 20 min, agitado rigorosamente em vórtex por 10 s e incubado a 95°C por 8 min. A amostra foi novamente agitada em vórtex por 10 s e centrifugada a 20°C por 3 min. Finalmente, 200 µL do sobrenadante foram colhidos, transferidos para tubos de microcentrífuga autoclavados, os quais foram estocados em freezer - 20°C até o momento do uso. O DNA das linhagens *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel® WP) (*Btk*), *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Xentari® WDG) (*Bta*), *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Sorotipo H3a3b3c) (*Btk*), *B. thuringiensis* var. *tolworthi* (Sorotipo H:9) (*Btt*), *B. thuringiensis* var. *galleriae* (Sorotipo H:1), *B. thuringiensis* var. *israelensis* (Sorotipo H14) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Sorotipo H:7) foram utilizados nas reações de amplificação por PCR para comparações.

A identificação dos genes *cry*, *cyt* e *vip* para cada isolado foi feita em um volume de 25 µL, contendo: 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl (solução tampão para reação de PCR Invitrogen®), 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,2 µM de cada iniciador, 2 µL de DNA molde e água ultrapura previamente esterilizada. Como controle negativo a quantidade de DNA genômico foi substituída por água ultrapura livre de DNase e RNase.

As reações de amplificação foram realizadas em aparelho termociclador (Termociclador Mastercycler Gradient – Eppendorf), onde foram utilizadas as seguintes

condições para os iniciadores: um passo inicial de desnaturação de 95°C a 2 min e 35 ciclos consistindo de um ciclo de 1 min de desnaturação a 95°C, temperaturas de anelamento (Tabela 1) a 1 min e 1 min de extensão a 72°C e, ao final dos ciclos, um passo extra de 5 min de extensão a 72°C. Ao fim do programa, foi adicionado um passo para a manutenção da amostra a 4°C até a retirada dos tubos do termociclador.

Após as amplificações, 10 µL das amostras misturados a 3µL de tampão de amostra (“loading buffer” 0,5% de azul de bromofenol em glicerol 50%) foram aplicados em gel de agarose a 1%, contendo Sybr[®]Safe (0,1 µL/mL) e submetido à eletroforese horizontal por 50 min, a 80 V, conduzida em tampão TEB 1X (Tris-borato 90mM, EDTA 1mM com pH 8). Em todas as eletroforeses realizadas, foi adotado o emprego de uma amostra de DNA com fragmentos de tamanhos conhecidos, 100 pb de DNA ladder[®] (Invitrogen, CA), a qual serviu como referência de migração eletroforética para verificação dos tamanhos dos fragmentos obtidos nas reações de amplificação. Os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador Vilber Lourmat[®], Biosystems, Paraná, Brasil.

Resultados

Patogenicidade Nos testes de patogenicidade com *D. saccharalis*, dos 24 isolados testados, no 7º dia de avaliação, 08 isolados (33,33%) não ocasionaram mortalidade superior a 30% (LIIT-0107, LIIT-2112, LIIT-2310, LIIT-2403, LIIT-2718, LIIT-2902, LIIT-4108 e LIIT-4211), 01 isolado (4,17%) (LIIT-2601) apresentou atividade entomocida entre 30 e 50% a esta espécie, 11 isolados (45,84%) proporcionaram mortalidade superior a 50% (LIIT-0105, LIIT-0106, LIIT-0302, LIIT-0526, LIIT-0706, LIIT-1411, LIIT-2109, LIIT-2204, LIIT-2707, LIIT-3509 e

LIIT-3818) e 04 isolados (16,66%) atingiram 100% (LIIT-3303, LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406) de mortalidade (Tabela 2).

Para a espécie *D. flavipennella*, dentre os 24 isolados, o LIIT-0106 apresentou uma concentração de esporos baixa, não atingindo a concentração de 10^8 esporos + cristais/mL usada nos experimentos, não sendo utilizado nos testes de patogenicidade para esta espécie, testados desta forma, 23 isolados, onde no 7º dia de avaliação, 05 isolados (21,74%) causaram mortalidade inferior a 30% (LIIT-0107, LIIT-2112, LIIT-2403, LIIT-2718, LIIT-2902), 03 isolados (13,05%) apresentaram atividade entre 30 e 60% (LIIT-2109, LIIT-2204 e LIIT-4211), 08 isolados (34,78%) proporcionaram mortalidade superior a 60% (LIIT-0526, LIIT-0706, LIIT-1411, LIIT-2310, LIIT-3303, LIIT-3509, LIIT-3818 e LIIT4108) e 07 isolados (30,43%) levaram a uma atividade entomocida de 100% (LIIT-0105, LIIT-0302, LIIT-2601, LIIT-2707, LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406) (Tabela 2). Três dos vinte e quatro isolados mostraram 100% de mortalidade para ambas as espécies no 7º dia de avaliação (LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406). Os padrões utilizados como controle positivo, *Btk* e *Btt*, apresentaram atividade de 100% e acima de 80% para ambas as espécies, respectivamente (Tabela 2).

Toxicidade Dezesesseis isolados que proporcionaram mortalidade acima de 30% a *D. saccharalis* (Tabela 2) foram selecionados para testes de toxicidade. Com exceção dos isolados LIIT-0106, LIIT-1411 e LIIT-2601, que não foi possível estimar as CL_{50} s, os dados de concentração-mortalidade dos demais isolados ajustaram o modelo de Probit (χ^2 não significativo, $P > 0,05$) (Tabela 3). Os valores de CL_{50} entre os isolados para a população de *D. saccharalis* variaram entre $0,08 \times 10^5$ (LIIT-0105) e 4104×10^5 (LIIT-2707) esporos + cristais/mL de *B. thuringiensis* (Tabela 3). As linhagens padrões *Btk* e *Btt* apresentaram toxicidade para *D. saccharalis* com CL_{50} de 1,54 e 365×10^5 esporos + cristais/mL, respectivamente. O isolado LIIT-0105 foi 18,59 e 4382 vezes mais tóxico que o *Btk* e *Btt*,

respectivamente. O padrão *Btk* foi 235 vezes mais tóxico para esta espécie do que *Btt*. Os isolados LIIT-4311 e LIIT-4406 foram cerca de 3 vezes mais tóxicos do que *Btk*. As razões de toxicidade dos isolados a *D. saccharalis* variaram de 0,0004 (LIIT-2707) a 18,59 (LIIT-0105) vezes quando comparados com *Btk* e de 0,089 (LIIT-2707) a 4382 (LIIT-0105) comparados com *Btt*. Sendo os isolados LIIT-3303 e LIIT-2109 não significativos quando comparados com *Btk* e *Btt*, respectivamente (Tabela 3).

