

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

TOXICIDADE DE PROTEÍNAS BACTERIANAS E ANÁLISE *in silico* DE VIP3A EM POPULAÇÃO CRY-RESISTENTE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Raquel Oliveira Moreira
Licenciada em Ciências Biológicas

2023

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

TOXICIDADE DE PROTEÍNAS BACTERIANAS E ANÁLISE *in silico* DE VIP3A EM POPULAÇÃO CRY-RESISTENTE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Discente: Raquel Oliveira Moreira

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Coorientador: Prof Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas)

M838t Moreira, Raquel Oliveira
Toxicidade de proteínas bacterianas e análise in silico de Vip3A em população
Cry-resistente de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) /
Raquel Oliveira Moreira. -- Jaboticabal, 2023
87 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Coorientador: Ricardo Antonio Polanczyk

1. Plantas transgênicas. 2. Plantas Resistência aos insetos. 3. Toxinas bacterianas. 4.
Pragas agrícolas Controle integrado. 5. Estrutura molecular. I. Título.

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.

Registro de impacto

A correlação entre a estrutura molecular e a toxicidade diferencial detectada na proteína Vip3Ae nas populações de *Spodoptera frugiperda* susceptível e resistente às proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) colabora na elucidação do modo de ação de proteínas Vip3 e no desenvolvimento de estratégias para prolongar a durabilidade das tecnologias Bt.

Impact record

The correlation between the molecular structure and the differential toxicity detected in the Vip3Ae protein in populations of *Spodoptera frugiperda* susceptible and resistant to *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins collaborates in the elucidation of the mode of action of Vip3 proteins and in the development of strategies to prolong the durability of the Bt technologies.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

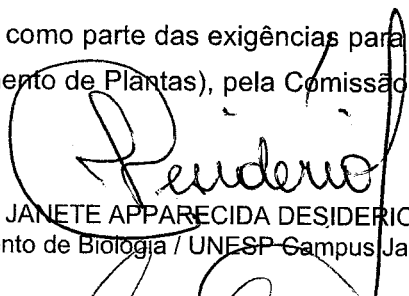
TÍTULO DA TESE: TOXICIDADE DE PROTEÍNAS BACTERIANAS E ANÁLISE *IN SILICO* DE Vip3A EM POPULAÇÃO CRY-RESISTENTE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

AUTORA: RAQUEL OLIVEIRA MOREIRA

ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

COORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Presencial)
Departamento de Biologia / UNESP - Câmpus Jaboticabal

Dra. ANA RITA NUNES LEMES (Participação Presencial)
Syngenta / Holambra/SP

gov.br


Documento assinado digitalmente
ANA RITA NUNES LEMES
Data: 20/03/2023 16:35:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal

Profa. Dra. ANA MARIA GUIDELLI THULER (Participação Presencial)
Engenharia Ambiental / Universidade de Uberaba - UNIUBE

gov.br

Documento assinado digitalmente
ANA MARIA GUIDELLI THULER
Data: 20/03/2023 13:48:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. SERGIO ANTONIO DE BORTOLI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Raquel Oliveira Moreira, nascida no município de Santana de Pirapama, Minas Gerais, em 26 de janeiro de 1993. Filha de Adilson de Almeida Moreira e Lucia Aparecida de Oliveira Moreira. Em 2012 iniciou a licenciatura em Ciências Biológicas, no Centro Universitário de Sete Lagoas (Sete Lagoas, MG), a qual foi concluída em fevereiro de 2016. Sob orientação do Dr. Newton Portilho Carneiro e coorientação da Dra. Beatriz de Almeida Barros, de 2012 a 2016 foi estagiária no Núcleo de Biologia Aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, com apoio financeiro da mesma instituição e, posteriormente, bolsista de iniciação científica (IC) pela concessão do CNPq (PIBIC). Projetos para avaliação do gene *cry1C* de *Bacillus thuringiensis* em milho transgênico no controle de lagarta do cartucho, além de estudos para controle de pragas em milho via tecnologia de RNAi foram desenvolvidos em colaboração. Após realização de estágios adicionais em docência e extensão e certa da linha temática que dedicar-se-ia, em 2016 foi dado o início do Mestrado *Stricto Sensus* em Biotecnologia Vegetal pela Universidade Federal de Lavras (Lavras, MG), sob orientação do Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente e coorientação da Dra. Beatriz de Almeida Barros e bolsa concedida pelo CNPq, com vigência entre maio de 2016 a maio de 2018. Neste período, pesquisas laboratoriais foram feitas para avaliar a potencialidade de *B. thuringiensis* no controle de *Schizaphis graminum*, além de selecionar genes endógenos para análises de PCR em tempo real em *Dichelops melacanthus*, apresentação em congresso relacionado à área, condução de aulas e treinamentos. Em 2018 ingressou no Doutorado em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas) pela Universidade Estadual Paulista “Júliode Mesquita Filho” (FCAV/Unesp), sob orientação da Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério e coorientação do Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk. No período, trabalhos com diferentes proteínas microbianas para controle da *H. armigera* e *S. frugiperda* foram desenvolvidos, além da condução de aulas na graduação, projetos de extensão vinculados à Vice – Reitoria da instituição e colaboração com a incubadora de empresas da unidade (Inova.Jab). O doutorado foi financiado com bolsas concedidas pela CAPES (08/2018 – 08/2021; 09/2022 – 03/2023), AUIN (11/2021 – 01/2022) e Vice-Reitoria UNESP (02/2022 – 08/2022).

“Cuide de seu corpo como se fosse viver para sempre e cuide de sua alma como se fosse morrer amanhã.”
Santo Agostinho

Aos meus amados pais Lucia e Adilson, minha avó Maria José, meus irmãos Alesandro, Alexsandro, Tobias e Ábias, meus tios Lindomar e Rosilene, que sempre oraram, torceram, apoiaram, confiaram, me aconselharam e proporcionaram a oportunidade para minha formação acadêmica e pessoal.

DEDICO.

À minha tia Chica (*in memorian*) e minha prima Maria Cecília (*in memorian*)

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir meu entendimento sobre o fato que “tudo tem o seu tempo determinado e há tempo para todo propósito debaixo do céu” (Eclesiastes 3:1).

Aos familiares: meus pais Lucia e Adilson, minha avó Maria José, meus irmãos Alesandro, Alexsandro, Tobias e Ábias, minhas cunhada Jéssica e meus sobrinhos Luan, Laís, Brayan, Arthur e Emilly, que sempre me impulsionaram a estudar através de carinho, paciência, suporte psicológico e confiança durante todos esses anos de pesquisa.

Às amigas Maria Helena Zanetti, Juliana Queiroz, Juliana Lopes, Jessika Larita, Isabela Alves e Tatiane Alves pelo companheirismo, advertências e palavras de incentivo que permitiram contornar todos os momentos difíceis vivenciados.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (FCAV/Unesp), pelo suporte das equipes administrativas da Direção e Vice – Direção, funcionários do Departamento de Biologia (em especial Rodrigo, Gustavo, Aldo, Márcia e Lucinda), Setor de Transporte (Jonas e Mafra), professores parceiros (Profa. Dra. Ana Margarida e Prof. Dr. Pedro Alves), equipe Inova.Jab e todas as equipes da unidade que de alguma forma proporcionaram suporte técnico, científico e de infraestrutura durante o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), nas pessoas do Prof. Dr. Vitor Miranda, corpo docente e assistentes da Seção de Pós – Graduação, por concederem a oportunidade em fazer parte do programa, garantirem a qualidade do curso, esclarecerem dúvidas e viabilizarem várias demandas ao longo da minha formação acadêmica e profissional.

Às instituições que concederam as bolsas de estudos ao longo da minha formação, uma vez que o período pandêmico obrigou-nos a buscar várias alternativas de fomento e em consequência houveram oportunidades de participar de projetos fantásticos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001., pela concessão da modalidade da bolsa de Doutorado Pleno – (08/2018 – 08/2021; 09/2022 – 03/2023), Agência UNESP de Inovação (AUIN) pela bolsa de pós - graduação AUIN / Santander (11/2021 – 01/2022) e a Vice – Reitoria da Unesp bolsa de

Ações Afirmativas e Diversidade (02/2022 – 08/2022).

À minha orientadora Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pelo acolhimento em sua equipe, confiança, auxílio no desenvolvimento do trabalho no laboratório, apoio emocional em todas as vezes que necessitei e todo amadurecimento profissional proporcionado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk pelo suporte em tudo ao que refere-se ao manejo dos insetos, desde criação à análise de resultados, pela aquisição de um dos clones sintéticos e demais ajudas que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

À Dra. Ana Rita Nunes Lemes, Profa. Dra. Ana Maria Guidelli Thuler, Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza e Prof. Dr. Sergio Antonio De Bortoli pela disposição em compor a banca avaliadora e contribuir para a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi e Dra. Saura Rodrigues pelas importantes colocações durante o exame de qualificação.

Aos colegas Joacir Nascimento e Samanta Carvalho pela ajuda prática ou no esclarecimento de dúvidas, revelando-se ótimos parceiros colaborativos no trabalho desenvolvido.

À atual equipe e todos que passaram pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), em especial ao Jardel Diego, Gustavo Henrique, Higor Alves, Maria Carolina Cordeiro, Thaís Nayara e Bruno Barbosa pela amizade, parceria e resiliência, proporcionando momentos felizes longe de casa e se tornando minha segunda família em Jaboticabal.

Aos integrantes do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, Laboratório de Bioquímica de Insetos (Dpto. de Ciências da Produção Agrícola) e Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (Depto. De Biotecnologia) (FCAV / Unesp), que contribuíram de alguma forma para o andamento do projeto.

Aos tios, primos, amigos e colegas em Minas Gerais e aos amigos conquistados em Jaboticabal, que sempre incentivaram e serviram de amparo mediante as fases de desespero a qual vivenciei.

Às demais pessoas que, embora não mencionadas, participaram dessa caminhada ao meu lado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lagarta-do-cartucho).....	6
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	8
2.2.1 Aspectos Gerais.....	8
2.2.2 Proteínas inseticidas Cry: características básicas	9
2.2.3 Proteínas inseticidas Vip3: características estruturais e funcionais	12
2.2.4 Plantas Bt e manejo de resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
2.3. <i>Spodoptera frugiperda</i> e a busca por inovações no manejo de resistência.....	22
2.3.1 Otimizações envolvendo as proteínas Bt.....	22
2.3.2 Novas tecnologias na piramidação de genes	24
2.3.3 Piramidação de genes: a busca por novas moléculas bacterianas.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Obtenção dos clones de <i>Escherichia coli</i> contendo os genes <i>Txp40</i> e <i>XnGroel</i>	32
3.2. Expressão e purificação das proteínas <i>Txp40</i> e <i>XnGroel</i>	34
3.3. Clones de <i>Escherichia coli</i> contendo os genes <i>vip</i>	37
3.4. Criação das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	39
3.5. Bioensaios seletivos de proteínas <i>Vip3</i> em <i>Spodoptera frugiperda</i> suscetível	39
3.6. Bioensaios para <i>Spodoptera frugiperda</i> com as proteínas inseticidas	39
3.7. Preparação do conteúdo intestinal de <i>Spodoptera frugiperda</i>	40
3.8. Ensaios de cinética proteolítica	40
3.9. Análise <i>in silico</i> das proteínas <i>Vip3</i>	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. Confirmação dos clones contendo os genes <i>Txp40</i> e <i>XnGroel</i> por digestão enzimática...42	
4.2. Expressão e purificação das proteínas <i>Vip3</i> de <i>B. thuringiensis</i> , <i>Txp40</i> de <i>P. akhurstii</i> e <i>XnGroel</i> de <i>X. nematophila</i>	43
4.4. Bioensaios para <i>Spodoptera frugiperda</i> com as proteínas <i>Vip3Aa20</i> , <i>Vip3Ae</i> , <i>Vip3Af</i> , <i>Txp40</i> e <i>XnGroel</i>	45
4.5. Ensaios de proteólise utilizando as proteínas <i>Vip3</i> , <i>Txp40</i> e <i>XnGroel</i> e os conteúdos intestinais de <i>S. frugiperda</i> suscetível e PowerCore™ resistente	46
4.6. Análise <i>in silico</i> das proteínas <i>Vip3</i>	50
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS	59

TOXICIDADE DE PROTEÍNAS BACTERIANAS E ANÁLISE *in silico* DE VIP3A EM POPULAÇÃO CRY-RESISTENTE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO - A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é uma praga de alto impacto econômico em grandes culturas, como o milho. Para reduzir os prejuízos causados pelos ataques, são utilizadas cultivares transgênicos expressando proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Entretanto, a alta pressão de seleção em campo favoreceu a seleção de populações Bt-resistentes dessa praga. Até o momento, não foram relatadas populações de *S. frugiperda* de campo resistentes a Vip3Aa20, proteína Bt expressa em milhos transgênicos para o controle de lepidópteros-praga. Portanto, é necessário explorar o potencial das proteínas de Bt e de outras espécies de bactérias no manejo da resistência. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inseticida de diferentes proteínas bacterianas de Bt, *Xenorhabdus nematophila* e *Photorhabdus akhurstii* em duas populações da lagarta-do-cartucho (suscetível e resistente às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F de Bt). As proteínas Txp40 de *P. akhurstii*, XnGroel de *X. nematophila* e diferentes Bt (Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af) foram obtidas por expressão heteróloga em *Escherichia coli* BL21 (DE3) "One Shot". Posteriormente, ensaios de toxicidade *in vitro* foram conduzidos para estimar a concentração letal média (CL₅₀) para cada proteína. A CL₅₀ foi estimada a partir de uma curva de nove doses, com quatro repetições de 16 lagartas/dose, previamente definidas para cada população. A comparação da cinética proteolítica também foi realizada para as populações suscetível e resistente de *S. frugiperda*. As proteínas testadas foram incubadas com o conteúdo intestinal de lagartas de 3º instar, nas condições de 30°C a 100 rpm e amostras foram coletadas ao longo de 120 min. O produto da proteólise foi quantificado por densitometria para avaliar a intensidade das bandas referentes às proteínas após o processamento no intestino do inseto. As proteínas Txp40 e XnGroel não apresentaram toxicidade em ambas as populações. As CL₅₀ estimadas de Vip3Aa20 e Vip3Af foram, respectivamente, 4x e 14x superior na população resistente de *S. frugiperda* em relação à população suscetível, e a de Vip3Ae foi semelhante entre as populações. Na cinética proteolítica, diferenças entre as populações avaliadas não foram identificadas. A atividade inseticida diferencial detectada em Vip3Ae foi correlacionada à estrutura molecular da proteína. A localização de *motifs* diferenciais na região C-terminal, onde a ausência de um sítio foi detectada para Vip3Ae e as alterações nos resíduos Glu⁵⁴⁶→Gly⁵⁴⁶ e Asn⁵⁶⁸→Lys⁵⁶⁸ do domínio IV também podem estar associadas a susceptibilidade das populações em relação a esta proteína. Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para auxiliar no desenvolvimento de estratégias para manejo de resistência e prolongar a durabilidade das tecnologias Bt.

Palavras-chave: Lagarta-do-cartucho, Resistência de plantas a insetos, *Bacillus thuringiensis*, Domínios proteicos, *Photorhabdus akhurstii*, *Xenorhabdus nematophila*

BACTERIAL PROTEIN TOXICITY AND *in silico* ANALYSIS OF VIP3A IN CRY-RESISTANT POPULATION OF *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT - The fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) is a pest of high economic impact on large crops such as maize. To reduce damages caused by their attacks, transgenic cultivars expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins have been adopted. However, the high selection pressure in the field has favored this pest Bt-resistant populations selection. Until now, no field populations of *S. frugiperda* resistant to Vip3Aa20, a Bt protein expressed in commercial transgenic maize used to control Lepidoptera pests. Therefore, explore the Bt proteins potential and other bacterial species is needed on resistance management. The aim of this work was to evaluate the insecticidal activity of different bacterial proteins from Bt, *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus akhurstii* in two fall armyworm populations (susceptible and resistant to Bt proteins Cry1A.105, Cry2Ab2 and Cry1F). Txp40 proteins from *P. akhurstii*, XnGroel from *X. nematophila* and different Bt (Vip3Aa20, Vip3Ae and Vip3Af) were obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) "One Shot". Subsequently, *in vitro* toxicity assays were conducted to estimate the lethal concentration mean (LC₅₀) for each protein. The LC₅₀ was estimated by a nine doses curve, with four replications of 16 caterpillars/dose, previously defined for each population. The proteolytic kinetics comparison was also performed on susceptible and resistant *S. frugiperda* populations. The tested proteins were incubated with the intestinal contents of 3rd larvae instar, under 30°C at 100 rpm conditions and the samples were collected during 120 min. The proteolysis product was quantified by densitometry to evaluate bands intensity referring the proteins after processing in the insect's intestine. The Txp40 and XnGroel proteins did not show toxicity in both populations. The estimated LC₅₀ of Vip3Aa20 and Vip3Af were 4x and 14x higher, respectively, in *S. frugiperda* resistant population compared to the susceptible population, and the Vip3Ae CL₅₀ was similar among populations. In proteolytic kinetics, differences among the evaluated populations were not identified. The differential insecticidal activity detected in Vip3Ae was correlated to the protein molecular structure. The differential motifs location on C-terminal region, where a site absence was detected for Vip3Ae and changes in Glu⁵⁴⁶→Gly⁵⁴⁶ and Asn⁵⁶⁸→Lys⁵⁶⁸ residues of domain IV may also be associated with populations performance compared to this protein. The results of this work are important to held the strategies development for resistance management and to extend Bt technologies durability.

Keywords: Fall armyworm, Plant resistance to insects, *Bacillus thuringiensis*, Protein domains, *Photorhabdus akhurstii*, *Xenorhabdus nematophila*

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga migratória, polífaga, com alta capacidade reprodutiva e destacado potencial de adaptação. Em virtude dessas características são altamente relevantes os prejuízos econômicos causado pelos ataques em grandes culturas, como o milho e algodão (Yang et al., 2022a).

Além da América, a invasão e os prejuízos da praga na Austrália e nos continentes asiático e africano têm sido destacadas (Bird et al., 2022; Tay et al., 2022). Em consequência do contexto aferido à biologia, métodos de controle, impactos diretos, impactos indiretos e regulamentação a nível internacional e nacional desses insetos, *S. frugiperda* foi hierarquizada entre as pragas de maior risco fitossanitário para o Brasil, conforme nota técnica publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA, 2022a).

As táticas de controle de lepidópteros são voltadas em maioria para o estágio larval do inseto, por meio da administração via oral de inseticidas químicos e biológicos (Haile et al., 2021). Algumas dessas moléculas biológicas atingem o epitélio do intestino médio da larva, onde ocorre a digestão e absorção de nutrientes, além do metabolismo xenobiótico, interações parasitárias e outros processos biológicos (Denecke et al., 2018; Caccia et al., 2019). Assim, torna-se relevante estudos envolvendo esse tecido e a forma como os inseticidas interagem com as estruturas intestinais das pragas.

Diferentes sistemas de cultivo asseguraram o potencial produtivo das lavouras ao adotar híbridos geneticamente modificados que expressam proteínas entomopatogênicas de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 (Bacillales: Bacillaceae) (Bt) (Brookes e Barfoot, 2020; Hamdan et al., 2022). Quando utilizada adequadamente, essa tática de controle permite a eficiência no controle das lagartas, reduzindo as aplicações de inseticidas, propiciando menores gastos econômicos por parte dos produtores e um menor impacto ambiental (National Academies of Sciences, Engineering and Medicine, 2016).

A bactéria *B. thuringiensis* é considerada um importante agente biológico para controle de pragas, sejam elas agrícolas ou urbanas (Valtierra-de-Luis et al., 2020). Inicialmente, o interesse biotecnológico a essa bactéria se refere à descoberta do seu potencial em acumular proteínas inseticidas em forma de cristal no interior das suas células. Essas inclusões proteicas são liberadas juntamente com os esporos após a desintegração da membrana celular e são nomeadas Cry e Cyt (δ -endotoxinas) (Lereclus

et al., 1993). Posteriormente, outras proteínas produzidas pelo Bt foram descobertas, como as Vip (proteínas inseticidas vegetativas) e várias toxinas (exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases), ambas produzidas durante a fase vegetativa (Santos et al., 2022).

De maneira geral, as proteínas Cry possuem mecanismo de ação semelhante, independente da praga, diferenciando essencialmente nos tipos de receptores existentes no inseto alvo. Uma vez ingeridas, as proteínas Cry são ativadas por proteases intestinais. A molécula de ~130 kDa altera a conformação estrutural, reduzindo para 55 a 65 kDa. A toxina Cry atravessa a matriz peritrófica, contendo moléculas de carboidrato que podem retê-la, até chegar nos eritrócitos do intestino médio (Hayakawa et al., 2004).

Nas vesículas da membrana da borda em escova (ou BBM, de *brush border membrane vesicles*) do intestino médio, a toxina se liga a receptores específicos constituídos de proteínas e gliconjugados, família de transportadores semelhantes à caderina, N - aminopeptidase (APN), fosfatase alcalina (ALP) e cassete de ligação de ATP. Após a ligação, há a inserção do pré-poro na membrana ocorrendo a formação do poro. Em sequência, o hospedeiro sofre choque osmótico e/ou, em casos de inseticidas, septicemia pela Bt, resultando na apoptose celular e a consequente morte do inseto (Raymond et al., 2010; Adang et al., 2014). Aproximadamente, 800 proteínas Cry são listadas para o controle de diferentes pragas (Jouzani et al., 2017; Crickmore et al., 2022).

As proteínas Vip (*Vegetative Insecticidal Protein*) foram descobertas por Estruch et al. (1996), tornando-se muito estudadas por serem diferentes das proteínas Cry e apresentarem uma família com alta toxicidade a lepidópteros praga, especialmente *S. frugiperda* (Chakroun et al., 2016). As proteínas Vip possuem cerca de 88 kDa, produzidas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria, podendo ser isolada em meio de cultura líquido como uma proteína solúvel após 15 horas de inoculação.

Após ser ingerida como protoxina, a proteína é convertida para sua forma ativa (subunidade maior de ~65 kDa) e interage com receptores específicos da membrana intestinal do inseto, onde a ligação levará a formação de poros e os sintomas semelhantes às proteínas Cry, com a sequente morte do inseto alvo (Lee et al., 2003). Cerca de 130 proteínas Vip3 estão listadas no banco de dados *on-line* (Crickmore et al., 2022), sendo as proteínas Vip3Aa20 e Vip3Aa19 utilizadas em piramidações de milho e algodão transgênicos, respectivamente (CTNBIO, 2023).

Uma das grandes dificuldades em relação a *S. frugiperda* é a evolução da

resistência de populações aos produtos e tecnologias utilizados em programas de manejo de *S. frugiperda* apresenta resistência a 45 ingredientes ativos disponíveis no mercado, desde inseticidas químicos a biológicos (Mota-Sanchez e Wise, 2022). Tratando-se de eventos transgênicos, as pragas sob forte pressão de seleção em uma grande monocultura podem desenvolver resistência a determinado cultivar (Storer et al., 2012; Prasanna et al., 2022; Rajput et al., 2022).

A evolução da resistência de *S. frugiperda* aos transgênicos foi desencadeada pela ausência de estratégias cruciais para salvaguardar a tecnologia, sendo uma delas a piramidação de genes inseticidas na planta. O evento transgênico deve expressar diferentes proteínas inseticidas com modo de ação distintos. Assim, pragas que desenvolverem resistência a uma proteína Bt ainda serão suscetíveis a outras proteínas presentes na planta (Roush, 1998; Gilreath et al., 2021).

Em milho e algodão, eventos transgênicos expressando proteínas Bt pertencentes às famílias Cry1, Cry2 e Vip3 foram liberados no mercado (CTNBIO, 2023). Entretanto, apenas o gene *vip3A* ainda apresenta alta toxicidade para *S. frugiperda*. Vip3A é a única proteína eficiente para retardar a resistência cruzada positiva da praga nessas culturas, ocasião onde insetos resistentes a determinada proteína Bt desenvolvem resistência a uma proteína semelhante (Jurat-Fuentes et al., 2021; Yang et al., 2022b).

Os casos de resistência de insetos à plantas Bt fomentam estudos que ampliem o entendimento sobre o desempenho dessas pragas às proteínas expressas nessas plantas. Em relação às proteínas Vip3, sabe-se que tais moléculas apresentam cinco domínios conservados, onde cada qual exerce uma função que garante a ação inseticida. Os níveis de toxicidade da proteína Vip3 são dependentes da ativação e da estabilidade da molécula durante a clivagem proteolítica (função dos domínios I, II e III), além da especificidade de ligação aos receptores intestinais da praga (domínios IV e V) (Caccia et al., 2014; Núñez-Ramírez et al., 2020; Yang et al., 2022a).

Embora as proteínas Vip3 se liguem aos mesmos receptores no inseto, ainda hoje há a necessidade de elucidar melhor a correlação existente entre a especificidade de ligação e os níveis de toxicidade (Yang et al., 2022a). Compreendendo o modo de ação da molécula é possível prolongar a duração de tecnologias que são lançadas, assim como é o caso dos eventos de milho e algodão transgênicos disponíveis no mercado.

Uma outra alternativa para incremento de estratégias em programas de manejo de resistência é a identificação de novas moléculas e tecnologias sustentáveis que possam ser implementadas. Alternativamente às proteínas de Bt, pode-se apontar

algumas espécies de bactérias como potenciais fontes de metabólitos. Esses organismos podem ser utilizados como fontes de genes para obtenção de eventos transgênicos, produção heteróloga para biopesticidas ou para aprofundamento em estudos de sinergismo (Kumar et al., 2021)

As bactérias gram-negativas *Xenorhabdus nematophila* (Enterobacteriae: Morganellaceae) e *Photorhabdus akhurstii* (Enterobacteriae: Morganellaceae), são organismos eficientes na secreção de proteínas inseticidas. A patogenicidade dessas bactérias foi descoberta pela simbiose feita com nematoides do gênero *Steinernema* (*X. nematophila*) e Heterorhabditis (*P. akhurstii*), que as injetam na hemolinfa de insetos-praga de plantas (Ffrench-Constant et al., 2007).

Alguns trabalhos demonstram a eficiência de proteínas específicas dessas espécies de bactérias contra lepidópteros praga. A exemplo, a proteína XnGroel (GenBank: AY184491.2), isolada de *X. nematophila* de 58 kDa, possui toxicidade para *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) em dieta artificial (Joshi et al., 2008) e em tabaco transgênico expressando altas doses da proteína (Kumari et al., 2014).

Dentre as proteínas presentes nas vesículas da membrana externa (OMVs) de *X. nematophila*, a XnGroel é a principal do complexo. A proteína XnGroel é liberada no sobrenadante da cultura em associação com as OMVs, porém ainda não possui mecanismo de secreção caracterizado. Diferentemente de outras proteínas inseticidas que causam toxicidade por ação enzimática ou por citólise em *H. armigera*, o modelo de ligação proposto se refere à junção da proteína XnGroel na quitina da membrana peritrofica, inibindo o metabolismo da quitina e conseqüentemente o desenvolvimento da praga (Joshi et al., 2008).

