

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

**SUSCETIBILIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY1 E
VIP3A DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE
LEPIDÓPTEROS-PRAGA**

Paula Cristina Brunini Crialesi Legori
Bióloga

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**SUSCETIBILIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY1 E
VIP3A DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE
LEPIDÓPTEROS-PRAGA**

Paula Cristina Brunini Crialesi-Legori

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Coorientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

**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).**

2013

C928s Crialesi-Legori, Paula Cristina Brunini
Suscetibilidade e interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para o controle de lepidópteros-praga/ Paula Cristina Brunini Crialesi Legori. – – Jaboticabal, 2013
xi, 76 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Janete Aparecida Desidério

Co-orientador: Odair Aparecido Fernandes

Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Ricardo Antonio Polanczyk, Ana Maria Guidelli Thuler, Alexandre de Sene Pinto

Bibliografia

1. *Anticarsia gemmatalis*. 2. *Chrysodeixis includens*. 3. Controle biológico. 4. Sinergismo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULA CRISTINA BRUNINI CRIALESI LEGORI – nasceu em 18 de abril de 1979 em São Paulo - SP. Concluiu o ensino médio em 1997. Ingressou na Universidade em 1999, concluindo o curso de Biologia pelo Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto - SP em 2003. Em 2005 concluiu a pós-graduação “Latu-Sensu” em Didática: A prática escolar nos diferentes níveis de ensino, na Faculdade de educação São Luís de Jaboticabal – SP. Em 2009 concluiu o mestrado na área de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal - SP. Em 2010 iniciou o doutorado na área de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal - SP.

Dedicatória

Aos meus pais, Verdino e Maria Martha que me proporcionaram o privilégio da educação, pelo apoio, confiança e incentivo para atingir meus objetivos, direcionando sempre o caminho certo a seguir.

A minha irmã Marina, pelo carinho em todos os momentos de minha vida.

Ao meu esposo Ronaldo Ap. Legori, pelo companheirismo, amor, amizade, paciência e incentivo em vários momentos difíceis que juntos passamos neste período. Amo e amarei você eternamente.

Minha família é minha vida, amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me amparado e reerguido em cada momento em que estava a cair;

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, orientadora deste trabalho, pelo apoio, paciência, ensinamentos, amizade, credibilidade e compreensão;

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes pela coorientação e ensinamentos dedicados;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos pela amizade, apoio e ensinamentos;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA): Suzana, Camila, Maria Laura, Cláudio, Isis, Bruna, Juliana, Najara, Antônio, Paula, Jaqueline, André, Natália, pelo convívio, trabalho em equipe e troca de experiências;

À Eliane Cristina da Cunha Alves pela amizade, atenção e disponibilidade;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e a Técnica Neide, da Universidade de São Paulo-ESALQ pelo fornecimento dos insetos utilizados neste estudo;

Aos membros da banca examinadora: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, Profa. Dra. Ana Maria Guidelli Thuler, Prof. Dr. Alexandre de Sene Pinto, pela contribuição e ensinamentos oferecidos.

À Camila Chiaradia Davolos e Ana Rita Nunes Lemes pela amizade, carinho, e companheirismo no desenvolvimento deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à agropecuária, pela assistência e disposição;

A Maria de Lourdes e Rosiane Legori que durante esta etapa me acolheram como membro de sua família;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

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

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	viii
RESUMO.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2. 1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2. 2. Toxinas produzidas por <i>B. thuringiensis</i>	5
2. 2. 1. Proteínas Cry.....	5
2. 2. 2. Proteínas Vip.....	8
2. 3. Planta geneticamente modificada.....	8
2. 4. Resistência de insetos-praga a toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	11
2. 5. A cultura da Soja.....	13
2. 6. <i>Anticarsia gemmatilis</i> (Hübner, 1818) (Lepidoptero: Eribidae).....	15
2. 7. <i>Chrysodeixis includens</i> (Walker, 1857) (Lepidoptero: Noctuidae).....	17
3. OBJETIVO.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4. 1. Obtenção dos clones de <i>E. coli</i> expressando proteínas Cry1A e Vip3A de <i>B. thuringiensis</i>	20
4. 2. Cultivo dos clones de <i>E. coli</i> XL-1 Blue e expressão das proteínas Cry1A.....	20
4. 3. Cultivo dos clones de <i>E. coli</i> WK6 e expressão das proteínas Vip3A.....	22

4. 4. Confirmação da expressão e quantificação das proteínas Cry1 e Vip3A.....	23
4. 5. Suscetibilidade de <i>A. gemmatalis</i> e <i>C. includens</i> às proteínas Cry1A e Vip3A.....	24
4. 6. Inibição do Desenvolvimento das Lagartas.....	27
4. 7. Interações de proteínas no controle de <i>A. gemmatalis</i> e <i>C. includens</i>	27
4. 8. Ação das enzimas digestivas de <i>A. gemmatalis</i> e <i>C. includens</i> na ativação das proteínas Cry1A e Vip3A <i>in vitro</i>	28
5. RESULTADOS.....	30
5. 1. Expressão das proteínas Cry1A e Vip3A recombinantes em <i>E. coli</i>	30
5. 2. Suscetibilidade de <i>A. gemmatalis</i> e <i>C. includens</i> às proteínas Cry1A e Vip3A.....	31
5. 3. Interações de proteínas no controle de <i>A. gemmatalis</i> e <i>C. includens</i>	35
5. 4. Ação das enzimas digestivas <i>A. gemmatalis</i> e <i>C. includens</i> na ativação das proteínas Cry1A e Vip3A <i>in vitro</i>	40
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERÊNCIAS.....	54

TÍTULO - SUSCETIBILIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A DE *Bacillus thuringiensis* PARA O CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS-PRAGA