Dezoito isolados que proporcionaram mortalidade acima de 30% para *D. flavipennella* foram selecionados para os testes de toxicidade, todos ajustaram os dados de concentração-mortalidade para o modelo de Probit (χ^2 não significativo, $P > 0,05$) (Tabela 4). Os valores de CL_{50} entre os isolados para a população de *D. flavipennella* variaram entre $0,40 \times 10^5$ (LIIT-2707) e $542,75 \times 10^5$ (LIIT-2109) esporos + cristais/mL de *B. thuringiensis* (Tabela 4). As linhagens padrões *Btk* e *Btt* apresentaram toxicidade para *D. flavipennella*, com CL_{50} de 4,71 e 466×10^5 esporos + cristais/mL, respectivamente. O isolado LIIT-2707 foi 11,52 e 1137 vezes mais tóxico que o *Btk* e *Btt*, respectivamente. Os isolados LIIT-4311 e LIIT-2601 foram 6 vezes mais tóxicos e os isolados LIIT-0105, LIIT-1411 e LIIT-4306 não diferiram do *Btk*. O padrão *Btk* foi 98 vezes mais tóxico para esta espécie do que *Btt*. As razões de toxicidade dos isolados a *D. flavipennella* variaram de 0,009 (LIIT-2109) a 11,52 (LIIT-2707) vezes quando comparados com *Btk* e de 0,85 (LIIT-0105) a 1137 (LIIT-2707) comparados com *Btt*. Sendo os isolados LIIT-0105, LIIT-0706, LIIT-1411, LIIT-4306 e LIIT-4406 não significativos quando comparados com *Btk* e LIIT-0706, LIIT-2109, LIIT-2204, LIIT-3509 e LIIT-4108 não significativos quando comparados com *Btt* (Tabela 4).

O isolado LIIT-0105 foi 44 vezes mais tóxico para *D. saccharalis* do que para *D. flavipennella* e o isolado LIIT-2707 foi 100 vezes mais tóxico para *D. flavipennella* do que para *D. saccharalis*.

Caracterização dos Isolados quanto ao Conteúdo de Toxinas. Os isolados de *B. thuringiensis* que apresentaram atividade para as espécies *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, foram analisados por PCR, utilizando-se os pares de iniciadores gerais *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cyt* e *vip*, permitiram verificar que dos nove iniciadores gerais, quatro (*cry1*, *cry2*, *cry8* e *cry9*) amplificaram para os isolados de *B. thuringiensis*, com o tamanho da banda esperado (Tabela 5). Os iniciadores *cry2* e *cry9* apresentaram banda para 17 (95%) dos isolados. Para os iniciadores *cry1* e *cry8* foi possível visualizar banda em 11 (61%) e 5 (25%) dos isolados, respectivamente (Tabela 5).

Para os iniciadores específicos *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1I*, *cry2A*, *cry2Aa1*, *cry2Ab2*, *cry8A*, *cry8B* e *cry9C*, dos 11 isolados que apresentaram *cry1*, todos (100%) apresentaram bandas para os primers *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1D*, *cry1F* e *cry1I*, sendo os mais ativos LIIT-0105, LIIT-4311 e LIIT-4406 para *D. saccharalis* e para *D. flavipennella* LIIT-2707, LIIT-4311 e LIIT-2601, apenas 01 isolado (9%) não apresentou banda para *cry1B* e 05 isolados (45,45%) não mostraram banda para *cry1C*. Dos 17 isolados que foi possível visualizar banda para *cry2*, 06 isolados (35,30%) apresentaram banda para *cry2A*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2*. Nenhum dos 05 isolados que mostraram banda para *cry8* amplificaram para *cry8A* e *cry8B*. Dos 17 isolados que apresentaram banda para *cry9*, 05 deles (29,41%) mostraram banda para *cry9C* (Tabela 6).

Os isolados LIIT-3303, LIIT-3509, LIIT-3818, LIIT-4108 e LIIT-4211 mostraram banda somente para *cry2* e *cry9* (Tabela 5). As linhagens padrões amplificaram os genes *cry1*, *cry1Ab* e *cry1Ac* para *Btk* e *cry1*, *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1I*, *cry2*, *cry2A* e *cry2Aa1* para *Btt* (Tabela 5, 6). Os isolados LIIT-0105 e LIIT-2707 que apresentaram atividade diferente para as espécies *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, mostraram diferença na caracterização molecular,

onde o isolado LIIT-0105 amplificou para os genes *cry1C*, *cry8* e *cry9C*, não amplificados no isolado LIIT-2707 (Tabela 5, 6).

Discussão

Em geral, estes isolados de *Bt* mostraram uma larga amplitude na atividade tóxica a essas espécies de *Diatraea*, sugerindo a existência de diferentes fatores que podem ser explorados para o controle delas. As espécies de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* foram mais suscetíveis aos isolados do que *Plutella xylostella* (L.) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Silva *et al.* 2012). Estas diferenças sugerem a existência de toxinas com atividade diferenciada para estas espécies ou estas apresentam suscetibilidade diferencial em particular. Os isolados LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406, que são muito ativos a *S. frugiperda* e *P. xylostella* (Silva *et al.* 2012), também ocasionaram 100% de mortalidade para *D. saccharalis* e *D. flavipennella*. Estes isolados contêm pelo menos toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1F, Cry1I, Cry2A, Cry2Aa1, Cry2Ab2 e Cry9C, que comumente estão associadas a altas atividades frente a lepidópteros (Ben-Dov *et al.* 1997, Bravo *et al.* 1998, Gitahy *et al.* 2007, Monnerat *et al.* 2007, Patel *et al.* 2009). Portanto, estes isolados apresentam grande potencial para o controle desses insetos já que eles contêm toxinas que são simultaneamente ativas contra estas espécies, em especial a toxina Cry1C para *P. xylostella* (Mohan *et al.* 2009) e Cry1F para *S. frugiperda* (Siebert *et al.* 2008). A caracterização destes genes é um passo importante para determinar se são genes similares aos já existentes ou se esta se trata de novas configurações, o que poderá conduzir a uma nova ferramenta de controle destas pragas.