No mesmo sentido, *P. akhurstii* é fonte doadora do gene *txp40* (GenBank: MH052595), responsável por uma proteína que também apresenta atividade entomopatogênica para *H. armigera*, além dos insetos *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), *Plodia interpunctella* (*Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae), *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) e *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Brown et al., 2006; Mathur et al., 2018; Shankhu et al., 2020).

Quando testada em *H. armigera*, verificou-se que Txp40 invadiu o intestino médio, desencadeando a disseminação de células epiteliais colunares no lúmen intestinal, deslocamento de células caliciformes e regenerativas da membrana basal, formação de

vacúolos no lúmen intestinal e desintegração da membrana peritrófica (Shankhu et al., 2020). Nesse mesmo trabalho, sugeriu-se que Txp40 interage com os receptores caderina, ABCC2, APN1 e ALP no intestino de *H. armigera*, mesmos receptores envolvidos no modo de ação de proteínas Cry de *B. thuringiensis*.

De maneira geral, estudos por meio de bioensaios de toxicidade e de interações moleculares são indispensáveis para ampliar o espectro de ação dos produtos oriundos de *B. thuringiensis*, *X. nematophila* e *P. akhurstii* a diferentes espécies pragas. Em especial, cita-se aquelas pragas onde não há uma estratégia de manejo sustentável e economicamente viável ou que estão expostas à recorrente pressão de seleção de transgênicos de Bt, onde Vip3Aa20 é a proteína que ainda garante o sucesso desses eventos comerciais.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade inseticida de diferentes proteínas bacterianas de *B. thuringiensis*, *X. nematophila* e *P. akhurstii* em duas populações de *S. frugiperda* (suscetível e resistente às proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Spodoptera frugiperda* (Lagarta-do-cartucho)

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*) é uma das pragas mais importantes da agricultura, nativa de 48 regiões tropicais da América e com alto potencial migratório. A espécie é polífaga, alimentando-se de mais de 350 plantas (Nagoshi et al., 2017). A alta capacidade adaptativa da lagarta-do-cartucho está relacionada com seu grande número de hospedeiros, alta taxa reprodutiva, às inúmeras gerações ao longo de safras e habilidade da dispersão de adultos entre regiões ou até mesmo países (Nagoshi et al., 2015; Early et al., 2018). A praga compromete importantes culturas como milho, arroz, soja e algodão (Boregas et. al., 2013; Montezano et al., 2018; Nagoshi, 2022).

A lagarta-do-cartucho é holometábola, com cerca de seis instares larvais (Figura 1). Em milho, o ciclo biológico dura em torno de 25 dias, o que pode ser alterado pela temperatura (Busato et al., 2005; Early et al., 2018). O inseto permanece em estágio de pupa por ~10 dias e a sexagem pode ser feita pela medição da distância entre as fendas da entrada genital e anal. A fase adulta possui duração entre 9-15 dias e apresenta dimorfismo sexual, onde as fêmeas possuem coloração uniforme em relação ao macho. Os ovos são postos em camada (s) sobre a superfície da folha do hospedeiro, onde reiniciará o ciclo do inseto (Reddy et al., 2021).

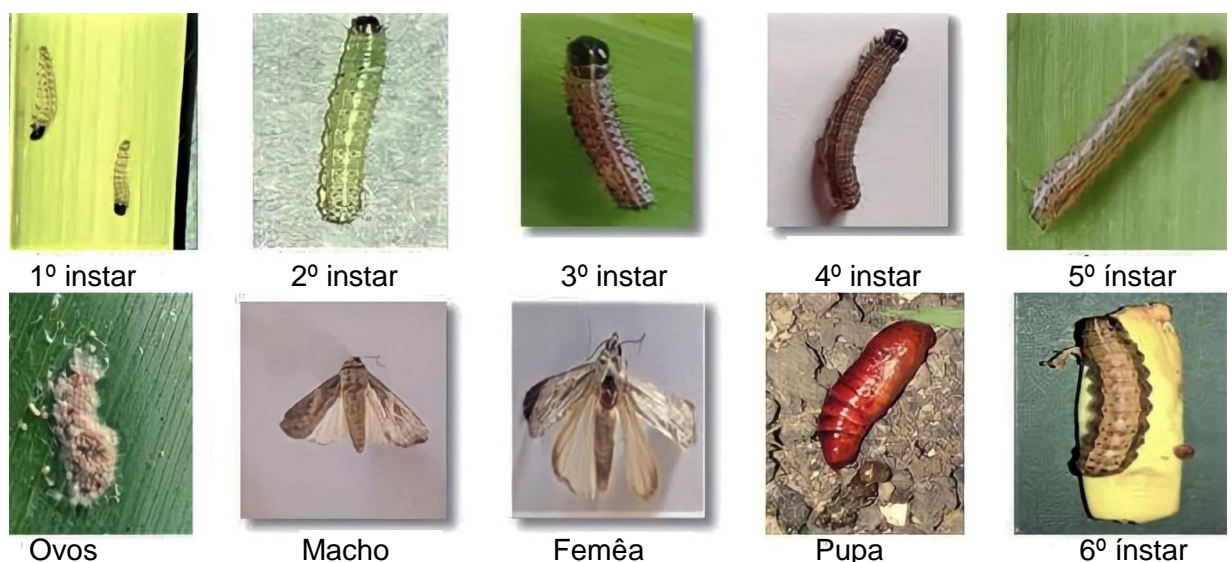


Figura 1. Ciclo de vida de *S. frugiperda*. Estágios de desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda*. Fonte: Adaptado de Reddy et al., 2021.

Em milho, as larvas iniciam sua alimentação por meio da raspagem das folhas, o

que é caracterizado como um primeiro sintoma do ataque do inseto. Ao longo do período larval, a praga tende a se deslocar para o verticilo das folhas, tornando-se mais protegidas e dificultando os métodos de controle (Cruz, 1995; Prasanna et al., 2022). Ao longo do desenvolvimento das larvas, as injúrias vão ficando mais drásticas, sendo observadas perfurações em toda a região do cartucho da planta, podendo estender o ataque ao colmo e às espigas (Cruz, 1995; Anjorin et al., 2021).

O ataque da lagarta-do-cartucho pode representar uma perda de 34 a 52% do rendimento da cultura do milho (Valicente, 2015), o que dependerá do genótipo, programa de manejo, estágio fenológico da planta em que ocorre o ataque e local da infestação (Anjorin et al., 2021). Em 2017, 12 países africanos produtores de milho e recém-invadidos pela lagarta-do-cartucho apresentaram uma perda monetária dimensionada entre US\$ 2,48 bilhões e US\$ 6,19 bilhões, consequência de cultivos desprovidos de programa de manejo da praga (Day et al., 2017; Montezano et al., 2018).

Os surtos populacionais da lagarta-do-cartucho são favorecidos pelas chamadas “pontes verdes” – que se referem a monoculturas cultivadas em sequência e que servem como plantas hospedeiras para que a lagarta-do-cartucho migre de uma cultura para outra na mesma região, mantendo altas populações (Fatoretto et al., 2017).

As táticas de controle da lagarta-do-cartucho no campo são voltadas para o estágio larval do inseto. O controle dependerá da cultura, das linhagens utilizadas e fase de desenvolvimento da planta. Em milho convencional, por exemplo, o nível de ação de controle é recomendado ao identificar 20% das plantas atacadas pela lagarta (plantas avaliadas com nota ≥ 3 segundo a Escala Davis). Em plantas com transgenes inseticidas, os níveis de ação variam entre 4 e 10% (IRAC, 2016).

Os inseticidas são usualmente empregados para evitar que as larvas recém-eclodidas se desloquem para o cartucho da planta, o que acaba dificultando a eliminação da praga por produtos pulverizados (Scheidegger et al., 2021). Entretanto, as incessantes aplicações sobre a cultura favorece a exposição da praga a doses subletais ou a um volume baixo de produto que não apresenta eficácia ao combater o inseto já instalado no cartucho da planta. Em consequência, a praga desenvolveu mecanismos de resistência a muitos inseticidas disponíveis no mercado (Diez-Rodríguez e Omoto, 2001).

2.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

2.2.1 Aspectos Gerais

A bactéria de solo *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) é uma espécie ubíqua, esporulante e até então era a única do seu grupo que apresentava plasmídeos com um ou mais genes de δ -endotoxinas. Esses genes são codificadores de diferentes proteínas cristalinas classificadas como Cry e Cyt (Crickmore et al., 2021; Sauka et al., 2022). Essas proteínas formam inclusões parasporais acumuladas no interior da bactéria ao longo do seu ciclo de vida, liberadas durante a fase de esporulação (Figura 2) (Palma et al., 2014).

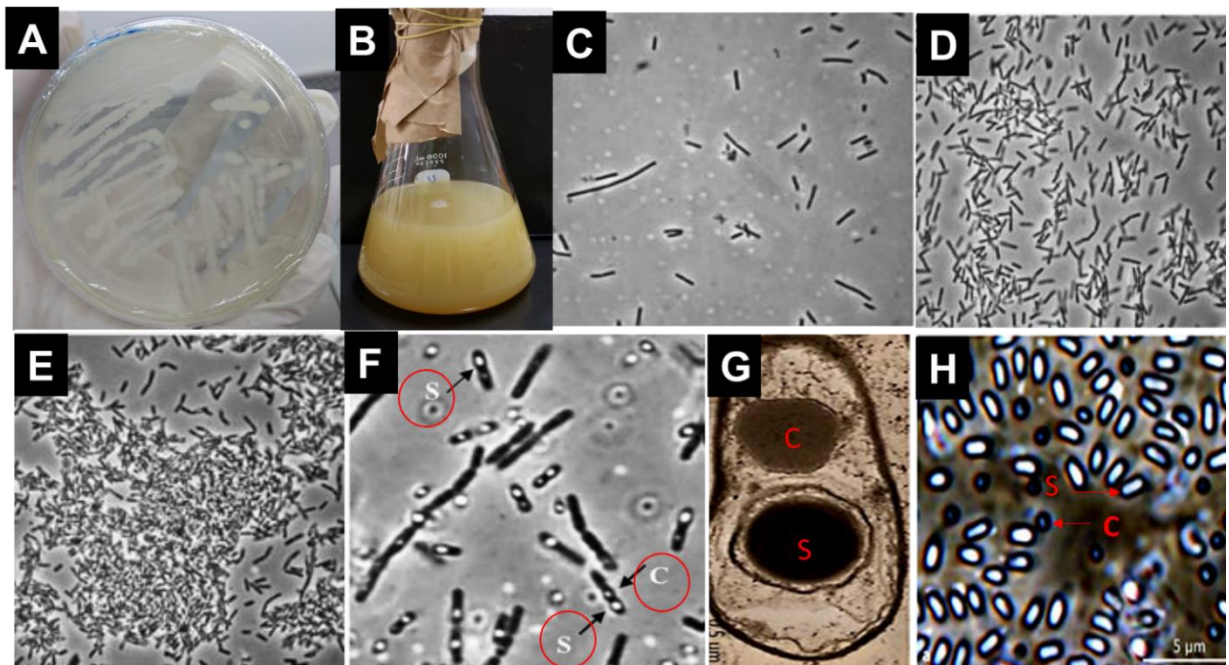


Figura 2. *B. thuringiensis* e fases de cultivo. *B. thuringiensis* cultivada em laboratório nos meios de cultura sólido (A) e líquido (B). O ciclo de vida da bactéria pode ser dividido em quatro fases: I) Fase vegetativa inicial (C); II) Início da flocculação (D); III) Flocculação intensa e esporulação (E) e; IV) Lise da célula após maturação completa dos esporos (F). Destaque para a célula esporulada antes (G) e depois da lise (H). Fonte: Adaptado de Berbert-Molina et al., 2008; Amadio et al., 2013.

Inicialmente, *B. thuringiensis* ganhou notoriedade como biopesticida, graças a sua eficiência no controle de pragas agrícolas e urbanas, pertencentes às ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (Choe et al., 2022). Os baixos custos de produção, a ausência de efeitos ofensivos ao meio ambiente, à saúde humana, animal e demais

organismos não-alvos, tornaram Bt o princípio ativo de 90% dos biopesticidas disponíveis no mercado mundial (Gounina-Allouane et al., 2022).

Os benefícios do uso de Bt bioinseticidas são relacionados com a potencialidade da espécie em produzir um complexo de multitoxinas. Ao combinarem-se, essas moléculas determinam a especificidade e eficiência em causar a mortalidade no hospedeiro, além de retardar a seleção de indivíduos resistentes contra os biopesticidas (Zheng et al., 2017).

Além da expressão de genes *cry* e *cyt* no mesmo plasmídeo, Bt é capaz de sintetizar proteínas inseticidas durante a fase vegetativa do seu ciclo biológico. Uma delas é classificada como proteínas Vip, moléculas de grande importância no controle de lepidópteros praga (Estruch et al., 1996). Em sinergia, as proteínas Cry e Vip são capazes de aumentar a toxicidade no inseto alvo e, conseqüentemente, a eficiência no controle (Figueiredo et al., 2020).

A combinação das multitoxinas de Bt, tais como Cry e Vip, foi explorada para a geração de novas tecnologias, como o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas, conforme abordado nos tópicos a seguir.

2.2.2 Proteínas inseticidas Cry: características básicas

A denominação de uma proteína como uma toxina Cry está relacionada às diferenças da sequência de aminoácidos e na especificidade do hospedeiro (Crickmore et al., 2021). Na natureza, as proteínas de Bt se encontram em sua forma inativa, denominadas como protoxinas (130 kDa). Ao serem ingeridas pela praga, a protoxina é dissociada após a retirada de aminoácidos nas extremidades da proteína por ação de proteases exclusivas do pH alcalino (pH ~9,5) de algumas ordens de insetos (Bravo et al., 2004).

Após a ingestão, são sugeridos diferentes modelos moleculares caracterizando o mecanismo de ação das toxinas Cry (Bravo et al., 2004; Zhang et al., 2006). Entretanto, o modelo de ligação sequencial proposto por Bravo et. al. (2004) é o mais difundido. Basicamente, a proteína ativa (65 kDa) obtida após a solubilização da protoxina por proteases, interage com proteínas presentes na membrana intestinal do inseto, aminopeptidase (APN), fosfatase alcalina (ALP) e a proteína tipo-caderina, respectivamente. A ligação à caderina favorece a oligomerização da toxina, conformando a molécula em um tetrâmero denominado como pré-poro. Em consequência, há uma intensificação da interação dos receptores glicosilfosfatidil-inositol (GPI), ANP e ALP,

localizados dentro de camadas lipídicas. O evento leva a inserção do pré-poro à membrana, ocorrendo a formação do poro, com o sequente choque osmótico que resulta na lise celular e morte do inseto (Gomez et al., 2002; Bravo et al., 2004; Pacheco et al., 2009).

A proteína Cry se encontra no grupo das α -hélice, apresentando uma estrutura 3D composta por três domínios (Figura 3A) (De Maagd et al., 1996; Palma et al., 2014). Os domínios proteicos são responsáveis pelo modo de ação da proteína, determinando a especificidade das toxinas Cry na interação, ligação, oligomerização, inserção e formação de poros na membrana intestinal de insetos-praga (Figura 3B) (Palma et al., 2014).

O domínio I apresenta um espiral helicoidal alfa, com sete hélices localizadas ao redor da hélice central. A região está envolvida com a inserção da proteína na membrana do inseto, devido suas características anfipática, aromática e hidrofóbica (Li et al., 2001; Wang et al., 2019). O domínio II possui 3 folhas antiparalelas unidas em formato de beta-prisma, com 3 dobras simétricas. A região do ápice das alças determinam a interação com o receptor e a especificidade do domínio. O domínio III é menos variável, consistindo em uma estrutura beta-sanduíche, formada por duas folhas β antiparalelas, com função também similarmente associada à ligação nas célula alvo, reconhecendo as porções de açúcar presentes nos receptores. Além disso, o domínio mantém a integridade estrutural da proteína ativa (Pigott et al., 2008; Wang et al., 2019).

Os modelos da atividade molecular de proteínas Cry foram elucidados em pragas pertencentes à ordem Lepidoptera, com a descrição de sintomas semelhantes em resposta à toxina entre as pragas dessa ordem (hiporexia, disfunção peristáltica intestinal e paralisia geral do inseto) (Yu et al., 1997). Entretanto, aproximadamente 800 proteínas com toxicidade para diferentes pragas são distribuídas entre 75 famílias listadas em um banco de dados *on-line* atualizado “*Bacterial Pesticidal Protein Database*” (BPPRC) (Crickmore et al., 2022). Dentre elas, proteínas das famílias Cry1, Cry2, Cry9, Cry15, Cry20, Cry51, Cry54, Cry59 são referidas como proteínas para controle de lepidópteros praga (Van Frankenhuyzen 2009; Jouzani et al., 2017). Nesse mesmo banco são listadas todas as proteínas relacionadas à família Vip3 de Bt, toxina que também apresenta espectro de ação específico para lepidópteros praga.

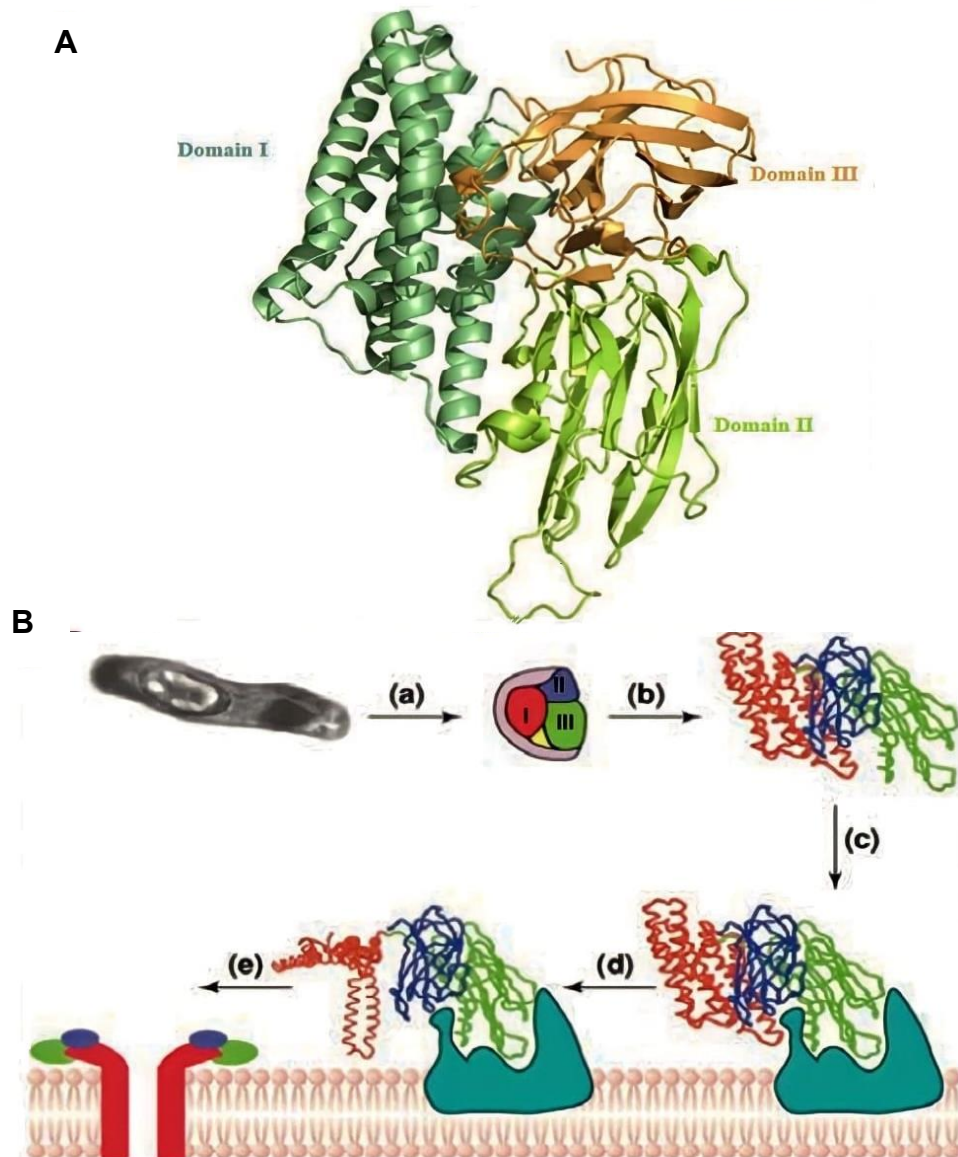


Figura 3. Estrutura tridimensional da proteína Cry. A) Apresentação do três domínios da proteína Cry. B) Interação dos domínios proteicos durante a atividade inseticida da molécula. (a) Fase de ingestão e solubilização da protoxina no intestino médio do hospedeiro; (b) Ativação proteolítica da toxina nos terminais N e C; (c) Fase de interação da toxina com sítios de ligação no epitélio membrana, onde o domínio III atua como uma âncora nas bicamadas lipídicas para mediar a biotoxicidade; (d) Mudança conformacional revelando um grampo helicoidal entre os loops 4-5 domínio I; (e) Oligomerização e incorporação na membrana do intestino médio para fazer canais iônicos ou poros (Qamar et al., 2021). Fonte: Adaptado de Qamar et al., 2021.

2.2.3 Proteínas inseticidas Vip3: características estruturais e funcionais

A proteína Vip é comumente encontrada em cepas nativas de Bt são frequentemente estudadas por serem boas alternativas complementares à ação de proteínas inseticidas da família Cry (Núñez-Ramírez et al., 2020). Existem quatro famílias de proteínas Vip: as proteínas binárias Vip1 e Vip2, proteínas Vip3 e proteínas Vip4. Dentre elas, as proteínas Vip3 são as mais estudadas pelo amplo espectro de ação contra lepidópteros praga e sua importância comercial na agricultura (Crickmore et al., 2020), sendo também o objeto de estudo dessa tese.

As proteínas Vip3 apresentam cerca de 789 aminoácidos e uma massa molecular de 89 kDa. A arquitetura tridimensional da protoxina é organizada em cinco domínios distribuídos em forma de pirâmide (Figura 4) (Núñez-Ramírez et al., 2020). Assim como nas proteínas Cry, a ativação enzimática de Vip3 é essencial para sua função inseticida e os domínios funcionais são indispensáveis para o processo (Bel et al., 2017; Jiang et al., 2020; Núñez-Ramírez et al., 2020).

A proteína inseticida Vip3 é organizada em uma região N-terminal (domínios I, II e III) altamente conservada. Essa extremidade forma um núcleo e o ápice da molécula, enquanto os domínios C-terminais (IV e V) são expostos ao solvente (Núñez-Ramírez et al., 2020). Na porção N-terminal, o domínio I apresenta-se com quatro α -hélices e é o sítio de clivagem de proteases semelhantes à tripsina (entre os aminoácidos 198 e 199) (Bel et al., 2017; Núñez-Ramírez et al., 2020). O domínio II (resíduos 200–325) começa imediatamente após o local de clivagem. Alguns resíduos de aminoácidos encontram-se em contato ao solvente (resíduos 190-202), viabilizando a clivagem da tripsina no domínio I. O domínio II desempenha o papel de estabilizar a proteína durante o processamento por meio de duas alças que são projetadas na etapa de oligomerização (Núñez-Ramírez et al., 2020).

O domínio III (resíduos 328–532) é formado por três folhas β -antiparalelas e se assemelha às proteínas Cry por apresentar uma dobra de prisma. Núñez-Ramírez et al. (2020) confirmou que o domínio interage com os resíduos 14-23 da porção N-terminal os prendendo contra o tetrâmero, porém a função desse domínio não é elucidada. Possivelmente está associado ao papel central no direcionamento da ligação da proteína na célula hospedeira (Jiang et al., 2020). Na região C-terminal os domínios IV e V se apresentam com dobras de *motifs* ligantes de carboidratos (CBM) e não interagem com a região N-terminal. Em uma predição aliada a ensaios *in vivo* publicada recentemente

confirmaram que os domínios IV e V determinam a especificidade da proteína em relação a seu hospedeiro. A ausência desses domínios afeta o reconhecimento das células da membrana epitelial do inseto, impedindo a interação entre a proteína e a superfície da membrana, anulando a toxicidade (Lázaro-Berenguer et al., 2022).

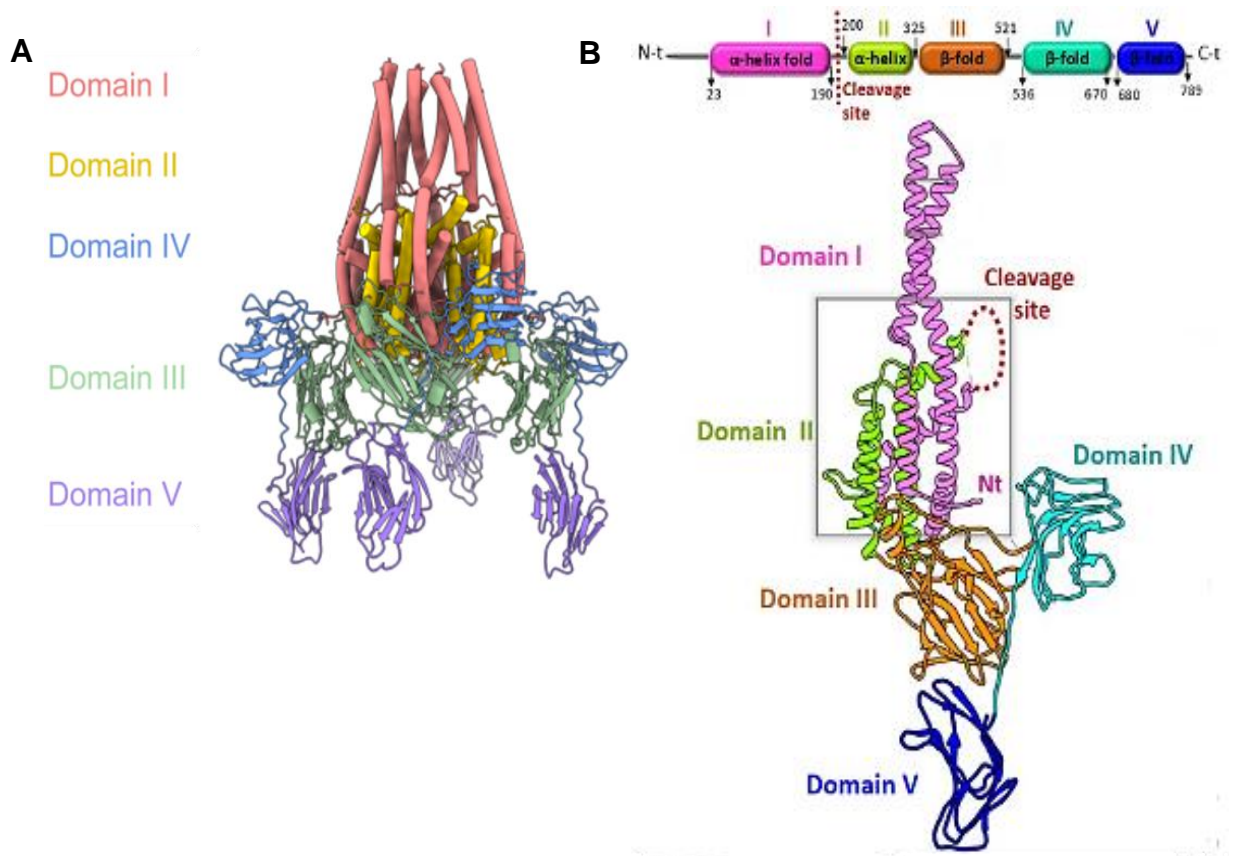


Figura 4. Estrutura tridimensional da proteína Vip3. A) Microscopia crioelétrica da estrutura primária da proteína Vip3A; B) Conformação da proteína Vip3, com destaque para os cinco domínios e o local de clivagem por proteases no domínio I. Fonte: Adaptado de Núñez-Ramírez et al., 2020; Lázaro-Berenguer et al., 2022.