RESUMO - Os inseticidas químicos são amplamente utilizados no controle de insetos-praga, no entanto, causam enormes prejuízos ambientais. Uma alternativa a esses inseticidas é a utilização de microrganismos entomopatogênicos, que controlam seletivamente os insetos e preservam o meio ambiente. A bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner é considerada a espécie de maior interesse neste cenário, pois é responsável pela produção de proteínas inseticidas. Genes de *B. thuringiensis* vêm sendo amplamente estudados e utilizados na construção de culturas transgênicas no mundo todo. No entanto, quando não associadas a áreas de refúgio podem acelerar a seleção de organismos resistentes em populações de insetos-praga. Estudos relatam a necessidade em retardar a evolução da resistência a insetos-praga e dentre as possibilidades, a utilização de mais de um gene na construção de plantas transgênicas mostra-se eficiente. Desta forma, o presente estudo avaliou a suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebididae) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) às proteínas de *B. thuringiensis*, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea, Vip3Aa, Vip3Ae e Vip3Af. Após estimar a CL₅₀ de cada proteína para cada espécie avaliou-se a interação entre as combinações de Vip3A+Cry1 e Cry1+Cry1. Os resultados sugerem que todas as proteínas foram eficientes no controle de ambas as espécies, destacando-se a proteína Cry1Ac (0,75 ng.cm⁻²) para *A. gemmatilis* e a proteína Vip3Af (1,4 ng.cm⁻²) para *C. includens*. O padrão geral de comparação da suscetibilidade das espécies frente às proteínas avaliadas indicou que há uma diferença significativa na toxicidade das proteínas para cada espécie. Verificou-se uma grande inibição do desenvolvimento larval de lagartas sobreviventes a CL₅₀ de cada proteína. As interações das proteínas indicaram as combinações sinérgicas Vip3Aa+Cry1Ea, Cry1Aa+Cry1Ea e Cry1Ab+Cry1Ac como alternativas para o controle e manejo de resistência de *A. gemmatilis* e *C. includens* simultaneamente. Entretanto, outras combinações atuaram em sinergismo especificamente para cada espécie. Em ensaios proteolíticos o suco entérico de cada espécie mostrou-se eficiente na ativação de proteínas.

Palavras-chave: *Anticarsia gemmatilis*, *Chrysodeixis includens*, controle biológico, sinergismo

TITLE - SUSCEPTIBILITY AND INTERACTION OF VIP3A AND CRY1 FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* TO CONTROL LEPIDOPTERA PEST

ABSTRACT - Chemical insecticides are widely used to control insect pests, however, cause enormous environmental damage. An alternative to these insecticides is the use of entomopathogenic microorganisms which selectively control insects and preserve the environment. The *Bacillus thuringiensis* Berliner is the species of greatest interest responsible for production of insecticidal proteins. Genes of *B. thuringiensis* have been widely studied and used in the construction of transgenic crops worldwide. However, when not associated with refuge areas can accelerate the selection of resistant organisms in populations of insect pests. Studies have reported the need to slow the evolution of resistance to insect pests and among the possibilities, the use of more than one gene in the construction of transgenic plants proves efficient. Thus, the present study evaluated the susceptibility of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ) and *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidæ), from the proteins isolated from *B. thuringiensis* Cry1Aa , Cry1Ab , Cry1Ac , Cry1Ca , Cry1Ea , Vip3Aa , Vip3Ae and Vip3Af . After estimating the LC₅₀ of each protein for each species evaluated the interaction between combinations of Vip3A + Cry1 and Cry1 + Cry1. The results suggest that all proteins were effective in controlling both species, emphasized the Cry1Ac protein (0.75 ng.cm⁻²) to *A. gemmatalis* and Vip3Af protein (1.4 ng.cm⁻²) to *C. includens*. A comparison of the susceptibility of the species to proteins indicated that there is a significant difference in toxicity for each species. There was a large inhibition of larval development of caterpillars surviving the LC₅₀ of each protein. The interactions of proteins indicated the synergistic combinations Vip3Aa + Cry1Ea, Cry1Aa + Cry1Ab and Cry1Ea + Cry1Ac as alternatives for the control and management of resistance in *A. gemmatalis* and *C. includens* simultaneously. However, other combinations acted in synergism specifically for each species. In proteolytic assays enteric juice each species has been successful in activating proteins.

Keywords: *Anticarsia gemmatalis*, Biological control, *Chrysodeixis includens*, synergism

1. INTRODUÇÃO

A utilização de inseticidas químicos para o controle de insetos causadores de danos às culturas agrícolas proporcionam enormes prejuízos ambientais, além de alto custo aos produtores. Constantemente buscam-se métodos alternativos de controle dos insetos-praga em todo o mundo, devido principalmente a preservação do meio ambiente.

Os inseticidas biológicos são excelentes alternativas para contornar a poluição ambiental derivada de inseticidas químicos, além de proporcionar o controle mais seletivo de insetos. Para o controle biológico de insetos-praga, a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 é considerada a espécie de maior interesse sendo caracterizada pela produção de cristais proteicos durante a esporulação, que possuem atividade inseticida (Proteínas Cry) com alta especificidade contra larvas de insetos de várias ordens (DE MAAGD et al., 2003). Este microrganismo também é responsável pela produção de outras proteínas com atividade inseticida, denominada Vip “*Vegetative Insecticidal Proteins*” (ESTRUCH et al., 1996).

As proteínas Vip são produzidas e secretadas pelas células bacterianas durante a fase vegetativa (ESTRUCH et al., 1996), não formam inclusões cristalinas e, por esse motivo, e também por não apresentarem homologia de sequência ou estrutural, foram excluídas da nomenclatura das proteínas Cry.

Culturas transgênicas que expressam proteínas de *B. thuringiensis* (*Bt*) são utilizadas no manejo de insetos-praga em todo o mundo desde que foram comercializadas pela primeira vez em 1996 (JAMES, 2011). Estas necessitam de menos aplicações de agrotóxicos, reduz custos de produção, proporciona seletividade e especificidade contra as pragas-alvo, além da conservação dos inimigos naturais e nenhuma ameaça ao meio ambiente e saúde humana quando comparada aos agrotóxicos (JAMES, 2002). Entretanto, apesar dessas vantagens, existe atualmente grande preocupação pelo uso generalizado de culturas *Bt* uma vez que estas podem acelerar a seleção de organismos resistentes em populações de pragas-alvo (ZHANG et al., 2013) quando não associadas a estratégias de manejo, como a adoção de áreas de refúgio.

A causa desta resistência pode estar relacionada à modificação de receptores do intestino médio ou à sua capacidade de ligação às proteínas (TABASHNIK, 1994). Algumas alternativas para retardar a evolução da resistência vêm sendo estudada e a mistura de toxinas inseticidas foram consideradas eficazes, no entanto recomenda-se sua utilização antes que ocorra essa evolução, mesmo sob pressão de seleção contínua (ZAHIRI; MULLA, 2003).

As proteínas Cry e Vip3 não possuem similaridade em suas sequências de aminoácidos (RANG et al., 2005) e se ligam a distintos receptores na membrana epitelial do intestino médio dos insetos-pragas (LEE et al., 2003; SENA; HERNANDEZ-RODRIGUES; FERRE, 2009). Desta forma o uso de combinações de proteínas inseticidas em culturas transgênicas podem ser empregadas no manejo de resistência de insetos.