Interessantemente, além dos isolados acima, outros isolados apresentaram alta toxicidade para as espécies de *D. saccharalis* e *D. flavipennella*. Os isolados LIIT-0105, 0526, 3303 e 3818 foram muito ativos a *D. saccharalis*, enquanto que os isolados LIIT-0105, 2601 e 2707

foram muito ativos a *D. flavipennella*. Esta suscetibilidade pode ser em função da presença de receptores nas espécies de *Diatraea* que tenham uma afinidade maior por estas toxinas. O fato do isolado LIIT-0105 ser muito ativo às duas espécies sugere que o isolado tenha pelo menos uma proteína tóxica para as duas espécies ou proteínas que atuam independentemente uma da outra. Adicionalmente, os isolados que foram muito ativos a *D. saccharalis* e não a *D. flavipennella* e vice-versa podem indicar a existência de novas toxinas específicas para uma espécie e não para a outra, ou ainda, à presença ou ausência de receptores diferenciados nas duas espécies. Os isolados LIIT-0105 e LIIT-2707 foram os mais tóxicos com as menores CL_{50s} para *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, respectivamente, os quais apresentaram o gene *cry1B*, que apresenta uma alta atividade a *D. saccharalis* (Bohorova *et al.* 1997), o isolado LIIT-0105 apresentou ainda os genes *cry1C* e *cry9C*, tóxicos para lepidópteros, não apresentados no isolado LIIT-2707, podendo ser esses genes responsáveis por uma maior toxicidade desse isolado à *D. saccharalis*. A toxicidade desses isolados pode estar relacionada com a quantidade de proteínas produzidas, como também pela combinação de mais de um gene presente (Silva *et al.* 2012), ou ainda, essas duas espécies apresentarem uma atividade proteolítica, defesas imunológicas ou receptores diferentes.

Os isolados LIIT-0105, LIIT-4406 e LIIT-4311 para população de *D. saccharalis* e LIIT-2707, LIIT-4311, LIIT-2601, LIIT-4306, LIIT-0105 e LIIT-1411 para *D. flavipennella*, mostraram valores de CL_{50} menores que o padrão de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki*, assim relatado por Bohorova *et al.* (1996) quando testaram a atividade de isolados de *B. thuringiensis* para *D. saccharalis*, *Diatraea grandiosella* (Dyar), *S. frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Boddie), e dos mais eficientes, nenhum apresentou taxa de mortalidade superior a 60% para *D. saccharalis*, porém todos apresentaram toxicidade maior do que a estirpe padrão de *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1. Gitahy *et al.* (2007) relataram um isolado, causando

100% de mortalidade para *D. saccharalis*, o qual foi 10 vezes mais tóxico que o padrão *B. thuringiensis* subespécie *kurstaki* HD-1 e contêm os genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cry2Aa1* e *cry2Ab2*, genes encontrados nos isolados LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT4406 que apresentaram alta atividade às brocas da cana-de-açúcar, indicando que as toxinas codificadas por estes genes, ou uma combinação delas, pode ser responsável pela alta mortalidade provocada.

Dentre os iniciadores que não amplificaram banda para os isolados de *B. thuringiensis* apenas o gene *vip*, na literatura, codifica proteínas com atividade tóxica contra vários lepidópteros (Yu *et al.* 1997, Bhalla *et al.* 2005). O gene *cry3* é ativo contra insetos coleópteros (Sekar *et al.* 1987, Sato *et al.* 1994) e os genes *cry4*, *cry11* e *cyt* são ativos contra dípteros (Orduz *et al.* 1998, Thiery *et al.* 1998, Berry *et al.* 2002).

A relação entre a toxicidade e o conteúdo de genes dos isolados de *B. thuringiensis* estudados, sugere que a toxicidade dos isolados à *D. saccharalis* e *D. flavipennella* esteja fortemente ligada às proteínas Cry2 e Cry9, proteínas tóxicas a insetos lepidópteros, uma vez que os genes *cry2* e *cry9* foram verificados praticamente em 100% dos isolados testados nestes insetos, com exceção do isolado LIIT-0706 que apresentou atividade as duas espécies, porém não foi detectada nenhuma das toxinas utilizadas na técnica de PCR, podendo conter uma toxina não analisada na PCR ou se tratar de uma nova toxina.

Monnerat *et al.*(1999) testaram várias toxinas de *B. thuringiensis* em *P. xylostella* e obtiveram a menor CL₅₀ para a Cry2Aa, verificando assim, a alta toxicidade dessa proteína a esse inseto. Isolados que continham a toxina Cry2Aa1 testada nas brocas neste estudo, também levaram a uma mortalidade de 100%, com uma variação de CL₅₀ de 0,46 x 10⁵ a 7,25 x 10⁵ para *D. saccharalis* e de 0,70 x 10⁵ a 8,56 x 10⁵ para *D. flavipennella*, por se tratar de isolados com alta toxicidade às brocas, podendo esses isolados serem utilizados em programas de manejo dessas pragas.

A presença de banda do gene *cry8* nos isolados LIIT-0105, LIIT-2601, LIIT-4306, LIIT-4311 e LIIT-4406 pode ter contribuído para a toxicidade a estas espécies. No entanto, na literatura esse gene *cry8* codifica proteínas tóxicas contra insetos coleópteros como as proteínas Cry8Ba, Cry8Ca, Cry8Da e Cry8Ea1 (Hori *et al.* 1994, Asano *et al.* 2003, Shu *et al.* 2009) e a proteína Cry8Aa que apresenta atividade dupla para as ordens Coleoptera e Hemiptera (Afídeos) (Crickmore *et al.* 2013). Embora estes estejam associados àqueles isolados, muito provavelmente não participam na resposta toxicológica dos isolados.

Como o gene *cry1* amplificou banda para maioria dos isolados de *B. thuringiensis* tóxicos a *D. saccharalis* e *D. flavipennella* neste estudo, em especial 11 isolados apresentaram o gene *cry1Aa* ocorrendo uma variação de CL_{50} entre $0,08 \times 10^5$ (LIIT-0105) e 4104×10^5 (LIIT-2707) esporos + cristais/mL de *B. thuringiensis* para *D. saccharalis* e de $0,40 \times 10^5$ (LIIT-2707) e $542,75 \times 10^5$ (LIIT-2109) esporos + cristais/mL de *B. thuringiensis* para *D. flavipennella*, sugerindo que este gene esteja completando a ação tóxica dos isolados em combinação com o gene *cry2* e *cry9* amplificados juntos aos isolados que foram mais tóxicos a esses insetos. Rosas-García *et al.* (2004) mostraram um isolado com alta atividade (78,79%) a broca da cana-de-açúcar, *D. saccharalis*, amplificando para os genes *cry1Aa*, *cry1Ab* e *cry1Ac*, mostrando que o gene *cry1A* apresenta importante toxicidade para esta espécie, particularmente *cry1Aa*. Ghimire *et al.* (2011) mostraram que as toxinas Cry1Ab e Cry1F levaram a uma mortalidade entre 96 e 100% em populações suscetíveis de *D. saccharalis*, em híbridos comerciais de milho *Bt*. Vários estudos mostram que o gene *cry1* tem sido encontrado na grande maioria dos isolados de *B. thuringiensis* (Ben-Dov *et al.* 1997, Bravo *et al.* 1998, Wang *et al.* 2003), também observado neste estudo e, portanto, sugerindo que a atividade dos isolados pode estar também associada a esta toxina, como relatado por Silva *et al.* (2012), quando testados isolados que continham esse gene, contra *P. xylostella*. Relatos anteriores

indicam o alto efeito da toxina codificada pelo gene *cryIAb* para larvas de *D. saccharalis* (Arencibia *et al.* 1997, Braga *et al.* 2003).

