

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a proteína
inseticida mutante de Cry1Ab

Beatriz Batista Rocha

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Coorientadora: Dra. Kelly Cristina Gonçalves

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para graduação em ENGENHARIA
AGRONÔMICA.

Jaboticabal – SP

10º SEMESTRE/2021

R672s	<p>Rocha, Beatriz Batista</p> <p>Suscetibilidade de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae) a proteína inseticida mutante de Cry1Ab / Beatriz Batista Rocha. -- Jaboticabal, 2022</p> <p>38 p. : tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: Ricardo Antônio Polanczyk</p> <p>Coorientadora: Kelly Cristina Gonçalves</p> <p>1. Resistência aos inseticidas. 2. Mutagênese. 3. Biologia molecular. 4. Efeito letal. 5. Cristal proteico. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: Ciências da Produção Agrícola

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

TÍTULO: Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a proteína inseticida mutante CryIAb

ACADÊMICO: Beatriz Batista Rocha

CURSO: Engenharia Agrônômica

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)
Presidente	Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk
Membro	Prof. Dra. Renata de Lima
Membro	Prof Dr. Adriano Arrué Melo

(Assinaturas)

Jaboticabal 07 / 12 / 21

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 14 / 12 / 2021 Ad referendum

Chefe do Departamento

DEDICO

Aos meus amados pais

Neide Batista de Oliveira

Barcelos, José Eustáquio

Barcelos (*in memoriam*),

por todo apoio e amor.

“Without ambition one starts nothing. Without work one finishes nothing. The prize will not be sent to you. You have to win it.”

Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTO

À DEUS, por tudo que sou, e tudo que irei me tornar. Pela família linda que possuo, ao privilégio da vida, e as lutas que enfrentei e as conquistas que alcancei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk, e a minha orientadora Dra. Kelly Cristina Gonçalves por terem acreditado em mim, pelo incentivo, pela paciência, amizade, ensinamentos e orientação na condução do desafio de realizar este trabalho. Por instigarem o meu lado cientista e não somente executar uma pesquisa.

Aos meu pais, e aos meus irmãos: Roliney, Gercy, Odineia e Ednalva por me encherem de alegria, e por estarem comigo em todos os momentos. Agradeço também ao meu namorado Álvaro pelo apoio, aos meus amigos Stefania, Gabriel, Tales que estiveram comigo ao longo desses 5 anos. O bom da vida é ter vocês ao meu lado.

À FCAV UNESP – Jaboticabal pelo ensino durante esses anos, ao Departamento de Produção Agrícola, em especial ao Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP) por permitir que o projeto fosse executado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa – nº do processo: 2020/13537-6.

Aos meus professores de graduação, em especial Dr. Jairo Osvaldo Cazetta, Dra. Lucia Maria Carareto Alves por serem tão ávidos na arte de ensinar. Ao Dr. Igor e aos pós graduandos Raquel, Jardel, Joacir por todo ensinamento e companhia na pesquisa e pela amizade.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese.....	10
Tabela 2. Faixa de concentrações de proteínas inseticidas Cry1Ab mutantes e selvagem utilizadas para a estimativa da CL ₅₀ em lagartas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	14
Tabela 3. Mortalidade corrigida (%) causada por toxinas modificadas e selvagem de Cry1Ab em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> da população resistente.....	17
Tabela 4. Mortalidade corrigida (%) causada por toxinas modificadas e selvagem de Cry1Ab em lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> da população suscetível.	17
Tabela 5. Atividade inseticida de Cry1Ab selvagem e mutantes contra lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> da população suscetível.	18

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO GERAL.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797)	4
3.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
4.1 Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> (FAW)	8
4.2 Obtenção de proteínas inseticidas mutantes de Cry1Ab.....	10
4.3 Bioensaios de suscetibilidade de <i>S. frugiperda</i>	13
4.3.1 Teste de Patogenicidade.....	13
4.3.2 Ensaio de virulência	14
5. RESULTADOS.....	16
5.1. Perfil proteico	16
5.2. Testes de patogenicidade.....	16
5.3. Estimativa da CL50 para a população suscetível	17
6. DISCUSSÃO	18
7. CONCLUSÃO	21
8. REFERÊNCIAS.....	21

**Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)
a proteína inseticida mutante de Cry1Ab**

RESUMO

A *Spodoptera frugiperda* é uma praga polífaga, com grande variabilidade genética, além disso, possui alta capacidade reprodutiva e migratória, que a permitiu recentemente invadir o continente asiático. As principais formas de controle, produtos químicos e plantas Bt tem apresentado problemas devido a rápida evolução da resistência, devido à exposição de pragas a baixa dose e mutações em genes que codificam receptores. Uma alternativa é a utilização de toxinas mutantes de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para quebrar da resistência. Nesse estudo foi avaliada o potencial de toxicidade das proteínas inseticidas mutantes de Cry1Ab G439D e N514A em duas populações de *S. frugiperda*, uma população suscetível e outra resistente a Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2. Para tanto, realizou-se a extração, quantificação das proteínas e testes de suscetibilidade de *S. frugiperda*, utilizando-se 100 lagartas de primeiro instar por tratamento e sete concentrações das proteínas inseticidas. Somente na população suscetível as concentrações letais CL₅₀ e CL₉₀ foram estimadas, pois a população resistente apresentou baixa suscetibilidade e a proteínas inseticida mutante Cry1AbN514A foi a mais virulenta com CL₅₀ estimada oito vezes maior do que a toxina selvagem.

Palavras-chave: Resistência aos inseticidas, Mutagênese, Biologia molecular, Efeito letal, Cristal proteico.

Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ab mutant insecticidal protein

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda is a polyphagous pest, with great genetic variability, in addition, it has a high reproductive and migratory capacity, which has recently started to invade the Asian continent. As the main forms of control, chemicals and Bt plants have presented problems due to the rapid evolution of resistance, due to exposure to low-dose pests and mutations in genes that encode receptors. An alternative is to use mutant toxins from *Bacillus thuringiensis* (Bt) to break down resistance. In this study, the potential for toxicity of mutant insecticidal proteins of Cry1Ab G439D and N514A in two populations of *S. frugiperda*, a susceptible population and a resistant population to Cry1F, Cry1A.105 and Cry2Ab2. For that, the extraction, quantification of proteins and susceptibility tests of *S. frugiperda* were carried out, using 100 first-instar caterpillars per treatment and seven concentrations of insecticidal proteins. Only in the susceptible population the lethal concentrations LC50 and LC90 were estimated, as the resistant population showed low susceptibility and the mutant insecticide protein Cry1AbN514A was the most virulent with LC50 estimated eight times higher than the wild toxin.

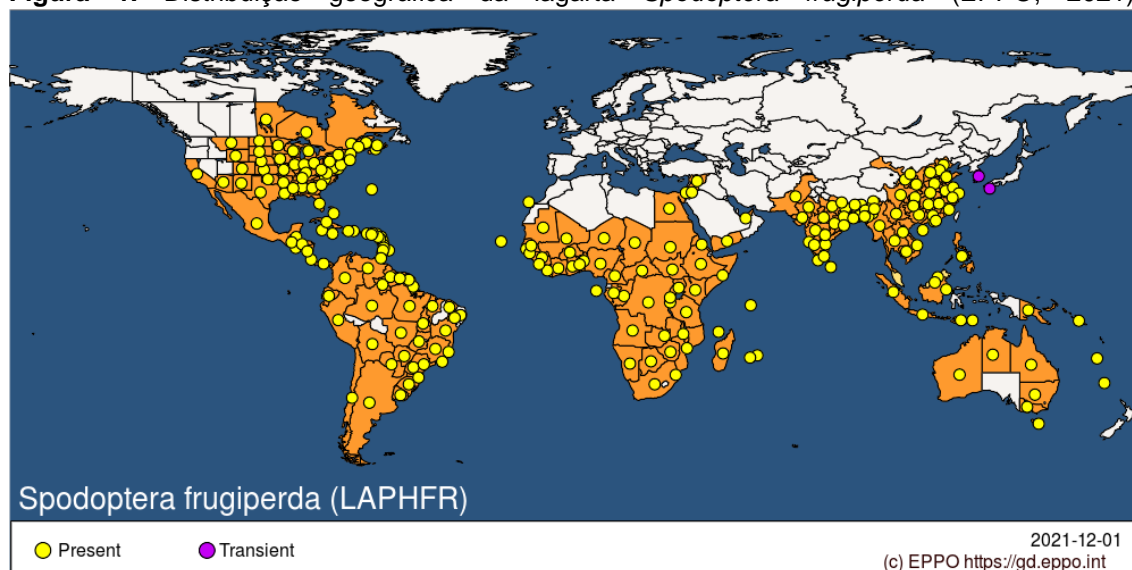
Keywords: Insecticide resistance, Mutagenesis, Molecular biology, Lethal effect, Protein crystal.