Uma semelhança encontrada entre o modo de ação das proteínas Cry e Vip3 refere-se à dependência das proteases do hospedeiro para ativação da proteína após a ingestão pelo inseto. A ação da tripsina e outras enzimas no intestino médio do inseto desencadeia uma alteração conformacional no domínio I, no ápice da pirâmide, reconfigurando em uma agulha de aproximadamente 200 Å de comprimento (Figura 5A) (Núñez-Ramírez et al., 2020).

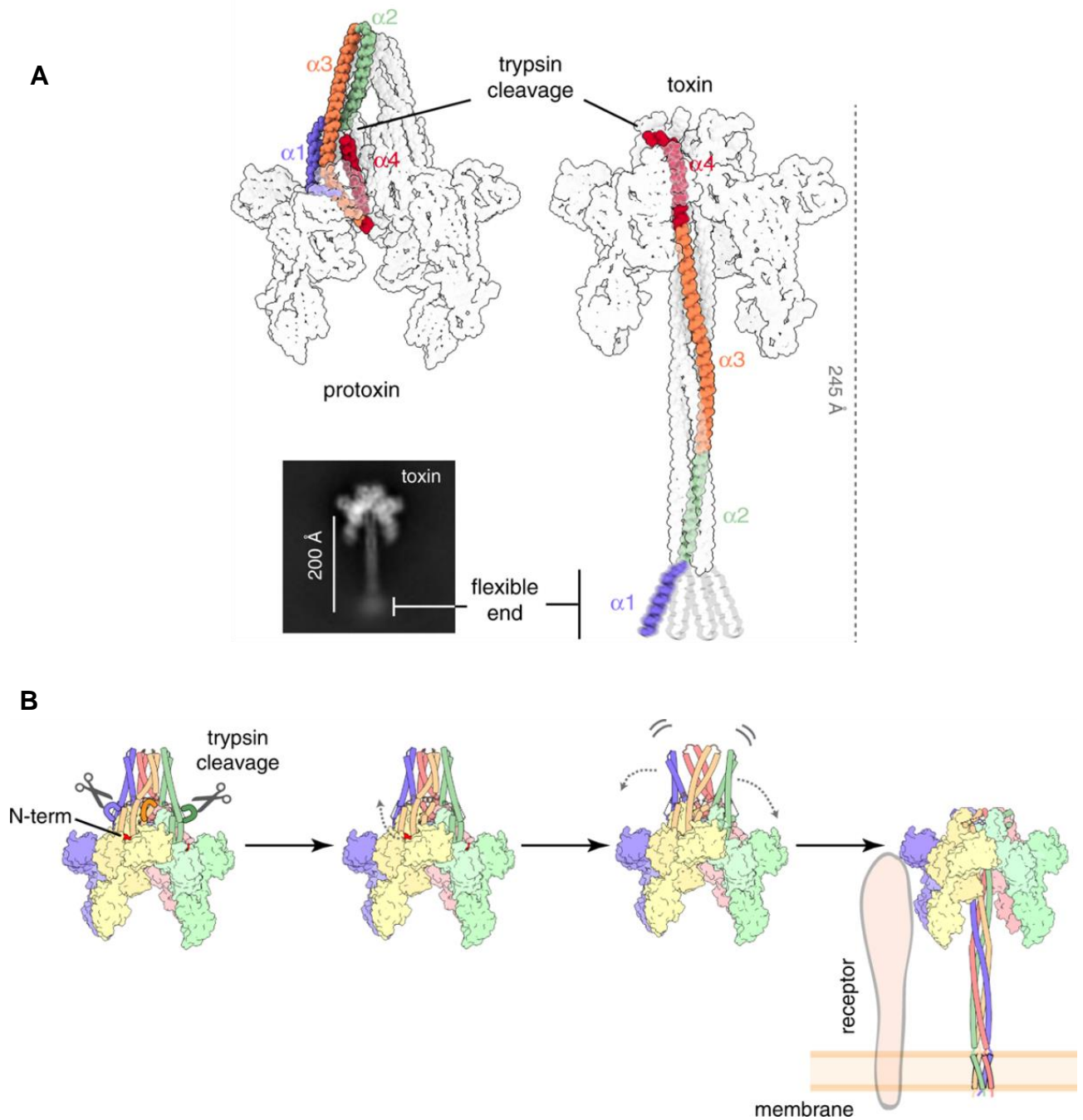


Figura 5. Alteração conformacional da proteína Vip3 após ativação proteolítica. A) Rearranjo do domínio I, com destaque para a flexibilidade das alfas-hélices ao estender a extremidade em espiral; B) Inserção da extremidade N-terminal na bicamada lipídica, permitindo a interação da região C-terminal com receptores presentes na superfície da membrana. Fonte: Adaptado de Núñez-Ramírez et al., 2020.

Após a proteólise, a Vip3 irá formar dois fragmentos diferentes de 19–22 e 62–66 kDa, associados ao domínio I e aos domínios II-V, respectivamente (Quan et al., 2021; Lázaro-Berenguer et al., 2022). Esses fragmentos se mantêm ligados e se reorganizam

à proteína ativada, que ligarão à membrana peritrófica através do domínio V. Posteriormente, os domínios II e III interagem com os potenciais receptores das vesículas da membrana da borda escovada (BBMs), poré o mecanismo ainda não foi elucidado (Quan et al., 2021; Chen et al., 2023). Após a interação com os receptores, os domínios I e III induzem a citotoxicidade por meio da formação do poro que irá permitir a internalização da molécula (Figura 6) (Chen et al., 2023).

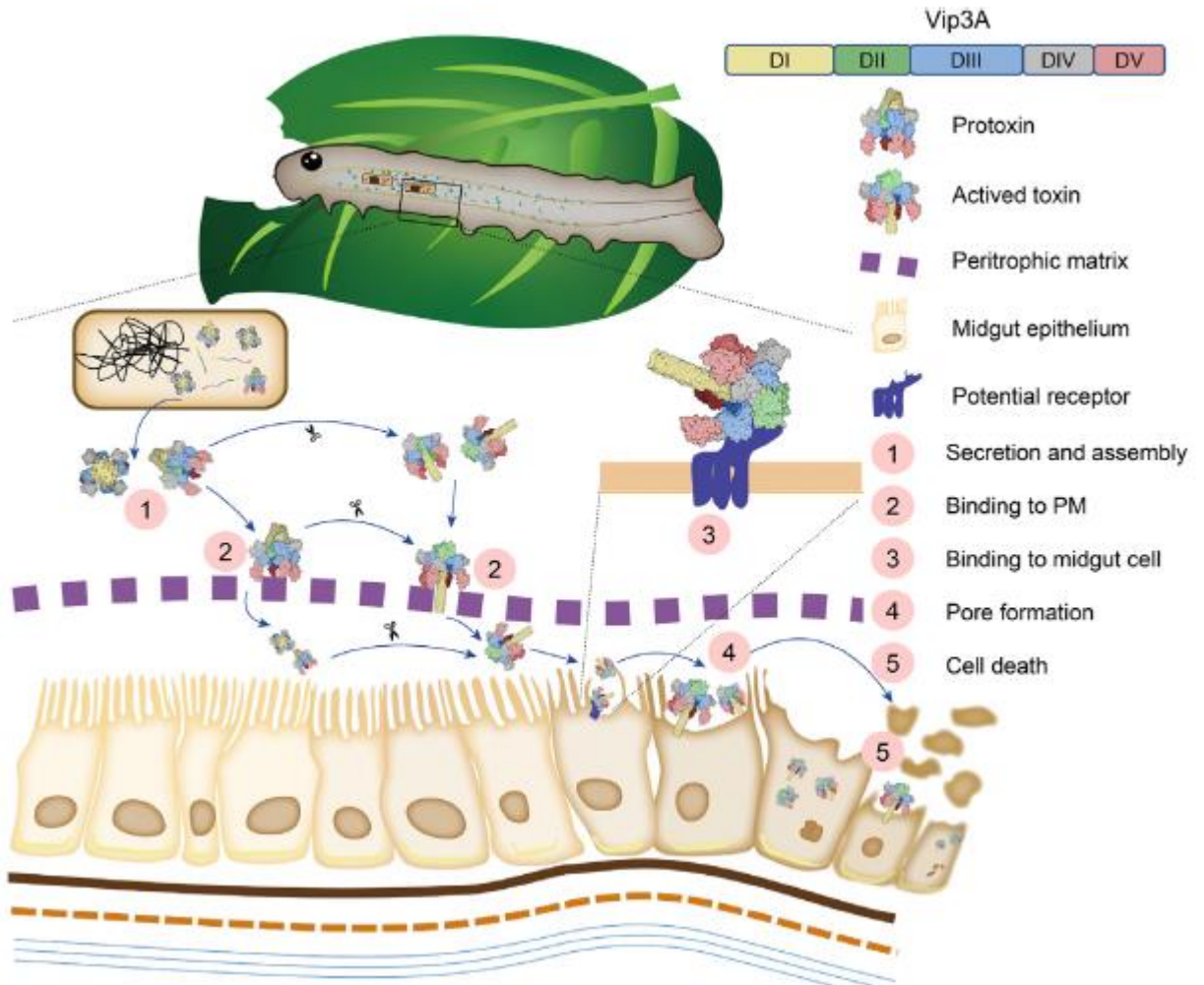


Figura 6. Modelo de formação de poros desencadeado pela Vip3 em insetos. A proteína é ativada pela presença de enzimas proteolíticas no intestino do inseto. O domínio I mantém a estabilidade do trêmero formado, mas o momento em que há a clivagem e a sequente ligação na matriz peritrófica é desconhecida (1). Vip3 se liga à matriz peritrófica através do domínio V, mas o local específico também não é conhecido (2). O mecanismo para atravessar a matriz deve ser elucidado, mas assim feito, os domínios II e III interagem com receptores específicos presentes na BBMV (3), desencadeando a formação de poros nessas células por meio dos domínios I e III (4). Após a internalização da proteína, ocorre a citotoxicidade (5) que poderá causar a morte do inseto. Fonte: Chen et al., 2023.

Alguns receptores principais podem estar envolvidos com o processo de ligação da proteína Vip3 à BBMV. Uma glicoproteína semelhante à tenascina foi sugerida como receptor de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), onde a mesma após se ligar à Vip3 interfere na função do canal que transporta nutrientes processados no intestino do inseto (Osman et al., 2019).

Outra proteína de ligação foi localizada em *S. frugiperda*, denominada como receptor do fator de crescimento de fibroblastos (*Sf*-FGFR) e pertence à subfamília da tirosina quinase. A ligação entre a Vip3 e *Sf*-FGFR ocorre no citoplasma e após a internalização da proteína inseticida, pode ativar uma via de sinalização relacionada à apoptose da célula do inseto, similarmente ao que ocorre em linhagens celulares de câncer de pulmão em mamíferos (Jiang et al. 2018a).

As proteínas ribossômicas S2, além do receptor *scavenger* tipo C de *S. frugiperda* (*Sf*-SR-C), são similarmente associadas à resposta endocítica na célula do inseto (Jiang et al. 2018b). Em análises *in vitro*, a proteína multifuncional Proibitina 2 (PHB2) também facilitou a internalização de Vip3A em linhagens de células de *S. frugiperda*, além de manter a estabilidade das mitocôndrias (An et al., 2022).

O mecanismo de ligação entre os domínios da Vip e a BBMV do hospedeiro ainda tem muito a ser explorado. A exemplo, Shan et al. (2022) investigaram o mecanismo inseticida de Vip3Aa envolvendo os receptores *Sf*-SR-C e *Sf*-FGFR. Os resultados indicaram que não houve mudança significativa na sensibilidade de *S. frugiperda* a Vip3Aa após silenciar o gene *Sf*-FGFR ou *Sf*-SR-C de linhagens homozigóticas usando o sistema de edição de genes CRISPR/Cas9. Isso demonstrou a complexidade do modo de ação da Vip3A e que as inconsistências de resultados entre diferentes grupos de pesquisa exigem maior investigação.

De maneira geral, a virulência de Vip3 sobre insetos-praga pode ser explicada pelo modelo de formação de poros (Figura 6) (Kunthic et al., 2017; Syed et al., 2020). Após a ativação proteolítica e a ligação da Vip3A à BBMV, o intestino médio do inseto será danificado, com sintomatologia semelhante às proteínas Cry (inchaço ou rompimento do intestino médio e/ou formação de poros) (Chakroun e Ferré, 2014). O modelo referente à permeabilização da membrana e formação de poros pode ser realizada pela ação do pH em condições ácidas e neutras, enquanto o pH alcalino induz a mudança conformacional da Vip3 e na perda da atividade de formação de poros (Kunthic et al., 2017).

2.2.4 Plantas Bt e manejo de resistência de *Spodoptera frugiperda*

A tecnologia do DNA recombinante permitiu o desenvolvimento dos transgênicos de primeira geração, aos quais cultivares vegetais foram manipulados geneticamente para obtenção de caracteres-alvo como resistência a insetos e tolerância a herbicidas (Obembe et al., 2011). Quase 30 países possuem algum cultivo transgênico liberado, sendo Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canadá e Índia os países com maiores extensões em culturas biotecnológicas (ISAAA, 2022).

Sete plantas geneticamente modificadas são aprovadas para comercialização no mercado brasileiro: algodão, milho, soja, trigo (farinha), feijão, cana-de-açúcar e eucalipto (CTNBIO, 2023). Os genes de *B. thuringiensis* estão presentes em 68 eventos transgênicos de milho, soja, algodão e cana-de-açúcar (CTNBIO, 2023). A expansão da adoção da tecnologia Bt é conseqüente dos benefícios que a mesma oferece. A redução do uso de inseticidas químicos nocivos ao meio ambiente, menor emissão de carbono na atmosfera, economia na aquisição de insumos para o controle de pragas, o modo de ação específico da proteína inócua à saúde humana e serviços do ecossistema são alguns dos benefícios apresentados (ISAAA, 2017).

No entanto, populações de pragas importantes como a *S. frugiperda* podem desenvolver resistência a determinado cultivar transgênico. Um inseto resistente caracteriza-se pela redução da sua suscetibilidade a uma toxina (Tabashnik, 1994). O desenvolvimento da resistência pode estar associado a adaptações biológicas e fisiológicas do inseto e outros fatores, conforme pontuado abaixo (Oppert et al., 1997; Ferré et al., 1991; Gillespie et al., 1997; Lavine e Strand, 2002; Head e Greenplate, 2012; Faretto et al., 2017; Prasanna et al., 2022):

- alterações no pH intestinal do inseto e da atividade das enzimas proteolíticas na ativação e processamento da protoxina;
- aumento da capacidade de coagulação e melanização da hemolinfa no tecido intestinal para responder ao estresse da toxina;
- redução da eficiência na ligação da toxina aos receptores intestinais do inseto;
- alteração de sítios de ligação entre a proteína inseticida e a membrana;
- aumento da desintoxicação celular e da eficiência no metabolismo de compostos tóxicos;
- ausência ou redução dos custos adaptativos ao hospedeiro, mesmo em casos onde é usada a rotação de culturas Bt;

- aumento na taxa de desenvolvimento, razão sexual, gerações por ano e taxa/tempo de reprodução;
- aumento da capacidade de migração dos insetos e dispersão de alelos de resistência;
- sobrevivência de indivíduos portadores de alelos de resistência em doses subletais;
- redução do canibalismo mediante adaptação à subletalidade;
- favorecimento da resistência pela paisagem do agroecossistema tropical;
- estratégias de manejo de resistência eficientes praticadas de maneira errônea;
- necessidade de implementação de programas de treinamento e educação para agricultores e profissionais envolvidos no cenário;
- rastreamento ineficiente de campos de cultivo e os padrões de uso de uma tecnologia de milho Bt;
- detecção tardia dos casos de resistência e monitoramento ineficiente dessas populações.

A implementação de algumas estratégias retardam a evolução das características adaptativas de resistência em cultivos de plantas Bt. Destaca-se o monitoramento do desenvolvimento de resistência da tecnologia Bt e o intensivo trabalho de transmissão do conhecimento a agricultores e profissionais sobre o manejo de pragas (Prasanna et al., 2022). Cultivares com expressão de uma alta dose da proteína inseticida, aliado à utilização de área de refúgio, são estratégias primárias para o manejo de resistência a insetos (Gould, 1998; Tabashnik et al., 2009; U.S. Environmental Protection Agency, 2018; Tavares et al., 2021; Prasanna et al., 2022).

Plantas Bt devem expressar uma concentração de proteína inseticida 25 vezes acima da quantidade necessária para causar a mortalidade 99% dos indivíduos suscetíveis (SS) e 95% dos indivíduos heterozigotos (RS) para alelos de resistência. Em casos raros, insetos resistentes (RR) poderão sobreviver. Entretanto, uma proporção específica de plantas hospedeiras não-Bt devem ser cultivadas para servir como refúgio de insetos suscetíveis (U.S. Environmental Protection Agency, 2018).

O acasalamento aleatório entre os insetos SS preservados no refúgio e os indivíduos RR que emergem dos campos de cultivo Bt resultará em indivíduos RS que serão eliminados pela planta Bt (Andow, 2008; U.S. Environmental Protection Agency, 2018). A durabilidade da resistência da planta Bt ao inseto está relacionada, portanto, à

estrutura genética da população de insetos, além da dominância, herança, complexidade e frequência inicial de alelos de resistência (Álvarez-Alfageme et al., 2022).

Em outra abordagem, a combinação de dois ou mais genes estranhos na mesma planta – também chamada de piramidação de genes - é outra estratégia no IRM (Quin, et al., 2022; Rajput et al., 2022). A expressão de proteínas inseticidas na planta devem apresentar modos de ação diferentes contra o inseto alvo (Rajput et al., 2022). Dessa forma, caso o inseto em contato com a planta desenvolva alguma variação genética adaptativa contra determinado produto expresso, a outra molécula defenderá a planta da herbivoria daquele indivíduo. Assim, evita-se casos de resistência cruzada positiva em plantas Bt, situação onde insetos resistentes a uma determinada proteína também desenvolvem resistência contra outras proteínas expressas na planta (Carrière et al., 2015).

Nesse contexto, casos de resistência em lavouras Bt foram reportados em todo o mundo (Álvarez-Alfageme et al., 2022). Populações de *S. frugiperda* resistentes às proteínas Cry1Ab e Cry1F foram documentadas em alguns trabalhos no Brasil, antes mesmo de completar 10 anos de utilização de plantas transgênicas no país (Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016).

Uma das causas para a evolução de populações Cry-resistentes de *S. frugiperda* a proteínas Bt refere-se à apresentação da resistência cruzada pela praga. Até o ano de 2015, a maioria dos eventos transgênicos no mercado expressavam proteínas da família Cry1 (CTNBIO, 2023). O compartilhamento de semelhanças quanto ao modo de ação das proteínas Cry1 acelerou o processo de seleção de indivíduos resistentes. A resistência cruzada foi associada principalmente ao compartilhamento dos mesmos sítios de ligação entre a proteína e os receptores intestinais do inseto (Ferré e Van Rie, 2002; Tabashnik et al., 2011; Hernández-Rodríguez et al., 2013). Mutações em transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABCC2), por exemplo, foram identificadas. O quadro de leitura do gene *ABCC2* pode ser alterado pela adição/substituição/deleção de nucleotídeos, o que impede a codificação de uma glicoproteína que facilita a inserção da proteína Cry na BBMV do inseto (Banerjee et al., 2017; Flagel, 2018).

Dessa forma, explica-se os insucessos ocorridos desde a liberação do primeiro milho Bt ocorrida em 2008, expressando a proteína Cry1Ab e o insucesso sendo apontado em 2011. Similarmente, o milho Cry1F foi introduzido em 2009 e casos de resistência foram registrados após três anos. Um evento piramidado expressando as

proteínas Cry1A.105 + Cry2Ab2 foi introduzido em 2009, mas danos inesperados no campo foram relatados 2013. Da mesma forma, o evento expressando Cry1A.105 + Cry2Ab2 + Cry1F lançado em 2013, e um ano depois já haviam relatos de insucesso (Fatoretto et al., 2017).

As proteínas Cry1 e Cry2 possuem sítios de ligação independentes em *S. frugiperda* (Figura 7) (U.S. Environmental Protection Agency, 2010; Hernández-Rodríguez et al., 2013; Figueiredo, 2019). Entretanto, os casos onde eventos piramidados com as proteínas Cry1 e Cry2 não controlaram eficientemente populações resistentes a Cry1 em campo foram associados à ausência ou uso impróprio da área de refúgio nos cultivos, além da hipótese associada à homologia dessas proteínas. Em diferentes casos de resistência foi notada uma similaridade significativa da sequência de aminoácidos do domínio II (acima de 80%), diferentemente dos domínios I e III. A função do domínio II durante o processo de ligação com a BBMV mutada seria o mecanismo de resistência mais importante. Devido a isso, muitas cepas de insetos resistentes demonstraram ter uma forte redução da capacidade de ligação (Carrière et al., 2015; Carrière et al., 2016; Fatoretto et al., 2017; Kahn et al., 2018). Ao ser exposta ao evento Cry1+Cry2, a população estava melhor adaptada ao modo de ação inseticida, consequência da elevada frequência alélica obtida após tantos anos de pressão de seleção à Cry1 (Farias et al., 2016; Fatoretto et al., 2017).

A resistência cruzada entre proteínas da família Cry2 também foi comprovada (Yang et al., 2017). Mediante ao cenário, houve a implementação de buscas por eventos que expressem proteínas com modo de ação distinto às proteínas Cry. Nesse sentido, em 2010 foi lançado comercialmente o primeiro híbrido com um transgene da proteína Vip3 de Bt (Fatoretto et al., 2017; CTNBIO, 2023). O sucesso da utilização dessa proteína é confirmado através das diferenças estruturais entre as proteínas Cry. Em soma, os ensaios de ligação demonstram ausência de competição com proteínas Cry por sítios de ligação em *S. frugiperda* (Figura 7) (Sena et al., 2009; Bergamasco et al., 2013; Lemes et al., 2014; Yang et al., 2017; Kahn et al., 2018; Figueiredo et al., 2019; Jurat-Fuentes et al., 2021).

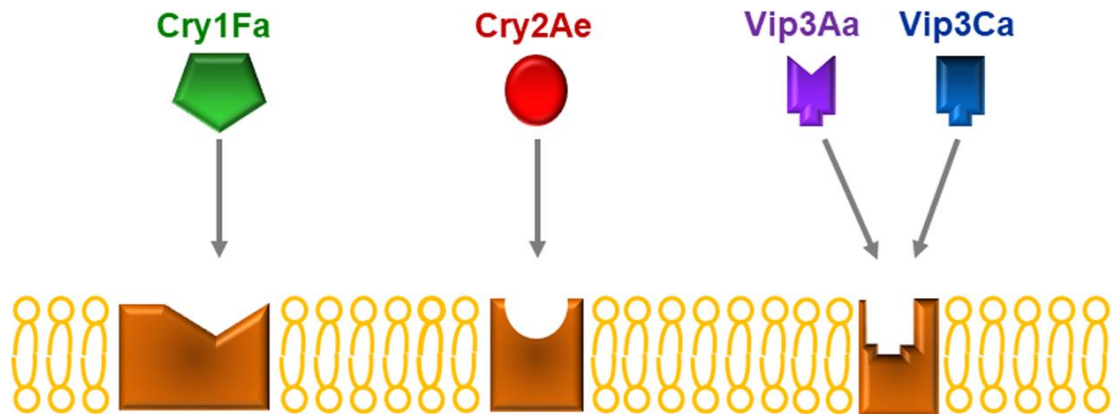


Figura 7. Modelo de sítio de ligação para as proteínas Cry e Vip3 em *S. frugiperda*. As proteínas Cry1Fa e Cry2Ae exemplificadas no esquema não compartilham sítios de ligação com as proteínas Vip3. Entretanto, as proteínas da família Vip3 apresentam sítio de ligação compartilhado entre si, tal como é exemplificado com as proteínas Vip3Aa e Vip3C. Fonte: Kahn et al., 2018.

As proteínas Vip3 são importantes aliadas ao manejo integrado de resistência, mas não é uma solução para o mesmo, vista a forte pressão de seleção existente sobre a praga e a crescente frequência alélica de resistência (Kahn et al., 2018; Wen et al., 2023). Atualmente não há populações de *S. frugiperda* resistentes à proteínas Vip3 em campo (Wen et al., 2023). Entretanto, o rastreamento dos alelos de resistência à proteína Vip3 é essencial, visto que a extensão territorial agrícola do Brasil é muito grande. Mapear a distribuição geográfica do alelo de resistência de *S. frugiperda* para Vip3 pode facilitar para as empresas e agricultores na implementação de práticas de manejo estratégicas em regiões onde o alelo de resistência foi inicialmente detectado (Amaral et al., 2019).

O constante entendimento sobre o desempenho da Vip3 nos programas de manejo a *S. frugiperda* se faz primordial para estender a durabilidade da tecnologia e propor novas estratégias de controle. Para ilustrar tal importância, a seleção de uma linhagem de *S. frugiperda* resistente à Vip3Aa20 presente em milho foi realizada em laboratório. A resistência dessa praga à proteína testada foi caracterizada funcionalmente autossômica recessiva e monogênica entre neonatas e o quarto ínstar larval. Além disso, a linhagem resistente a Vip3Aa20 sobreviveu ao milho transformado ao alcançar instares tardios (Bernardi et al., 2016; Miraldo et al., 2016). Em soma, Amaral et al. (2019) demonstraram que alelos de resistência de *S. frugiperda* à proteína Vip3Aa20 estão amplamente distribuídos nas regiões produtoras de milho no Brasil e

sua frequência aumenta ao longo das safras.

Em laboratórios, o aprofundamento sobre os modos de ação de Vip3 e a dinâmica de controle dessa proteína à populações Cry-resistentes pode ser explorado por meio de bioensaios de toxicidade e estudos envolvendo as microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio (BBMVs) dessas linhagens. No mesmo sentido, a investigação das características dos domínios funcionais existentes em Vip3 pode ser feita por meio de ferramentas robustas de predição (Chakrabarty et al., 2020).

Por fim, o uso de inseticidas químicos para controlar espécies de lepidópteros em cultivos Bt e convencionais no Brasil aumentaram devido a surtos de pragas secundárias ou evolução da resistência (Machado et al., 2022). Portanto, o fomento pela busca por novas moléculas e/ou tecnologias que apresentem modo de ação diferentes às proteínas de Bt, controlem com eficiência linhagens Cry-resistentes e não tenham impacto negativo ao meio ambiente e organismos não-alvos devem ser desenvolvidas por grupos de pesquisas de empresas, universidades e governo.