A busca e a caracterização de novos genes *cry* podem resultar em novas alternativas para o controle de insetos de ordens importantes como a ordem Lepidoptera, auxiliando dessa forma, programas de manejo para evitar ou minimizar o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de campo de insetos-alvos. A manipulação genética de genes *cry* em *B. thuringiensis* pode se tornar um meio promissor de melhorar a eficiência e a relação custo/benefício de bioinseticidas e de plantas transgênicas expressando estes genes, além de poder auxiliar no desenvolvimento de sistemas de manejo que minimizem o aparecimento de resistência a *B. thuringiensis* em populações de insetos-alvos em campo.

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural de Pernambuco através do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo. A Fiocruz pelo material cedido utilizado nos experimentos e ao programa PROAP/CAPES pelo suporte no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Literatura Citada

- Abbott, W.S.A. 1925.** Method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Agrofit (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários). 2013.** Consulta de pragas. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 20/02/2013.
- Alves, S.B., J.E.M. Almeida, A. Moino Jr. & L.F.A. Alves. 1998.** Técnicas de laboratório, p. 637-711. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.

- Araújo, J.R.; P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). *Saccharum APC* 36: 45-48.
- Arencibia, A., R. Vázquez, D. Prieto, P. Téllez, E. Carmona, A. Coego, Hernández, G. De La Riva & G. Selman-Housein, 1997.** Transgenic sugarcane plants resistant to stem-border attack. *Mol. Breed.* 3: 247–255.
- Asano, S.I., C. Yamashita, T. Iizuka, K. Takeuchi, S. Yamanaka, D. Cerf & T. Yamamoto. 2003.** A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biol. Control* 28: 191-196.
- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khamraev, E. Troitskaya, A. Dubitsky, N. Berezina & Y. Margalith. 1997.** Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4883-4890.
- Berry, C., S. O'Neil, E. Ben-Dov, A.F. Jones, L. Murphy, M.A. Quail, M.T.G. Holden, D. Harris, A. Zaritsky & J. Parkhill. 2002.** Complete sequence and organization of p*Btoxis*, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5082-5095.
- Bhalla, R., M. Dalal, S.K. Panguluri, B. Jagadish, A.D. Mandaokar, A.K. Singh & P.A. Kumar. 2005.** Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 467-472.
- Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo, 1997.** Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412–415.
- Bohorova, N., A.M. Maciel, R.M. Brito, L. Aguilart, J.E. Ibarra & D. Hoisington. 1996.** Selection and characterization of Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. *BioControl* 41: 153-156.
- Braga, D.P.V., E.D.B Arrigoni, M.C. Silva-Filho & E.C. Ulian. 2003.** Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. New Seeds Missouri* 5: 209-221.
- Braun, S. 2000.** Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental uses, p. 49-72. In A. Navon & K.R.S. Ascher (eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*. New York, CABI, 336p.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Pena, M.E. Nunez-Valdez, M. Soberon & R. Quintero. 1998.** Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.

- Castro, P.R.C & P.J. Christoffoletti. 2005.** Fisiologia da cana de açúcar. p. 3-48. In Mendonça, A.F. (ed.), Cigarrinhas da cana-de-açúcar: Controle Biológico. Maceió, Insecta, 317p.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2013.** Levantamento de safra da cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso em 20/02/2013.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo & D.H. Dean. 2013.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Nil_Crickmore/Bt/. Acesso em 20/02/2013.
- FAOSTAT. 2013.** Sugarcane production. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 20/02/2013.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London: Cambridge University Press, 333p.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Santana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the states of Alagoas, Brazil. F. Entomol. 89: 539-540.
- Ghimire, M.N., F. Huang, R. Leonard, G.P. Head & Y. Yang. 2011.** Susceptibility of Cry 1Ab-susceptible and -resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. C. Prot. 30: 74-81.
- Gitahy, P. M., M. T. de Souza, R. G. Monnerat., E. B. Arrigoni & J. I. Baldani. 2007.** A brasilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). B. J. Microbiol. 38: 531-537.
- Gitahy, P.M., P.G. Galvao, J.L.S. Araujo & J.I. Baldani. 2006.** Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 44p. (Documento 214)
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond Jr. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61: 1742-1743.
- Hori, H., N. Suzuki, K. Ogiwara, M. Himejima, L.S. Indrasith, M. Minami, S. Asano, R. Sato, M. Ohba & H. Iwahana. 1994.** Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. J. Appl. Microbiol. 76: 307-313.
- Juárez-Pérez, V.M., M.D. Ferrandis & R. Frutos. 1997.** PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2997-3002.

- Kalman, S., K.L. Kiehne, J.L. Libs & T. Yamamoto. 1993.** Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131-1137.
- Marques, E.J., R.O.R. Lima, J.V. Oliveira. 2009.** Pragas da cana-de-açúcar: nordeste do Brasil. Recife, EDUFRPE, 54p.
- Martin, P.A.W. & R.S. Travers. 1989.** Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2437-2442.
- Mohan, M., S.N. Sushil, G. Selvakumar, J.C. Bhatt, G.T. Gujar & H.S. Gupta. 2009.** Differential toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and their crystal toxins against high-altitude Himalayan populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. Pest Manag. Sci. 65: 27-33.
- Monnerat, R.G., A.C. Batista, P.T. de Medeiros, É.S. Martins, V.M. Melatti, L.B. Praça, V.F. Dumas, C. Morinaga, C. Demo, A.C.M. Gomes, R. Falcão, C.B. Siqueira, J.O. Silva-Werneck & C. Berry. 2007.** Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. Biol. Control 41: 291-295.
- Monnerat, R., L. Masson, R. Brousseau, M. Pusztai-Carey, D. Bordat & R. Frutos. 1999.** Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. Curr. Microbiol. 39: 159-162.
- Orduz, S., M. Realpe, R. Arango, L.A. Murillo & A. Delécluse. 1998.** Sequence of the *cry11Bb1* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and toxicity analysis of its encoded protein. Biochim. Biophys. Acta 1388: 267-272.
- Patel, H.K., J.J. Jani & H.G. Vyas. 2009.** Isolation and characterization of Lepidopteran specific *Bacillus thuringiensis*. Int. J. Integ. Biol. 6: 121-126.
- Pinto, A.S. 2006.** Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho, BioControl, 64p.
- Pocar, M., V. Juárez-Pérez. 2003.** PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiol. Rev. 26: 419-432.
- Robertson, J.L. & H.K. Preisler. 1992.** Pesticide Bioassays with Arthropods. Boca Raton, CRC Press, 224p.
- Rosas-García, N.M., B. Pereyra-Alfárez, K.A. Niño, L.J. Galán-Wong, L.H. Morales-Ramos. 2004.** Novel toxicity of native and HD *Bacillus thuringiensis* strains to the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. BioControl 49:455-465.
- Salles, J. F. & J.I. Baldani. 1998.** *Bacillus thuringiensis* como agente de controle biológico. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br>. (Documento 54). Acesso em 20/12/2012.