1. INTRODUÇÃO

A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) pertence à família Noctuidae, tem sua origem nas regiões tropicais e subtropicais da América (Li et al., 2019). Embora tenha preferência por gramíneas, principalmente o milho, é um inseto polífago, tendo mais de 350 plantas hospedeiras (MONTEZANO et al., 2018; FERNANDES et al., 2013). Ao se estimar perdas no rendimento, o ataque dessa praga pode causar uma queda superior a 50%, dependendo do genótipo do milho e do estágio de desenvolvimento da planta, e por consequência as medidas necessárias para o seu controle impactam os custos de produção (BLANCO et al., 2016; CRUZ, 2010; GALVÃO et al., 2015; WANG et al., 2020).

Essa praga inicialmente foi relatada na África, pouco tempo depois na Ásia e na Austrália, devido a sua capacidade reprodutiva e migratória (Figura 1) (GEOGEN et al., 2016; BAUDRON et al., 2019; EPPO, 2021). O impacto econômico precisa ser estudado e as ferramentas para o controle ainda precisam ser aperfeiçoados em nível global, priorizando soluções mais econômicas e menos danosas ao ambiente produtivo (OVERTON et al., 2021). Por essa razão, o controle utilizando plantas Bt, que expressam toxinas inseticidas Cry ou Vip tem sido amplamente adotado para o controle desta praga (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2020).

Figura 1. Distribuição geográfica da lagarta *Spodoptera frugiperda* (EPPO, 2021).



Todavia, a alta pressão de seleção das plantas Bt, ou seja, a eliminação de indivíduos suscetíveis em uma população da praga, com prevalência de indivíduos resistentes, causa uma rápida evolução de resistência. Como resultado deste processo ocorrem falhas no controle, que podem ter como causa a alta exposição às plantas Bt ligado a baixa dose da proteína inseticida (STORER *et al.*, 2010; FARIAS *et al.*, 2014), bioecologia das pragas (HARRISON *et al.*, 2019), baixa adoção de áreas de refúgio (KAUR *et al.*, 2019) e cultivo de eventos transgênicos que expressam proteínas com o mesmo modo de ação (resistência cruzada) (VÉLEZ *et al.*, 2013; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2014; JURAT- FUENTES & CRICKMORE, 2017; TABASHNIK & CARRIÈRE, 2019).

Conseqüentemente, o manejo da evolução da resistência das plantas Bt é essencial para as agências reguladoras, produtores e empresas do agronegócio (CARRIÈRE, 2020). Segundo Burtet *et al.*, (2017), o combate a populações resistentes ao milho Bt que expressam Cry1 e Cry2, na região sul do

Brasil, tem exigido muitas pulverizações com inseticidas sintéticos para que o controle da praga seja eficiente.

No Brasil, casos de resistência às tecnologias de milho Bt Herculex[®], que expressa a proteína Cry1F e YieldGard[®], que expressa a proteína Cry1Ab foram observados no campo (FARIAS *et al.*, 2014; OMOTO *et al.*, 2016). Há também resistência a eventos piramidados, como exemplo, a que foi estudada nesta pesquisa sobre a tecnologia PowerCore[®] a qual expressa três toxinas de forma piramidada (Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2) (MURARO *et al.*, 2019).

Uma das formas de reverter ou retardar a evolução da resistência é induzir mutações nas toxinas selvagens com objetivo de aumentar a sua toxicidade (WANG *et al.*, 2019; GOMÉZ *et al.*, 2018; De MAAGD *et al.*, 1996). O Instituto de Biotecnología da Universidad Nacional Autónoma do México (UNAM) tem realizado substituições de aminoácidos no domínio II e III de Cry1Ab, em um estudo foi avaliado o efeito sobre uma população brasileira de *Spodoptera frugiperda*, resultando em um aumento significativo da atividade inseticida (GOMÉZ *et al.*, 2018). Pesquisas que buscam construir mutantes de Cry são de grande valia, pois favorecem o desenvolvimento de toxinas com atividade aprimorada contra pragas alvo.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar o efeito de proteínas Cry1Ab mutantes em populações de *Spodoptera frugiperda*.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Criar as populações de *S. frugiperda*

2.2.2 Extração das proteínas Cry1Ab

2.2.3 Realizar os bioensaios de suscetibilidade de *S. frugiperda* as proteínas inseticidas mutantes e selvagens.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

Spodoptera frugiperda é um inseto originário da América tropical e subtropical (SISAY, 2019). O ciclo de vida desse inseto passa por quatro fases, sendo necessário de 3 a 5 dias para que ocorra a eclosão das lagartas, após os adultos colocarem as posturas sobre as folhas da planta (CRESPO *et al.*, 2021). A fase larval dura entre 14 a 22 dias, quando são menores, as lagartas raspam as folhas, ao aumentarem de tamanho começam a fazer perfurações nas plantas, devido ao nível elevado de canibalismo desta espécie as lagartas se dispersam a fim de aumentar as suas chances de sobrevivência (BENTIVENHA *et al.* 2017; PANNUTI *et al.* 2016). A fase seguinte é a de pupa, podendo durar de 7 a 13 dias e os adultos vivem por mais 10 a 12 dias (CRESPO *et al.*, 2021).

Por ser polífaga, esta lagarta possui muitas culturas hospedeiras de importância agrícola, a exemplo: milho, sorgo, arroz, soja, algodão e outras culturas (GUTIÉRREZ-MORENO *et al.*, 2019). O inseto adulto possui alta capacidade de voo, percorrendo grandes distâncias no período noturno, sendo

favorecido pela migração natural pelo vento, no entanto, é o comércio internacional o grande responsável pela rápida disseminação desta praga (PRIMEIROS *et al.*, 2018).

Em 2016, surgiu os primeiros relatos desta praga no continente africano, recentemente confirmou-se a ocorrência no continente asiático, o potencial danoso e migratório desta praga resultou em uma mobilização do governo chinês para criação de uma plataforma para o mapeamento da disseminação (KALLESHWARASWAMY *et al.*, 2018; GOERGEN *et al.*, 2016).

Os inseticidas químicos, bem como, as plantas Bt utilizados no controle de pragas embora eficazes possuem uma desvantagem em comum, a rápida evolução da resistência, sendo cada vez mais necessário descobrir novas moléculas com atividade inseticida. Entretanto, a descoberta destas novas moléculas está cada vez mais difícil, o que eleva o seu custo de desenvolvimento (PAREDES-SÁNCHEZ *et al.*, 2021).