2.3. *Spodoptera frugiperda* e a busca por inovações no manejo de resistência

O manejo de resistência de pragas, inclusive da *S. frugiperda*, tem sido um cenário desafiador no Brasil e no mundo. Mediante a isso, empresas e instituições públicas e privadas impulsionam a identificação de soluções que possam mitigar os impactos econômicos e ambientais envolvidos no desafio. A abordagem abaixo pretende apontar algumas das soluções tendentes no mercado, como a identificação de novas moléculas e tecnologias, ou ainda a otimização do uso das mesmas.

2.3.1 Otimizações envolvendo as proteínas Bt

Por muito tempo, a busca por novas linhagens de Bt para o controle de pragas de *S. frugiperda* manteve enfoque para ampliar os conhecimentos sobre as proteínas Cry e Vip3 (Vázquez-Ramírez et al., 2022). Muitas linhagens foram registradas comercialmente como bioinseticida, promovendo Bt como a principal bactéria do controle biológico de pragas agrícolas e ingrediente ativo de aproximadamente 20% dos produtos fitossanitários registrados no Brasil (Agrofit, 2022). A importância da bactéria foi aumentada após a mesma tornar fonte de genes para construção de eventos transgênicos, conforme aqui mencionado.

Com os desafios frente a evolução de insetos resistentes às proteínas Cry, muitos

estudos sobre os domínios proteicos envolvidos na atividade inseticida de proteínas Bt foram desenvolvidos (Jiang et al., 2023). Para tal, a obtenção de uma proteína de alta pureza é essencial para realizar uma análise precisa e detalhada da atividade proteica (Yamamoto, 2022).

A cepa cultivada pode expressar diferentes metabólitos inseticidas. A presença de esporos no meio de cultura está correlacionada à níveis de toxicidade elevados, devido ao sinergismo existente entre as duas estruturas (Loutfi et al., 2020; Dubovskiy et al., 2021). O isolamento de genes inseticidas a partir de cepas de Bt e a clonagem molecular em um vetor de expressão heteróloga permitiu a obtenção dessas proteínas purificadas e o aprofundamento sobre informações a respeito das suas características (Wang et al., 2018).

Essa otimização alavancou o detalhamento dos domínios funcionais das proteínas Bt. A proteína Cry1A.105, por exemplo, expressa em eventos da Monsanto (atual Bayer Crop Science), foi obtida por meio da manipulação da sua sequência de aminoácidos. Assim como outras proteínas Cry, a quimera apresenta três domínios, onde os domínios I e II foram construídos a partir das sequências das proteínas Cry1Ab ou Cry1Ac, o domínio III foi derivado da proteína Cry1F e a região C-terminal foi construída conforme Cry1Ac (Wang et al., 2018).

Embora a troca de domínio tenha sido proposta para obter uma nova especificidade no hospedeiro, aumentar a toxicidade em insetos que apresentam a suscetibilidade ou melhorar a atividade inseticida da proteína de alguma forma, a estratégia não demonstra ser tão eficiente no manejo de resistência (Yamamoto, 2022). Entretanto, esses experimentos trouxeram a possibilidade de obter informações a respeito da interação entre proteínas Cry ou Vip3 e o hospedeiro, assim como isso pode ser aplicado no manejo de resistência.

Nesse mesmo sentido, a técnica de mutagênese sítio-dirigida têm contribuído enormemente para a compreensão do modo de ação de proteínas Vip3. Embora a família apresente resistência cruzada entre si através do compartilhamento de receptores, a toxicidade em uma mesma praga pode ser maior ou menor a depender da proteína. A alteração em um ou poucos resíduos da sequência Vip3 pode aumentar ou reduzir a toxicidade. Dá-se a importância dos ensaios *in vivo* de toxicidade, ligação e de competição, além das análises de predição proteica e imunohistoquímicas (Figueiredo et al., 2013; De Escudero et al., 2014; Chakroun e Ferré, 2014; Gomis-Cebolla et al., 2017; Quan et al., 2021; Gupta et al., 2021; Vázquez-Ramírez et al., 2022).

2.3.2 Novas tecnologias na piramidação de genes

A piramidação de genes é um pré-requisito para a manipulação genética de características em eventos comerciais. Muitas limitações envolvendo a piramidação genética em plantas ainda precisam ser otimizadas. Como exemplo, há a segregação de transgenes não co-localizados no mesmo *locus* de indivíduos em uma população após realizar a introdução sequencial de genes por processos de re-transformação ou por cruzamento entre eventos transgênicos. Quanto maior a população, maior o tempo e gastos são despendidos para o rastreamento de plantas que apresentem os transgenes (Ceccon et al., 2020; Rajput et al., 2022). Outra limitação seria a construção de cassetes de expressão que possuam mais de um gene, como em vetores Ti (utilizados em *Agrobacterium*) ou em construções policistrônicas (Rajput et al., 2022).

Em suma, o maior enfoque das empresas nas pesquisas envolvendo piramidações genéticas refere-se à busca por novas proteínas e tecnologias (Rajput et al., 2022). A tecnologia CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) – Cas (*CRISPR-associated*) é uma tecnologia de edição de genomas muito explorada nos últimos anos. De forma simples, a técnica consiste na projeção de um RNA guia (*sgRNA*) unido a uma nuclease (a Cas9, por exemplo). O RNA irá direcionar a nuclease em uma região específica, baseando-se na construção de um *sgRNA* complementar ao alvo. Assim, a Cas conseguirá identificar, ligar e produzir quebras de fita dupla no local do genoma, podendo resultar na produção de uma proteína não funcional truncada por meio da alteração da janela de leitura dos códons (Jinek et al., 2012; Chiang et al., 2016; Ying et al., 2022).

A utilização do CRISPR no desenvolvimento de cultivares resistentes a insetos é favorecida por dispensar a inserção de uma sequência heteróloga de origem bacteriana ou viral durante o processo de transformação. A liberação de transgênicos obedece uma regulamentação rigorosa e ainda é proibida em muitos países (Qaim et al., 2009; Karmakar et al., 2022). Nesse sentido, a técnica CRISPR dispensa a inserção de transgenes no genoma da planta, o que facilita seu processo de regulamentação no mercado (Karmakar et al., 2022).

No Brasil, a Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018, publicada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, classifica a edição precisa de genomas sem a inserção de transgene como uma das Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão. A deliberação de eventos utilizando CRISPR é feita após aprovação das comissões competentes, com pareceres individuais de cada produto (Brasil, 2018).

Assim, uma cultivar que demoraria dez anos para ser aprovada para deliberação como OGM, pode ter um tempo reduzido para um tempo máximo de cinco anos caso seja obtida pelo CRISPR. Somado a isso, plantas editadas envolvem custos mais baixos e as modificações são mais precisas (Ayanoğlu et al., 2020).

Como estratégia de resistência de plantas a insetos, cultivares podem ser editadas para permitir a retração dos insetos ao hospedeiro por meio da modificação de compostos voláteis liberados pela planta. Em uma outra perspectiva, o CRISPR é uma ferramenta importante na compreensão dos processos de interação praga e hospedeiro através da desativação de genes vitais para o inseto. Ainda é possível a utilização do CRISPR para editar genes relacionados ao comportamento de acasalamento e impedir a reprodução de insetos, suprimindo a população da praga alvo (Karmakar et al., 2022). Entretanto, no Brasil, as plantas desenvolvidas a partir de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão são na maioria voltadas para características nutricionais ou de tolerância a estresses abióticos, como o aumento da digestibilidade em soja e cana-de-açúcar ou soja tolerante à seca (CTNBIO, 2022b).

No contexto do manejo de pragas, piramidações gênicas em plantas com tecnologia de interferência por RNA (RNAi) foram liberadas comercialmente. Resumidamente, a via do RNAi envolve pequenos RNAs dupla fita (dsRNA) que interagem com endonucleases e seus complexos de enzimas e proteínas (complexo da enzima *Dicer* é um deles) (Wilson e Doudna, 2013).

Dentro da célula eucariótica, uma molécula de dsRNA é identificada como uma invasão viral ou como uma atividade de transposon. Nas duas situações a maquinaria celular tentará suprimir a atividade da molécula atípica. Nesse sentido, a utilização da técnica pode ser feita pela entrega de dsRNA alvos para o inseto praga de interesse. Ao serem ingeridos, essas moléculas irão induzir o RNAi, causando “*knockdown*” da transcrição de genes essenciais locais ou sistêmicos, desencadeando a mortalidade da praga (Wilson e Doudna, 2013; Joga et al., 2016; Mezzetti et al., 2022).

Embora exista a necessidade de identificar genes alvo eficientes para o silenciamento pós-transcricional, o RNAi tornou-se uma técnica sustentável e específica para o controle de pragas (Mehlhorn et al., 2021). No Brasil, o evento de milho MZIR098 (VT Pro4[®] - Bayer Crop Science), é capaz de silenciar o gene *Snf7* em *Diabrotica* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae), impedindo a produção de uma proteína que é vital para o funcionamento de tecidos de pragas do gênero. O *Dvsf7* RNA é expresso no sistema radicular da planta em sinergia com a proteína Cry3Bb. Além destes, o evento é

piramidado com outros genes de *B. thuringiensis*, *Agrobacterium thumefaciens* (Hyphomicrobiales: Rhizobiaceae), *Streptomyces viridochromogenes* (Streptomycetales: Streptomycetaceae) e *Sphingobium herbicidovorans* (Sphingomonadales: Sphingomonadaceae). O mecanismo de ação conjunto minimiza os impactos causados ao cultivo em um incremento de produtividade de até 70% (Bayer, 2021; CTNBIO, 2023).

Cultivares com a tecnologia RNAi voltada especificamente para *S. frugiperda* ainda não foram disponibilizadas no Brasil. Entretanto, um composto formulado para pulverizações em lavouras baseado na técnica foi deferido na CTNBIO (2021). Conforme o parecer requerido pela empresa Evolutta Agro Biotecnologia, o produto é uma alternativa promissora para o controle e manejo de resistência das pragas *S. frugiperda* e *H. armigera*. O composto pode reduzir a frequência dos alelos de resistência em regiões agrícolas, podendo ser aplicado individualmente ou em combinação com outras moléculas ou tecnologias existentes (inseticidas químicos, biológicos, plantas transgênicas).

2.3.3 Piramidação de genes: a busca por novas moléculas bacterianas

Nos últimos anos, alinhadas às tendências sustentáveis de mercado, formulações microbianas têm se tornado uma das estratégias de controle de pragas agrícolas de maior viabilidade. No Brasil, mais de 3.000 produtos formulados são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelo menos 252 destes correspondem à inseticidas microbiológicos formulados a partir de bactérias, fungos, vírus ou protozoários (Agrofit, 2022b). Segundo o mesmo relatório, o número de produtos biológicos registrados por ano aumentou 14 vezes em uma década, destacando o segmento de pesticidas microbiológicos com potencial desenvolvimento.

Esse panorama de desenvolvimento de produtos biológicos pode ser explorado por ferramentas robustas da área das ômicas para a busca de novas moléculas bacterianas (Maithani et al., 2022). Bt é uma importante bactéria que pode ser citada como exemplo de sucesso na exploração do seu genoma. O primeiro produto utilizando essa bactéria como princípio ativo foi comercializado em 1938 (Beegle e Yamamoto, 1992). Embora sua produção foi descontinuada, nos anos de 1950, Bt seria novamente alvo de pesquisas. Na década de 1980 os primeiros tabacos transgênicos expressando a proteína Bt foram obtidos (Beegle e Yamamoto, 1992; Barton et al., 1987) e em sequência tantos outros eventos comerciais de importância para a agricultura mundial. Proteínas inicialmente exploradas como biopesticidas, atualmente representam o

ingrediente ativo de 30% dos biopesticidas comercializados em todo o mundo (Šunjka e Mechora, 2022), além de compor o cassete de expressão gênica de pelo menos 64 eventos transgênicos no Brasil (CTNBIO, 2023).

Nesse contexto, Bt é uma bactéria que ainda pode ser explorada. Além de fonte das endotoxinas ou proteínas vegetativas, essa bactéria pode ser fonte de moléculas como as quitinases, potenciais candidatas para entomopatogenicidade em insetos-praga (Dhole et al., 2021).

Quitinases são enzimas produzidas por bactérias do solo para transformar a quitina em fontes de carbono e nitrogênio para seu metabolismo, além de ser um mecanismo de defesa bactericida. A quitina é um polímero de cadeia linear de N-acetil-D - glucosamina (N-acetil-2-amino-2-desoxi – D - glicose), unidas umas às outras por ligações 1,4- β -glicosídicas com uma pequena quantidade de monômeros desacetilados (2-amino-2-desoxi- D-glicose) (Barboza-Corona, 1999; Hsieh et al., 2010; Dhole et al., 2021). A quitinase hidrolisa a ligação interna β -1,4-glicosídica da quitina de invertebrados, fungos e algas para formação do monômero N -acetil-D-glucosamina, em temperatura e pH ótimos (Wang et al., 2016; Dhole et al., 2021).

Estudos para controle do mosquito *Aedes aegypti*, do nematoide *Caenorhabditis elegans* (Rhabditida: Rhabditidae), do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Glomerellaceae:Glomerellales) e lepidópteros praga como *S. frugiperda*, *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae), *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) e *H. armigera* foram realizados utilizando as quitinases e em todos obtiveram-se resultados de mortalidade acima de 70% (Martínez-Zavala et al., 2020). A expressão ectópica de uma quitinase de *X. nematophila* foi obtida em tabaco, conferindo resistência contra *H. armigera* (Mahmood et al., 2022).

As quitinases de Bt podem potencializar o efeito das proteínas Cry ou Vip3 por meio da danificação ou degradação da membrana peritrófica intestinal da praga, estrutura composta em maioria por proteínas e fibras de quitina (Barboza-Corona, 2003). Um gene de quitinase foi clonado para a expressão heteróloga e sua atividade bioquímica foi caracterizada por Augusto (2014). Observa-se a viabilidade, portanto, em explorar essa molécula combinada com outras proteínas inseticidas, para determinar o potencial sinérgico das mesmas e propor combinações candidatas a piramidações em plantas.

Alternativamente às proteínas de Bt, as bactérias gram-negativas *X. nematophila* e *P. akhurstii*, pertencentes à família Morganellaceae, são potenciais fontes de proteínas

inseticidas (Ffrench-Constant et al., 2007). Morganellaceae é reconhecida por apresentar muitos patógenos e bactérias oportunistas associados à ocorrência de doenças em humanos, como meningite e encefalite (Guanghui et al., 2020).

No entanto, a família Morganellaceae apresenta o grupo γ - proteobactérias, que inclui várias espécies entomopatogênicas e que vivem em simbiose com nematoides. A espécie *Steinernema* é hospedeira da bactéria *Photorhabdus*, enquanto o *Heterorhabditis* vive em simbiose com *Xenorhabdus* (Husnik et al., 2011). As duas espécies de bactérias são anaeróbicas facultativas e não-formadoras de esporos. Ambas podem ser diferenciadas pela produção de bioluminescência que apenas a *Photorhabdus* apresenta (Sajnaga e Kazimierczak, 2020).

Na natureza, a interação entre as bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* e seus hospedeiros é muito semelhante. A infecção se inicia após a colonização dos seus respectivos nematoides durante a única fase onde os mesmos conseguem sobreviver fora de um hospedeiro, denominado estágio juvenil infectante (IJ). Nessa fase, os nematoides não se alimentam e as bactérias em simbiose exercerão papéis cruciais como superar a resposta imune do inseto e causar a mortalidade por septicemia, produzir nutrientes a partir do hospedeiro morto para possibilitar o desenvolvimento do nematoide e colonizar o estágio juvenil infectante do nematoide para reinício do ciclo (Castillo et al., 2011; Garcia-Del-Pino et al., 2018; Cimen et al., 2022).

Os nematoides *Steinernema* e *Heterorhabditis* são utilizados como bioinseticidas em alguns países, como os EUA e Canadá. A eficiência no controle, assim como facilidade de criação massal e a inocuidade para seres humanos e organismos não-alvos torna tais produtos uma alternativa promissora (Koppenhöfer et al., 2020). Entretanto, a aplicação das bactérias *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* como inseticidas em larga escala ainda é limitada pela ausência de formulações que garantam a estabilidade dos produtos mediante fatores abióticos (Castillo et al., 2018; Garcia-Del-Pino et al., 2018).

Estudos dos genomas de *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* permitiram associá-las à produção de inúmeros genes envolvidos na codificação de moléculas secundárias de baixo peso molecular e outros metabólitos com atividades inseticida (Bode, 2009; Shi e Bode, 2018; Silva et al., 2020). Dentre estes, expressão heteróloga em *Escherichia coli* permitiu explorar dois genes que têm sido explorado para algumas espécies de lepidópteros praga: *Txp40*, presente em *Photorhabdus*, e *XnGroel*, isolado a partir de espécies de *Xenorhabdus* (Tabela 1). Homóloga à Groel, a proteína XnGroel foi amplamente testada em algumas pragas, sendo inclusive utilizada em cassete de

expressão em plantas. É importante ressaltar que muitos estudos realizados adotaram a injeção como método de entrega, que embora não possa ser aplicado comercialmente como um biopesticidas ou planta transgênica, viabilizou muitas respostas a respeito do modo de ação dessas proteínas.

Txp40 é uma das subunidades tóxicas a lepidópteros e que juntamente ao complexo de toxinas (T_c) e as proteínas MCf1 and MCf2 (*Makes Caterpillar Toxins*), constituem ilhas genômicas putativas que estão envolvidas na virulência de *Photorhabdus* (Brown et al., 2006). Esses mesmos autores associaram a atividade inseticida da Txp40 ao intestino médio do inseto. Ao avaliar a ação da proteína injetada em larvas de *H. armigera*, a matriz peritrófica de larvas tratadas com a proteína começou a se desintegrar após seis horas de tratamento. Após 18h de teste, muitas células do lumen do intestino médio estavam danificadas e o corpo gorduroso, tecido dinâmico onde a maioria das proteínas da hemolinfa são sintetizadas, encontrava-se degradado.

A desintegração da membrana do intestino médio foi semelhante aos danos causados por Bt durante seu modo de ação. Considerando isso, um docking molecular foi realizado para obter um modelo de interação entre Txp40 e proteínas ancoradas no intestino médio de *H. armigera*. Possíveis ligações de hidrogênio foram sugeridas entre Txp40 e as proteínas ABCC2, APN1 e ALP, mesmos receptores envolvidos no processo de toxicidade das proteínas Cry (Shankhu et al., 2020). Porém nada foi comprovado e estudos de ligação se tornam interessantes para confirmar se Txp40 compete pelos mesmos sítios de ligação em relação às proteínas Cry.

Ao analisar indução de resposta imune das pragas *G. mellonella*, *H. armigera*, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), à Txp40, Shankhu et al. (2020) observaram a redução dos níveis de hemócitos, induzindo a citotoxicidade nos insetos. A atividade da enzima *PO*, envolvida na defesa imune do inseto contra patógenos, foi avaliada. Uma eficiente catalisação na oxidação de fenóis para formar depósitos de melanina insolúveis na hemocele do inseto foram demonstrados. Essa reação pode induzir uma alta produção de quinonas que causam a toxicidade na célula do hospedeiro.

As proteínas XnGroel e XeGroel foram isoladas a partir de espécies *X. nematophila* e *X. ehlersii*. Ambas possuem 96,9% de similaridade entre si (Shi et al., 2012) e apresentam diferentes atividades inseticidas (Tabela 1). XnGroel é homóloga à proteína Groel de *E. coli*, com 89% de similaridade (Joshi et al., 2008). Essas proteínas são do tipo chaperonas, um importante grupo associado às funções de enovelamento e

na montagem de proteínas não-nativas codificadas nessa bactéria. Em proteínas que possuem alto peso molecular, proteínas ácidas ou que apresentam entre três e cinco domínios de estruturas α/β , GroEL viabiliza o redobramento de forma eficiente (To et al., 2022).

XnGroel foi isolada a partir da vesícula de membrana externa (OMVs) de *X. nematophila*. As OMVs são produzidas por diversas bactérias gram-negativas e desempenham funções variadas, como exportação de moléculas. As OMVs de *X. nematophila* apresentam diferentes proteínas inseticidas e a XnGroel é uma delas, o que pode aferir seu importante papel na patogenicidade do inseto quando a bactéria está em simbiose (Joshi et al., 2008).

A interação entre XnGroel e BBMV de *H. armigera* foi avaliada por meio de ensaios de ligação com derivados de açúcar (Joshi et al., 2008). Foi observado o reconhecimento específico e ligação da proteína testada às BBMVs através de porções N-acetil-glucosamina (GlcNAc) ou N-acetilgalactosamina (GalNAc). Após as BBMVs serem tratadas com quitinases, a XnGroel não apresentou toxicidade. Esses resultados foram associados ao potencial de ligação da XnGroel à membrana peritrófica quitinosa do intestino e não a glicoproteína e outros receptores compartilhados com as proteínas Cry, tal como ocorre em Txp40 de *Photorhabdus*.

A expressão da proteína em tabaco transgênico causou redução do peso larval e menor taxa de pupação em larvas de *H. armigera*. XnGroel possivelmente interage de forma tão eficiente com a camada quitinosa da matriz peritrófica do inseto que impossibilita a remodelação de estruturas quitinosas durante a metamorfose da praga lepidóptera (Kumari et al., 2014). Dessa forma, há a inibição do metabolismo da quitina e, conseqüentemente, do crescimento e desenvolvimento larval (Joshi et al., 2008).

Tabela 1. Toxicidade de Txp40, XeGroel e XnGroel em diferentes espécies de pragas pertencentes à ordem Lepidoptera.

Proteína	Organismo Doador do Gene	Inseto testado	Estádio Larval	Método de Entrega	Dose Letal (LC ₅₀) *	Referência Bibliográfica
XnGroel	<i>Xenorhabdus nematophila</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	1° ínstar	Dieta artificial	5,8 ug/g	Joshi et al., 2008 Kumari et al., 2014
			1° ínstar	Folha Transgênica		
XeGroel	<i>Xenorhabdus ehlersii</i>	<i>Galleria mellonella</i>	6° ínstar	Injeção	0.76 ± 0.08 ug/g	Shi et al., 2012
		<i>Helicoverpa armigera</i>	Não especificado	Dieta artificial	≥ 50 ug/g	
		<i>Galleria mellonella</i>	Não especificado	Injeção	43 ng/g	
Txp40	<i>Photorhabdus luminescens</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	Não especificado	Injeção	460 ug/g	Brown et al., 2006
		<i>Plodia interpunctella</i>	Não especificado	Injeção		
		<i>Lucilia cuprina</i>	Não especificado	Injeção	5 a 100 ng/g	
		<i>Galleria mellonella</i>	4° ínstar	Injeção	41,52 e 35,36 ng/g (12 e 72 h, respectivamente)	
		<i>Galleria mellonella</i>	1° ínstar	Dieta artificial	630,11 ng/g	
Txp40	<i>Photorhabdus akhurstii</i>	<i>Helicoverpa armigera</i>	4° ínstar	Injeção	98 ug/g	Shankhu et al., 2020
		<i>Helicoverpa armigera</i>	1° ínstar	Dieta artificial	343,1 ug/g	
		<i>Spodoptera litura</i>	4° ínstar	Injeção	150 ug/g	
		<i>Spodoptera litura</i>	1° ínstar	Dieta artificial	522 ug/g	
		<i>Spodoptera exigua</i>	4° ínstar	Injeção	96,25 ug/g	
		<i>Spodoptera exigua</i>	1° ínstar	Dieta artificial	329 ug/g	
		<i>Galleria mellonella</i>	4° ínstar	Injeção	32,33 ug/g	
<i>Galleria mellonella</i>	1° ínstar	Dieta artificial	187,7 ug/g			

*nanograma por grama de dieta artificial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos clones de *Escherichia coli* contendo os genes *Txp40* e *XnGroel*

Os clones sintéticos contendo os genes *Txp40* (GenBank: MH052595) e *XnGroel* (GenBank: AY184491.2), fusionados ao vetor pET-28a(+), foram produzidos pela empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). Os clones possuem uma cauda de hexa-histidina adicionada à porção N-terminal, importante durante o método de purificação proteica por coluna Ni Sepharose.

O volume de 1 μ L das construções gênicas sintéticas *Txp40*::pET-28a(+) e *XnGroel*::pET-28a(+) foram introduzidas individualmente em 50 μ L células competentes de *E. coli* BL21(DE3) One Shot. O método de transformação por choque térmico sugerido por Hanahan (1983) foi utilizado. As células foram mantidas em gelo por 30 min e em seguida foram submetidas ao choque térmico realizado a 42°C por 45 seg, seguido de uma incubação em gelo por 2 min. Para a recuperação das células, 800 μ L de meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10mM) e a cultura foi incubada a 37 °C por uma hora a 150 rpm. Após esse período, as células foram concentradas a 1500 x g por 5 min em microcentrífuga 5424R (Eppendorf), ressuspensas em 150 μ L de meio SOC, dos quais 100 μ L foram plaqueados em meio Luria-Bertani (LB) sólido (20 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g de Ágar, água destilada q.s.p. 1L, pH 7,2) e sob pressão de seleção do antibiótico canamicina (50 μ g/ml).

As colônias obtidas foram inoculadas individualmente em 5 ml de meio LB líquido suplementado com canamicina (50 μ g/ml) e incubadas por 12h a 37 °C e rotação de 150 rpm. Posteriormente, alíquotas de 800 μ L da cultura bacteriana foram retiradas e misturadas em 800 μ L de glicerol estéril para armazenamento em ultrafreezer a -80 °C. O volume de 3 ml foi utilizado para a obtenção do DNA plasmidial através do método de lise alcalina (Green e Sambrook, 2012).

As bactérias crescidas em meio LB foram concentradas em microtubos com volume de 2,0 ml e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min na microcentrífuga 5424R (Eppendorf), que foi utilizada em todo o procedimento. Ao final da centrifugação, a parte líquida foi descartada e o *pellet* foi solubilizado em 200 μ L da solução de ressuspensão (EDTA 10Mm, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, D-glicose 50 mM), utilizando-se um agitador vórtex. O volume de 200 μ L da solução de lise (NaOH 2 M, SDS 1%) foi acrescentado em

cada tubo, onde a solução foi homogeneizada por inversão e incubada em gelo.

Após 5 min, 150 µl da solução de neutralização (acetato de potássio 3 M, ácido acético 2 M em pH 5,2) foram adicionados, homogeneizados por inversão manual (4 a 5 vezes, vagarosamente) e incubados em gelo por 5 min. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm, transferindo-se o sobrenadante (~750 µl) para um novo microtubo de 1,5 ml, desprezando-se o precipitado. O volume de 400 µl de isopropanol foi acrescentado em cada microtubo e as amostras foram homogeneizadas por inversão, sendo posteriormente mantidas à temperatura ambiente por 2 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado.

A etapa de lavagem foi repetida duas vezes, onde 500 µl de etanol 70% a -4 °C foi pipetado sobre o precipitado e o tubo invertido manualmente. Ao final de cada lavagem a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o precipitado foi mantido no fluxo laminar até total secagem do etanol. A amostra foi ressuspensa em 27 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 M pH 8,0) contendo 3 µl de RNaseA (10 mg ml⁻¹). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (A_{260nm}) e armazenadas a -20°C.