- SAS Institute Inc. 1999.** STAT User's guide computer program, version 9.0. By SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sato, R., K. Takeuchi, K. Ogiwara, M. Minami, Y. Kaji, N. Suzuki, H. Hori, S. Asano, M. Ohba & H. Iwahana. 1994.** Cloning, heterologous expression, and localization of a novel crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain buibui toxic to scarabaeid insects. *Curr. Microbiol.* 28: 15-19.
- Sekar, V., D.V. Thompson, M.J. Maroney, R.G. Bookland & M.J. Adang. 1987.** Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. US A* 84: 7036-7040.
- Shu, C., H. Yu, R. Wang, S. Fen, X. Su, D. Huang, J. Zhang & F. Song. 2009.** Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185. *Curr. Microbiol.* 58: 389-392.
- Siebert, M.W., J.M. Babock, S. Nolting, A.C. Santos, J.J. Adamczyk Jr., P.A. Neese, J.E. King, J.N. Jenkins, J. Mccarty, G.M. Lorenz, D.D. Fromme & R.B. Lassiter. 2008.** Efficacy of Cry1F insecticidal protein in maize and cotton for control of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Fl. Entomol.* 91: 555-565.
- Silva, M.C., H.A.A. Siqueira, E.J. Marques, L.M. Silva, R. Barros, J.V.M. Lima Filho & S.M.F.A. Silva. 2012.** *Bacillus thuringiensis* isolates from northeastern Brazil and their activities against *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 22: 583-599.
- Thiery, I., S. Hamon, A. Delecluse & S. Orduz. 1998.** The Introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* *cyt1Ab1* gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3910-3916.
- Travers, R.S., P.A. Martin & C.F. Reichelderfer. 1987.** Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1263-1266.
- Wang, J., A. Boets, J. Van Rie & G. Ren. 2003.** Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 63-71.
- Yu, C., M. Mullins, G. Warren, M. Koziel & J. Estruch. 1997.** The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 532-536.

Tabela 1. Sequências dos primers gerais e específicos para genes *cry*.

Primers	Sequências	Referências	Tamanho produto(bp)	TA (°C)
Geral-cry1	5'-CTGGATTTACAGGTGGGGATAT-3'(d) 5'-TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT-3'(r)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	543-594 pb	52
Geral-cry2	5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'(d) 5'-CGGATAAAAATAATCTGGGAAATAGT-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	689-701 pb	52
Geral-cry3	5'-CGTTATCGCAGAGAGATGACATTAAC-3'(d) 5'-CATCTGTTGTTCTCGGAGGCAAT-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	589-604 pb	52
Geral-cry4	5'-GCATATGATGTAGCGAAACAAGCC-3'(d) 5'-GCGTGACATACCCATTTCCAGGTCC-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	439 pb	52
Geral-cry8	5'-AAGCAGTGAATGCCTTGTTAC-3'(d) 5'-CTTCTAAACCTTGACTACTT-3'(r)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	511-679 pb	49
Geral-cry9	5'-CCAGGWTTYAYAGGAGGRG-3'(d) 5'-ASCAYRACACTAAATTTGCCGC-3'(r)	*	497 pb	51
Geral-cry11	5'-TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC-3'(d) 5'-CATTGTACTTGAAGTTGTAATCCC-3'(r)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	305 pb	51
Geral-cyt	5'-AACCCCTCAATCAACAGCAAGG-3'(d) 5'-GGTACACAATACATAACGCCACC-3'(r)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	522-525 pb	51
Geral-vip	5'-ACNTTYCAYGAYGTNATG-3'(d) 5'-CCNARNGGCRTRTANAY-3'(r)	*		53
Spe-cry1Aa	IAa (TTCCCTTATTGGGAATGC) I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)	1286 pb	52
Spe-cry1Aa	TYIAA (GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC) TYIUN12 (ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	723 pb	52
Spe-cry1Ab	IAb (CGGATGTCATAGAGGAGAA) I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)	1371 pb	52
Spe-cry1Ab	TY6 (GGTCGTGGCTATATCCTTCGTGTCACAGC) TY14 (GAATTGCTTTCATAGGCTCCGTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	274 pb	52
Spe-cry1Ac	IAc (GGAAACTTTCTTTTAATGG) I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)	844 pb	52
Spe-cry1Ac	TYIAC (TCACTTCCCATCGACATCTACC) TYIUN12 (ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	619 pb	52
Spe-cry1B	IB (GGCTACCAATACTTCTATTA) I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)	1323 pb	52
Spe-cry1B	TYIB (GTCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC) TYIUN12 (ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	1268 pb	52
Spe-cry1C	IC (ATTAAATTTACGTGGTGTG) I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)	1176 pb	52
Spe-cry1C	TYIC (CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTTC) TYIUN12 (ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	720 pb	52
Spe-cry1D	TYID (GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC) TYIUN12 (ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	721 pb	52
Spe-cry1F	IF (GATTTTCAGGAAGTGATTCAT) I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)	Juárez-Pérez <i>et al.</i> (1997)	967 pb	52
Spe-cry1F	TYIF (CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC) TYIUN12 (ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC)	Kalman <i>et al.</i> (1993)	434 pb	52
Spe-cry1I	I-FW (ACAATTTACAGCTTATTAAG) I-RV (CTACATGTTACGCTCAATAT)	Porcar & Juárez-Pérez (2003)		52
Spe-cry2A	2-FW (CGATATGTTAGAATTTAGAAC) 2-RV (TACCGTTTATAGTAACTCG)	Porcar & Juárez-Pérez (2003)		52
Spe-cry2Aa1	5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'(d) EE-2Aa(r) (GAGATTAGTCGCCCTATGAG)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	498 pb	52
Spe-cry2Ab2	5'-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG-3'(d) EE-2Ab(r) (TGGCGTTAACAATGGGGGGAGAAAT)	Ben-Dov <i>et al.</i> (1997)	546 pb	52
Spe-cry8A	spe-cry8A(d) (ATGAGTCCAAATAATCTAAATG) spe-cry8A(r) (TCTCCCATATATCTACGCTC)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	338 pb	49
Spe-cry8B	spe-cry8B(d) (ATGAGTCCAAATAATCTAAATG) spe-cry8B(r) (GAACATCTCGTAAGGCTC)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	510 pb	49
Spe-cry9C	spe-cry9C(d) (CTGGTCCGTTCAATCC) spe-cry9C(r) (CCGCTTCCAATAACATCTTTT)	Bravo <i>et al.</i> (1998)	306 pb	51