Várias espécies de inseto-praga se alimentam de folhas de culturas agrícolas e dentre estas, a cultura da soja é amplamente prejudicada com a desfolha causada por importantes pragas. Dentre estas, destaca-se a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera:Eribidae), por sua abundância e ocorrência frequente em todas as regiões do país onde a soja é cultivada. Outros lepidópteros-praga, como a lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]), também se destaca como importante desfolhadora desta cultura desde 2003 e tem-se observado que sua ocorrência pode ser simultânea ou mais tardia à lagarta *A. gemmatilis* (BRAGA et al., 2011)

Ainda não há relatos de estudos com combinações de toxinas de *B. thuringiensis* para o controle destas espécies. Neste sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a suscetibilidade de *A. gemmatilis* e *C. includens* a cinco diferentes proteínas Cry1A e três proteínas Vip3A de *B. thuringiensis* recombinantes em *E. coli*. Após esta avaliação, verificar a interação destas proteínas, buscando indicar alternativas para o controle ou retardo da evolução de resistência pelos insetos-praga, por meio da construção de plantas transgênicas piramidadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis é uma bactéria gram-positiva, da família Bacillaceae, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, formadora de esporos e produtora de uma variedade de fatores de virulência, sendo a maioria destes, ativos contra insetos-praga, tornando esta bactéria um entomopatógeno em potencial. É de ocorrência ubíqua (KRYWUNCZYR; FAST, 1980), sendo assim, pode ser encontrada em vários substratos como: solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (SCHNEPF et al., 1998, MIRALLES; PÉREZ, 2004)

A descoberta de *B. thuringiensis* ocorreu em 1901 quando um pesquisador chamado Ishiwata realizou um estudo, descrevendo a sobre a atuação de uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade encontrada em populações do bicho-da-seda (*Bombyx mori*). Somente em 1908, foi sugerida a primeira nomenclatura por Iwabuchi, que a denominou como *B. sotto* Ishiwata. Outro estudo realizado na Alemanha em 1911, distrito de Thuringia, Ernest Berliner descreve a mesma bactéria, tendo esta sido isolada de *Ephestia kuhniella* (traça da farinha) e somente em 1915, Berliner denominou-a como *Bacillus thuringiensis*, sendo este nome atribuído em função do local na qual as lagartas foram encontradas (WHITELEY; SCHNEPF, 1986; GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

Após sua descoberta, somente em 1938 foi produzida na França uma formulação denominada Sporeína, composta desta bactéria e, a partir dos anos 50, vários relatos são encontrados sobre a utilização de formulações contendo *B. thuringiensis* como alternativa para o controle de insetos na agricultura em diversos países (WEISER, 1986).

O termo *B. thuringiensis* é usualmente empregado para uma única espécie, no entanto, esta pertence a um complexo de três espécies, sendo as demais, *B. cereus* e *B. anthracis*, que apresentam características fenotípicas e bioquímicas comuns entre si, dentre estas, *B. thuringiensis* pode ser diferenciado pela presença de cristais (LUTHY; WOLFERSBERGER, 2000), visíveis em microscopia de contraste de fase (Figura 1).

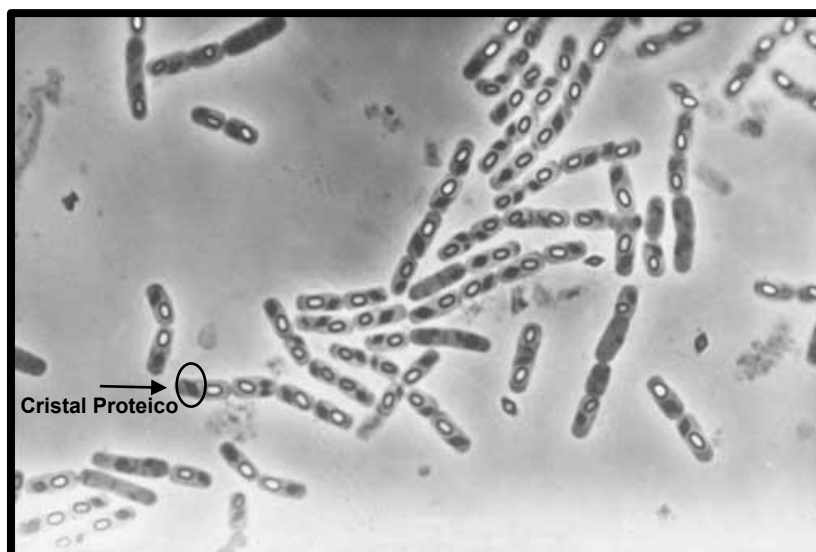


Figura 1. Microscopia de contraste de fase com *B. thuringiensis* adaptado de <http://www.futurasciences.com/uploads/tx_oxcsfutura/comprender/d/images/604/pitureau_03.jpg>

Este microrganismo apresenta-se na forma de bastões isolados, aos pares ou em cadeias com tamanhos que variam de 0,5 a 2,5 μm de largura e 1,2 a 10 μm de comprimento (MIRALLES; PÉREZ, 2004).

O ciclo de vida de *B. thuringiensis* é compreendido de duas fases principais, sendo uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria se multiplica por bipartição e, outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Na fase vegetativa de crescimento é produzida e secretada as proteínas Vip (Proteína Inseticida Vegetativa) (ESTRUCH et al., 1996) e, quando atinge a fase de esporulação, as bactérias sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos sob forma de cristais (Proteínas Cry) (PEFERÖEN, 1997).

As toxinas produzidas por *B. thuringiensis* são utilizadas na formulação de bioinseticidas comerciais, apresentando-se como um dos principais agentes que promovem resultados desejáveis e consistentes no controle biológico. No entanto, problemas relacionados ao tempo de permanência das toxinas puras sobre a planta, com efeito entomocida eficaz, difícil acesso da toxina a praga pelas suas características físico-químicas e elevado custo de fabricação destes bioinseticidas impossibilitam a difusão deste produto no emprego do controle biológico. Desta

forma, a engenharia genética de plantas surge como alternativa concreta para viabilizar o amplo emprego de *B. thuringiensis*, destacando-se a possibilidade de obtenção e uso de plantas transgênicas contendo os genes codificadores dessas toxinas inseticidas.

2. 2. Toxinas produzidas por *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis tem capacidade de produzir e secretar várias proteínas com atividade inseticida, como: α - exotoxinas, β -exotoxinas, δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), hemolisinas, exoenzimas, quitinases, fosfolipases e proteínas inseticidas vegetativas (HANSEN; SALAMITOU, 2000). A contribuição de cada um destes fatores na virulência presente nesta espécie ainda permanece desconhecida, por ser difícil estabelecer o espectro tóxico de um isolado que sintetiza mais de uma proteína, pois quando diversos fragmentos tóxicos encontram os receptores de membrana do intestino do inseto, ocorre uma competição pelos sítios de união e isto pode interferir na toxicidade do isolado (PINTO et al., 2009). Por outro lado, o esporo também pode contribuir para a toxicidade quando atua em sinergismo com as proteínas Cry (JOHNSON; McGAUGHEY, 1996).