A confirmação do inserto inserido foi feita por restrição simultânea utilizando as enzimas *NDel* e *BamHI* (New England Biolabs, Ipswich, Estados Unidos), de acordo com as condições do fabricante. Os volumes de 3 µl de DNA plasmidial (400 ng/ µl), 2 µl de NEBuffer 10X, 1 µl de enzima *NDel* (20000 U/ml), 1 µl de enzimas *BamHI* (20000 U/ml) e 13 µl água deionizada estéril foram adicionados em um mesmo microtubo de 0,2 ml e incubados a 37°C por 90 min em termociclador.

Decorrido o período, os produtos da restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose. O volume total da reação (20 µl) foi misturado a 3 µL de tampão de carregamento fornecido no kit das enzimas utilizadas [Gel Loading Dye, Purple (6X)]. Um gel de agarose contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) foi preparado a 1,2% com tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Acido Bórico 89 mM (pH 8,2)]. O gel foi transferido para uma cuba horizontal e imerso no mesmo tampão TEB, onde as amostras e 5 µl de padrão molecular denominado "GeneRuler 1kb DNA Ladder" (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) foram aplicadas e submetidas à corrida eletroforética realizada a 80 V por 90 min. Após o final da eletroforese, o produto da restrição foi visualizado em luz ultravioleta em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.2. Expressão e purificação das proteínas Txp40 e XnGroel

A indução e extração proteica dos clones Txp40 e XnGroel foram realizadas conforme descrito por Marucci et al. (2015), com adaptações. Os clones contendo os genes Txp40 e XnGroel foram cultivados em meio LB sólido suplementado com canamicina (50 µg/ml) por 12h a 37°C. As colônias isoladas obtidas foram inoculadas individualmente em 10 ml de LB líquido sob mesma condição de antibiótico. O pré-inóculo foi incubado sob rotação constante de 150 rpm por 16h a 37 °C.

Decorrida a incubação, cada cultura teve 4 ml do pré-inóculo transferido para um Erlenmeyer de 1000 ml contendo 400 ml de meio LB suplementado com canamicina (50 µg/ml). A cultura foi mantida a 37 °C sob rotação de 200 rpm até a densidade óptica 600 nm (DO₆₀₀) alcançar os limiares entre 0,5 e 0,8. Feito isso, a expressão proteica foi induzida pela adição da concentração final de 1 mM do reagente IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo) à cultura, seguida pela incubação a 37 °C por 5h a 200 rpm. Na finalidade de comparar os perfis de expressão entre as amostras, um clone de *E. coli* BL21 (DE3) não-portadora de genes recombinantes e culturas individuais dos clones de Txp40 e XnGroel foram submetidos às mesmas etapas de incubação, porém após atingirem a (DO)₆₀₀ 0,5-0,8, as mesmas não tiveram a expressão induzida, sendo incubadas sem a adição de IPTG por 5h.

As proteínas foram extraídas após a coleta do *pellet* da cultura em centrífuga (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) resfriada a 4 °C por 30 min, em uma rotação de 21.952 g. O sobrenadante obtido foi descartado e 20 ml de tampão de lise (fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8; NaCl 400 mM; KCl 100 mM; glicerol 10 %; Triton x 100 0,5 %; imidazol 10 mM) foram adicionados sobre o sedimento coletado. Após a ressuspensão e homogeneização do *pellet* em agitador vórtex, a lise celular foi complementada pelo acréscimo de 600 µL de lisozima (100 mg/ml), 200 µL de DNase I (1 mg/ml) e 20 µL de PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto) (0,1 mol/L) e incubação a 37 °C sob agitação de 80 rpm por 30 min.

Posteriormente, rompimento celular foi finalizado por sonicação no aparelho “Onmi Sonic Ruptor 400” (Omni International). As amostras foram submetidas a três repetições de sonicação com intensidade de 60 W por 60 s, intercaladas em pausas de 15 s. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 21.952 g por 3 min a 4 °C. Uma alíquota de 20 µL da fração solúvel foi separada para análise por SDS-Page a 12%. O

restante foi transferido para um tubo estéril e armazenado a -20 °C.

As proteínas totais obtidas foram analisadas de acordo com seu peso molecular por meio da técnica SDS-PAGE (Laemmli, 1970) no sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN 2-D (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA). A matriz do gel foi preparada utilizando uma solução de poliacrilamida 12% e 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS). A corrida eletroforética foi feita em tampão Tris-Glicina (Tris 50 mM pH 8,6, glicina 1,92 M e SDS 1%).

Um volume de 10 µL de proteína foi homogeneizado com 10 µL de tampão de amostra [Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,02% (m/v)]. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min antes de serem aplicadas no gel, juntamente com marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific™). A eletroforese ocorreu a 200 V por 70 min. Posteriormente, o gel foi corado por 20 min em solução [Coomassie-Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v), metanol 50% (v/v) e Ácido Acético 10% (v/v)] sob agitação 50 rpm. As bandas de proteínas totais foram visualizadas após a retirada do excesso de corante aderido no gel por agitação lenta em solução descorante [metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)]. O gel foi fotodocumentado e analisado antes da purificação das proteínas.

O volume de lisado proteico armazenado (~20 ml) foi filtrado em filtro para seringa com tamanho de poro de 0,22 µm. As proteínas foram purificadas por afinidade à cauda de histidina em colunas HisTrap™ HP de 1 ml (Cytiva, Marlborough, Estados Unidos da América) e por diálise. Conforme informações do fabricante, as colunas His-Trap são projetadas para que a cauda de seis histidinas fusionada à proteína recombinante de *E. coli* interaja com um íon metálico, o níquel (Ni²⁺), acoplado em uma matriz quelante na coluna. Assim, a proteína alvo ficará retida na purificação enquanto demais resíduos contaminantes presentes no mesmo extrato serão removidos durante o processo. A marcação da proteína de interesse com aminoácidos de histidina aumenta a afinidade de ligação ao Ni²⁺, formando complexos que podem ser dissociados pela adição do imidazol, que competirá pela interação à matriz. A combinação entre uma concentração otimizada de imidazol e lavagens com água miliQ e tampões, para obtenção de ponto isoelétrico e de pH ideais, permitiram que a proteína fosse eluída após a passagem na coluna. A sequência de soluções adicionadas e seus respectivos volumes para obtenção das proteínas purificadas estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de soluções e seus respectivos volumes aplicados na coluna HisTrap™ HP durante o processo de purificação.

Sequência de soluções	Volume (ml)	Observação
1- H ₂ O miliQ autoclavada e filtrada	5,0	-
2- Tampão de equilíbrio*	5,0	-
3- Lisado proteico filtrado	~20,0	Frações de ~6 ml coletadas separadamente
4- Tampão de equilíbrio	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
5- Tampão de eluição** + imidazol (10mM)	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
6- Tampão de eluição + imidazol (25 mM)	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
7- Tampão de eluição + imidazol (50 mM)	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
8- Tampão de eluição + imidazol (75 mM)	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
9- Tampão de eluição + imidazol (100 mM)	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
10- Tampão de eluição + imidazol (250 mM)	5,0	Etapa realizada 3x. Frações coletadas separadamente
11- H ₂ O miliQ autoclavada e filtrada	10	-
12- Etanol 20%	5,0	-

* Tampão de equilíbrio: tampão fosfato de sódio 20Mm, pH 7,4.

** Tampão de eluição: tampão fosfato 50 mM; pH 8,0; NaCl 5 M; imidazol 500 mM; água milliQ.

A etapa de diálise foi realizada para a retirada dos resíduos de imidazol presentes nas frações proteicas. O procedimento foi feito utilizando a membrana “Dialysis tubing cellulose membrane avg. flat width 25mm (1.0 in.)” (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). As membranas foram preparadas previamente, sendo imersas em água deionizada e fervidas no micro-ondas por 5 min. O procedimento foi repetido até a remoção total da glicerina incrustada no material, identificada pela transparência da água utilizada.

Posteriormente, as frações proteicas obtidas com diferentes gradientes de imidazol após a purificação foram transferidas para a membrana de diálise, vedada em ambas as extremidades por fibras de algodão. As proteínas foram imersas individualmente em recipiente contendo tampão de diálise resfriado (10mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0), por 12 horas a 4 °C. O recipiente foi mantido sobre um agitador magnético com agitação de 100 rpm. O tampão de diálise foi substituído quatro vezes em intervalos de três horas. Decorrido o tempo, as amostras foram transferidas

para tubos estéreis identificados e congeladas a -20 °C.

As proteínas foram liofilizadas por 24 h no Savant Super Modulyo Freeze dryer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) e ressuspensas em 1 ml de água deionizada. As amostras purificadas foram visualizadas por SDS-Page 12%, conforme descrito anteriormente. Posteriormente, as proteínas foram quantificadas pelo método de densitometria. Uma curva padrão foi delineada utilizando a soroalbumina bovina (BSA). Cinco concentrações de BSA (0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg/ml) foram preparadas e submetidas ao SDS-Page a 12%, juntamente com as amostras de Txp40 e XnGroel purificadas. Em seguida, a quantificação das proteínas foi calculada pelo programa ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Suécia).

3.3. Clones de *Escherichia coli* contendo os genes *vip*

Proteínas Vip3 pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (Unesp, Câmpus de Jaboticabal) e com eficácia comprovada contra lepidópteros praga foram utilizadas nos bioensaios de toxicidade. As proteínas referentes à bactéria *B. thuringiensis*, assim como a classificação das famílias baseada na similaridade da sequência de aminoácidos, podem ser consultadas no banco de dados on-line Bacterial Pesticidal Protein Resource Center (BPPRC) (<https://www.bpprc.org/>).

As proteínas Vip3 analisadas e seus respectivos números de acesso no NCBI foram a Vip3Aa20 (GenBank: ABG20429), Vip3Aa42 (GenBank: ADQ73634), Vip3Ad2 (GenBank: CAI43276), Vip3Ae1 (GenBank: CAI43277), Vip3Af1 (GenBank: CAI43275) e Vip3Ca2 (GenBank: AEE98106).

A proteína purificada Vip3Aa20 (clonada em *E. coli* XL1- Blue, plasmídeo pBD150) foi disponibilizada pela Syngenta (Holambra, Brasil) e adotada no estudo como uma amostra padrão. A amostra foi cedida liofilizada e mantida a -80 °C. O clone de *E. coli* BL21 que codifica o gene *vip3Aa42* (plasmídeo pET- Sumo) foi obtido por Marucci et al. (2015) e a obtenção da proteína ocorreu como descrito no item 2.2 dessa tese, com alteração da temperatura de indução proteica feita a 22 °C e concentração de IPTG de 0,4 mM, conforme otimizado pelos autores do artigo (Marucci et al., 2015).

Os clones de *E. coli* WK6 contendo os genes *vip3Ae1* (plasmídeo pGA60), *vip3Af1* (plasmídeo pNN814) e *vip3Ad2* (plasmídeo pGA59) foram cedidos pela Bayer CropScience (Ghent, Bélgica) (De Escudero et al., 2014). O clone de *E. coli* WK6

[plasmídeo pET-28b(+)] contendo o gene *vip3Ca2* foi cedido pelo Prof. Dr. Juan Ferré da Universidade de Valência (Burjassot, Espanha). A indução proteica nos quatro clones de *E. coli* WK6 citados ocorreu como descrito por De Escudero et al. (2014), com adaptações.

Inicialmente, clones de Vip3Ad, Vip3Ae, Vip3Af e Vip3C foram cultivados individualmente em meio LB sólido suplementado com ampicilina (100 µg/ml) por 12h a 37°C. Uma colônia isolada foi transferida para um pré-inóculo de 10 ml de LB líquido sob mesma condição de antibiótico. O pré-inóculo foi incubado sob rotação constante de 150 rpm a 37 °C até atingir DO₆₀₀ de 1,2 (~8 horas de incubação).

Decorrido o tempo, cada cultura teve 4 ml do pré-inóculo transferido para um Ellermeyer de 1000 ml contendo 400 ml de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml). A cultura foi mantida a 37 °C sob rotação de 200 rpm até a DO₆₀₀ alcançar os limiares entre 0,5 e 0,6. Feito isso, a expressão proteica foi induzida pela adição da concentração final de 1 mM do reagente IPTG à cultura, seguida pela incubação a 37 °C por 16 h a 200 rpm. Um clone de *E. coli* BL21 (DE3) portador do gene *vip3Ae* foi usado como controle (não houve a indução proteica pela adição de IPTG).

As proteínas foram extraídas após a coleta do *pellet* da cultura em centrífuga resfriada a 4 °C por 30 min, em uma rotação de 21.952 *g*. O sobrenadante obtido foi descartado e 20 ml de tampão de lise (tampão fosfato 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M) foram adicionados sobre o sedimento coletado. Após a ressuspensão e homogeneização do *pellet* em agitador vórtex, a lise celular foi complementada pelo acréscimo de 600 µL de lisozima (100 mg/ml), 200 µL de DNase I (1 mg/ml) e 20 µL de PMSF (0,1 mol/L) e incubação a 37 °C sob agitação 80 rpm por 30 min.

Posteriormente, o rompimento celular foi finalizado utilizando três repetições de sonicação com intensidade de 60 W por 60 s, intercaladas em pausas de 10 s. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 21.952 *g* por 3 min a 4 °C. Uma alíquota de 20 µL da fração solúvel foi separada para análise em SDS-Page a 12% (Laemmli, 1970). O restante foi transferido para um tubo estéril e armazenado a -20 °C. As proteínas extraídas a partir das induções foram analisadas em SDS-PAGE a 12%. As proteínas diferencialmente expressas foram quantificadas por densitometria e utilizadas nos bioensaios de dose discriminatória. As proteínas Vip3 que causaram maior letalidade à *S. frugiperda* durante o bioensaio seletivo foram purificadas em coluna HisTrap™ HP, dialisadas e novamente quantificadas, conforme descrito no item 2.2 do presente trabalho.

3.4. Criação das populações de *Spodoptera frugiperda*

A população de *S. frugiperda* resistente ao milho PowerCore™, transgênico que expressa as proteínas Cry1A.105, Cry2Ab2 e Cry1F (PW-R), foi caracterizada quanto à herança da resistência (Bernardi, 2015) e é mantida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (Unesp, Câmpus Jaboticabal) em dieta artificial proposta por Greene et al. (1976). Para a manutenção da resistência, a cada três gerações a população é alimentada com o evento em que foram coletadas e após são novamente transferidas para dieta artificial. Uma linhagem suscetível (Sus) de *S. frugiperda* foi utilizada como controle nos ensaios de toxicidade. Essa população se encontra livre de pressão de seleção por inseticidas, bioinseticidas ou proteínas Bt, sendo mantida em dieta artificial em laboratório.

3.5. Bioensaios seletivos de proteínas Vip3 em *Spodoptera frugiperda* suscetível

Bioensaios seletivos com concentração discriminatória para as proteínas de *B. thuringiensis* Vip3Aa20, Vip3Aa42, Vip3Ad2, Vip3Ae1, Vip3Af1 e Vip3Ca2 em *S. frugiperda* suscetível foram realizados. As lagartas foram expostas à concentração de 100 ng/cm² de cada proteína. A dose foi definida baseando-se nas médias de CL₅₀ relatadas na literatura.

A dieta artificial foi colocada em bandejas plásticas reutilizáveis com 16 células de 2 cm², contendo aproximadamente 1 cm³ de dieta. Para total cobertura da dieta, o volume de 70 µl da solução da proteína contendo a concentração apropriada foi distribuído sobre a dieta. Após secagem ao ar, uma lagarta recém-eclodida foi colocada sobre a dieta em cada poço e selada com tampa perfurada.

Os tratamentos foram mantidos a 26±2 °C, 70±10% umidade relativa do ar e fotoperíodo de 14:10 horas (luz: escuro) por 7 dias. Quatro repetições de 30 lagartas foram usadas. Os números de larvas mortas e vivas foram contados sete dias após a aplicação dos tratamentos? e os dados foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.6. Bioensaios para *Spodoptera frugiperda* com as proteínas inseticidas

As concentrações letais de 50% (CL₅₀) das proteínas Txp40 e XnGroel, além das proteínas de *B. thuringiensis* Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af, selecionadas no bioensaio de dose discriminatória, foram avaliadas em *S. frugiperda*. Bioensaios com larvas neonatas das populações PW-R (resistente) e Sus (suscetível) foram submetidas ao método de aplicação superficial em bandejas plásticas, conforme descrito no item anterior. Após testes prévios, as proteínas expostas a *S. frugiperda* PW-R foram preparadas nas concentrações de 25; 50; 100; 200; 400; 800; 1600; 3200 e 6400 ng/cm². Em *S. frugiperda* Sus, as doses letais foram determinadas a partir das concentrações 5; 10; 20; 40; 80; 160; 320; 640 e 1280 ng/cm². Cada dose testada apresentava quatro repetições de 16 neonatas. Um tratamento onde foi pipetado água deionizada estéril sobre a dieta foi adotado como controle negativo. As lagartas mortas e vivas foram quantificadas e os dados foram submetidos à análise Probit usando o software POLO (LeOra Software) para obter a concentração letal (CL₅₀) e seus limites de confiança a 95% (IC95) (Robertson et al., 2003). A razão de resistência foi calculada utilizando o valor de CL₅₀ da população PW-R dividido pelo CL₅₀ da população Sus (Gilreath et al., 2021).

3.7. Preparação do conteúdo intestinal de *Spodoptera frugiperda*

Os conteúdos intestinais das larvas pertencentes às populações PW-R e Sus de *S. frugiperda* foram obtidos para avaliação da atividade proteolítica do inseto. Larvas de quarto instar de cada população foram dissecadas em gelo para retirada do intestino médio. Os intestinos foram imediatamente lavados em tampão MET (300 mM Manitol, 5 mM EGTA, 20 mM Tris), colocados em microtubos de 1,5ml e centrifugados a 6000 Xg a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo resfriado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para armazenamento em ultrafreezer a -80 °C. Em cada população, o conteúdo intestinal foi coletado em triplicatas de dez larvas. A quantificação das repetições foi feita por reagente de Bradford, usando BSA como padrão (Bradford, 1976).

3.8. Ensaios de cinética proteolítica

A comparação da cinética proteolítica das populações PW-R e Sus foi feita após a ativação das proteínas purificadas VipAa20, Vip3Ae, Vip3Af, Txp40 e XnGroel com o conteúdo intestinal das larvas (Fatoreto, 2017). As reações foram feitas inicialmente com

tripsina comercial de pâncreas bovino (Sigma-Aldrich) para otimização da proporção proteína:enzima. Na proteólise, cada proteína foi preparada com uma solução de volume final de 70 µl, contendo 60 µg de proteína e 20 µg de conteúdo intestinal, ambos diluídos em água destilada estéril. A solução foi incubada a 30 °C e agitada a 100 rpm ao longo de diferentes tempos de ativação (5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 e 120 min). Ao final da incubação, 35 µl de tampão de carregamento SDS-PAGE [Tris-HCl 0,125 M (pH 6,8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,02% (m/v)] eram misturados à amostra e aquecidos por 5 min a 99 °C para desativação da reação. As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer.

Os produtos da proteólise nas populações PW-R e Sus foram identificados por SDS-PAGE 12% e digitalizados (HP Scanjet 3570c). Os fragmentos das proteínas inativadas (89 kDa: Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af; 37 kDa: Txp40; 58 kDa: XnGroel) foram quantificados por densitometria usando o software ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Suécia). Nas proteínas Vip3 também foram quantificados os fragmentos da porção ativada (62 kDa). Os dados foram submetidos à análise de variância por meio do teste F e as médias foram comparadas por teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.9. Análise *in silico* das proteínas Vip3

A análise *in silico* foi realizada para identificação dos domínios e *motifs* conservados das proteínas Vip3 testadas. O programa MAFFT v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) foi utilizado para o alinhamento múltiplo das sequências de proteínas. A visualização do alinhamento foi feita pela ferramenta Geneious Prime® 2022.1.1 (<https://www.geneious.com>).

Os domínios conservados foram confirmados no NCBI Conserved Domain Database (CDD; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). A diversidade de *motifs* foi identificada nas proteínas testadas com lagartas das duas populações de *S. frugiperda*, sendo a sequência da proteína comercial Vip3Aa20 usada como referência, através da ferramenta MEME Suite v.5.4.1 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), com os seguintes parâmetros de busca: Motif sites distribution = Any Number of Repetitions (anr); motif size ≥ 6 to ≤ 200 , motifs number = 10). Os sítios dos *motifs* diferenciais foram gerados pela ferramenta WebLogo

(<http://weblogo.threeplusone.com/#>) com parâmetros padrões e *stracks* por linha = 100.

4. RESULTADOS

4.1. Confirmação dos clones contendo os genes *Txp40* e *XnGroel* por digestão enzimática

Os insertos clonados em vetor pET-28a(+) estão localizados entre os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI*. Para confirmação da clonagem, os DNAs plasmidiais foram digeridos com as referidas enzimas. A construção total, somando-se região His e considerando-se a otimização de códons, é de 6980bp para *XnGroel* e 6341bp para *Txp40*. A clivagem com os produtos esperados pode ser observada no clone *Txp40* (1017bp) e *XnGroel* (1656bp) (Figura 8).

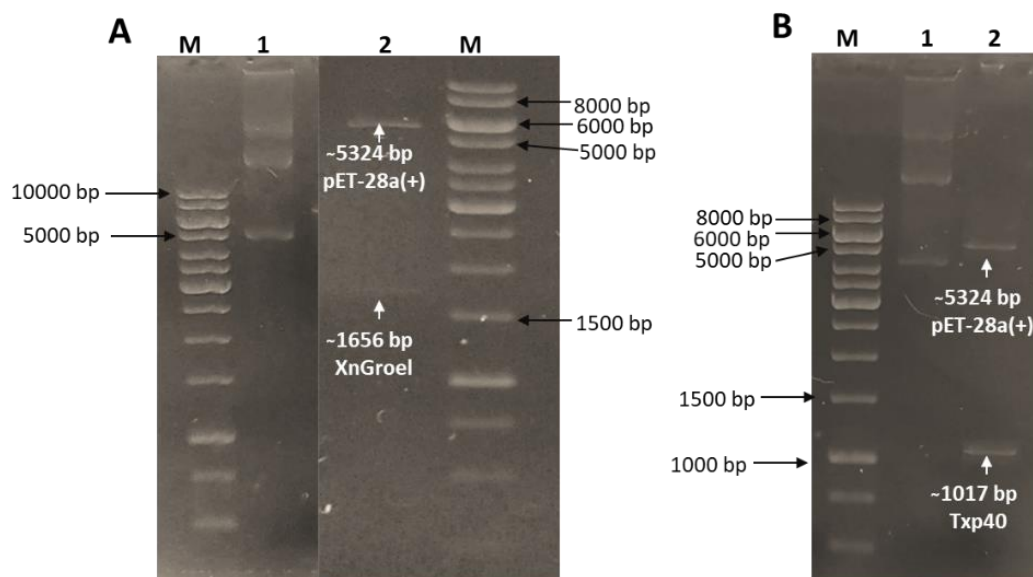


Figura 8. Eletroferograma da digestão enzimática dos clones recombinantes referentes aos insertos *XnGroel* e *Txp40*. Os DNAs plasmidiais foram digeridos com as enzimas *NdeI* / *BamHI*. A: M - Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 – DNA plasmidial do *XnGroel*:pET-28a(+) em estirpe de *E. coli* BL21 (DE3); 2 - DNA plasmidial do *XnGroel*:pET-28a(+) em estirpe de *E. coli* BL21 digerido com as enzimas *NdeI* / *BamHI*. B: M - Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 – DNA plasmidial do *Txp40*:pET-28a(+) em estirpe de *E. coli* BL21 (DE3); 2 - DNA plasmidial do *XnGroel*:pET-28a(+) em estirpe de *E. coli* BL21 digerido com as enzimas *NdeI* / *BamHI*. Aplicação em gel de agarose, concentração 1%.

4.2. Expressão e purificação das proteínas Vip3 de *B. thuringiensis*, Txp40 de *P. akhurstii* e XnGroel de *X. nematophila*

As proteínas Vip3 de *B. thuringiensis* foram obtidas por sistema de expressão heteróloga (Figura 9A). A indução da expressão dos genes por IPTG foi confirmada pela presença da bandas de proteínas e seus pesos moleculares entre 88 – 101,5 kDa. A proteína Vip3Aa20 foi cedida pela Syngenta, sem necessidade de indução. A indução da expressão gênica por IPTG das proteínas Txp40 (37 kDa) de *P. akhurstii* e XnGroel (58 kDa) de *X. nematophila* foi igualmente confirmada por SDS-PAGE (Figura 9B).

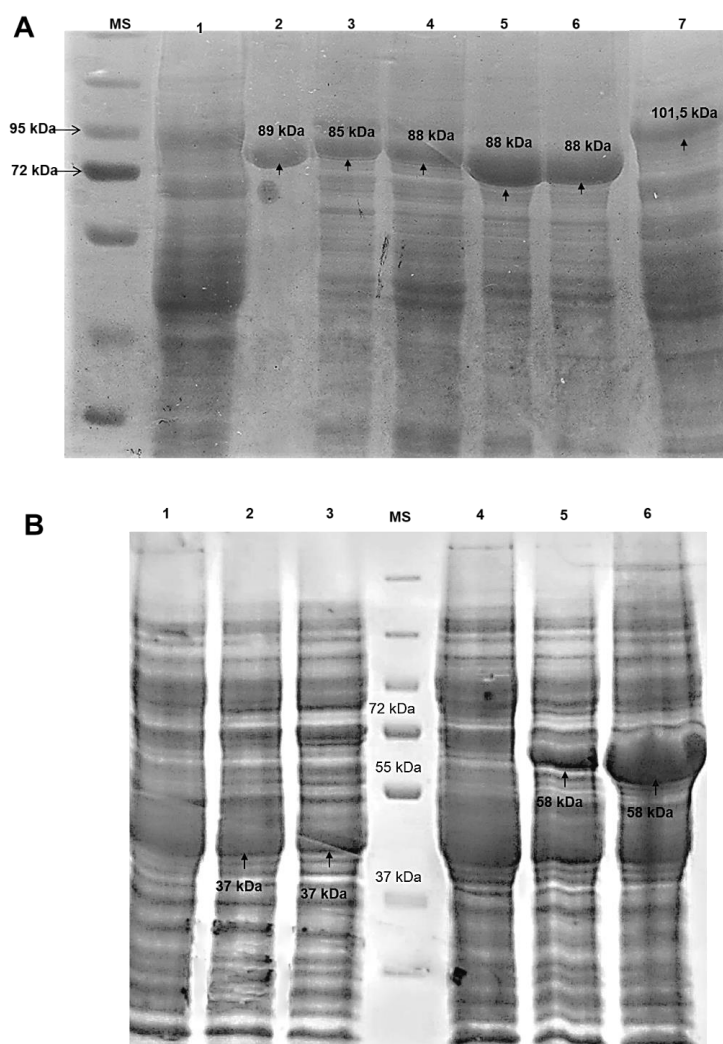


Figura 9. SDS-PAGE das proteínas Vip3, Txp40 e XnGroel. A: MS- Marcador Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1- lisado de *E. coli* BL21 (DE3) não transformado; 2- Vip3Aa20; 3- Vip3Ca; 4- Vip3Ad2; 5- Vip3Ae; 6- Vip3Af e; 7- Vip3Aa42. B: MS- Marcador Marcador de massa molecular “PageRuler™ Prestained Protein Ladders”; 1- Lisado de *E. coli* BL21 (DE3) não transformado; 2- Clone Txp40 lisado sem indução proteica por IPTG; 3- Clone Txp40 lisado após a indução proteica por IPTG; 4, lisado de *E. coli* XnGroel BL21 (DE3) não transformado; 5: clone

XnGroel sem indução proteica por IPTG; 6: clone XnGroel lisado após a indução proteica por IPTG.