3.2 *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, que na fase de esporulação produz inclusões cristalinas (cristais), onde estão contidas proteínas inseticidas conhecidas como δ -endotoxinas que possuem propriedades inseticidas contra várias espécies de importância agrícola e vetores de doenças humanas (BRAVO *et al.*, 2007; ADANG *et al.*, 2014). Pertence à família Bacillaceae, e apresenta formato de bastonete com 1 a 1,2 de comprimento por 3 a 5 μm (MIRALLES; PÉREZ, 2004).

Existem três hipóteses sobre o modo de ação das proteínas Cry, todavia, a teoria mais aceita é segundo Bravo et al. (2004), onde proteínas inseticidas Bt atuam formando poros na membrana. Após a lagarta ingerir o cristal, ele é dissolvido pelo pH alcalino do intestino médio do inseto, com isso, a protoxina de 130-140 kDa é então processada por ação de proteases presentes no lúmen, sendo ativada, a proteína final apresenta massa molecular de 65 kDa. Posteriormente, ocorre uma série de ligações de baixa e alta afinidade com receptores celulares, causando clivagem, oligomerização, formação de poros, lise osmótica que resulta na morte do inseto (BRAVO *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2009).

Essa bactéria comanda a maior parte do mercado de inseticidas biológicos, sendo apresentada em duas formas comerciáveis, uma delas como ingrediente ativo, e outra em plantas que expressam as proteínas inseticidas Cry e Vip. A previsão é que o mercado de agente de controle biológico ultrapasse o mercado dos inseticidas químicos em cerca de 30 anos (MARRONE, 2019).

As plantas transgênicas disponíveis no mercado expressam as proteínas inseticidas Cry e/ou Vip produzidas por *Bacillus thuringiensis*, podendo diminuir a quantidade de aplicações de defensivos químicos dependendo do espectro de ação da toxina empregada (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2020). Entretanto, esta ferramenta muito utilizada, quando não se adota áreas de refúgio contribui para a rapidez na seleção de indivíduos resistentes (ZHANG *et al.*, 2013). O refúgio serve para que os insetos homozigotos suscetíveis (SS) da área do cultivo de plantas não Bt consigam acasalar com os insetos homozigotos resistentes (RR) das áreas cultivadas com Bt, desta forma, grande parte dos indivíduos da

próxima geração seriam de insetos heterozigotos (SR) suscetíveis as proteínas inseticidas (BERNARDI *et al.*, 2016).

No Brasil, as primeiras gerações de milho Bt lançadas no mercado expressavam uma única proteína inseticida Bt (CTNBio, 2007, 2008). Contudo, a partir de 2009 houve a liberação da segunda geração de plantas, que expressam mais de uma proteína Bt, conhecidas como plantas piramidadas, com objetivo de retardar a evolução da resistência. Exemplos de plantas piramidadas estão os eventos MON 89034; Yieldgard VT PRO™ (Cry1A.105/Cry2Ab2); MON 89034 x TC 1507 PowerCore® (Cry1A.105/Cry2Ab2/Cry1F); MIR 162 x Bt 11 (CryAb/Vip3Aa20); TC1507 x MON 810 (Cry1F/Cry1Ab) (CTNBio, 2009; CTNBio, 2010).

A toxicidade das proteínas Cry em lepidópteros depende da sua interação com diferentes receptores presentes nas células do intestino médio, tais como caderina (CAD), aminopeptidase-N (APN), fosfatase alcalina (ALP), entre outras (Da SILVA *et al.*, 2018).

A maioria das proteínas Cry (89%) são compostas por uma estrutura tridimensional (3D), sendo que o domínio I apresenta um feixe de sete α -hélices e está envolvido na formação do poro e oligomerização da toxina. O domínio II é composto por folhas β anti-paralelas formando uma estrutura de β -prisma com loops expostos e está envolvido na interação com os receptores do intestino médio. O domínio III, por uma β -sanduíche com folhas β anti-paralelas e também está envolvido na interação de ligação com receptores (BRAVO *et al.*, 2007; ADANG *et al.*, 2014). Mutações nestes domínios tem sido empregada para

aumentar a toxicidade do Bt para espécies praga (De MAAGD *et al.*, 1996; GÓMEZ, *et al.*, 2018; GÓMEZ, *et al.*, 2020).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação de *Spodoptera frugiperda* (FAW)

No Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP), UNESP Campus Jaboticabal foi mantida a população de *S. frugiperda* suscetível (Sf-SUS) desde 2014, sem pressão de seleção por inseticidas, entomopatógenos ou proteínas inseticidas Bt.

A sala de criação de insetos era mantida a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa constante de $60 \pm 10\%$, ambiente favorável ao ciclo de desenvolvimento da praga, além disso, minimiza o risco por contaminações.

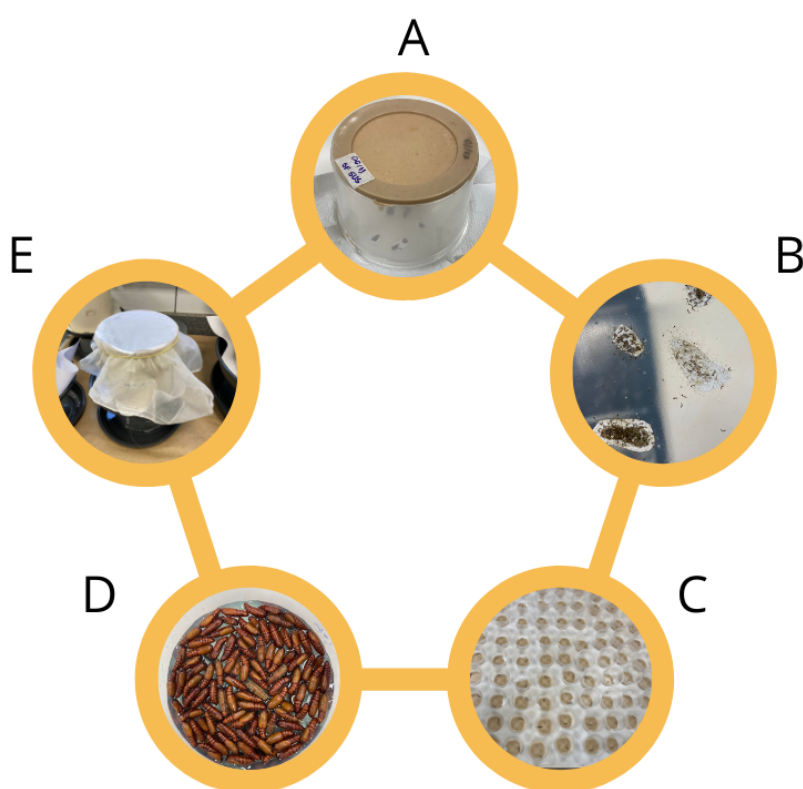
Pedaços de papel sulfite contendo as posturas de *S. frugiperda* foram coletados das gaiolas a cada três dias e transferidos para um recipiente plástico transparente (500 mL), contendo dieta artificial, quando as lagartas alcançaram o terceiro instar foram individualizadas em potes de plástico menores de (100 mL) contendo 50 g de dieta artificial, onde permaneceram até a fase de pupa (GREENE *et al.*, 1976).

As pupas foram recolhidas, lavadas com água, em seguida, com solução de sulfato de cobre a 1% e deixadas para secarem sobre o papel toalha, após secarem as pupas foram transferidas para recipientes plásticos (11,5 x 3,5 cm) com papel filtro sobre o fundo.

Quando os adultos (machos e fêmeas) emergiram foram transferidos para gaiolas de PVC (20 x 30 cm), a face superior das gaiolas foi vedada com tecido

voil, a face inferior é apoiada em prato de plástico (28 cm de diâmetro) coberto com papel filtro e toda a parede interna da gaiola foi recoberta com papel sulfite para coleta de massa de ovos. A alimentação dos adultos foi realizada com algodão embebido com solução de mel à 10% e 1mL de cerveja (Figura 2).