2. 2. 1. Proteínas Cry

O cristal proteico, sintetizado durante a fase de esporulação é formado por polipeptídeos denominados de proteínas Cry ou δ -endotoxinas (YAMAMOTO; DEAN, 2000), estes são acumulados dentro da célula bacteriana e liberados juntamente com esporos (SCHNEPF et al., 1998).

A forma do cristal é determinada pela composição e estrutura das δ -endotoxinas presentes, podendo ser bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico ou, ainda, sem forma definida (HABIB; ANDRADE, 1998). Estes são especificamente tóxicos para insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera e Diptera.

Atualmente, mais de 560 genes *cry* foram sequenciados e estão classificadas em 68 classes com base na similaridade das suas proteínas, onde são agrupadas

em função do grau de similaridade de seus aminoácidos ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil Crickmore / Bt](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt)).

O mecanismo de ação destas proteínas foi caracterizado principalmente em lepidópteros (Figura 2), assim, quando as inclusões cristalinas na forma de protoxinas são ingeridas pelas lagartas são solubilizadas em meio alcalino do intestino médio dos insetos e sofrem uma ativação por proteases presentes no meio. A protoxina possui tamanho de massa molecular de aproximadamente 130 kDa e após sua ativação pelas proteases intestinais, são distintas em duas regiões estruturais que compreende de 60 a 70 kDa (HÖFTE; WHITELEY, 1989; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005), constituintes da região N-terminal, contendo a toxina ativa e Carboxy-Terminal (C-terminal).

A toxina ativa se liga a receptores glicoproteicos específicos nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio das larvas, antes de se inserirem dentro de células da membrana. A inserção das toxinas gera a formação de poros líticos nas microvilosidades da membrana apical e posterior lise celular, fornecendo aos esporos favorável a condições de germinação, levando a uma septicemia e a morte do inseto (GILL; COWLES; PIETRATONIO, 1992). Alguns estudos demonstram que a porção C-terminal é necessária para a formação do cristal dentro da bactéria (DE MAAGD et al., 2003; SAMIR et al., 2006)

Os sintomas que são observados nas larvas a partir desse momento são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia geral e por fim morte do inseto. Não há atividade de *B. thuringiensis* na fase de pupa em insetos adultos (MONNERAT; BRAVO, 2000).

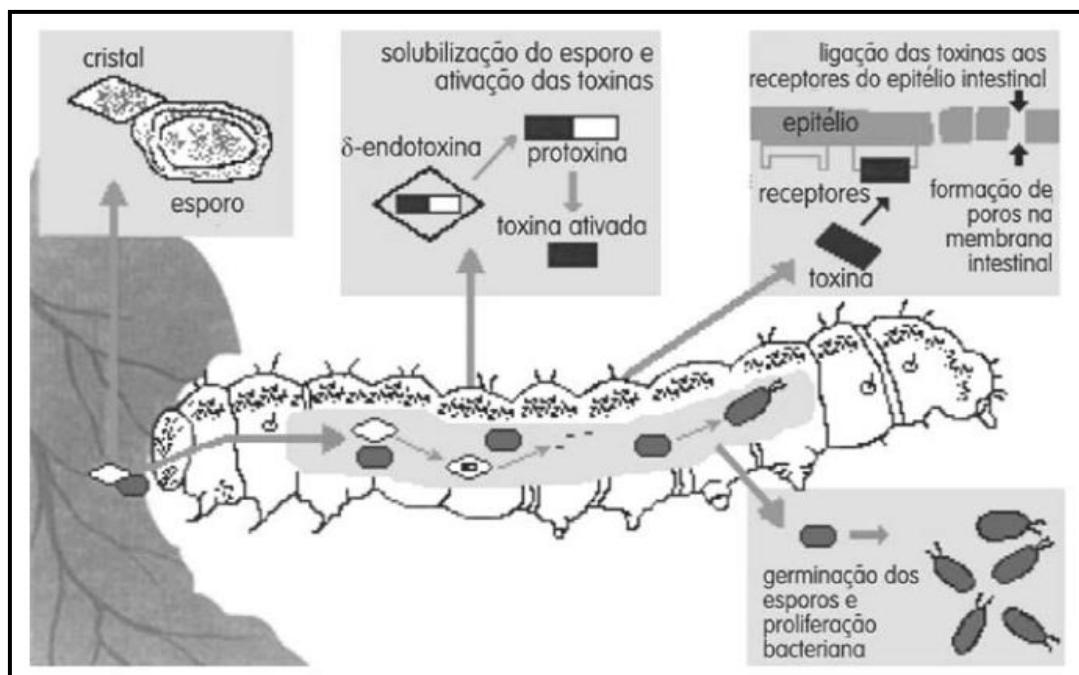


Figura 2. Mecanismo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* proposto pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999).

Os receptores responsáveis pela união da toxina à membrana tem sido extensivamente estudados em lepidópteros para determinar especificidade, toxicidade e mecanismo de ação das toxinas Cry (GÓMEZ et al., 2006; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; ARENAS et al., 2010). A união dos sítios receptores é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo (MONNERAT; BRAVO, 2000).

Muitos receptores de toxinas Cry presentes na superfície do intestino médio têm sido relatados, dos quais o melhor caracterizado são os receptores aminopeptidases N (APN ou ALP) e os receptores caderina (CADR) (PIGOTT; ELLAR, 2007). Estudos recentes revelam que a caderina desempenha um papel fundamental sobre o modo de ação das toxinas Cry1A em lepidópteros, sendo esta o primeiro receptor da toxina Cry, que tem a função de direcionar a ligação para um segundo receptor que pode ser uma aminopeptidase ou fosfatase-alcálico. Esta ligação na membrana confere que proteína específica de membrana seja formada, resultando na inserção de oligômeros, formação de poro e morte da célula por choque osmótico (BRAVO et al., 2004; PIGGOT; ELLAR, 2007; PENG et al., 2010).

2. 2. 2. Proteínas Vip

Durante o crescimento vegetativo ocorre a produção e secreção das toxinas denominada Vip, estas não possuem homologia de sequência com as proteínas Cry e são produzidas como proteína solúvel por algumas linhagens de *B. thuringiensis* (ARORA et al., 2003).