Após bioensaios seletivos com doses discriminatórias com a população Sus (Tabela 3), as proteínas Vip3 com maiores mortalidades (Vip3Ae e Vip3Af) foram purificadas em coluna cromatográfica e submetidas à diálise para retirada do imidazol (Figura 10a). De modo similar, as proteínas Txp40 e XnGroel foram submetidas à purificação antes dos bioensaios seletivos, considerando que Txp40 apresenta uma banda sobreposta a uma proteína nativa de *E. coli* BL21 (DE3), tornando necessária a confirmação do lisado proteico obtido. Posteriormente, Txp40 e XnGroel foram submetidas à diálise para retirada de imidazol, confirmando os tamanhos dos fragmentos. Proteínas mais limpas e concentradas foram viabilizadas para a montagem dos bioensaios (Figura 10B).

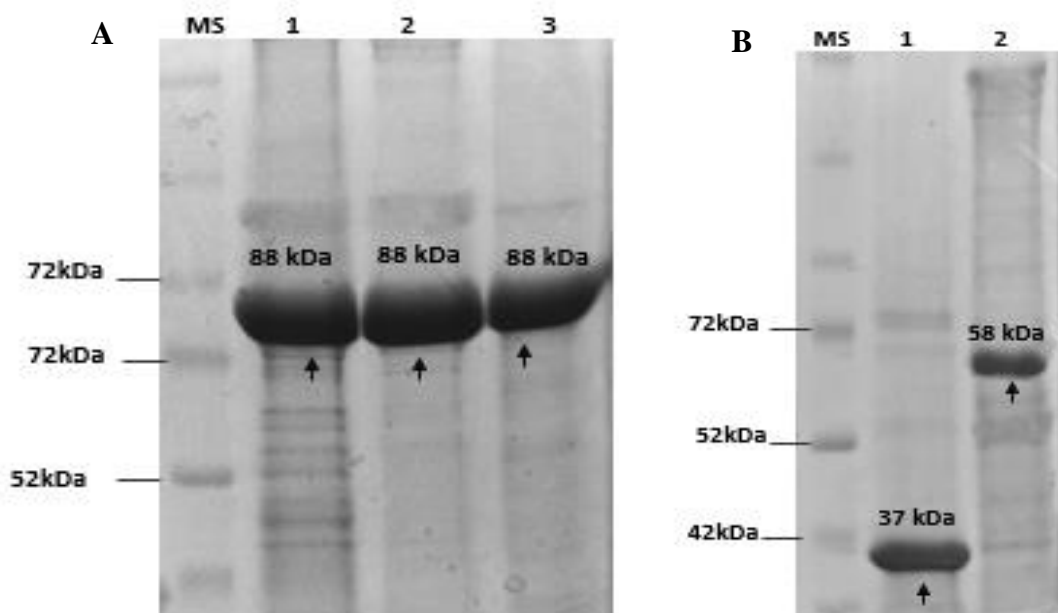


Figura 10. Proteínas Vip3Aa20, Vip3Ae, Vip3Af, Txp40 e XnGroel purificadas. A) MS: Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”, 1: proteína Vip3Aa20, 2: Vip3Ae e 3: Vip3Af, ambas de 88kDa. B) MS: Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”, 1: proteína Txp40 e 2: XnGroel. Os pesos moleculares das proteínas Txp40 e XnGroel são 37 kDa e 58 kDa, respectivamente (desconsiderando o acréscimo de aminoácidos devido a cauda de Histina).

4.3. Bioensaios seletivos com proteínas Vip3 em *S. frugiperda* suscetível

As larvas de *S. frugiperda* susceptíveis foram submetidas ao bioensaio de dose discriminatória a 100 ng/cm² de cada proteína Vip3 de *B. thuringiensis*. O teste apontou que Vip3Ae, Vip3Af, Vip3Aa20 e Vip3Aa42 causaram maiores mortalidades em relação às demais proteínas (Tabela 3).

A proteína Vip3a42 apresenta identidade de 98,4% quando comparada à Vip3Aa20 e ambas as proteínas resultaram em média de mortalidade semelhante (Tabela 3). Como a proteína comercial já seria usada como um controle nas análises, a CL₅₀ de Vip3Aa42 não foi determinada e a toxicidade dessa proteína poderá ser estudada em oportunidades posteriores.

Tabela 3: Mortalidade de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* suscetível às proteínas de *Bacillus thuringiensis* em dose discriminatória de 100 ng/cm².

Proteínas	Mortalidade (%) ⁽¹⁾	DP ⁽²⁾
Vip3Ae	71,88 ^a	0,08
Vip3Af	51,56 ^a	0,08
Vip3Aa20	23,43 ^b	0,08
Vip3Aa42	23,43 ^b	0,17
Vip3Ca	9,37 ^{bc}	0,15
Tampão pET-SUMO	7,81 ^{bc}	0,09
Vip3Ad2	3,12 ^{bc}	0,07
Água	1,5 ^c	0,06
Tampão Fosfato	0,0 ^c	0,00

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra não possuem diferença entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Desvio padrão (DP)

4.4. Bioensaios para *Spodoptera frugiperda* com as proteínas Vip3Aa20, Vip3Ae, Vip3Af, Txp40 e XnGroel

As concentrações letais médias necessárias para causar 50% da mortalidade dos insetos (CL₅₀) foram determinadas. Os bioensaios de toxicidade foram feitos com lagartas das populações de *S. frugiperda* Sus a eventos Bt e *S. frugiperda* PW-R, alimentadas com as proteínas Vip3Aa20, Vip3Ae, Vip3Af, Txp40 e XnGroel (Tabela 4). Os bioensaios mostraram que as proteínas Txp40 de *P. akhurstii* e XnGroel de *X.*

nemathophila não apresentaram virulência à *S. frugiperda*. Entretanto, testes de dose única (500 ng/cm²) realizados em *H. armigera* atingiram acima de 70% de mortalidade na espécie*, confirmando que os clones sintéticos foram elaborados corretamente.

Em relação à proteína comercial Vip3Aa20 e à proteína Vip3Af, nas duas populações de *S. frugiperda* houve suscetibilidade e ausência de sobreposição nos limites de confiança nas proteínas testadas. Em relação à CL₅₀ da proteína Vip3Aa20, em Sus foi quatro vezes menor que PW-R, enquanto que nos testes com a Vip3Af, PW-R apresentou CL₅₀ 14,6 vezes maior em relação à Sus (Tabela 4). As CL₅₀ da proteína Vip3Ae foram semelhantes entre Sus e PW-R, de acordo com a sobreposição dos limites de confiança (Tabela 4).

Tabela 4: Estimativa da concentração letal (CL₅₀) de proteínas Vip3, Txp40 e XnGroel purificadas para neonatas de *S. frugiperda* em bioensaios de sobreposição em dieta artificial.

Proteínas	População S. <i>frugiperda</i>	CL ₅₀ (IC95) ⁽¹⁾	Slope± SE ⁽²⁾	χ ² ⁽³⁾	Razão de Resistência ⁽⁴⁾
Vip3Aa20	Sus	94,73 (60,47-151,96)	1,64±0.22	27,0	1.00
	PW-R	388,87 (208,4-562,11)	2.09±0.20	1,35	4.11
Vip3Ae	Sus	34,85 (28,62-41,36)	3,51±0.63	7,4	1.00
	PW-R	52,88 (26,4-81,51)	1.09±0.16	3,71	1.52
Vip3Af	Sus	59,45 (43,88-77,73)	1.67±0.27	7,8	1.00
	PW-R	867,68 (455,07-1294,55)	1.7±0.18	7,12	14.60
Txp40	Sus	>6000	1.67±0.27	7,8	—
	PW-R	>6000	0,13±0.35	15,03	—
XnGroel	Sus	>6000	2,36±4.25	7,24	—
	PW-R	>6000	0.1±0.15	5,00	—

Os valores representam 64 lagartas, que é a média de quatro replicatas de 16 lagartas cada;

(1) Valores expressos em ng/cm² com intervalo de confiança de 95% (IC95);

(2) Slope e Erro padrão (SE);

(3) Qui-quadrado (P < 0,05);

(4) A razão de resistência para uma proteína Bt foi calculada usando o valor de LC₅₀ de PW-R dividido pelo LC 50 de SS.

4.5. Ensaios de proteólise utilizando as proteínas Vip3, Txp40 e XnGroel e os conteúdos intestinais de *S. frugiperda* suscetível e PowerCore™ resistente

Considerando as diferenças de toxicidade obtidas nos bioensaios, o ensaio proteolítico foi realizado para comparar o padrão de ativação das proteínas Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af entre as populações Sus e PW-R ((Figuras 11 e 12).

*Moreira RO (2022) (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal). Comunicação Pessoal.

Como esperado, todas as proteínas Vip3A testadas foram ativadas pelo conteúdo intestinal das larvas nas duas populações, onde a banda de ~89 kDa é clivada em um fragmento principal de 62 kDa. A ativação da Vip3Aa20 ocorreu de forma semelhante entre Sus e PW-R, embora após 120 min a banda de 89 kDa tenha sido totalmente ativada em PW-R, a banda de 62 kDa foi menos intensa nesse tempo em relação aos outros, o que não acontece em Sus. Na incubação do fluido gástrico com Vip3Ae, percebe-se que a proteína é processada em ambas as populações, sendo que o fragmento de 89 kDa não foi detectável decorridos os 120 min de proteólise em conteúdo intestinal de PW-R. A banda de 89 kDa de Vip3Af não desapareceu após 120 min de incubação nos fluidos gástricos de Sus e PW-R. Entretanto, a ativação da Vip3Af ocorreu de maneira gradativa em Sus, com maior rendimento a partir de 20 min.

Em todas as proteínas Vip3A incubadas em PW-R, assim como nas amostras dos tempos finais coletados em Sus, percebe-se o processamento de produtos intermediários, com massas moleculares próximas de 89 kDa e 62 kDa. Fragmentos de ~42 kDa, além de outros intermediários entre ~45 e ~50 kDa, foram processados com maior rendimento nas duas populações, principalmente quando incubados com Vip3Ae e Vip3Af.

Embora as proteínas Txp40 e XnGroel não apresentaram toxicidade à *S. frugiperda*, a proteólise também foi avaliada, de modo a investigar se o conteúdo intestinal exercia algum efeito sobre a estabilidade das proteínas no interior do intestino (Figuras 11 e 12). A proteólise realizada em Txp40 foi mais estável em PW-R quando comparada à Sus, que foi quase totalmente degradada após 120 min. Em relação à XnGroel, a proteína gerou dois fragmentos de ~30 e ~45 kDa durante a incubação, degradados juntamente à banda de 58 kDa ao longo da proteólise em ambas as populações.

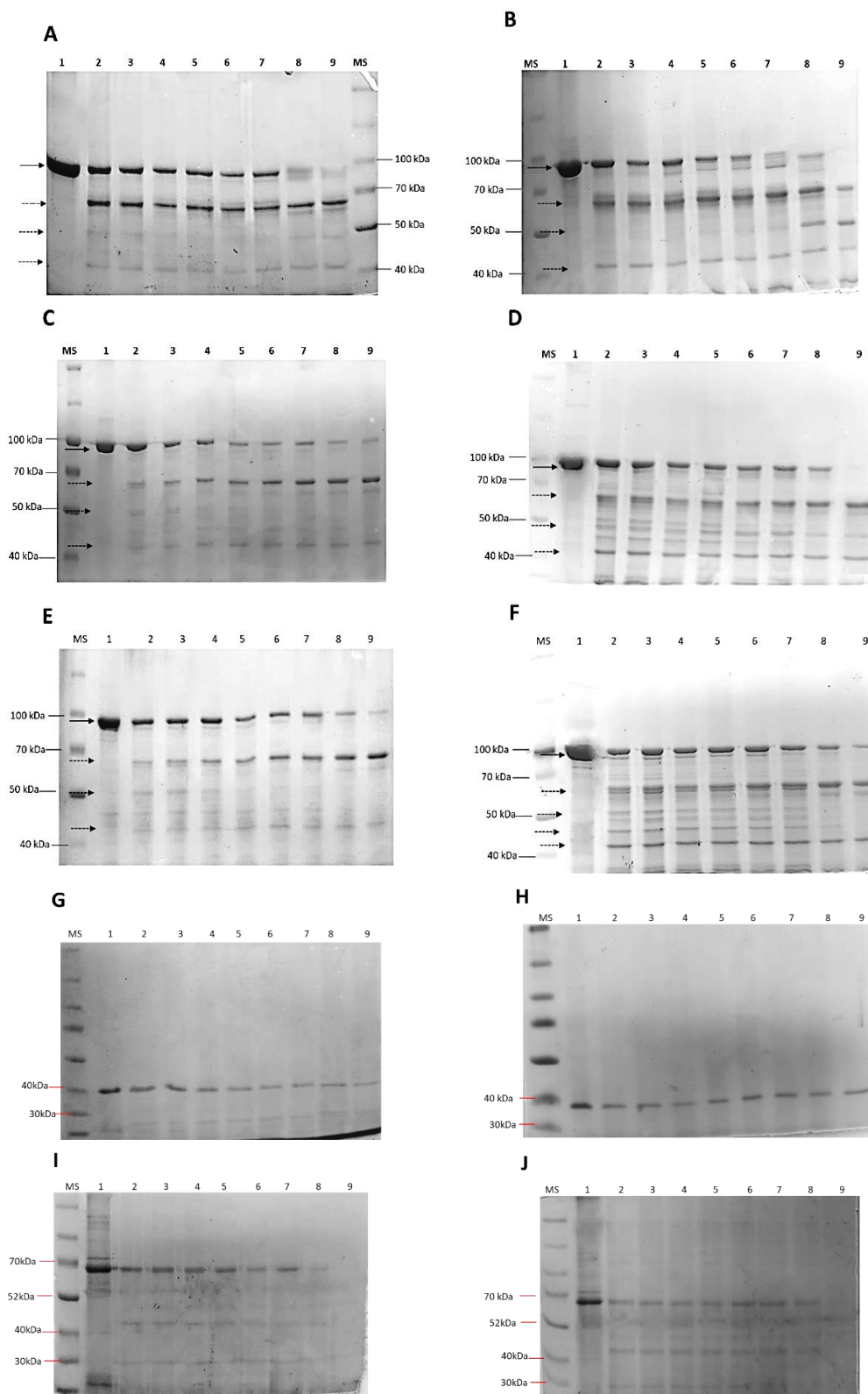
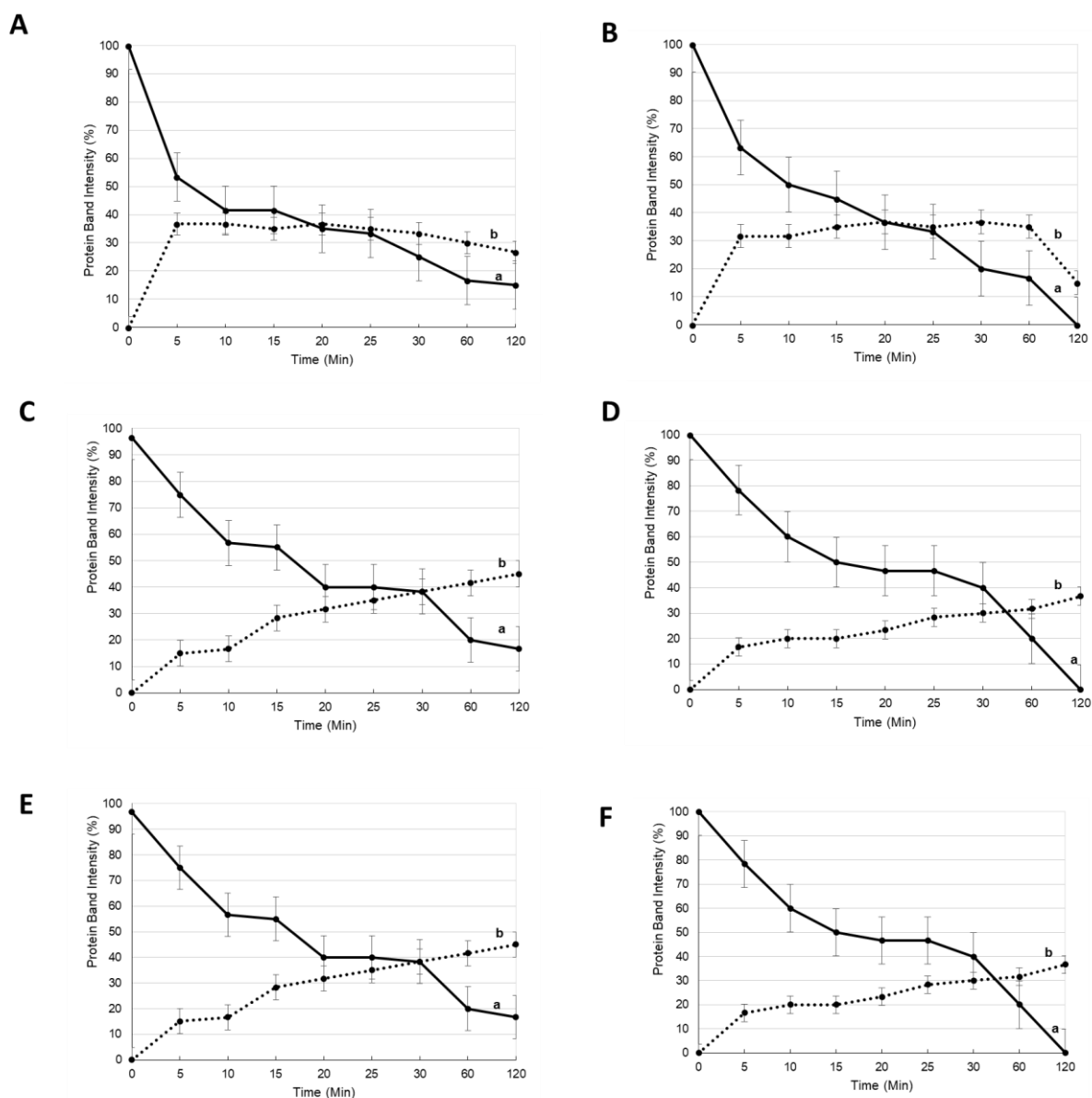


Figura 11. Cinética de proteólise de Vip3, Txp40 e XnGroel incubadas com conteúdo intestinal de *S. frugiperda* suscetível e resistente ao evento de milho PowerCore®. As incubações foram realizadas com as proteínas Vip3Aa20 (A e B), Vip3Ae (C e D), Vip3Af (E e F), Txp40 (G e H) e XnGroel (I e J). Os géis da esquerda (A, C, E, G e I)

correspondem ao conteúdo intestinal da população suscetível; géis da direita (B, D, F, H e J) referem-se à população resistente ao milho PowerCore®. Nas canaletas: MS: Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1: Proteína não incubada com tripsina; 2: incubação por 5 min; 3: incubação por 10 min; 4: incubação por 15 min; 5: incubação por 20 min; 6: incubação por 25 min; 7: incubação por 30 min; 8: incubação por 60 min; 9: incubação por 120 min.



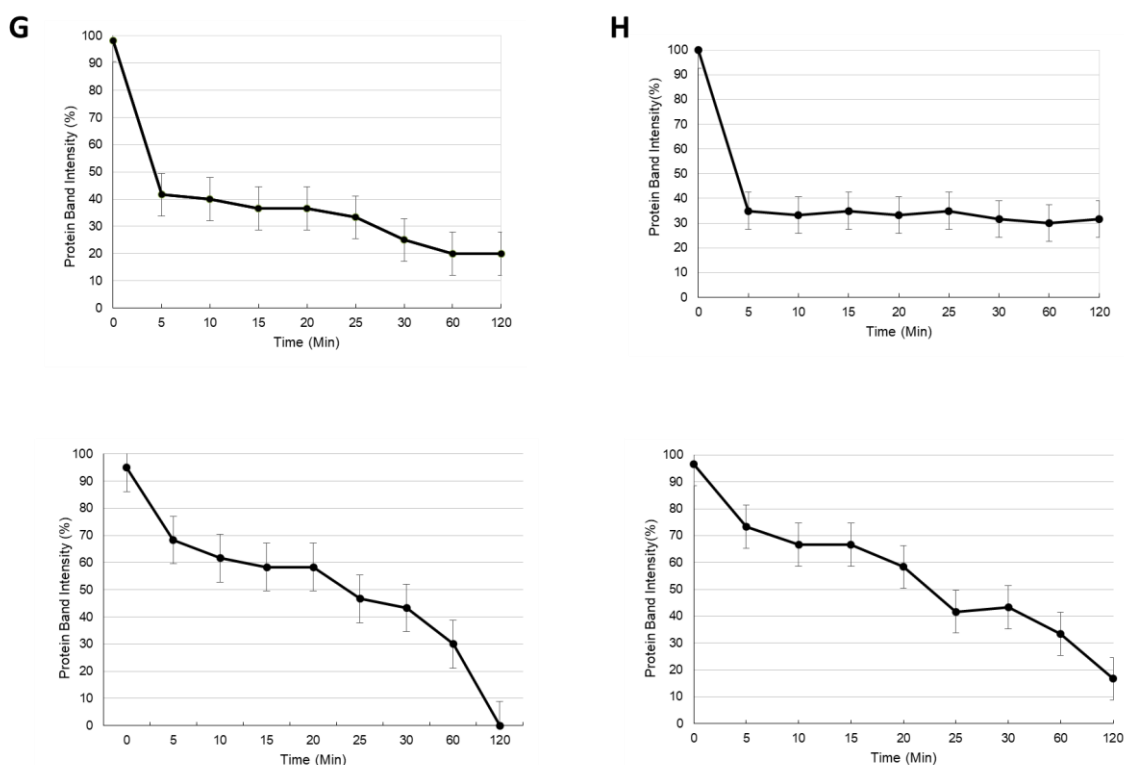


Figura 12. Gráfico da cinética de proteólise de Vip3, Txp40 e XnGroel incubadas com conteúdo intestinal de *S. frugiperda* suscetível e resistente ao evento de milho PowerCore[®]. As incubações foram realizadas com as proteínas Vip3Aa20 (A e B), Vip3Ae (C e D), Vip3Af (E e F), Txp40 (G e H) e XnGroel (I e J). Os dados representam a média entre as três repetições quantificadas por densitometria e as barras são o erro padrão. Nas proteínas Vip3A, a linha contínua representa a proteína desativada (89kDa), enquanto a linha tracejada refere-se à toxina (62 kDa). Em Txp40 e XnGroel foi feita a quantificação apenas da proteína não ativada (37 e 58 kDa, respectivamente).

4.6. Análise *in silico* das proteínas Vip3

Os cinco domínios conservados das proteínas Vip3 testadas em *S. frugiperda* foram delimitados no alinhamento múltiplo das sequências (Figura 13), baseando-se no banco de dados e em trabalhos publicados. Entre as Vip3A, o domínio I e II são altamente conservados. A identidade entre as sequências é reduzida ao analisar o domínio III e os domínios localizados na região C-terminal (IV e V).

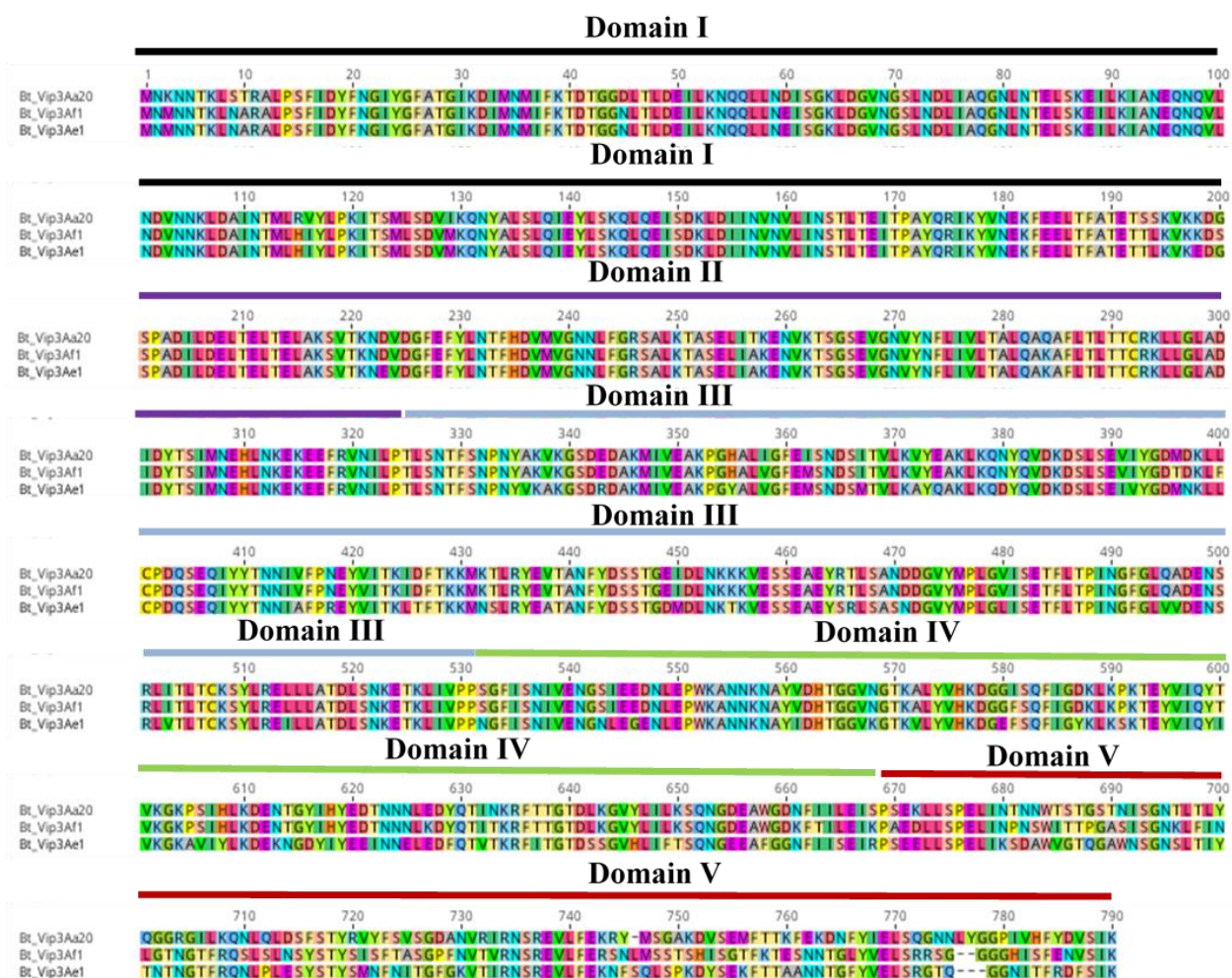


Figura 13. Alinhamento múltiplo das sequências de proteínas Vip3. Os aminoácidos que se diferem entre as sequências não estão coloridos. Os domínios conservados foram delimitados com linhas, indicando o início e o final de cada um: Domínio I – linha preta; Domínio II - linha lilás; Domínio III - linha azul; Domínio IV – linha verde e; Domínio V – linha vermelha.