Figura 2. Criação de *Spodoptera frugiperda* em laboratório. A - Massa de ovos. B – Lagartas de 1º instar. C – Individualização de lagartas de 3º instar. D – Pupas. E – Gaiola contendo adultos.



O Dr. Oderlei Bernardi da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) Santa Maria-RS, forneceu a população de *S. frugiperda* resistente a tecnologia PowerCore® (Sf-PW). Foram semeadas a campo a cultivar de milho PowerCore 2A620PW, Corteva, Paracatu, MG, Brasil.

A seleção da população resistente foi realizada pelo método estabelecido de triagem em F2 Screen (ANDOW, 1998). A caracterização da resistência utilizada neste trabalho foi apresentada por Muraro *et al.*, (2019). A população

resistente foi mantida no LCMAP, com pressão de seleção a cada 2 gerações, utilizando folhas da tecnologia PowerCore®, que expressa as proteínas inseticidas Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2.

4.2 Obtenção de proteínas inseticidas mutantes de Cry1Ab

A Dra. Alejandra Bravo do Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma do México, Morelos, MEX forneceu as toxinas selvagem e mutantes que foram utilizadas neste estudo. As substituições nos resíduos G439D e N514A foram realizadas pelo método de mutagênese dirigida (QuikChange; Stratagene) de acordo com protocolo do fabricante (ARENAS *et al.*, 2010). Os oligonucleotídeos utilizados para a construção dos mutantes foram caracterizados por GÓMEZ *et al.* (2018).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na mutagênese.

Mutantes	Sequência	Região
G439D	5' – TGT <u>TTC</u> AAT GTT TCG AAG TGG CTT TAG TAA TAG TAG TGT AAG – 3'	Alça II do domínio II
N514A	5' – TCA ACC TTA AGA GTA <u>GCG</u> ATT ACT GCA CCA TTA TCA – 3'	β16 do domínio III

*Os locais onde houve as substituições de aminoácidos estão sublinhados.

O plasmídeo utilizado foi o pHT315 (MEZA *et al.*, 1996) que abriga o gene *cry1Ab* e os correspondentes oligonucleotídeos mutagênicos (Tabela 1). Os plasmídeos candidatos foram mutados e purificados a partir de células *Escherichia coli* (SC110) em ponto único de mutação (Tabela 1) e verificados por sequenciamento de DNA. Os plasmídeos purificados dessas células foram utilizados na transformação da cepa acristalífera de Bt 407- por eletroporação e

selecionados em meio Luria Bertani a 30 °C suplementado com 10 µg/ml de eritromicina.

No Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada - LGBBA foi realizada a extração das proteínas Cry1Ab. Os clones estavam em fitas de papel absorvente, mantidos em tubos na Incubadora do tipo MOD.

Para replicar os clones, uma fita de papel absorvente foi transferida para um microtubo estéril de 2 mL, em seguida, foram adicionados 1 mL de água deionizada estéril, e aguardado 24h antes do uso. Uma alíquota de 20 µL de bactéria foi transferida para tubos de 15 mL e incubadas por 12 h em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) suplementado com antibiótico eritromicina (10 µg / mL) a 30 ° C. As culturas foram inoculadas em meio de esporulação LB mais sais e incubadas por 72 horas a 30 ° C.

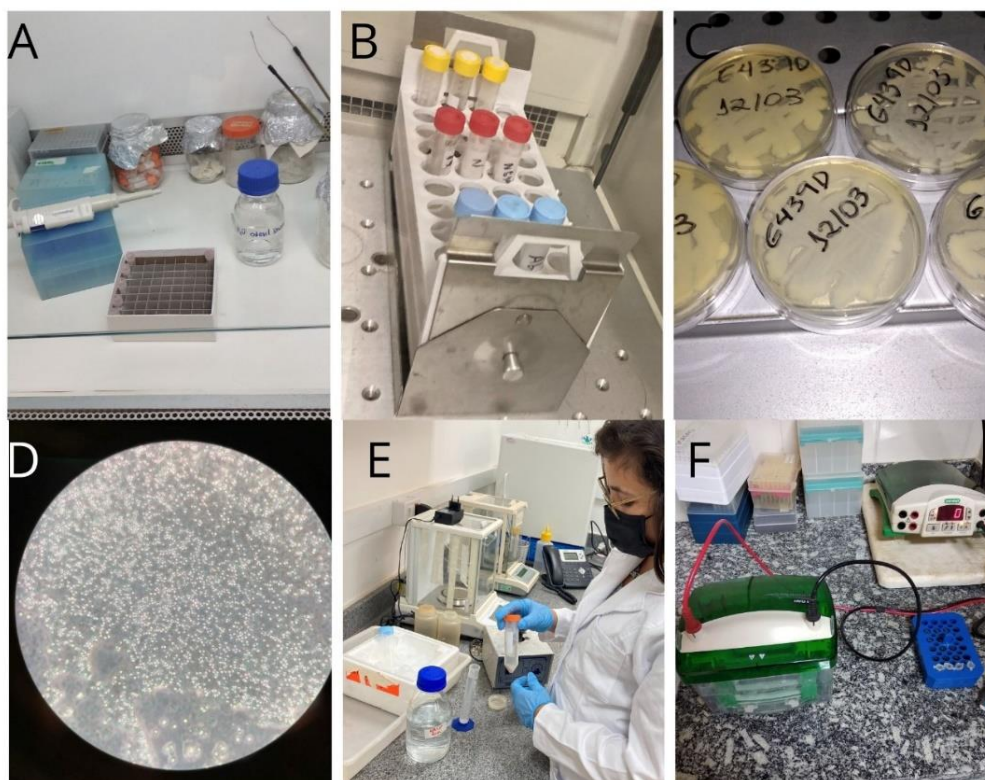
Após a esporulação completa confirmada por microscopia, a mistura de esporos e cristais foi raspada e suspensa em 30 mL de tampão de lavagem (NaCl 0,3 M; EDTA 0,01 M; pH 8,0) seguida de centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, por 3 vezes. O sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 20mL de solução de PMSF 1 mM e centrifugado a 10.000 rpm por 10 min, 3 vezes. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento recuperado com 20mL de tampão TTN (20 mM de tris, 300 mM de NaCl, 0,1% de triton x-100, pH 7,2) sendo centrifugado a 10.000 rpm (Jouan BR4i) por 10 minutos a 4 °C. O procedimento foi repetido por três vezes.

Para a solubilização dos cristais, o pellet foi ressuspensão em solução (50 mM Na₂CO₃ pH 10,5; utilizando NaHCO₃ para correção do pH; 0,2% β-mercaptoetanol), incubando por 2 horas a 37 °C sob agitação. Após o tempo de

solubilização, o material foi sonificado a três pulsos de um minuto com intervalos iguais de um minuto a 40 W. Ao final desse processo, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm, para remover as partículas insolúveis. O sobrenadante foi transferido para *ependorf* de 2mL e armazenado a -20° C.

Para verificar a expressão proteica foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato (SDS-PAGE) (12%). A proteína bruta quantificada por densitometria, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (Figura 3).

Figura 3. Etapas do Protocolo de Extração de Cry1Ab. A – Fita de papel contendo esporos de Cry1Ab. B – Preparação do pré-inóculo. C - Plaqueamento. D – Lâmina de Cry1Ab contendo mais de 90% de esporulação. E – Extração da proteína com diferentes tampões. F – Eletroforese de proteína.



4.3 Bioensaios de suscetibilidade de *S. frugiperda*

4.3.1 Teste de Patogenicidade

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, UNESP Jaboticabal. Na população de *Spodoptera frugiperda* resistente. Para o bioensaio uma alta concentração de 3000 ng.cm⁻² foi aplicada e a mortalidade corrigida foi calculada de acordo com Abbot (1925).