*Iniciadores delineados a partir de alinhamentos de sequências dos genes *cry9* e *vip* depositados no GENBANK
TA, Temperatura de anelamento.

Tabela 2. Médias de mortalidade percentual (\pm EP) de *Diatraea saccharalis* e *Diatraea flavipennella* a isolados de *Bacillus thuringiensis* com 10^8 cristais + esporos/mL.

Isolados	<i>D. saccharalis</i>			<i>D. flavipennella</i>		
	3° dia	5° dia	7° dia	3° dia	5° dia	7° dia
LIIT-0105	96,87 \pm 3,12 ab ¹	97,91 \pm 2,08 ab	98,95 \pm 1,04 a	97,91 \pm 2,08 abc ¹	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a
LIIT-0106	46,87 \pm 40,62 abcd	52,08 \pm 41,66 abcd	59,37 \pm 36,45 abc	*	*	*
LIIT-0107			-----			-----
LIIT-0302	81,25 \pm 6,25 abc	90,62 \pm 1,04 abc	94,79 \pm 5,20 a	69,79 \pm 11,45 abcde	96,87 \pm 1,04 ab	100 \pm 0,00 a
LIIT-0526	90,62 \pm 9,37 ab	96,87 \pm 3,12 ab	97,91 \pm 2,08 a	38,54 \pm 3,12 de	60,41 \pm 0,00 bc	70,83 \pm 0,00 bc
LIIT-0706	75 \pm 10,41 abc	88,54 \pm 7,29 abc	94,79 \pm 3,12 a	44,79 \pm 11,45 cde	58,33 \pm 10,41 bc	62,50 \pm 10,41 c
LIIT-1411	45,83 \pm 41,66 abcd	51,04 \pm 44,79 abcd	57,29 \pm 40,62 abc	76,04 \pm 21,87 abcde	86,45 \pm 11,45abc	90,62 \pm 7,29 abc
LIIT-2109	22,92 \pm 2,08 bcd	22,92 \pm 2,08 bcd	55,20 \pm 1,04 abc	19,79 \pm 1,04 e	39,58 \pm 8,33 c	51,04 \pm 11,45 c
LIIT-2112			-----			-----
LIIT-2204	63,54 \pm 3,12 abcd	86,45 \pm 3,12 abc	97,70 \pm 1,04 a	30,20 \pm 7,29 de	43,76 \pm 0,00 c	59,37 \pm 5,20 c
LIIT-2310			-----	33,33 \pm 0,00 de	62,50 \pm 4,16 bc	75 \pm 2,08 abc
LIIT-2403			-----			-----
LIIT-2601	26,04 \pm 1,04 bcd	38,54 \pm 1,04 abcd	45,83 \pm 0,00 abc	97,91 \pm 0,00 abc	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a
LIIT-2707	24,29 \pm 7,62 abcd	36,96 \pm 11,96 abcd	54,96 \pm 3,63 abc	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a
LIIT-2718			-----			-----
LIIT-2902			-----			-----
LIIT-3303	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	73,95 \pm 5,20 abcde	89,58 \pm 0,00 abc	97,91 \pm 2,08 ab
LIIT-3509	66,40 \pm 8,60 abcd	89,45 \pm 2,21 abc	93,66 \pm 3,63 a	51,04 \pm 7,29 abcde	72,91 \pm 6,25 abc	84,37 \pm 7,29 abc
LIIT-3818	96,87 \pm 1,04 ab	96,87 \pm 1,04 ab	98,95 \pm 1,04 a	58,33 \pm 6,25 abcde	77,08 \pm 6,25 abc	86,45 \pm 1,04 abc
LIIT-4108			-----	29,16 \pm 0,00 de	59,37 \pm 1,04 bc	69,79 \pm 1,04 bc
LIIT-4211			-----	32,29 \pm 26,04 de	44,79 \pm 34,37 c	57,29 \pm 30,20 c
LIIT-4306	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	98,95 \pm 1,04 ab	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a
LIIT-4311	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	98,95 \pm 1,04 ab	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a
LIIT-4406	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	85,41 \pm 14,58 abcd	97,91 \pm 2,08 ab	100 \pm 0,00 a
<i>Btk</i>	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a	100 \pm 0,00 a
<i>Btt</i>	45,83 \pm 6,25 abcd	69,80 \pm 3,12 abcd	80,20 \pm 5,20 ab	45,83 \pm 6,25 cde	67,70 \pm 1,04 abc	81,25 \pm 2,08 abc

¹Médias (\pm EP) seguida pela mesma letra da coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
 ----- Isolados que causaram mortalidade < 30% para *Diatraea saccharalis* ou *Diatraea flavipennella* no 7° dia.
 * Isolado não testado.