A diversidade de *motifs* foi analisada considerando a atividade inseticida das proteínas Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af sobre as populações Sus e PW-R de *S. frugiperda*. Dez *motifs* foram inicialmente buscados nas sequências proteicas, nomeados de 1–10 e representados por cores diferentes (Figura 14A).

Alguns *motifs* se apresentaram em dois domínios distintos: no domínio I estão localizados os *motifs* 1, 2, 9 e 10; no domínio II, *motifs* 4 e 5; no domínio III, *motifs* 1, 3, 6, 7 e 8; domínio IV, *motif* 2, 3 e 4; e domínio V, *motif* 6 (Figura 14A). Em sua maioria, os *motifs* foram detectados com sítios únicos nas três sequências proteicas. Os *motifs* 3, 4 e 6 apresentaram sítios duplicados e o *motif* 1 foi detectado em quatro posições distintas nas três proteínas. O resíduo diferencial encontrado nas proteínas estudadas refere-se

ao *motif 2*, que não apresentou repetição na proteína Vip3Ae. Esse *motif* está localizado no resíduo 543-571aa no domínio IV da região C-terminal e a proteína Vip3Ae se distingue em seis aminoácidos em relação à Vip3Aa20 e Vip3Af1 nas seguintes posições: Ser⁵⁴³→Asn⁵⁴³, Ile⁵⁴⁴→Leu⁵⁴⁴, Glu⁵⁴⁶→Gly⁵⁴⁶, Asp⁵⁴⁷→Glu⁵⁴⁷, Val⁵⁶¹→Ile⁵⁶¹ e Asn⁵⁶⁸→Lys⁵⁶⁸. A diversidade de aminoácidos nesse resíduo também foi evidenciada conforme as sequências logo dos *motifs* geradas pela ferramenta WebLogo, onde a distorção dos aminoácidos nas sequências alinhadas implica em logotipos de sulco menor (Figura 14B).

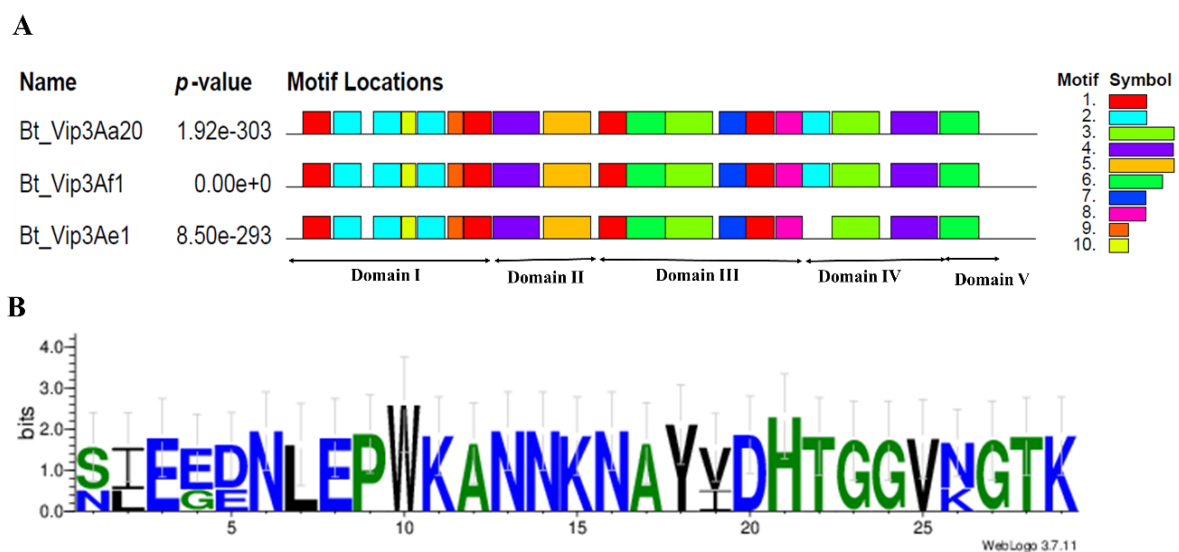


Figura 14. Análise de diversidade de *motifs* de proteínas Vip3. A) Diversidade e distribuição de *motifs* nos domínios conservados das proteínas Vip3 testadas contra Sus e PW-R. Cada *motif* está representado com coloração específica: vermelho- *motif 1*; ciano- *motif 2*; verde-grama- *motif 3*; roxo- *motif 4*; laranja- *motif 5*; verde- *motif 6*; azul- *motif 7*; rosa- *motif 8*; laranja- *motif 9* e amarelo: *motif 10*. O *motif 2* e as alterações identificadas na sequência de aminoácidos foram destacados; B) Confirmação da diversidade residual do *motif 3* utilizando o programa WebLogo.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliada a toxicidade das proteínas Txp40, XnGroel e diferentes proteínas Vip3A contra uma população Cry-resistente de *S. frugiperda*. Txp40 e XnGroel apresentaram resultados semelhantes entre as populações PW-R e Sus, com ausência de toxicidade. Inicialmente, a ineficácia sugere que essas proteínas não possuem necessidade de ativação em pH específico sobre presença de enzimas proteolíticas, tal como ocorre com proteínas Cry e Vip. Para que o processamento proteolítico ocorra,

alguns domínios conservados das proteínas Bt são modificados. A ausência de similaridade entre as sequências de aminoácidos no alinhamento entre Vip3Aa20 e as proteínas simbióticas sustentam a falta da ativação por pH em Txp40 e XnGroel.

A proteína Txp40 é uma subunidade do complexo de toxinas (T_C) do gênero *Photorhabdus*, bactéria gram-negativa entomopatogênica simbiótica com nematoides da família Heterorhabditidae (Somvanshi et al., 2019). Ao ser isolada de *P. akhurstii* e testada contra lagartas de *H. armigera*, *S. litura* e *S. exigua*, Txp40 apontou menor virulência quando oferecida oralmente em dieta artificial em relação à proteína injetada diretamente na hemocele dos insetos, tal como ocorre na natureza durante o processo de infecção do nematoide ao seu hospedeiro, onde essas bactérias são liberadas (Shankhu et al., 2020).

A redução da suscetibilidade da Txp40 administrada via oral relatada pelos autores, assim como a ineficácia para *S. frugiperda* são associadas à degradação da proteína durante a penetração da membrana peritrófica do intestino médio do hospedeiro (Shankhu et al., 2020). Os autores do trabalho não descartaram a degradação pelo conteúdo intestinal do inseto e por meio da proteólise realizada neste trabalho, percebe-se que Txp40 não é clivada em subunidades e a ação das enzimas proteolíticas reduzem em até 80% da concentração inicial da proteína após duas horas de incubação.

Uma discussão semelhante envolve a ausência de virulência XnGroel à *S. frugiperda*. XnGroel é homóloga à proteína Groel (Joshi et al., 2008), uma das diversas moléculas derivadas da vesícula de membrana externa (OMV), complexo antigênico de lipopolissacarídeo e lipoproteína produzido sob condições estressantes e crescimento desequilibrado de bactérias gram-negativas (Knox et al., 1966).

Groel é uma chaperona molecular, família conservada de proteínas responsáveis pelo dobramento e redobramento correto de substratos proteicos (Hanpanich e Maruyama, 2020). Diversas Groel foram isoladas de bactérias entomopatogênicas que vivem em simbiose com outros organismos, onde os níveis de expressão desta proteína são mais altos em relação aos níveis da mesma espécie em vida livre (Fares et al., 2002).

A XnGroel utilizada nesse estudo foi isolada de *X. nematophila*, uma espécie endossimbionte do nematoide entomopatogênico do gênero *Steinernema*. A proteína XnGroel é liberada pelo nematoide diretamente no intestino do hospedeiro e não na hemocele (Joshi et al., 2008). Ao ser tratada com conteúdo intestinal de *S. frugiperda*, a cinética proteolítica aponta que há degradação total da XnGroel após duas horas de incubação, com ausência de novos fragmentos gerados por clivagem.

O mesmo ocorreu quando Joshi et al (2008) testaram a macromolécula contra lagartas de *H. armigera* e apontaram que o tratamento de vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) com 0,1-25 µg de tripsina não mostrou nenhuma alteração no perfil proteico e na ligação de XnGroEL às BBMVs. Portanto, além de ser uma proteína independente de ativação por enzimas proteolíticas, a XnGroel tem como principal ponto de ligação a quitina da membrana peritrófica, que fará com que o metabolismo seja inibido pela ação da proteína (Joshi et al., 2008).

Nesse estudo, as populações Sus e PW-R apresentaram desempenhos diferentes nos bioensaios com as proteínas Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af. Como esperado, as Vip3A testadas causaram mortalidade às larvas Sus. As CL₅₀ foram superiores ao relatado em outros trabalhos envolvendo Vip3A (Hernández-Martínez et al., 2013; Chakroun and Ferré, 2014; Gomis-Cebolla et al., 2017; Boukedi et al., 2018), o que sugere estar relacionado à população de insetos testada, duração do bioensaio, processo de extração/purificação da proteína ou quantificação da amostra (Chakroun et al., 2012; Hernández-Martínez et al., 2013). Embora esses mesmos trabalhos sustentam que as proteínas Vip3A competem pelos mesmos sítios de ligação, Vip3Ae apresentou CL₅₀ significativamente menor em relação à Vip3Af e à proteína comercial Vip3Aa20 quando testadas contra PW-R.

Sugere-se que o aumento dos intervalos de confiança das proteínas Vip3Aa20 e Vip3Af contra *S. frugiperda* estão relacionados aos custos adaptativos do inseto durante o desenvolvimento da resistência às proteínas Cry expressas no evento PowerCore, que promovem a alteração da composição da membrana ou alteração do pH intestinal do inseto, podendo influenciar na afinidade de ligação, inserção e estabilidade das proteínas Vip3Aa20 e Vip3Af testadas (Carrière et al., 2015; De Maagd et al., 2003; Gilreath et al., 2021). Em campo esse fator pode influenciar na estratégia de piramidação de tecnologias, considerando que a planta expressa quantidades diferentes de proteína inseticida a depender do estágio de desenvolvimento e do tecido, com níveis menores em órgãos reprodutivos (Carrière et al., 2019; Gilreath et al., 2021).

Em contraste, sugere-se que o aumento inexpressivo da relação de resistência no bioensaio de Vip3Ae contra PW-R pode estar atrelado ao efeito da resistência cruzada negativa da população. Embora a resistência cruzada positiva - situação onde insetos resistentes a determinada proteína Bt desenvolvem resistência a uma proteína semelhante - entre Vip3 x Cry2Ab2 não exista, *S. frugiperda* apresenta resistência cruzada negativa fraca e estatisticamente significativas contra Vip3 x Cry1 ou Cry2Ae,

ou seja, efeito de alelo que confere resistência a uma proteína inseticida Bt e hipersusceptibilidade a outra não semelhante (Pittendrigh et al., 2014; Yang et al., 2016; Tabashnik e Carrière, 2020; Gilreath et al., 2021). Esse fator pode ter colaborado para os resultados, somado às características estruturais da proteína Vip3Ae (Figuras 13 e 14).

O processamento da Vip3A no intestino médio larval ocorre quando a região N-terminal (domínios I) é remodelada após a clivagem proteolítica e a estabilidade da proteína é determinante para a toxicidade, visto que uma superdigestão interfere na eficiência da ação inseticida (Núñez-Ramírez et al., 2020; Yang et al., 2022). Considerando a importância dos fragmentos denominados *motifs* durante a manutenção da estabilidade estrutural e funcional da proteína (Bork e Koonin, 1996) e a diferença de desempenho nos ensaios com *S. frugiperda* Sus e PW-R, comparou-se a diversidade dos *motifs* em Vip3Aa20, Vip3Ae e Vip3Af.

Na análise estrutural não foram identificadas diferenças de *motifs* nos domínios I, II e III apontados como importantes responsáveis pela estabilidade da protoxina Vip3 durante as alterações conformacionais na proteólise (Jiang et al., 2023). A região C-terminal ancora nesse ponto durante todo processo (Núñez-Ramírez et al., 2020). O domínio I fornece uma estrutura estável durante as mudanças conformacionais, que levam à ativação da proteína. O domínio II e III, envolvidos na ligação ao receptor, assim como os domínios I e III, mediadores da citotoxicidade, também não apresentaram *motifs* diferentes entre as três proteínas (Jiang et al., 2023).

A conexão entre os domínios da região N-terminal (domínios I, II e III) é compacta, e as mudanças da atividade biológica das proteínas Vip3 são associadas normalmente à conexão entre os domínios III/IV e IV/V, devido a flexibilidade dos domínios da região C-terminal (Jiang et al., 2020). As substituições em poucos aminoácidos do C-terminal podem modificar a atividade inseticida das proteínas Vip3, desencadeando maior afinidade de ligação e estabilidade da proteína em diferentes espécies de lepidópteros (Chi et al., 2019; Shao et al., 2020; Yang et al., 2022).

Em estudo envolvendo *H. armigera*, por exemplo, a substituição de aminoácidos por alanina em Vip3Aa através de mutagênese sítio-dirigida no aminoácido 619 melhorou a atividade inseticida contra a praga, mas nos aminoácidos 552 e 627 houve redução significativa da toxicidade, o que levaram os autores relacionarem a modificação com o processo de ligação dos receptores aos mutantes (Chi et al., 2019). Ao substituir glicina por serina, ácido glutâmico ou alanina no aminoácido 689 de Vip3Af, alguns autores

apontaram a diminuição da atividade inseticida dos mutantes, associada ao papel estrutural desse aminoácido no dobramento do domínio V durante o processamento (Banyuls et al., 2018 e 2021).

Em estudo recente sugeriu-se que a proteína Vip3Aa se liga à matriz peritrófica através do domínio V. O *motif* de ligação a glicano facilita o reconhecimento de receptores glicosilados pela proteína na membrana do intestino médio do inseto. Alterações na sequência de aminoácidos na região impede a interação entre a Vip3Aa e o hospedeiro (Jiang et al., 2023).

O presente estudo aponta *motif* diferencial no domínio IV. A Vip3Ae apresenta seis aminoácidos distintos de Vip3Aa20 e Vip3Af no *motif* estudado, nas posições 543, 544, 546, 547, 561 e 568. Dentre as alterações, somente nas posições 546 (Vip3Aa20/Vip3Af = ácido glutâmico; Vip3Ae = glicina) e 568 (Vip3Aa20/Vip3Af = asparagina; Vip3Ae = lisina) tratando-se de aminoácidos com grupos funcionais diferentes segundo sua cadeia lateral (ácido glutâmico – polar ácido; glicina – apolar alifático; asparagina – polar não carregado; lisina – polar básico). Uma maior investigação a respeito do efeito de possíveis mutações de sítio-dirigidas nesses resíduos devem ser consideradas mediante as diferenças de desempenho de *S. frugiperda* PW-R expostas a Vip3Ae.

In vitro, a protoxina Vip3Aa20 e o fragmento principal de 62 kDa referente à proteína ativada apresentaram uma cinética um pouco mais estável em relação à Vip3Ae e Vip3Af nos primeiros trinta minutos de proteólise com conteúdo intestinal bruto. A formação de banda intermediária entre 40 e 50 kDa, além dos produtos identificados próximos as bandas principais de 62 e 89 kDa, pode estar associada à estabilidade da proteína inerente à sua pureza ou até mesmo às substâncias tamponantes do meio durante o processamento, visto que a Vip3Aa20 apresentou menor quantidade destes fragmentos intermediários durante a proteólise.

Fragmentos intermediários são relatados em outros estudos, onde Caccia et al. (2014) apontaram o fragmento de 47 kDa durante as proteólises realizadas com conteúdo intestinal de *S. frugiperda* e *S. exigua* incubado com Vip3Aa e Vip3Ae. Nesse mesmo estudo, o maior rendimento da banda de 62 kDa em Vip3Aa foi correlacionado com a suscetibilidade de *S. frugiperda*, mas o mesmo não foi relacionado à proteína Vip3Ae.

Em outro trabalho envolvendo a atividade inseticida de Vip3Ae contra duas espécies de *Spodoptera*, os autores não conseguiram correlacionar o perfil de proteólise

com a toxicidade (Chakroun et al., 2012). O rendimento do fragmento de 62 – 66 kDa, derivado do C-terminal, não foi correlacionada com a suscetibilidade diferencial da PW-R frente à Vip3Ae. Porém, a diversidade nesta região sugere maiores investigações, pois pode ter contribuído no efeito inseticida da proteína na população PW-R. A proteína Vip3Ae não apresenta um sítio para o *motif 2* no domínio IV da sequência onde interagem as estruturas dos CBM e os sítios de ligação putativos de glicano expostos ao solvente (Núñez-Ramírez et al., 2020). Essa detecção pode estar relacionada à atividade inseticida da proteína Vip3Ae que manteve seu intervalo de confiança quando testada contra PW-R.

Assim como o domínio V, o domínio IV também apresenta sítio de ligação a glicano. Entretanto, a interação da Vip3Aa com a matriz peritrófica independente deste domínio, indispensável para a toxicidade *in vivo*. Ao ser expresso isoladamente, o mutante referente ao domínio IV mostrou ser resistente à digestão pelo conteúdo intestinal de *S. frugiperda*. Portanto, a função biológica desse domínio pode colaborar para a estabilidade da proteína mediante o gradiente de pH existente no lúmen intestinal da lagarta (Jiang et al., 2023).

Por fim, embora não tenha sido testada contra PW-R em bioensaios seletivos, a proteína Vip3Aa42 apresentou mortalidade semelhante à proteína Vip3Aa20, além de apresentar identidade de 98,4% com a proteína comercial, o que pode ser uma atividade a ser explorada no contexto de resistência cruzada em *S. frugiperda*.

6. CONCLUSÃO

A atividade inseticida diferencial detectada entre Vip3Ae e Vip3Aa20 ou Vip3Af testadas na população de *S. frugiperda* suscetível e Cry-resistente foi correlacionada à estrutura molecular das proteínas.

A localização de motifs diferenciais na região C-terminal, onde a ausência de um sítio foi detectada para Vip3Ae e as alterações nos resíduos Glu⁵⁴⁶→Gly⁵⁴⁶ e Asn⁵⁶⁸→Lys⁵⁶⁸ do domínio IV estão associadas ao melhor desempenho da proteína quando exposta à *S. frugiperda*.

Os resultados destacam a importância da exploração de novas proteínas inseticidas que possam ser utilizadas para o manejo de populações Cry – resistentes. As proteínas Txp40 e XnGroel não foram eficientes para causar mortalidade em *S. frugiperda*, mas podem ser exploradas em outras pragas, assim como outras moléculas dos complexos de proteínas inseticidas das bactérias *X. nematophila* e *P. akhurstii* são

opções interessantes a serem investigadas em *S. frugiperda*.

A exploração da resistência cruzada negativa é uma estratégia que pode ser aproveitada para prolongamento das tecnologias de milho Bt presentes no campo.

Estudos semelhantes com outras proteínas Vip3 em populações resistentes são necessários para elucidar os modos de ação dessas proteínas e serem considerados nos programas de manejo. Bem como, o aprofundamento sobre a alteração de efeitos inseticidas decorrentes de mutações de sítio-dirigidas nos domínios C-terminais dessas macromoléculas se faz importante nesse contexto.

REFERÊNCIAS

- Adang MJ, Crickmore N, Jurat-Fuentes JL (2014) Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In: **Advances in insect physiology**. Amsterdam:Academic Press, p. 39-87.
- AGROFIT/MAPA (2022): Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT Consulta Aberta. 2022a. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 01 dez. 2022.
- AGROFIT/MAPA (2022b): Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT Dados e Gráficos de Registros Agrotóxicos e Afins (Novo). Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>. Acesso em: 01 dez. 2022.
- Álvarez-Alfageme F, Devos Y, Camargo AM, Arpaia S, Messéan A. Managing resistance evolution to transgenic Bt maize in corn borers in Spain. **Critical Reviews in Biotechnology** 42:201-219.
- Amadio AF, Navas LE, Sauka DH, Berretta MF, Benintende GB, Zandomeni RO (2013) Identification, Cloning and Expression of an Insecticide *cry8* Gene from *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4. **Microbial Physiology** 23:401-409.
- Amaral FS, Guidolin AS, Salmeron E, Kanno RH, Padovez FE, Fatoretto JC, Omoto C (2020) Geographical distribution of Vip3Aa20 resistance allele frequencies in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Pest management science** 76:169-178.
- An B, Zhang Y, Li X, Hou X, Yan B, Cai J (2022) PHB2 affects the virulence of Vip3Aa to Sf9 cells through internalization and mitochondrial stability. **Virulence** 13:684-697.
- Anadow DA (2008) The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews** 4:142-199.
- Anjorin FB, Odeyemi OO, Akinbode OA, Kareem KT (2021) Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) infestation: maize yield depression and physiological basis of tolerance. **Journal of Plant Protection Research** 62:12-21.
- Ayanoğlu FB, Elçin AE, Elçin YM (2020) Bioethical issues in genome editing by CRISPR-Cas9 technology. **Turkish Journal of Biology** 44:110-120.
- Augusto MLV (2014) **Caracterização do gene chi_I555 e propriedades bioquímicas da quitinase de *Bacillus thuringiensis***. 39 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Unesp, Jaboticabal.
- Banerjee R, Hasler J, Meagher R, Nagoshi R, Hietala L, Huang F, Narva K, Jurat-Fuentes JL (2017) Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Scientific reports** 7:1-10.
- Banyuls N, Hernández-Rodríguez CS, Van Rie J, Ferré J (2018) Critical amino acids for the insecticidal activity of Vip3Af from *Bacillus thuringiensis*: Inference on structural

aspects. **Scientific Reports** 8:1-14.

Banyuls N, Quan Y, González-Martínez RM, Hernández-Martínez P, Ferré J (2021) Effect of substitutions of key residues on the stability and the insecticidal activity of Vip3A_f from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of invertebrate pathology** 186:107439.

BAYER (2021) Nova biotecnologia VTPRO4 traz evolução para a cultura do milho híbrido no Brasil. Bayer JeffreyGroup. Disponível em: <<https://www.bayer.com.br/pt/midia/nova-biotecnologia-vtpro4-evolucao-cultura-milho-hibrido-brasil>>. Acesso em: 02 dez. 2022.

Barton KA, Whiteley HR, Yang NS (1987) *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. **Plant physiology** 85:1103-1109.

Beegle CC, Yamamoto T (1992) Invitation paper (CP Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development **The Canadian Entomologist** 124:587-616.

Barboza-Corona JE, Contreras JC, Velázquez-Robledo R, Bautista-Justo M, Gómez-Ramírez M, Cruz-Camarillo R, Ibarra JE (1999) Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters** 21:1125-1129.

Barboza-Corona JE, Nieto-Mazzocco, E, Velázquez-Robledo R, Salcedo-Hernandez R, Bautista M, Jiménez B, Ibarra JE (2003) Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology** 69:1023-1029.

Bel Y, Banyuls N, Chakroun M, Escriche B, Ferré J (2017) Insights into the structure of the Vip3A_a insecticidal protein by protease digestion analysis. **Toxins** 9:131.

Berbert-Molina MA, Prata AMR, Pessanha LG, Silveira MM (2008) Kinetics of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis growth on high glucose concentrations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 35:1397-1404.

Bergamasco VB, Mendes DRP, Fernandes OA, Desidério JA, Lemos VF (2013) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3A_a protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of invertebrate pathology** 112:152-158.

Bernardi D (2015) **Resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a eventos piramidados de milho que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* Berliner.** 121 f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Universidade de São Paulo.

Bernardi O, Bernardi D, Horikoshi RJ, Okuma DM, Miraldo LL, Fatoletto J, Medeiros FC, Burd T, Omoto C (2016) Selection and characterization of resistance to the Vip3A_a20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science** 72:1794-1802.

Bird L, Miles M, Quade A, Spafford H (2022) Insecticide resistance in Australian *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) and development of testing procedures for resistance surveillance. **Plos one** 17:e0263677.

Bode HB (2009) Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. **Current opinion in chemical biology** 13:224-230.

Boregas KGB, Mendes SM, Waquil JM, Fernandes GW (2013) Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia** 72:61-70.

Bork P, Koonin EV (1996) Protein sequence motifs. **Current opinion in structural biology** 6:366-376.

Brasil, CTNBio. Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018. Estabelece os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas/-/asset_publisher/OgW431Rs9dQ6/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018>. Acesso em 02 dez. de 2022.

Bravo A, Gomez I Conde J, Sanchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberon M (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta** 1667:38-46.

Brookes G, Barfoot P (2020) Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996-2018: impacts on pesticide use and carbon emissions. **GM Crops Food**. 11:215-241.

Boukedi H, Khedher SB, Abdelkefi-Mesrati L, Van Rie J, Tounsi S (2018) Comparative analysis of the susceptibility/tolerance of *Spodoptera littoralis* to Vip3Aa, Vip3Ae, Vip3Ad and Vip3Af toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of invertebrate pathology** 152:30-34.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry** 72:248-254.

Brown SE, Cao AT, Dobson P, Hines ER, Akhurst RJ, East P (2006) Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. **Applied and Environmental Microbiology** 72:1653-1662.

Busato GR, Grutzmacher AD, Garcia MS (2005) Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology** 34:743-750.

Caccia S, Chakroun M, Vinokurov K, Ferre J (2014) Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins by two *Spodoptera* species. **Journal of insect physiology** 67:76-84.

Caccia S, Casartelli M, Tettamanti G (2019) The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell and Tissue research** 377:505-525.

Capinera JL (2002) **Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Insecta:**

Lepidoptera: Noctuidae) University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville, Florida.

Carrière Y, Crickmore N, Tabashnik BE (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature biotechnology** 33:161-168.

Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik, BE (2016) Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? **Trends in biotechnology** 34:291-302.

Carrière Y, Degain B, Unnithan GC, Harpold VS, LI X, Tabashnik BE (2019) Seasonal declines in Cry1Ac and Cry2Ab concentration in maturing cotton favor faster evolution of resistance to pyramided Bt cotton in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of economic entomology** 112:2907-2914.

Castillo JC, Reynolds SE, Eleftherianos I (2011) Insect immune responses to nematode parasites. **Trends in parasitology** 27:537-54.

Ceccon CC, Caverzan A, Margis R, Salvadori JR, Grandó MF (2020) Gene stacking as a strategy to confer characteristics of agronomic importance in plants by genetic engineering. **Ciência Rural** 50:e20190207.

Chakrabarty S, Jin M, Wu C, Chakraborty P, Xiao Y (2020) *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. **Pest management science** 76:1612-1617.

Chakroun M, Bel Y, Caccia S, Abdelkefi-Mesrati L, Escriche B, Ferré J (2012) Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of invertebrate pathology** 110:334-339.

Chakroun M, Ferré J (2014) *In vivo* and *in vitro* binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by 125I radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology** 80:6258-6265.

Chakroun M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J (2016) Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 80:329-350.