O teste de patogenicidade foi um teste qualitativo, sendo utilizado para selecionar os microrganismos que possuem capacidade de causar mortalidade (SHAPIRO-ILAN *et al.* 2005). Os tratamentos com mortalidade igual ou maior que 80% são considerados promissores para o controle da praga e são utilizados em etapas posteriores de seleção, como por exemplo, estimativas da concentração letal mediana (CL₅₀), que uma forma de demonstrar a agressividade do tratamento para o inseto alvo, também conhecida como virulência (GRECCO *et al.*, 2008)

Após a higienização bandejas (128 células - Bio-Assay tray Bio-BA-128; CD International, Inc.) está recebeu 1mL de dieta artificial, a qual foi vertida nas células, onde posteriormente foram pipetadas alíquotas de 50 microlitros de cada proteína inseticida em cada célula, de acordo com o método de contaminação superficial, descrito por Arenas *et al.* (2010). Para cada um dos tratamentos foram utilizadas 100 lagartas neonatas (uma lagarta por célula), distribuídas em duas repetições e as bandejas foram fechadas com adesivo plástico. Os ensaios foram alocados em câmara BOD (25°C ±2°C e 12 horas de fotofase) durante sete dias, sendo neste dia realizada a avaliação da mortalidade. Considerou-

se morta a lagarta com coloração escura e/ou com ausência de movimentos ao ser tocada com pincel de cerdas finas.

4.3.2 Ensaio de virulência

Nos bioensaios de estimativa da Concentração Letal Média (CL_{50}) diferentes faixas de concentrações foram testadas, sendo baseadas por testes preliminares, Cry1Ab wt (40 – 2560 $ng.cm^{-2}$), Cry1Ab G439D (40 - 2560 $ng.cm^{-2}$), Cry1Ab N514A (10 – 640 $ng.cm^{-2}$) (Tabela 2).

Figura 4. Teste de virulência. A – Preparo das concentrações a serem testadas. B – Câmara BOD para assegurar as condições de ambiente. C – Avaliação após 7 dias de exposição.

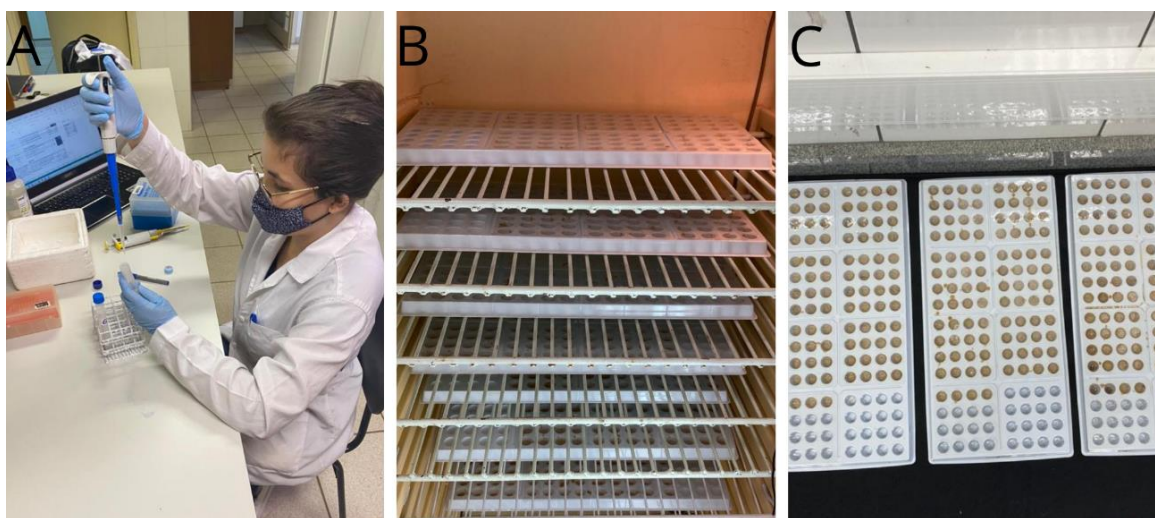


Tabela 2. Faixa de concentrações de proteínas inseticidas Cry1Ab mutantes e selvagem utilizadas para a estimativa da CL_{50} em lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*.

Proteína	Concentrações ($ng.cm^{-2}$)						
	1	2	3	4	5	6	7
wt ^a	40	80	160	320	640	1280	2560
G439D ^b	40	80	160	320	640	1280	2560
N514A ^b	10	20	40	80	160	320	640

^a Proteína Cry1Ab selvagem

^b Proteínas modificadas

Sete concentrações de proteínas inseticidas, mais uma testemunha onde foi utilizada água destilada foram utilizadas nos experimentos. Para a preparação das proteínas inseticidas foi necessário a diluição da solução estoque que foi quantificada, em água Milli-Q (deionizada e autoclavada) para obter as concentrações que foram testadas de acordo com cada proteína, como citado anteriormente. O procedimento experimental, acondicionamento e avaliação foram semelhantes àqueles utilizados nos experimentos de patogenicidade.

As concentrações foram aplicadas sobre a dieta artificial de acordo com Arenas *et al.* (2010), em seguida, foram pipetados 50 microlitros de solução (proteína e esporos), aguardou-se o tempo de secagem para que as lagartas fossem distribuídas, e em cada tratamento foram atribuídas 100 lagartas neonatas (1 lagarta por célula). Logo depois, as bandejas foram fechadas com adesivo plástico. Para a controle, foi pipetado 50 microlitros de água Milli-Q.

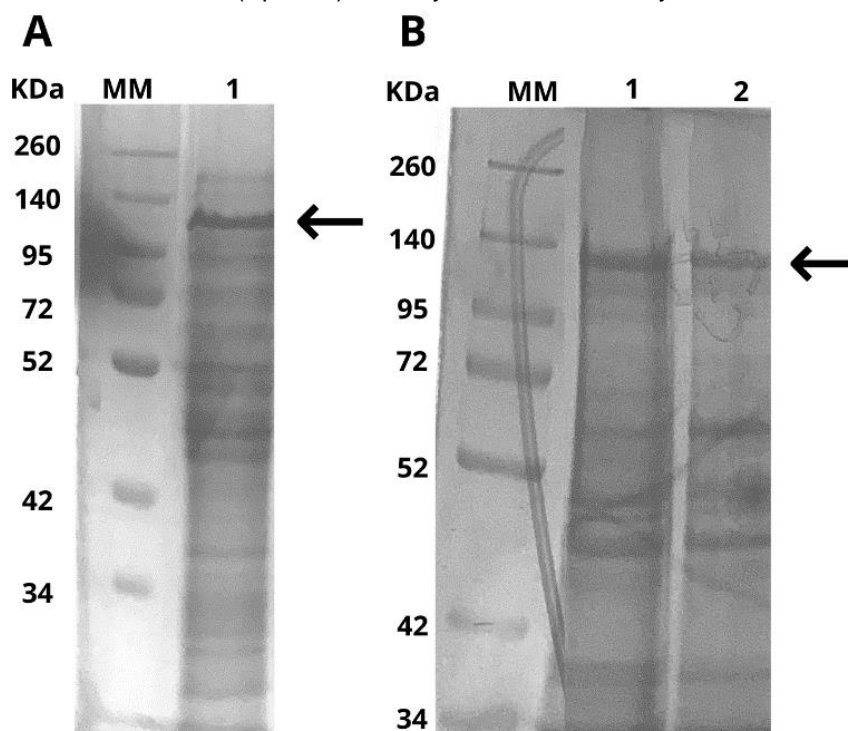
A avaliação de mortalidade foi realizada após 7 dias da exposição das lagartas ao tratamento, os dados foram trabalhados no software POLUS PC, e a estimativa de CL₅₀ e CL₉₀ feitas por análise de Probit (ROBERTSON *et al.*, 1980). Assim como no teste de patogenicidade, os ensaios foram mantidos em câmara BOD por 7 dias e nas mesmas condições de temperatura e luz.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil proteico

Os perfis proteicos das protoxinas Cry1Ab foram observados por SDS-PAGE, as delta-endotoxinas apresentaram bandas de aproximadamente 130 kDa (Figura 5).