Tabela 3. Suscetibilidade de *Diatraea saccharalis* a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	N ¹	Inclinação ±EP ²	CL ₅₀ (IC 95%) ³	CL ₉₀ (IC 95%) ³	χ ² (GL) ⁴	<i>Btk</i> RT ₅₀ (IC 95%) ⁵	<i>Btt</i> RT ₅₀ (IC 95%) ⁶
LIIT-0105	224	1,33 ± 0,17	0,08 (0,03-0,17)	0,68 (0,29-3,45)	7,66 (5)	18,59 (9,86-35,02)*	4382 (2114-9082)*
LIIT-4406	224	1,37 ± 0,21	0,46 (0,24-0,76)	3,94 (2,20-9,74)	0,72 (5)	3,35 (1,63-6,88)*	789 (352-1767)*
LIIT-4311	208	0,88 ± 0,12	0,51 (0,15-1,23)	14,35 (5,41-72,60)	5,23 (5)	3,02 (1,26-7,23)*	713 (277-1831)*
<i>B.t. kurstaki</i>	224	1,20 ± 0,14	1,54 (0,95-2,45)	4,22 (2,65-7,35)	4,19 (5)	1 (0,51-1,94)	235 (110-501)*
LIIT-3303	224	1,13 ± 0,16	2,53 (1,29-4,42)	33,86 (17,60-89)	1,81 (5)	0,61 (0,28-1,3)	144 (62-335)*
LIIT-0526	224	1,33 ± 0,16	3,82 (2,41-5,94)	34,76 (19,60-80,79)	1,50 (5)	0,40 (0,21-0,77)*	95,19 (45,43-199)*
LIIT-4306	224	1,13 ± 0,22	7,25 (2,41-14,07)	97 (50,10-289,97)	3,16 (5)	0,21 (0,08-0,54)*	50,28 (18,50-136)*
LIIT-3818	208	0,99 ± 0,12	8,15 (4,53-13,81)	160 (81,20-425)	3,62 (5)	0,18 (0,09-0,39)*	44,61 (19,88-100)*
LIIT-0302	224	1,33 ± 0,15	25,19 (16,25-30,30)	229 (128,80-523,11)	3,80 (5)	0,06 (0,03-0,11)*	14,45 (6,9-30)*
LIIT-0706	224	1,24 ± 0,17	38 (21,30-63,17)	406 (219-1021)	4,50 (5)	0,04 (0,02-0,04)*	9,6 (4,33-21,29)*
LIIT-2204	224	1,03 ± 0,11	142 (56,81-400)	2482 (757,24-27309)	9,09 (5)	0,01 (0,005-0,02)*	2,58 (1,17-5,65)*
LIIT-3509	208	1,48 ± 0,18	159,41 (105-243,14)	1159 (670,25-2625)	2,96 (5)	0,001 (0,005-0,01)*	2,28 (1,11-4,70)*
LIIT-2109	192	1,17 ± 0,14	342 (145,42-739)	4203 (1704-21836)	6,64 (5)	0,004 (0,002-0,009)*	1,06 (0,48-2,31)
<i>B.t. tolworthi</i>	224	1,37 ± 0,31	365 (93,77-745)	876,69 (412-2700)	5,32 (5)	0,004 (0,002-0,009)*	1 (0,43-2,30)
LIIT-2707	224	0,85 ± 0,10	4104 (1686-10708)	130760 (38468-1248200)	6,12 (5)	0,0004 (0,0001-0,0008)*	0,089 (0,03-0,20)*

^{1a} Número total de insetos testados.

² Inclinação ± Erro padrão.

³ Esporos+cristais×10⁸/mL de NaCl a 0,9%.

⁴ Qui-quadrado e Grau de liberdade.

⁵ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e os isolados de *Bacillus thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Diatraea saccharalis*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992). * Razão de toxicidade significativa para isolados de *Bacillus thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

⁶ Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi* (*Btt*) e os isolados de *Bacillus thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Diatraea saccharalis*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992).

*Razão de toxicidade significativa para isolados de *Bacillus thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 4. Suscetibilidade de *Diatraea flavipennella* a isolados de *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	N ¹	Inclinação ±EP ²	CL ₅₀ (I C95%) ³	CL ₉₀ (IC 95%) ³	χ ² (GL) ⁴	Btk RT ₅₀ (IC 95%) ⁵	Btt RT ₅₀ (IC 95%) ⁶
LIIT-2707	224	1,65 ± 0,22	0,40 (0,26-0,61)	0,84 (0,56-1,38)	4,99 (5)	11,52 (5,8-22,66)*	1137 (601-2148)*
LIIT-4311	224	1,48 ± 0,21	0,70 (0,41-1,10)	5,10 (2,97-11,37)	4,79 (5)	6,70 (3,2-13,76)*	660 (333-1308)*
LIIT-2601	224	1,14 ± 0,13	0,81 (0,48-1,31)	10,68 (5,67-26,81)	1,62 (5)	5,80 (2,8-12,04)*	573 (286-1145)*
LIIT-4306	224	1,35 ± 0,19	2,64 (1,50-4,28)	23,27 (13,01-56,32)	0,86 (5)	1,78 (0,84-3,75)	175 (86-357)*
LIIT-0105	224	1,08 ± 0,21	3,67 (1,80-6,83)	11,23 (6,10-28)	0,79 (5)	1,28 (0,56-2,92)	126 (57-279)*
LIIT-1411	224	0,58 ± 0,07	4,22 (1-29,40)	33,90 (7,20-956)	10,53(5)	1,11 (0,43-2,90)	110 (43-278)*
<i>B.t. kurstaki</i>	224	1,18 ±0,15	4,71 (2,61-7,87)	13,03 (7,80-23,41)	1,36 (5)	1 (0,46-2,15)	98 (47,5-205)*
LIIT-4406	224	1,75 ± 0,23	8,56 (5,81-12,62)	46,16 (28,27-96,85)	0,94 (5)	0,54 (0,28-1,06)	54,21 (29,11-100)*
LIIT-3303	224	0,87 ± 0,10	32,00 (12,38-78,53)	943 (310,25-6471)	6,53 (5)	0,14 (0,06-0,33)*	14,50 (6,72-31,30)*
LIIT-3818	224	0,95 ± 0,11	35,00 (19,00-62,00)	778,33 (369-2262)	4,65 (5)	0,13 (0,06-0,30)*	13,35 (6,21-28,70)*
LIIT-0302	224	1,04 ± 0,11	38,30 (23,27-63,42)	122 (73,12-229)	2,98 (5)	0,12 (0,06-0,26)*	12,15 (6,03-24,48)*
LIIT-4211	224	1,36 ± 0,25	43,37 (15,48-84,47)	375,56 (172,17-2335)	5,31 (5)	0,11 (0,05-0,23)*	10,72 (5,15-22,28)*
LIIT-0706	224	1,16 ± 0,18	117,09 (59,63-203)	331,25 (190,92-627,53)	4,17 (5)	0,04 (0,0001-17,22)	3,96 (0,009-1692)
LIIT-2310	224	0,80 ± 0,09	124,31 (42,34-463)	556,71(179,86-3993)	9,56 (5)	0,038 (0,01-0,08)*	3,71 (1,70-8,14)*
LIIT-0526	224	1,33 ± 0,21	204,63 (115,64-333)	507 (312-930,21)	2,32 (5)	0,023 (0,01-0,05)*	2,27 (1,12-4,61)*
LIIT-3509	224	0,64 ± 0,10	224,49 (96,31-543,68)	21739 (5760-215930)	1,47 (5)	0,02 (0,008-0,06)*	2,05 (0,77-5,45)
LIIT-4108	224	0,93 ± 0,10	246,45 (145,45-423,31)	5758 (2703-16950)	4,87 (5)	0,02 (0,009-0,04)*	1,87 (0,90-3,86)
<i>B.t. tolworthi</i>	224	1,53 ± 0,29	466,34 (186,91-928,82)	1022 (526-2870)	5,74 (5)	0,01 (0,005-0,02)*	1 (0,49-2,00)
LIIT-2204	224	0,88 ± 0,10	534,27 (308,63-953,61)	2096 (1156-4516)	3,04 (5)	0,009 (0,004-0,02)*	0,86 (0,41-1,82)
LIIT-2109	224	1,18 ± 0,14	542,75 (240,44-1169)	1499 (717,21-4030)	6,90 (5)	0,009 (0,004-0,02)*	0,85 (0,42-1,71)

¹Número total de insetos testados.