Chi B, Li H, Zhang J, Wei P, Gao J, Liu R (2019) *In silico* structure-based identification and validation of key residues of Vip3Aa involving in lepidopteran brush border receptor binding. **Applied biochemistry and biotechnology** 187:1448-1459.

Choe, S. G.; Maeng, H. R.; Pak, S. J (2022) Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using penicillin fermentation waste matter and application in agriculture. **Journal of Natural Pesticide Research** 2:1-6.

Chiang TW, Le Sage C, Larrieu D, Demir M, Jackson SP (2016) CRISPR-Cas9^(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing **Scientific Reports** 6:1-17.

Cimen H, Touray M, Gulsen SH, Hazir S (2022) Natural products from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: Mechanisms and impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**

106:4387-4399.

Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC (2021) A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of invertebrate pathology** 186:107438.

Crickmore N, Berry C, Panneerselvam S, Mishra R, Connor TR, Bonning BC. Bacterial Pesticidal Protein Resource Center. Disponível em: <https://www.bpprc.org>. Acesso em: 03. jun. 2022.

Cruz I (1995) **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 45 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 21).

CTNBIO. Tabela de Plantas - Uso Comercial. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/>. Acesso em: 22 jun. 2023.

CTNBIO. Produtos Avaliados - Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2304555/Tabela+TIMP/8c4a7218-f810-405b-94bf-a352d849f3dc?version=1.2.> Acesso em: 02 dez. 2022.

Day R et al. (2017) Fall armyworm: impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Management** 28:196-201.

De Escudero IR, Banyuls N, Bel Y, Maeztu M, Escrache B, Muñoz D, Caballero P, Ferré J (2014) A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. **Journal of Invertebrate Pathology** 117:51-55.

De Maagd R, Kwa M, Van Der Klei H, Yamamoto T, Schipper B, Vlak J, Stiekema W, Bosch D (1996) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Applied and Environment Microbiology** 62:1537–1543.

De Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual review of genetics** 37:409-433.

Denecke S, Swevers L, DOURIS V, Vontas J (2018) How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 103:22-35.

Diez-Rodríguez GI, Omoto C (2001) Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology** 30:311-316.

Dhole NP, Dar MA, Pandit RS (2021) Recent advances in the bioprospection and applications of chitinolytic bacteria for valorization of waste chitin. **Archives of Microbiology** 203:1953-1969.

Dubovskiy IM, Grizanova V, Tereshchenko D, Krytsyna TI, Alikina T, Kalmykova G,

Kabilov M, Coates CJ (2021) *Bacillus thuringiensis* Spores and Cry3A Toxins Act Synergistically to Expedite Colorado Potato Beetle Mortality. **Toxins** 746:1-17.

Early R, González-Moreno P, Murphy ST, Roger D (2018) Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. **NeoBiota** 40:25-50.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 93:5389-5394.

Fares MA, Barrio E, Sabater-Muñoz B, Moya A (2002) The evolution of the heat-shock protein GroEL from Buchnera, the primary endosymbiont of aphids, is governed by positive selection. **Molecular Biology and Evolution** 19:1162-1170.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, Dos Santos AC, Omoto C (2014) Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop protection** 64:150-158.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Santos ACD, Omoto C (2016) Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest management science** 72:974-979.

Faretto JC (2017) **Molecular Characterization of Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) Resistant to Vip3Aa20 Protein Expressed in Corn**. 168 f. Dissertation (Graduate Program in Translational Plant Science) - The Ohio State University, Columbus, Ohio.

Faretto JC et al. (2017) Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management** 8:1-17.

Ferré J et al. (1991) Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 88:5119-5123.

Ferré J, Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology** 47:501-533.

French-Constant RH, Dowling A, Waterfield NR (2007) Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. **Toxicon** 49:436-451.

Figueiredo CS, Lemes ARN, Sebastião I, Desidério JA (2019) Synergism of the *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2, and Vip3 proteins in *Spodoptera frugiperda* control. **Applied biochemistry and biotechnology** 188:798-809.

Figueiredo CS, Zara FJ, Desidério JA (2022) Effect of the Cry1, Cry2 and Vip3 protein combinations on the control of *Anticarsia gemmatalis* (Erebidae) and *Chrysodeixis includens* (Noctuidae) Lepidoptera. **International Journal of Pest Management** 68:175-183.

Figueiredo CS, Marucci SC, Tezza RID, Lemos MVF, Desidério JA (2013) Caracterização do gene vip3A e toxicidade da proteína Vip3Aa50 à lagarta-do-cartucho e à lagarta-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48:1220-1227.

Flagel L et al. (2018) Mutational disruption of the ABCC2 gene in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, confers resistance to the Cry1Fa and Cry1A.105 insecticidal proteins. **Scientific Reports** 8:1-11.

Garcia-Del-Pino, F.; Morton, A.; Shapiro-Ilan, D (2018) Entomopathogenic nematodes as biological control agents of tomato pests. In: Wakil W, Brust GE, Perring TD (Eds.) **Sustainable management of arthropod pests of tomato**. Academic Press, p. 269-282.

Guanghui Z, Jing L, Guojun Z, Hong L (2020) Epidemiology and risk factors of neurosurgical bacterial meningitis/encephalitis induced by carbapenem resistant Enterobacteriaceae. **Journal of Infection and Chemotherapy** 26:101-106.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T (1997) Biological mediators of insect immunity. **Annual review of entomology** 42:611-643.

Gilreath RT, Kerns DL, Huang F, Yang F (2021) No positive cross-resistance to Cry1 and Cry2 proteins favors pyramiding strategy for management of Vip3Aa resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science** 77:1963-1970.

Gould F (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual review of entomology** 43:701-726.

Gómez I, Sánchez J, Miranda R, Bravo A, Soberón M (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 letters** 513:242-246.

Gomis-Cebolla J, Ruiz De Escudero I, Vera-Velasco NM, Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Ceballos T, Ferré J (2017) Insecticidal spectrum and mode of action of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Ca insecticidal protein. **Journal of invertebrate pathology** 142:60-67.

Gounina-Allouane R, Acheuk F, Sahir-Halouane F (2022) Efficient and cost-effective production of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* spores and delta-endotoxins using agricultural raw materials and agro-industrial wastes under submerged fermentation. **Bioresource Technology Reports** 18:e101001.

Green MR, Sambrook J (2012) Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4th Revised ed., 2028 p.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of economic entomology** 69:487-488.

Gupta M, Kumar H, Kaur S (2021) Vegetative insecticidal protein (Vip): A potential contender from *Bacillus thuringiensis* for efficient management of various detrimental agricultural pests. **Frontiers in Microbiology** 12:e659736.

Haile F, Nowatzki T, Storer N (2021) Overview of Pest Status, Potential Risk, and

Management Considerations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) for U.S. Soybean Production, **Journal of Integrated Pest Management** 12: 1–10.

Hamdan MF Noor SNM, Abd-Aziz N, Pua TL, Tan BC (2022) Green Revolution to Gene Revolution: Technological Advances in Agriculture to Feed the World. **Plants** 11:1-31.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology** 166:557-580.

Hanpanich O, Maruyama A (2020) Artificial chaperones: From materials designs to applications. **Biomaterials** 254:120150.

Hayakawa T, Shitomi Y, Miyamoto K, Hori H (2004) GalNAc pretreatment inhibits trapping of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac on the peritrophic membrane of *Bombyx mori*. **Febs Letters** 576:331-335.

Head GP, Greenplate J (2012) The design and implementation of insect resistance management programs for Bt crops. **GM crops & food** 3:144-153.

Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Van Rie J, Escriche B, Ferré J (2013) Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal Invertebrate Pathology** 113:78-81.

Hernández-Rodríguez CS, Hernández-Martínez P, Van Rie J, Escriche B, Ferré J (2013) Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS one** 8:e6816,

Hsieh YC et al. (2010) Crystal structures of *Bacillus cereus* NCTU2 chitinase complexes with chitooligomers reveal novel substrate binding for catalysis: a chitinase without chitin binding and insertion domains. **Journal of Biological Chemistry** 285:31603-31615.

IRAC. Manejo da resistência a inseticidas e plantas Bt. *Spodoptera frugiperda*. *Helicoverpa armigera*. *Chrysodeixis includens*. Programa IRAC-BR 2016. Disponível em https://www.iraac-br.org/_files/ugd/2bed6c_029627fdae5a499ca06c3eb4cb2fba0a.pdf. Acesso em 29 de nov. de 2022.

ISAAA (2017) Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech crop adoption surges as economic benefits accumulate in 22 years. **ISAAA Brief** 53:104-106.

ISAAA. GM Approval Database | GMO Database | GM Crop Approvals. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). 2022. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>>. Acesso em 28 nov. 2022.

Jiang, K.; Hou, X.; Han, L.; Tan, T.; Cao, Z.; Cai, J (2018a) Fibroblast growth factor receptor, a novel receptor for vegetative insecticidal protein Vip3Aa. **Toxins** 10:e546.

Jiang K, Hou XY, Tan TT, Cao ZL, Mei SQ, Yan B, Chang J, Han L, Zhao D, Cai J (2018b) Scavenger receptor-C acts as a receptor for *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa and mediates the internalization of Vip3Aa via endocytosis. **PLoS pathogens** 14:e1007347.

- Jiang K, Zhang Y, Chen Z, Wu D, Cai J, Gao X (2020) Structural and functional insights into the C-terminal fragment of insecticidal Vip3A toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Toxins** 12:438.
- Jiang K, Chen Z, Zang Y, Shi Y, Shang C, Jiao X, Cai J, Gao X (2023) Functional characterization of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* reveals the contributions of specific domains to its insecticidal activity. **Journal of Biological Chemistry**, 299:1-15.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science** 337:816-821.
- Joga MR, Zotti MJ, Smagghe G, Christiaens O (2016) RNAi efficiency, systemic properties, and novel delivery methods for pest insect control: what we know so far. **Frontiers in physiology** 7:553.
- Joshi MC, Sharma A, Kant S, Birah A, Gupta GP, Khan SR, Bhatnagar R, Banerjee N (2008) An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila*. **Journal of Biological Chemistry** 283:28287-28296.
- Jouzani GS, Valijanlian E, Sharafi R (2017) *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. **Applied microbiology and biotechnology** 101:2691-2711.
- Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré, J (2021) Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* **Annual Review of Entomology** 66:121-140.
- Kahn TW, Chakroun M, Williams J, Walsh T, James B, Monserrate J, Ferré J (2018) Efficacy and resistance management potential of a modified Vip3C protein for control of *Spodoptera frugiperda* in maize. **Scientific Reports** 8:1-11.
- Koppenhöfer, AM, Shapiro-Ilan, DI, Hiltbold I (2020) Entomopathogenic nematodes in sustainable food production. **Frontiers in Sustainable Food Systems** 4:25.
- Karmakar S, Das P, Panda D, Xie K, Baig MJ, Molla KA (2022) A detailed landscape of CRISPR-Cas-mediated plant disease and pest management. **Plant Science** 323:111376.
- Knox K, Vesik M, Work E (1966) Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine-limited culture of *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology** 92:1206-1217.
- Kumar J, Ramlal A, Mallick D, Mishra V (2021) An overview of some biopesticides and their importance in plant protection for commercial acceptance. **Plants**, 10:1185-1200.
- Kumari P, Kant S, Zaman S, Mahapatro GK, Banerjee N, Sarin NB (2014) A novel insecticidal GroEL protein from *Xenorhabdus nematophila* confers insect resistance in tobacco. **Transgenic research** 23:99-107.

Kunthic, T.; Watanabe, H.; Kawano, R.; Tanaka, Y.; Promdonkoy, B.; Yao, M.; Boonserm, P (2017) pH regulates pore formation of a protease activated Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** 1859:2234-2241.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.

Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferre J, Lemos MVF Desiderio JA (2014) Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 9:e107196.

Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology** 32:1295-1309.

Lázaro-Berenguer M, Paredes-Martínez F, Bel Y, Núñez-Ramírez R, Arias-Palomo E, Casino P, Ferré J (2022) Structural and functional role of Domain I for the insecticidal activity of the Vip3Aa protein from *Bacillus thuringiensis*. **Microbial biotechnology** 15:2607-2618.

Lee MK Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology** 69:4648-4657.

Lereclus D, Delécluse A, Lecadet MM. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: Entwistle, PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S (Eds.) ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester: John Wiley & Sons, p.37-69.

Li J, Derbyshire DJ, Promdonkoy B, Ellar DJ (2001) Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. **Biochemical Society Transactions** 29:571-577.

Loutfi H, Fayad N, Pellen F, Le JB, Chakroun M, Benfarhat D, Lteif R, Kallassy M, Brun GL, Abbound M (2020) Morphological study of *Bacillus thuringiensis* crystals and spores. **Applied Sciences** 11:155.

Machado EP, Garlet CG, Weschenfelder MA, Führ FM, Godoy DN, Pretto VE, Contini RE, Franco CR, Omoto C, Bernardi O (2022) Interspecific Variation in Susceptibility to Insecticides by Lepidopteran Pests of Soybean, Cotton, and Maize Crops From Brazil. **Journal of Economic Entomology** 115:305-312.

Maino JL, Schouten R, Overton K, Day R, Ekesi S, Bett B, Barton M, Gregg PC, Umina PA, Reynolds OL (2021) Regional and seasonal activity predictions for fall armyworm in Australia. **Current Research in Insect Science** 1:100010.

Maithani D, Sharma A, Gangola S, Choudhary P, Bhatt, P (2022) Insights into applications and strategies for discovery of microbial bioactive metabolites. **Microbiological Research** 10:127053.

MAPA. **Hierarquização de pragas de maior risco fitossanitário do Brasil**. Brasília, 22 abr. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-divulga-lista-com-hierarquizacao-de-pragas-de-maior-risco-fitossanitario/1NotaTcnica_Hierarquizao-de-pragas-de-maior-risco-fitossanitario_.pdf>. Acesso em 13 nov. 2022.

Mahmood S, Kumari P, Kisku AV, Mahapatro GK, Banerjee N, Sarin NB (2022) Ectopic expression of *Xenorhabdus nematophila* chitinase in tobacco confers resistance against *Helicoverpa armigera*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)** 151:593–604.

Marucci SC, Figueiredo CS, Tezza RID Alves ECdaC, Lemos MVF, Desidério JA (2015) Relação entre toxicidade de proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a receptores intestinais de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 50:637-648.

Martínez-Zavala SA, Barboza-Pérez UE, Hernández-Guzmán G, Bideshi DK, Barboza-Corona JE (2020) Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, modular structure, and applied potentials. **Frontiers in microbiology** 10:3032.

Mathur C, Kushwah J, Somvanshi VS, Dutta TK (2018) A 37 kDa Txp40 protein characterized from *Photorhabdus luminescens* sub sp. *akhurstii* conferred injectable and oral toxicity to greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Toxicon** 154:69-73.

Mehlhorn S, Hunnekuhl VS, Geibel S, Nauen R, Bucher G (2021) Establishing RNAi for basic research and pest control and identification of the most efficient target genes for pest control: a brief guide. **Frontiers in Zoology** 18:1-16.

Mezzetti B, Arpaia S, Baraldi E, Dietz-Pfeilstetter A, Smagghe G, Ventura V, Sweet J (2022) Advances and Challenges of RNAi Based Technologies for Plants. **Frontiers in Plant Science** 12:680242.

Miraldo LL, Bernardi O, Horikoshi RJ, e Amaral FS, Bernardi D, Omoto C (2016) Functional dominance of different aged larvae of Bt-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic maize expressing Vip3Aa20 protein. **Crop Protection** 88:65-71.

Montezano DG, Sosa-Gómez DR, Specht A, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Peterson JA, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African entomology** 26:286-300.

Mota-Sanchez D, Wise JC (2022) **The Arthropod Pesticide Resistance Database**. Michigan State University. Disponível em: <<http://www.pesticideresistance.org>>. Acesso em 28 nov. 2022.

Nagoshi RN, Rosas-García NM, Meagher RL, Fleischer SJ, Westbrook JK, Sappington TW, Hay-Roe M, Thomas JMG, Murúa GM (2015) Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of economic entomology** 108:135-144.

Nagoshi RN, Fleischer S, Meagher RL, Hay-Roe M, Khan A, Murúa MG (2017) Fall

armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations. **PloS one** 12:e0171743.

Nagoshi RN (2022) Observations of genetic differentiation between the fall armyworm host strains. **Plos one**17:e0277510.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (2016) Genetically engineered crops: experiences and prospects. Washington, DC: The National Academies Press, 606 p.

Núñez-Ramírez R, Huesa J, Bel Y, Ferré J, Casino P, Arias-Palomo E (2020) Molecular architecture and activation of the insecticidal protein Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis*. **Nature communications** 11:1-9.

Obembe OO, Popoola JO, Leelavathi S, Reddy SV (2011) Advances in plant molecular farming. **Biotechnology advances** 29:210-222.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Carvalho RA, Willse A, Martinelli S, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736.

Oppert B et al. (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry** 272:23473-23476.

Osman GH, Soltane R, SALEH I, Abulreesh HH, Gazi KS, Arif IA, Ramadan AM, Alameldin HF, Osman YA, Idriss M (2019) Isolation, characterization, cloning and bioinformatics analysis of a novel receptor from black cut worm (*Agrotis ipsilon*) of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxins. **Saudi Journal of Biological Sciences** 26:1078-1083.

Pacheco S, Gómez I, Gill SS, Bravo A, Soberón M (2009) Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. **Peptides** 30:583-588.

Palma L, Muñoz D, Berry C, Murillo J, Caballero P (2014) *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins** 6:3296-3325.

Pigott CR, King MS, Ellar DJ (2008) Investigating the properties of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins with novel loop replacements created using combinatorial molecular biology. **Applied and environmental microbiology** 74:3497-3511.

Pittendrigh BR, Huesing J, Walters KR, Olds BP, Steele LD, Sun L, Gaffney P, Gassmann AJ (2014) Negative cross-resistance: history, present status, and emerging opportunities. In: **Insect Resistance Management**. Academic Press, p. 373-401.

Prasanna BM, Bruce A, Beyene Y, Makumbi D, Gowda M, Assim M, Martinelli S, Head GP, Parimi S (2022) Host plant resistance for fall armyworm management in maize: relevance, status and prospects in Africa and Asia. **Theoretical and Applied Genetics** 23:1-20.

Qaim M. (2009) The economics of genetically modified crops. **The Economics of Genetically Modified Crops** 1:665-694.

Quan Y, Lázaro-Berenguer M, Hernández-Martínez P, Ferré J (2021) Critical Domains in the Specific Binding of Radiolabeled Vip3Af Insecticidal Protein to Brush Border Membrane Vesicles from *Spodoptera* spp. and Cultured Insect Cells. **Applied and Environmental Microbiology** 87: e01787.

Qin G, Wu S, Zhang L, Li Y, Liu C, Yu J, Deng L, Xiao G, Zhang Z (2022) An Efficient Modular Gateway Recombinase-Based Gene Stacking System for Generating Multi-Trait Transgenic Plants. **Plants** 11:488.

Rajput R, NAIK J, Misra P, Trivedi PK, Pandey A (2022) Gene Pyramiding in Transgenic Plant Development: Approaches and Challenges. **Journal of Plant Growth Regulation** 14:1-19.

Raymond B, Johnston, PR, Nielsen-Leroux C, Lereclus D, Crickmore N (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in microbiology**18:189-194.

Reddy NA, Saindane YS, Chaudhari CS, Landage SA (2021) Biology of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) on maize under laboratory conditions. **The Pharma Innovation Journal** 10:1997-2001.

Robertson JL, Preisler HK, Russell RM, Plus P. Probit and logit analysis user's guide. LeOra Software LLC, 2003.

Roush RT (1998) Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: Can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 353:1777-1786.

Ruiz De Escudero I, Banyuls N, Bel Y, Maeztu M, Escriche B, Muñoz D, Caballero P, Ferré J (2014) A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. **Journal of Invertebrate Pathology** 117:51-55.

Sajnaga E, Kazimierczak W (2020) Evolution and taxonomy of nematode-associated entomopathogenic bacteria of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: an overview. **Symbiosis** 80:1-13.

Santos EN, Menezes LP, Dolabella SS, Santini A, Severino P, Capasso R, Zielinska A, Souto EB, Jain S. (2022). *Bacillus thuringiensis*: From biopesticides to anticancer agents. **Biochimie** 192:83-90.

Sauka DH, Peralta C, Pérez MP, Onco MI, Fiodor A, Caballero J (2022) *Bacillus toyonensis* biovar *Thuringiensis*: A novel entomopathogen with insecticidal activity against lepidopteran and coleopteran pests. **Biological Control** 167:104838.

Scheidegger L, Niassy S, Midega C, Chiriboga X, Delabays N, Lefort F, Zürcher R, Hailu G, Khan Z, Subramanian S (2021). The role of *Desmodium intortum*, *Brachiaria* sp. and *Phaseolus vulgaris* in the management of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) in maize cropping systems in Africa. **Pest Management Science**, 77:2350-2357.

Sena JAD Hernández-Rodríguez CS, Ferré J (2009) Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and**

Environmental Microbiology 75:2236-2237.

Shan Y, JIN M, Chakrabarty S, Yang B, LI Q, Cheng Y, Zhang L, Xiao Y (2022) Sf-FGFR and Sf-SR-C Are Not the Receptors for Vip3Aa to Exert Insecticidal Toxicity in *Spodoptera frugiperda*. **Insects** 13:547.

Shankhu PY, Mathur C, Mandal A, Sagar D, Somvanshi VS, Dutta TK (2020) Txp40, a protein from *Photorhabdus akhurstii*, conferred potent insecticidal activity against the larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *S. exigua*. **Pest management Science** 76:2004-2014.

Shao E, Zhang A, Yan Y, Wang Y, Jia X, Sha L, Guan X, Wang P, Huang Z (2020) Oligomer formation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin. **Toxins** 12:274.

Somvanshi VS, Dubay B, Kushwah J, Ramamoorthy S, Vishnu US, Sankarasubramanian J, Rajendhran J Rao U (2019) Draft genome sequences for five *Photorhabdus* bacterial symbionts of entomopathogenic Heterorhabditis nematodes isolated from India. **Microbiology Resource Announcements** 8:e01404-18.

Šunjka D, Mechora Š (2022) An Alternative Source of Biopesticides and Improvement in Their Formulation—Recent Advances. **Plants** 11:3172.

Silva WJ, Pilz-Júnior HL, Heermann R, Da Silva OS (2020) The great potential of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* for mosquito control: A review. **Parasites & Vectors** 13:1-14.

Storer NP, Thompson GD, Head GP (2012) Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. **GM crops & food** 3:154-162.

Syed T, Askari M, Meng Z, LI Y, Abid MA, Wei Y, Sandui G, Liang C, Zhang R (2020) Current insights on vegetative insecticidal proteins (Vip) as next generation pest killers. **Toxins** 12:522.

Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual review of entomology** 39:47-79.

Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carrière Y (2009) Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of economic entomology** 102:2011-2025.

Tavares CS, Santos-Amaya OF, Oliveira EE, Paula-Moraes SV, Pereira EJG (2021) Facing Bt toxins growing up: developmental changes of susceptibility to Bt corn hybrids in fall armyworm populations and the implications for resistance management. **Crop Protection** 146:05664.

Tay WT et al. (2022) Global population genomic signature of *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) supports complex introduction events across the Old World. **Communications Biology** 5:297.

To P, Xia Y, Devlin T, Fleming KG, Fried SDA (2022) Proteome-Wide Map of Chaperone-Assisted Protein Refolding in the Cytosol. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences 119:e2210536119.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Biopesticide Registration Action Document: *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn. 2010. Disponível em: <https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/mon-89034-brad.pdf>. Acesso em: 28 out. 2022.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. White Paper on Resistance in Lepidopteran Pests of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant Incorporated Protectants in the United States. 2018. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-07/documents/position_paper_07132018.pdf>. Acesso em: 28 out. 2022.

Valicente FH (2015) Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Sete Lagoas: EMBRAPA: Milho e Sorgo, 45 p. (Embrapa-CNPMS. Circular Técnica, 208).

Valtierra-de-Luis D, Villanueva M, Berry C, Caballero P. (2020) Potential for *Bacillus thuringiensis* and other bacterial toxins as biological control agents to combat dipteran pests of medical and agronomic importance. **Toxins** 12:773.

Van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology** 101:1-16.

Vázquez-Ramírez FM, Ibarra JE, Casados-Vázquez LE, Barboza-Corona JE, Rincón-Castro MCD (2022) Molecular and Toxicological Characterization of a *Bacillus thuringiensis* Strain Expressing a Vip3 Protein Highly Toxic to *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 115:1455-1463.

Wang X, Chi N, Bai F, Du Y, Zhao Y, Yin H (2016) Characterization of a cold-adapted and salt-tolerant exo-chitinase (ChiC) from *Pseudoalteromonas* sp. DL-6. **Extremophiles** 20:167-176.

Wang C, Li W, Kessenich CR, Petrick JS, Rydel TJ, Sturman EJ, Lee TC, Glen KC, Edrington TC (2018) Safety of the *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1A.105 protein: Evidence that domain exchange preserves mode of action and safety. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** 99:50-60.

Wang Y et al. (2019) *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 protein interactions with novel receptors allow control of resistant fall armyworms, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Applied and environmental microbiology** 85:e00579.

Wen Z, Conville J, Matthews P, Hootman T, Himes J, Wong S, Huang F, Ni X, Chen JS, Bramlett M (2023) More than 10 years after commercialization, Vip3A-expressing MIR162 remains highly efficacious in controlling major Lepidopteran maize pests: laboratory resistance selection versus field reality. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 192:1-10.

Wilson RC, Doudna JA (2013) Molecular mechanisms of RNA interference. **Annual review of biophysics** 42:217-239.

Yamamoto T (2022) Engineering of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. **Journal**

of **Pesticide Science** 47:47-58.

Yang F, Kerns DL, Brown S, Kurtz R, Dennehy T, Braxton B, Head G, Huang F (2016) Performance and cross-crop resistance of Cry1F-maize selected *Spodoptera frugiperda* on transgenic Bt cotton: implications for resistance management. **Scientific Reports** 6:1-7.

Yang, F.; Kerns, D. L.; Head, G. P.; Price, P.; Huang F (2017) Cross-resistance to purified Bt proteins, Bt corn and Bt cotton in a Cry2Ab2-corn resistant strain of *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science** 73:2495-2503.

Yang X, Wang Z, Geng L, Chi B, Liu R, Li H, Gao J, Zhang J (2022a) Vip3Aa domain IV and V mutants confer higher insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa armigera*. **Pest Management Science** 78:2324-2331.

Yang F, Wang Z, Kerns DL (2022b) Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Cry1, Cry2, and Vip3Aa Proteins in Bt Corn and Cotton in the Americas: Implications for the Rest of the World. **Journal of Economic Entomology** 115:1752-1760.

Ying YAN, Aumann RA, Häcker I, Schetelig MF (2022) CRISPR-based genetic control strategies for insect pests. **Journal of Integrative Agriculture** 22:651-668.

Zhang X, Candas M, Grinko NB, Taussing R, Bulla LA (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103:9897–9902.

Zheng J, Gao Q, Liu L, Liu H, Wang Y, Peng D, Ruan L, Raymond B, Sun M (2017) Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts. **MBio** 8:e00822.