Figura 5. Perfil protéico das protoxinas Cry1Ab. A - Gel de proteína de Cry1Ab selvagem. MM - Marcador molecular (Spectra). 1 - Cry1Ab wt. B - Gel de proteína de Cry1Ab mutante. MM – Marcador molecular (Spectra). 1 – Cry1AbG439D. 2– Cry1AbN514A.



5.2. Testes de patogenicidade

As toxinas modificadas e a selvagem não foram capazes de causar mortalidade acima de 80% sobre a população resistente a tecnologia PowerCore® (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade corrigida (%) causada por toxinas modificadas e selvagem de Cry1Ab em lagartas de *Spodoptera frugiperda* da população resistente.

Toxina	Dose discriminatória	% de mortalidade corrigida
Cry1Ab (wt)		15,96
Cry1Ab (N514A)	3000 ng.cm ⁻²	24,47
Cry1Ab (G439D)		8,51

A baixa suscetibilidade desta população quando exposta a uma alta dose das toxinas (3000 ng.cm⁻²) impossibilitou que testes de virulência fossem realizados. Enquanto isso, a mortalidade das lagartas da população suscetível para as proteínas selvagem e mutantes N514A e G439D foi de 87,23%, 100% e 84,04%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Mortalidade corrigida (%) causada por toxinas modificadas e selvagem de Cry1Ab em lagartas de *Spodoptera frugiperda* da população suscetível.

Toxina	Dose discriminatória	% de mortalidade corrigida
Cry1Ab (wt)		87,23
Cry1Ab (N514A)	3000 ng.cm ⁻²	100
Cry1Ab (G439D)		84,04

5.3. Estimativa da CL50 para a população suscetível

O mutante N514A diferiu da toxina selvagem (Cry1Ab wt) e da mutante G439D nos ensaios com a população suscetível e obteve a menor CL50. A dose da toxina selvagem necessária para matar 10% da população é a mesma dose que na N514A causa 50% de mortalidade. Portanto, é preciso de uma dose 8

vezes menor de Cry1AbModN514A para alcançar a mesma eficiência de controle da toxina selvagem (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade inseticida de Cry1Ab selvagem e mutantes contra lagartas de *Spodoptera frugiperda* da população suscetível.

Toxina	CL ₅₀ ng.cm ⁻² ^a (Intervalo de confiança)	CL ₉₀ ng.cm ⁻² ^b (Intervalo de confiança)	Slop ^c	χ ² ^d
Cry1Ab (wt)	541,664 (456,826-644,336)	3267,496 (2428,503 - 4821,778)	1,642±0,130	4,220
Cry1Ab (N514A)	61,373 (43,531-82,904)	282,791 (194,772 - 489,097)	1,932±0,160	5,014
Cry1Ab (G439D)	829.453 (650.175-1062.201)	3547 (2396,0 - 6896,0)	2,272±0,293	4,496

^{a,b} Concentração que mata 50% e 90% da população, com limites fiduciais

de 95%. A unidade utilizada é ng de toxina Cry por cm² de dieta artificial;

^c Inclinação ± erro padrão;

^d Qui-quadrado;

Esses resultados demonstram que mutações em regiões pontuais, ou modificações em apenas um resíduo da proteína Cry1Ab são capazes de gerar respostas diferentes sobre o controle de *Spodoptera frugiperda*. Neste caso, as mutações não foram suficientes para quebrar a resistência, mas aumentaram a suscetibilidade da *S. frugiperda* para a proteína inseticida mutante Cry1Ab (N514A)

6. DISCUSSÃO

As proteínas Cry causam diferentes níveis de toxicidade para a *Spodoptera frugiperda* (GOMEZ *et al.*, 2020; MONNERAT *et al.*, 2006). Segundo Celso Omoto (2016), a Cry1Ab é considerada de atividade moderada contra esta espécie, enquanto, para Gómez *et al.*, (2020) é considerada de baixa

suscetibilidade. Uma população brasileira de *Spodoptera frugiperda* estudada por Gomez *et al.*, (2018) obteve 468 ng.cm⁻² valor próximo ao encontrado neste estudo (Tabela 5).

A CL₅₀ da toxina N514A estimada neste estudo (61,373 ng.cm⁻²) diferiu da concentração encontrada por Gomez *et al.*, (2018). Essa pequena diferença é justificada pela diferença na suscetibilidade entre populações (MONNERAT *et al.*, 2006).

A baixa CL₅₀ da Cry1Abmod (N514A) que sofreu mutações na região β -16 do domínio III, que pode ser traduzida como alta virulência, pode estar relacionada com a importância que esse domínio possui para a interação de ligação com receptores (BRAVO *et al.*, 2007; ADANG *et al.*, 2014). Segundo Gomez *et al.*, (2018), a ligação aos receptores presentes nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio do inseto (BBMV) da lagarta é favorecida com essa mutação específica, devido a melhoria na ligação aos receptores ALP, APN, e especialmente aos receptores CAD, conferindo uma maior toxicidade quando comparada a toxina selvagem, em várias populações de *S. frugiperda*.

Além disso, foi demonstrado que a estabilidade da protoxina no suco do intestino médio de *S. frugiperda* se correlacionou com o aumento da toxicidade de mutantes de domínio III de Cry1Ab (GOMEZ *et al.*, 2018).

Em um estudo feito com *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), a substituição do domínio III de Cry1Ab por um domínio III de Cry1Ca foi capaz de aumentar a atividade inseticida, sendo 6 vezes mais tóxica do que a Cry1Ca,

notadamente o domínio III possui papel importante na busca por toxinas cada vez mais tóxicas aos insetos-praga (De MAAGD *et al.*, 1996).

Em um estudo feito por Quintero (2018), o mutante G439D também apresentou toxicidade reduzida (Tabela 5) comparada com a proteína Cry1Ab selvagem, em bioensaios com *Manduca sexta* (Lepidoptera: Shingidae), através de ensaios de ligação levantou-se a hipótese de que a mutação nessa região da proteína prejudica a ligação aos receptores APN e CAD. Os loops do domínio II são importantes no reconhecimento e ligação ao receptor, se ao selecionar mutações positivas nessa região é possível observar aumento da especificidade, bem como, melhora na interação toxina-receptores na superfície das células de insetos, o contrário é verdadeiro, justificando a causa da perda de toxicidade do mutante G439D devido a ligação ao receptor ter sido afetada (GUILLÉN, 2010; LUCENA *et al.*, 2014).

Para que a solubilização da proteína ocorra é necessário que o pH intestinal da lagarta seja alcalino, disso isso, uma alteração no pH pode ser uma das causas que explicam a baixa eficiência da proteína, no entanto, outros fatores foram levantados, como exemplo, mudança conformacional dos receptores; baixa capacidade de ativação por proteases intestinais; até mesmo o aumento da eficácia de proteases pode ser apontado, onde a protoxina é inteiramente digerida. Ainda que o evento PowerCore® não expresse a toxina Cry1Ab, possivelmente a população resistente a esse evento pode ter adquirido resistência cruzada, pois a Cry1F e Cry1A.105 competem com alta afinidade pelos mesmos sítios que a Cry1Ab, e a alteração destes sítios ativos pode ter comprometido a eficiência das três toxinas, não permitindo que a quebra da

resistência ocorresse (Tabela 3) (HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, 2013; MONNERAT E BRAVO, 2000).