²Inclinação ± Erro padrão.

³Esporos+cristais×10⁸/mL de NaCl a 0,9%.

⁴Qui-quadrado e Grau de liberdade.

⁵Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) e os isolados de *Bacillus thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Diatraea flavipennella*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992). * Razão de toxicidade significativa para isolados de *Bacillus thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

⁶Razão de toxicidade: razão das estimativas da CL₅₀ entre *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi* (Btt) e os isolados de *Bacillus thuringiensis* testados sobre larvas neonatas de *Diatraea flavipennella*, calculada através do método de Robertson & Preisler (1992).

*Razão de toxicidade significativa para isolados de *Bacillus thuringiensis*, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0.

Tabela 5. Conteúdo gênico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e das linhagens padrões, com genes universais, obtido por PCR.

Isolados	Genes universais									CL ₅₀ (IC 95%) ¹	
	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry3</i>	<i>cry4</i>	<i>cry8</i>	<i>cry9</i>	<i>cry11</i>	<i>cyt</i>	<i>vip</i>	<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>Diatraea flavipennella</i>
<i>B.t. kurstaki</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1,54 (0,95-2,45)	4,71 (2,61-7,87)
<i>B.t. tolworthi</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	365 (93,77-745)	466,34 (186,91-928,82)
LIIT-0105	+	+	-	-	+	+	-	-	-	0,08 (0,03-0,17)	3,67 (1,80-6,83)
LIIT-0302	+	+	-	-	-	+	-	-	-	25,19 (16,25-30,30)	38,30 (23,27-63,42)
LIIT-0526	+	+	-	-	-	+	-	-	-	3,82 (2,41-5,94)	204,63 (115,64-333)
LIIT-0706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38 (21,30-63,17)	117,09 (59,63-203)
LIIT-1411	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	4,22 (1-29,40)
LIIT-2109	+	+	-	-	-	+	-	-	-	342 (145,42-739)	542,75 (240,44-1169)
LIIT-2204	+	+	-	-	-	+	-	-	-	142 (56,81-400)	534,27 (308,63-953,61)
LIIT-2310	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	124,31 (42,34-463)
LIIT-2601	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	0,81 (0,48-1,31)
LIIT-2707	+	+	-	-	-	+	-	-	-	4104 (1686-10708)	0,40 (0,26-0,61)
LIIT-3303	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2,53 (1,29-4,42)	32,00 (12,38-78,53)
LIIT-3509	-	+	-	-	-	+	-	-	-	159,41 (105-243,14)	224,49 (96,31-543,68)
LIIT-3818	-	+	-	-	-	+	-	-	-	8,15 (4,53-13,81)	35,00 (19,00-62,00)
LIIT-4108	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	246,45 (145,45-423,31)
LIIT-4211	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	43,37 (15,48-84,47)
LIIT-4306	+	+	-	-	+	+	-	-	-	7,25 (2,41-14,07)	2,64 (1,50-4,28)
LIIT-4311	+	+	-	-	+	+	-	-	-	0,51 (0,15-1,23)	0,70 (0,41-1,10)
LIIT-4406	+	+	-	-	+	+	-	-	-	0,46 (0,24-0,76)	8,56 (5,81-12,62)

¹Esporos + cristais (x10⁵)/mL de NaCl a 0,9%.

Tabela 6. Conteúdo gênico dos isolados de *Bacillus thuringiensis* e das linhagens padrão, com genes específicos, obtido por PCR.

Isolados	Genes específicos														CL ₅₀ (IC 95%) ¹	
	<i>cryIAa</i>	<i>cryIAb</i>	<i>cryIAc</i>	<i>cryIB</i>	<i>cryIC</i>	<i>cryID</i>	<i>cryIF</i>	<i>cryII</i>	<i>cry2A</i>	<i>cry2Aa1</i>	<i>cry2Ab2</i>	<i>cry8A</i>	<i>cry8B</i>	<i>cry9C</i>	<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>Diatraea flavipennella</i>
<i>B.t. kurstaki</i>	-	+	+	*	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	1,54 (0,95-2,45)	4,71 (2,61-7,87)
<i>B.t. tolworthi</i>	-	+	-	*	+	-	*	+	+	+	-	-	-	-	365 (93,77-745)	466,34 (186,91-928,82)
LIIT-0105	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	0,08 (0,03-0,17)	3,67 (1,80-6,83)
LIIT-0302	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	25,19 (16,25-30,30)	38,30 (23,27-63,42)
LIIT-0526	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	3,82 (2,41-5,94)	204,63 (115,64-333)
LIIT-0706	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38 (21,30-63,17)	117,09 (59,63-203)
LIIT-1411	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	4,22 (1-29,40)
LIIT-2109	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	342 (145,42-739)	542,75 (240,44-1169)
LIIT-2204	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	142 (56,81-400)	534,27 (308,63-953,61)
LIIT-2310	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	124,31 (42,34-463)
LIIT-2601	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	0,81 (0,48-1,31)
LIIT-2707	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	4104 (1686-10708)	0,40 (0,26-0,61)
LIIT-3303	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,53 (1,29-4,42)	32,00 (12,38-78,53)
LIIT-3509	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	159,41 (105-243,14)	224,49 (96,31-543,68)
LIIT-3818	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,15 (4,53-13,81)	35,00 (19,00-62,00)
LIIT-4108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	246,45 (145,45-423,31)
LIIT-4211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	43,37 (15,48-84,47)
LIIT-4306	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7,25 (2,41-14,07)	2,64 (1,50-4,28)
LIIT-4311	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	0,51 (0,15-1,23)	0,70 (0,41-1,10)
LIIT-4406	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	0,46 (0,24-0,76)	8,56 (5,81-12,62)

¹Esporos+cristais (x10⁵)/ mL de NaCl a 0,9%.

* Não estimado.