Foram descritos quatro grupos de proteínas Vip, caracterizado como: Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4, onde Vip1 e Vip2 demonstram possuir atividade inseticida específica para coleópteros e hemípteros, enquanto a toxina Vip3 possui especificidade contra lepidópteros (ESTRUCH et al., 1996; SATTAR et al., 2008). O gene *vip3A* codifica uma proteína com 791 aminoácidos e possui massa molecular de aproximadamente 88,5 kDa, descritas primeiramente por Estruch et al (1996).

A proteína Vip, assim como as Cry, possui toxicidade contra insetos susceptíveis. No entanto, o espectro inseticida das proteínas Vip inclui, ainda, certas pragas importantes, as quais têm mostrado tolerância para as proteínas Cry (BHALLA et al., 2005). A ação da proteína Vip3A tem sido estudada e demonstra atuar no epitélio intestinal do inseto, assim como as proteínas Cry. Porém, devido à sua forma solúvel, estas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível, resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997).

3. 3. Planta geneticamente modificada

Plantas geneticamente modificadas (PGM) que expressam genes com atividade inseticida representam uma alternativa para o controle de insetos, além de ser consistente com a filosofia do Manejo Integrado de Pragas (MIP), cujo objetivo é utilizar todas as técnicas e métodos apropriados para manter a população de insetos-praga em nível baixo, apresentando-se incapazes de causar dano econômico a cultura (TABASHNIK, 2010).

Essas culturas transgênicas são utilizadas no manejo de insetos-praga em todo o mundo desde que foram comercializadas em 1996 (JAMES, 2011), pois destacam-se pela necessidade de menores aplicações de defensivos químicos,

redução dos custos de produção, seletividade e especificidade contra as pragas-alvo, além da conservação da biodiversidade e nenhuma ameaça ao meio ambiente e saúde humana em relação a agrotóxicos (JAMES, 2002).

Considerando os dados relativos à segurança, aos riscos ambientais e à eficiência no controle de insetos-praga, pode-se considerar que plantas que expressam genes inseticidas de *B. thuringiensis* oferecem segurança e controle efetivo dos insetos (DE MAAGD et al., 1999).

Em 1987 surgiram às primeiras plantas transformadas com genes de *B. thuringiensis*, conhecidas como plantas *Bt*. O primeiro relato consta a inserção de genes *cry* que codificam a síntese de proteínas inseticidas em plantas de tomate (proteína Cry1Ab) e tabaco (proteína Cry1Ac) (FISCHHOFF, 1987). Desde então, vários genes *cry* foram introduzidos em diversas plantas como: algodão, arroz, milho, batata, canola e soja (JOUANIN et al., 1998; PARROTT et al., 1994; STEWART et al., 1996; MACRAE et al., 2005; HOMRICH et al., 2008). Além dos genes *cry* algumas plantas *Bt*, como milho e algodão, expressam a proteína Vip, as quais mostram-se eficientes no controle de alguns insetos-praga economicamente importantes.

Neste contexto, é importante ressaltar que plantas que expressam uma única proteína de *B. thuringiensis* são consideradas plantas de primeira geração. No entanto, existem plantas que são modificadas geneticamente com dois ou mais genes inseticidas e estas são designadas plantas de segunda geração. Desta forma, quando os transgenes são direcionados para o controle do mesmo inseto-alvo, sendo cada um tóxico por si só, o evento é denominado “piramidado” e quando os dois transgenes são independentes e não atua sobre o mesmo inseto-alvo, o evento é denominado “estaqueado”.

A segunda geração de plantas *Bt* utiliza a estratégia de pirâmide de genes para o manejo da resistência a pragas, pois quando múltiplos genes são inseridos, e não há resistência cruzada, a taxa de evolução da resistência é reduzida, principalmente devido à baixa frequência inicial dos indivíduos resistentes a múltiplas toxinas (FERRÉ; VAN RIE, 2002).

A utilização de plantas *Bt* tem ocorrido de forma crescente na agricultura mundial (JAMES, 2010). Entretanto, no Brasil, somente em 2005, a Comissão

Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a liberação comercial da primeira planta *Bt* para o controle de insetos, o Algodão Bollgard® (Monsanto) que expressa a proteína Cry1Ac e em 2007, houve a liberação do primeiro evento de milho denominado Milho Yielgard® (Monsanto) resistente a insetos, expressando a proteína Cry1Ab de *B. thuringiensis*.

As PGM são de importante estratégia no MIP, pois apresentam expressão de toxinas constitutivamente, controlando os insetos-alvo durante todos os estádios de desenvolvimento fenológico das culturas e, desta forma, ocorre substancial redução no uso de inseticidas nas lavouras geneticamente modificadas, bem como favorecimento das populações de inimigos naturais presentes nos agroecossistemas (REED; FRANKHAM, 2001). Além do mais, os insetos-praga são controlados nas fases mais críticas da cultura, independentemente de condições climáticas, pois a ação inseticida é confinada à planta e não há o risco de deriva. Assim, apenas os insetos-alvo suscetíveis que se alimentam diretamente das plantas transgênicas são afetados, sendo que as toxinas expressas nas plantas são biodegradáveis e não se acumulam no ambiente, ao contrário de muitos inseticidas sintéticos (ROMEIS; MEISSLE; BIGLER, 2006). O uso de PGM na agricultura tem promovido significativos benefícios não só para os agricultores que as adotam, mas também para toda a população.

Apesar de todas as vantagens que as PGM oferecem, existe uma preocupação atual com o uso generalizado de culturas *Bt*, pois relatos afirmam que a pressão dos insetos-alvo expostos a toxinas inseticidas acelera a seleção de organismos resistentes (ZHANG et al., 2013) e em alguns casos este cenário pode ser evitado com a associação de áreas de refúgio. No entanto, a causa desta resistência pode estar relacionada à perda de receptores do intestino médio ou à sua capacidade de ligação às proteínas (TABASHNIK, 1994) que podem estar relacionados com a constante exposição dos insetos-praga às toxinas de *B. thuringiensis* expressas em plantas.

2. 4. Resistência de insetos-praga a toxinas de *B. thuringiensis*

A evolução da resistência é o resultado da pressão de seleção que, consequentemente pode ocasionar em mudanças na composição genética das populações aumentando a frequência relativa de alguns indivíduos “pré-adaptados” (CROW, 1957). Nesse contexto, resistência é definida como o desenvolvimento de uma habilidade herdada de um organismo em tolerar doses tóxicas que seriam letais para a maioria dos indivíduos de determinada espécie (CROFT; VAN DE BANN, 1988). No caso das plantas modificadas com genes de *B. thuringiensis*, uma determinada espécie é resistente quando podem crescer e se desenvolver, alimentando-se apenas destas plantas modificadas, sem sofrer danos, chegando ao acasalamento e produção de descendentes viáveis (ANDOW, 2008).