Pesquisas atuais têm unido esforços na criação de gerações de toxinas mutantes formados por diferentes subclasses de proteínas, conhecidas como proteínas quiméricas, a exemplo, Cry1B.868 que é formada por domínios I e II de Cry1Be (*Bt*), domínio III de Cry1Ca (*Bt. aizawai*) e pelo domínio da protoxina C-terminal de Cry1Ab (*Bt. kurstaki*) (HORIKOSHI *et al.*, 2021). Essas modificações aumentam a suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda*, uma vez que são capazes de se ligar a receptores do inseto que nenhum evento transgênico possui (WANG *et al.*, 2019).

7. CONCLUSÃO

A população resistente a tecnologia PowerCore® não apresentou suscetibilidade para as toxinas mutantes, não havendo quebra da resistência. No entanto, as toxinas modificadas aumentaram a mortalidade na população suscetível.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, W. S. (1925) A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, ed. 2, p. 265-267. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. **Advances in Insect Physiology**, v. 47, p. 39-87, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00002-6>

ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 screen for rare resistance alleles. **Journal of Economy Entomology**, n. 91, p. 572-578, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/91.3.572>

ANGELO, E. A.; VILAS-BOAS, G. T.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 945-958, out./dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n4p945>

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; GOMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, ed. 17, p. 12497-12503, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085266>

BAUDRON, F.; ZAMAN-ALLAH, M.A.; CHAIPA, I.; CHARI, N.; CHINWADA, P. Understanding the factors influencing fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) damage in African smallholder maize fields and quantifying its impact on yield: a case study in eastern Zimbabwe. **Crop Protection**, v. 120, p.141-150. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.01.028>

BENTIVENHA, J.P.; BALDIN, E. L.; MONTEZANO, D. G.; HUNT, T. E.; PAULA-MORAES, S. Movimentos de ataque e defesa envolvidos na interação de *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science**. v. 90, p. 433–445. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10340-016-0802-3>

BERNARDI, O. *et al.* Manejo da Resistência de Insetos a Plantas Bt. **Edição. PROMIP–Manejo Integrado de Pragas**, Engenheiro Coelho, SP, Brasil, 2016. Disponível em: <https://www.ufsm.br/pet/agronomia/2021/06/29/importancia-do-manejo-da-resistencia-de-insetos-na-cultura-da-soja/>

BLANCO, C. A. *et al.* Current situation of pests targeted by Bt crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science**, v. 15, p. 131-138, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2016.04.012>

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; Gill, SS.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1667, ed. 1, p. 38-46, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control, *Toxicon*, v. 49, p. 423-435, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

BURTET, L. M.; BERNARDI, O.; MELO, A. A.; PES, M. P.; STRAHL, T. T.; GUEDES, J. V. C. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2569-2577, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.4660>

CARRIÈRE, Y., BROWN, Z. S., DOWNES, S. J. et al. Governing evolution: A socioecological comparison of resistance management for insecticidal transgenic Bt crops among four countries. **Ambio**, v. 49, p. 1–16 (2020). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01167-0>

CERÓN, J., ORTÍZ, A., QUINTERO, R., GUERCA, L., BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **App. Environ. Entomol**, v. 61, ed. 11, p. 3826-3831, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.61.11.3826-3831.1995>

CRESPO, A. M; GONÇALVES, D. da C; SOUZA, M. N; ZANÚNCIO JUNIOR, J. S; COSTA, H; FAVARATO, L. F; RANGEL, O. J. P; ARAÚJO, J. B. S. **Manejo da lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*): panorama geral das atualizações no controle alternativo**. Alegre ES: IFES Alegre. Boletim Técnico, 06. 2021, ISBN: 978-65-89716-29-7 Disponível em: <http://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/handle/123456789/4192>

CRUZ I. **Lepidoptera como praga de milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, doc. 111, ed. 1., p 1-23, (2010). Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/883171>

CTNBIO. **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/inicio>

DA SILVA, I. H. S.; GOMÉZ, I.; SÁNCHEZ, J.; DE CASTRO, D. L. M.; VALICENTE, F. H.; SOBERÓN, M.; POLANCZYK, R. A.; BRAVO, A. Identification of midgut membrane proteins from different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. **PloS One**, v. 13, n. 12, p. 1-16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207789>

DE MAAGD, R. A.; KWA, M. S. G.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J. M.; STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition **Appl. Environ. Microbiol**, v. 62, ed. 5, p. 1537–1543. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.62.5.1537-1543.1996>

EPPO. *Spodoptera frugiperda* (LAPHFR). **EPPO global database**. 2021. Disponível em: <https://gd.eppo.int/taxon/LAPHFR/distribution>

FARIAS, J. R., ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150-158, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.019>

FERNANDES, O. D.; PARRA, J. R. P.; F. NETO. A.; PÍCOLI, R.; BORGATTO, A. F.; DEMÉTRIO, C. G. B. Efeito do milho geneticamente modificado MON 810 sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 2, p. 25-35, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v2n02p%25p>

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 61, n. suppl, p. 819-828, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0034-737x201461000007>

GALZER, E. C. W.; De AZEVEDO-FILHO, W. S. Utilização do *Bacillus thuringiensis* no controle biológico de pragas. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 1, n. 1, 2016. Disponível em: <https://sou.ucs.br/revistas/index.php/ricaucs/article/view/13>

GOERGEN, G.; KUMAR, P. L.; SANKUNG, S. B.; TOGOLA, A.; TAMÒ, M. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. **PLOS ONE**, v. 11, (10), p. 1-9, e0165632. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>

GÓMEZ, I.; OCELOTL, J.; SÁNCHEZ, J.; LIMA, C.; MARTINS, E.; ROSALES-JUÁREZ, A.; AGUILAR-MEDEL, S.; ABAD, A.; DONG, H.; MONNERAT, R.; PEÑA, G.; ZHANG, J.; NELSON, M.; WU, G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.

Enhancement of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Fa toxicity to *Spodoptera frugiperda* by domain III mutations indicates there are two limiting steps in toxicity as defined by receptor binding and protein stability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 20, p. e01393-18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01393-18>

GÓMEZ, I.; OCELOTL, J.; SÁNCHEZ, J.; AGUILAR-MEDEL, S.; PEÑA-CHORA, G.; LINA-GARCIA, L; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Domain III β -22 Mutants with Enhanced Toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Appl Environ Microbiol.** 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01580-20>

GRECCO, E. D.; POLANCZYK, R. A.; PRATISSOLI, D VIANA, U. R; BARBOSA, W. F; CELESTINO, F. N; ZINGER, F. D. Patogenicidade de *Bacillus thuringiensis* para o controle da lagarata-medede-palmo das crucíferas *Trichoplusia ni* (Lepidoptera.: Noctuidae), **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, S1899-S1903, 2008.