Nos anos 80, iniciou-se o surgimento de populações de insetos altamente resistentes aos inseticidas sintéticos, havendo também relatos de problemas causados aos seres vivos e ao meio ambiente pelos produtos químicos (MONNERAT; BRAVO, 2000). A partir deste momento *B. thuringiensis* tornou-se o microrganismo mais utilizado no âmbito do controle biológico.

Em 1985, foi relatado o primeiro caso de evolução da resistência de insetos para uma população de laboratório de *Plodia interpunctella* (Hübner), apresentando uma razão de resistência de 100 vezes, após ser criada por 15 gerações em dieta artificial contendo inseticida biológico a base de *B. thuringiensis* (McGAUGHEY, 1985). Estudos bioquímicos indicaram que esta população resistente possuía uma alteração no sítio de ligação da proteína inseticida no intestino médio do inseto (VAN RIE et al., 1990). Posteriormente, houve relatos de evolução de resistência a inseticidas biológicos de *B. thuringiensis* para populações de campo de *Plutella xylostella* (Linnaeus) (TABASHNIK et al., 1997), sendo este o primeiro caso de resistência de insetos a inseticidas biológicos em campo (FERRÉ; VAN RIE, 2002). A evolução da resistência de insetos a inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* também foi reportada para *Trichoplusia ni* (Hübner) em estufas comerciais de hortaliças no Canadá (JANMAAT; MYERS, 2003).

A partir de 2007, vários casos de evolução da resistência em campo com insetos-alvo e plantas *Bt* foram descritos, como: *Busseola fusca* (Fuller) à proteína

Cry1Ab expressa em milho na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007); a evidência de evolução da resistência de *Helicoverpa zea* (Boddie) à proteína Cry1Ac expressa em algodão nos EUA (TABASHNIK et al., 2008); *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) à proteína Cry1F expressa em milho em Porto Rico (STORER et al., 2010), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) à proteína Cry1Ac expressa em algodão na Índia (DUHRUA; GUJAR, 2011) e *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte (Coleoptera: Chrysomelidae) à proteína Cry3Bb1 expressa em milho nos EUA (GASSMANN et al., 2011).

Uma estratégia eficiente para evitar a evolução de indivíduos resistentes a determinadas toxinas inseticidas presentes em plantas transgênicas é a utilização de áreas de refúgio. Estas áreas possibilitam que o inseto não fique exposto à pressão de seleção pela mesma proteína inseticida presente em plantações transgênicas, podendo sobreviver às toxinas inseticidas e gerar descendentes. Desse modo, a evolução da resistência pode ser retardada se: (i) os poucos insetos homozigotos resistentes (RR) da cultura transgênica acasalarem com os insetos homozigotos suscetíveis (SS) da área de refúgio e (ii) se o heterozigoto (RS) resultante do acasalamento vier a óbito pela alta dose da proteína inseticida expressa na planta *Bt* (BRAVO; SOBERÓN, 2008). Segundo Tabashnik (2010), o uso de plantas *Bt* com múltiplas toxinas poderia reduzir o tamanho das áreas de refúgio.

Estudos indicam, que para a maioria dos casos de evolução da resistência, os insetos apresentaram mutações em genes envolvidos em qualquer uma das etapas referentes ao mecanismo de ação das toxinas no intestino do inseto (HECKEL et al., 2007). No entanto, alguns insetos selecionados em laboratório e levados a experimentação em campo ou casa de vegetação, apresentaram alteração no sítio de ligação das toxinas (FERRÉ; VAN RIE 2002; TABASHNIK et al., 2011).

Pesquisas realizadas com produtos sinérgicos têm auxiliado no esclarecimento dos mecanismos de resistência e, em alguns casos, representam ferramentas para combater esta problemática (LIU; TABASHNIK, 1997). Neste caso, misturas de toxinas foram consideradas mais eficazes se utilizadas antes dessa evolução, mesmo sob pressão de seleção contínua (ZAHIRI; MULLA, 2003).

Alguns eventos de plantas piramidadas já estão no mercado, como por exemplo, o Algodão Widestrike® (Dow Agrosiences) obtido por melhoramento

clássico entre eventos contendo o gene *cry1F* e o gene *cry1Ac*, e o Milho Bt11XMIR162XGA21 (Syngenta Seeds) que possui o gene *cry1Ab*, o gene *vip3Aa20* e tolerância à herbicida (CTNBio, 2013).

A principal vantagem da utilização de plantas piramidadas é que a resistência por uma toxina não resulta na resistência cruzada para outra toxina (ALYOKHIN, 2011), e desta forma retarda a evolução da resistência pelos insetos-praga expostos constantemente às plantas transgênicas.

2. 5. A cultura da soja

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma espécie de planta anual, considerada uma das mais importantes na economia mundial, muito utilizada na produção de óleo vegetal, rações para alimentação animal, indústria química e de alimentos além de apresentar-se como alternativa de biocombustível (COSTA NETO; ROSSI, 2000).

Esta cultura apresenta como centro de origem e domesticação o nordeste da Ásia (China) (CHUNG; SINGH, 2008), tendo sua disseminação do Oriente para o Ocidente realizado por navegações. No Brasil, o primeiro relato sobre o surgimento da soja através de seu cultivo data de 1882, no estado da Bahia (BLACK, 2000) sendo em seguida levada por imigrantes japoneses para São Paulo. Somente em 1914 a soja foi introduzida no estado do Rio Grande do Sul (BONETTI, 1981).

Segundo relatos emitidos pela CONAB (2013), a produção de soja na safra 2013/2014 deve variar de 87,859 milhões a 90,225 milhões de toneladas, representando aumento de 7,8% a 10,7% em relação ao período anterior e um novo recorde na produção nacional. Os dados fazem parte da segunda pesquisa de intenção de plantio da safra 2013/14. A Conab estima que a área na temporada 2013/2014 ficará entre 28,754 milhões e 29,522 milhões de hectares, "consolidando uma tendência de aumento observado em todas as regiões produtoras no País".

A cultura da soja esta sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita. Logo após a germinação, vários insetos como *Sternchus subsignatus* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) e *Phyllophaga cuyabana* (Moser) (Coleoptera: Melolonthidae) danificam a cultura. As lagartas *A. gemmatilis* e *C. includens* além

de outros desfolhadores, são responsáveis pela redução da área foliar fotossintética podendo ocorrer durante todo o desenvolvimento da planta.

Como a maioria das espécies de plantas cultivadas que fazem parte do sistema agrícola, a soja possui uma baixa variabilidade genética dificultando a realização do melhoramento através de técnicas de cruzamento clássico. A fonte de recursos genéticos representada por espécies afins é inaceitável para a soja, devido à incompatibilidade sexual dos cruzamentos interespecíficos e intergenéticos (HU; BODANESE-ZANETTINI, 1995). Desta forma, a manipulação genética *in vitro* possibilita a introdução de genes de interesse na utilização em programas de melhoramento, através de técnicas moleculares de transferências de genes.

A implantação de programas de melhoramento de soja no Brasil possibilitou o avanço da cultura para as regiões de baixas latitudes, através do desenvolvimento de cultivares mais adaptadas por meio da incorporação de genes que atrasam o florescimento mesmo em condições de fotoperíodo indutor, conferindo a característica de período juvenil longo (KIIHL; GARCIA, 1989).

A soja geneticamente modificada para tolerância ao glifosato - *Roundup Ready* (RR) da Monsanto foi a primeira planta transgênica a ser aprovada pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para cultivo no Brasil favorecendo a alimentação humana e animal, no ano de 1998. Entretanto, o seu cultivo comercial só foi liberado efetivamente a partir da safra 2006/07, após proibição ainda no ano de 1998 em virtude da alegação da inexistência de estudos sobre impacto ambiental e de normas de segurança alimentar, comercialização e rotulagem de alimentos transgênicos, por parte de algumas organizações (de FREITAS, 2011).

A cultura da soja transgênica Intacta Roundup ReadTM 2 Pro, expressando a proteína Cry1Ac e tolerância ao glifosato, resultado de melhoramento clássico dos eventos MON 87701 × MON 89788, foi liberada em diversos países no mundo e seu cultivo comercial está previsto para a safra de 2013/2014. O seu controle é efetivo principalmente para as espécies *A. gemmatilis* e *C. includens* (BERNARDI et al, 2012).

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja sempre estiveram associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo.

2. 6. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae)

A. gemmatalis, conhecida como lagarta da soja, é considerada a principal praga desfolhadora da soja. Mesmo em baixas densidades populacionais, esse inseto causa danos que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. Esse desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com consequente redução na produção dos grãos (MENDONÇA et al., 2009).

Este inseto-praga encontra-se distribuído no continente americano desde os Estados Unidos da América até a Argentina (GAZZONI et al., 1981, KOGAN; TURNIPSEED, 1987) e no Brasil pode ser encontrado em todas as regiões onde a soja é cultivada (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000), apresentando-se como uma praga-chave, responsável pela utilização de mais de 50% dos inseticidas químicos nesta cultura (MOSCARDI, 1999).

A importância de *A. gemmatalis* é ressaltada principalmente na cultura da soja, mas eventualmente esta espécie pode ocorrer em outras culturas, como: amendoim, alfafa, girassol, algodão, arroz e trigo, principalmente se essas culturas forem plantadas posteriormente ao cultivo da soja. Desta forma, com a eliminação da planta preferencial, os insetos passam a se alimentar de plântulas de outros hospedeiros podendo também causar sérios danos a tais culturas (HINDS; OSTERBERGER, 1931; SILVA et al., 1968; TARRAGÓ et al., 1977; EMBRAPA, 2000).

O potencial reprodutivo desta espécie é muito alto, tendo a fêmea uma capacidade de ovipositar até 1000 ovos (LEPPLA, 1976) isoladamente na parte inferior das folhas, no caule, nos ramos e pecíolos, mas com maior concentração nos trechos médio e inferior das plantas de soja (FERREIRA; PANIZZI, 1978), apresentam coloração verde clara assim que depositados, tornando-se acinzentados com o passar dos dias e quando próximos à eclosão passam a coloração marrom escuro (EMBRAPA, 2000).

Nos dois primeiros ínstaes, as lagartas medem aproximadamente 3 e 9 mm respectivamente, e apresentam os dois primeiros pares de falsas pernas. Sua locomoção nestes ínstaes iniciais é medindo palmos, o que pode levar a confusão com a lagarta-falsa-medideira.

A fase larval tem duração de 12 a 15 dias que compreende 5 – 6 ínstaes, e nesta fase quando as lagartas são encontradas em alta infestação podem causar danos de 100% de área foliar consumida. A lagarta apresenta coloração esverdeada (Figura 3A), contendo 5 estrias longitudinais brancas sobre o dorso (GALLO et al., 2002). Em condições de altas populações, ou escassez de alimento, a lagarta torna-se escura (Figura 3B), mantendo as estrias brancas.

Ao final da fase larval, esta cessa sua alimentação passando a fase de pré-pupa e esse período pode variar de um a dois dias. A fase de pupa (Figura 3 C) apresenta duração de nove a dez dias e após esse período ocorre à emergência das mariposas (Figura 3D) (EMBRAPA 2000) que possuem coloração cinza, marrom ou bege e na maioria das vezes apresenta uma linha transversal na parte superior das asas.

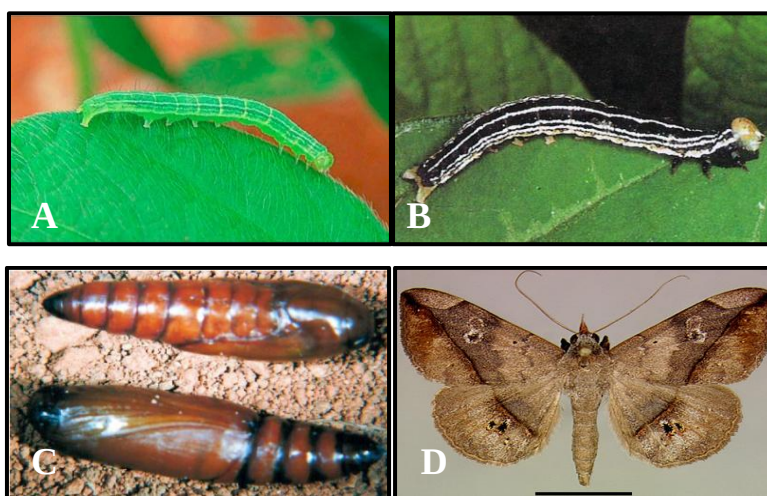


Figura 3. (A) Lagarta de *A. gemmatalis* (imagem: www.fmcagricola.com.br); (B) Lagarta de *A. gemmatalis* sob condições de altas populações (imagem: www.dowagro.com), (C) Fase de pupa e (D) Mariposa de *A. gemmatalis* (imagem: entomologiaufpel.wordpress.com).