GREENE, G.L. *et al.* Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of economic entomology*, v.69, p.487-488, 1976. doi: 10.1093/jee/69.4.487. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>

GUILLÉN, S. P. **Papel del asa 3 del dominio II de las toxinas Cry1A's de *Bacillus thuringiensis* en el mecanismo de toxicidad : un blanco potencial para modificar el reconocimiento de sus receptores.** (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, p. 114, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/62650>

HARRISON, R. D.; THIERFELDER, C.; BAUDRON, F.; CHINWADAD, P.; MIDEGA, C.; SCHAFFNER, U.; VAN DEN BERG, J. Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) management: providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest. **Journal of Environmental Management**, v. 243, p. 318-330, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.011>

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared Midgut Binding Sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Fa Proteins from *Bacillus thuringiensis* in Two Important Corn Pests, *Ostrinia nubilalis* e *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, e68164. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068164>

HORIKOSHI, R. J.; VERTUAN, H.; DE CASTRO, A. A.; MORRELL, K.; GRIFFITH, C.; EVANS, A.; TAN, J.; ASIIMWE, P.; ANDERSON, H.; JOSÉ, M. O. M. A.; DOURADO, P. M.; BERGER, G.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. A new generation of Bt maize for control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Pest Management Science**. v. 77, ed. 8, p. 3727-3736, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.6334>

HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER, JR. R. L.; REISIG, D. D.; HEAD, G. H.; ANDOW, D. A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G. D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e112958, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112958>

JURAT-FUENTES, J. L.; CRICKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 5-10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.018>

KALLESHWARASWAMY, C.M.; ASOKAN, R.; SWAMY, H.M.; MARUTHI, M.S.; PAVITHRA, H.B.; HEGDE, K.; NAVI, S.; PRABHU, S.T.; GOERGEN, G. First report of the Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), an alien invasive pest on maize in India. **Pest Manag. Hortic. Ecosyst**, v. 24 ed. 1, p. 23-29, 2018.

KAUR, G.; G. U. O, J.; BROWN, S.; HEAD, G. P.; PRICE, P. A.; PAULA-MORAES, S.; NI, X.; DIMASE, M.; HUANG, F. Field-evolved resistance of *Helicoverpa zea* (Boddie) to transgenic maize expressing pyramided Cry1A.105/Cry2Ab2 proteins in northeast Louisiana, the United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 163, p. 11-20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.02.007>

LI, X.J.; WU, M.F.; MA, J.; GAO, B. Y.; WU, Q. L.; CHEN, A. D.; LIU, J.; JIANG, Y. Y.; ZHAI, B. P.; Early, R, et al. Prediction of migratory routes of the invasive fall armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach. **Pest Manag. Science**. v. 76, ed. 2, p. 454 – 463, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5530>

LUCENA, W. A.; PELEGRINI, P. B.; MARTINS-DE-SA, D.; FONSECA, F. C. A.; GOMES, J. E., Jr.; DE MACEDO, L. L. P.; DA SILVA, M. C. M.; OLIVEIRA, R. S.; GROSSI-DE-SA, M. F. Molecular Approaches to Improve the Insecticidal Activity

of *Bacillus thuringiensis* Cry Toxins. **Toxins**, v. 6, p. 2393-2423, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxins6082393>

MARRONE, P. G. Pesticidal natural products – status and future potential. **Pest. Manag. Sci.**, 75: 2325-2340, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5433>

MEZA, R.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SANCHEZ, J.; BRAVO, A. Isolation of Cry1Ab protein mutants of *Bacillus thuringiensis* by a highly efficient PCR sitedirected mutagenesis system. **FEMS Microbiology Letters**, n. 145, p. 333-339, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08597>

MIRALLES M. P.; PÉRES V. J. Aislamiento y establecimiento de uma coleccion de *Bacillus thuringiensis*. In: Bravo, A. **Ceron, J. (Eds) Bacillus thuringiensis en el control biológico**. Bogotá p. 207-232, 2004.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; ORDÚZ, S.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL M. D.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; RAUSELL, C.; CERÓN, J.; IBARRA, J. E.; DEL RINCON-CASTRO, M. C.; ESPINOZA, A. M, MEZA-BASSO, L.; CABRERA, L.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. A variabilidade genética em populações de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) na América Latina está associada a variações na suscetibilidade às toxinas de *Bacillus thuringiensis* Cry. **Appl Environ Microbiol.** v. 72, ed. 11, p. 7029–7035. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01454-06>

MONTEZANO, D., SPECHT, A., SOSA-GOMEZ, D., ROQUE-SPECHT, V., SOUSA-SILVA, J., PAULÁ MORÁES, S., PETERSON, J., HUNT, T. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology.** v. 26, p. 286–300, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4001/003.026.0286>

MURARO, D. S.; GARLET, C. G.; GODOY, D. N; COSSA, G. E.; RODRIGUES JUNIOR, G. L. dos S.; STACKE, R. F.; PETERS, S. M.; GUEDES, J. V. C.; BERNARDI, O. Laboratory and field survival of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt and non-Bt maize and its susceptibility to insecticides. **Pest Management Science**, v. 75, ed. 8, p. 2202-2210, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5347>

OMOTO, C., BERNARDI, O., SALMERON, E., SORGATTO, R. J., DOURADO, P. M., CRIVELLARI, A.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, n. 9, p. 1727-1736, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.4201>

OVERTON, K.; MAINO, J. L.; DAY, R.; UMINA, P. A.; BETT, B.; CARNOVALE, D.; EKESI, S.; MEAGHER, R.; REYNOLDS, O. L. Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A review. **Crop Protection**, v. 145, 105641, (2021). Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105641>

PACHECO, S.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN M. 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. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 32750-32757, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024968>

PANNUTI, L. E. R.; PAULA-MORAES, S. V.; HUNT, T. E.; BALDIN, E. L. L.; DANA, L.; MALAQUIAS, J. V. Movimento planta a planta de *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho (*Zea mays*). **Journal of Economic Entomology**. v. 109, ed. 3, p. 1125-1131. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/tow042>

PAREDES-SÁNCHEZ, F. A.; RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCÍA, V.; MARTÍNEZ-PADRÓN, H. Y.; BERRONES-MORALES, M.; NIÑO-GARCÍA, N.; HERRERA-MAYORGA, V. Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. Uma revisão. **Molecules**, v. 26, p. 5587, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26185587>

POLANCZKY, R. A.; ALVES, S. *Bacillus Thuringiensis*: Uma Breve Revisão. **Agrociência**, Montecillo, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2003. Disponível em: <http://164.73.52.4/~agrociencia/index.php/directorio/article/view/363/287>

ROBERTSON, J.; RUSSELL, R. M.; SAVIN, N. E. **POLO: a user's guide to Probit Or LOGit analysis**. Gen. Tech. Rep. PSW-38, p. 15, illus. Pacific Southwest Forest and Range Exp. Stn., Forest Serv., U.S. Dep. Agric, Berkeley, California, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.2737/PSW-GTR-38>

SHAPIRO-ILAN, D. I.; FUXA, J. R.; LACEY L. A.; ONSTAD D. W.; KAYA H.K. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, ed. 1, p. 1-7, 2005, ISSN 0022-2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.10.003>

SISAY, B.; TEFERA, T.; WAKGARI, M.; AYALEW, G.; MENDESIL, E. The Efficacy of Selected Synthetic Insecticides and Botanicals against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Maize. **Insects**, v. 10, n. 2, p. 45. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects10020045>

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/EC10040>

TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Evaluating cross-resistance between Vip and Cry toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 113, ed. 2, p. 533-561, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/toz308>

VÉLEZ, A. M.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; CRESPO, A. L. B.; SIEGFRIED, B. D. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 138, n. 5, p. 315-325, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jen.12092>

ZHOU, Y.; WU Qi.; ZHANG, H.; WU, K. Spread of invasive migratory pest *Spodoptera frugiperda* and management practices throughout China. **Journal of Integrative Agriculture**. v. 20, ed. 3, p. 637-645. 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(21\)63621-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(21)63621-3)

WANG, R.; JIANG, C.; GUO, X.; CHEN, D.; YOU, C.; ZHANG, Y.; WANG, M.; QING, L. Potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in China and the major factors influencing distribution. **Global Ecology and Conservation**. v. 21, e00865, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00865>

WANG, Y.; WANG, J.; FU, X.; NAGEOTTE, J. R. SILVERMAN J, BRETSNYDER E.C., *et al.* *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 protein interactions with novel receptors allow control of resistant fall armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Appl Environ Microbiol**. v. 85, n. 16, e00579–e00519, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00579-19>