2. 7. *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta *C. includens*, conhecida como lagarta-falsa-medideira, anualmente, causa severos danos à cultura da soja no sul dos Estados Unidos (HAMADIAN; PITRE 2002) e no Brasil podendo ser encontrada em todas as áreas cultivadas com soja. Tem-se observado que sua ocorrência é simultânea à de *A. gemmatilis* e também não tem sido raro encontrá-las de forma isolada, principalmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento da cultura (MORAES; LOECK; BELARMINO, 1991).

Este inseto-praga possui hábito polífago com capacidade de se desenvolver em 73 plantas hospedeiras, pertencentes a 29 famílias. Além da soja e algodão, *C. includens* foi encontrada em feijão, fumo, girassol, alface, tomate, couve-flor entre outras culturas (HERZOG, 1980). No entanto, esta espécie possui preferência e melhor adaptação à cultura da soja em relação a outras 17 culturas avaliadas (KHALSA; KOGAN; LUCKMANN, 1979). No Brasil, o algodoeiro geralmente é semeado após a soja e apresenta um ciclo vegetativo maior, determinando a permanência de *C. includens* no campo e a dispersão das mariposas da soja para o algodão (SANTOS, 2011).

A capacidade reprodutiva é um fator importante para este inseto-praga, pois ovipositam em média 700 ovos, os quais são depositados na face inferior das folhas e nos dois terços superiores do dossel das plantas (JOST; PITRE, 2002). Em soja e algodoeiro, *C. includens* apresenta duração de período lagarta-adulto de aproximadamente 26 dias, com 5-6 instares larvais (MITCHEL, 1967). Nos instares iniciais apresentam hábito de se alimentarem das folhas mais tenras do terço inferior das plantas de soja (KOGAN; COPE, 1974), tornando-se menos exigentes à medida que se desenvolvem, quando passam a se alimentar das folhas mais fibrosas. Até o terceiro instar as lagartas deixam intactas regiões da epiderme das folhas, entretanto, a partir do quarto instar, consomem grandes áreas, mantendo integras as nervuras principais, o que confere o aspecto rendilhado característico às folhas danificadas (HERZOG, 1980).

Os surtos populacionais deste inseto-praga tornaram-se mais frequentes e abundantes desde a safra 2002/2003. Um aspecto preocupante em relação a essa

espécie é sua elevada tolerância a inseticidas químicos, assim como seu histórico de desenvolvimento de resistência a esses produtos nos Estados Unidos (MASCARENHAS; BOETHEL, 2000). Os primeiros casos de resistência de *C. includens* a piretroides foram documentados por Leonard et al. (1990), após 7 a 8 anos de utilização destes produtos, na Louisiana (FELLAND et al., 1990; LEONARD et al., 1990).

Estudos realizados com este inseto-praga relatam diferentes períodos durante a transição lagarta-adulto (Figura 4), sendo estes relatados em: 26, 5 e 31,7 dias quando alimentadas com folhas de soja e algodoeiro respectivamente e 13,7 dias (alimentadas com folhas de soja) (MITCHEL 1967; REID; GREENE, 1973).

O início para transformação em pré-pupa é visualizado por uma acentuada mudança de coloração, período que ocorrem alterações no sistema hormonal, envolvendo: a parada alimentar, mudança para coloração verde amarelada, início da construção do casulo, perda de mobilidade e transformação em pupa (VÁZQUEZ, 1986).



Figura 4. (A) Lagarta de *C. includens*; (B) Fase de pupa e (C) Adulto de *C. includens*. (imagens: bugguide.net)

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar a suscetibilidade de *A. gemmatalis* e *C. includens* a diferentes proteínas Cry1 e Vip3A de *B. thuringiensis*, bem como a interação destas proteínas, buscando indicar alternativas para o controle biológico destas espécies e manejo de resistência aos insetos.

Objetivos específicos

- Obter de proteínas expressas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea, Vip3Aa, Vip3Ae e Vip3Af de *B. thuringiensis* recombinantes em clones de *E. coli*;
- Avaliar a suscetibilidade de *A. gemmatalis* e *C. includens* às proteínas Cry1 e Vip3A por meio de bioensaios e estimar a CL₅₀ de cada proteína isoladamente;
- Verificar a inibição do desenvolvimento das lagartas sobreviventes à CL₅₀ de cada proteína;
- Estimar a CL₅₀ das interações de proteínas Vip3A+Cry1 e Cry1+Cry1 e indicar as combinações efetivas no controle de cada espécie isoladamente e simultaneamente.
- Conferir a ativação proteolítica por meio do suco entérico de *A. gemmatalis* e *C. includens* às proteínas Cry1 e Vip3A;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1. Obtenção dos clones de *E. coli* expressando proteínas Cry1 e Vip3A de *B. thuringiensis*

Os clones de *Escherichia coli* XL-1 Blue, expressando uma única proteína Cry1 de *B. thuringiensis*, foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Ruud de Maagd (Plant Research International, Wageningen, Netherlands). Estes são portadores dos genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca* e *cry1Ea*, clonados nos respectivos vetores de expressão: pPB08, pPBD140, pB03, pBD150, pBD160. Os clones de *E. coli* WK6 contendo os genes *vip3Aa* (Acesso AAC37036), *vip3Ae* (Acesso nº CAI43277) e *vip3Af* (Acesso nº CAI43275) de *B. thuringiensis* são provenientes da empresa Bayer Crop Science (Ghent, Belgium). Todos os vetores possuem genes de resistência ao antibiótico ampicilina.

Para o estoque dos clones de *E. coli* XL1-Blue e WK6, estes foram cultivados em placa de Petri, contendo meio LB (Luria-Bertani) (2x) sólido (2g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl, q.s.p 100 mL pH 7,2) com ampicilina (100 µg mL⁻¹) e incubados a 37°C por 12 h. Após esse período, uma colônia isolada foi transferida para tubos tipo Falcon, contendo 3 mL de meio de cultura LB e ampicilina (100 µg mL⁻¹), sendo submetida à incubação por 12 h à 37 °C sob agitação horizontal a 200 rpm. Um volume de 500 µL da cultura foi adicionado à 500 µL de glicerol 100% e estocado em freezer -80°C (solução estoque).

Todos os experimentos descritos a seguir foram conduzidos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP.

4. 2. Cultivo dos clones de *E. coli* XL-1 Blue e expressão das proteínas Cry1

O cultivo dos clones de *E. coli* XL-1 Blue portadores dos genes *cry1* e a expressão das proteínas de interesse foram realizadas como descrito por Herrero et

al. (2004), onde uma alíquota de 12 μL de cada clone (em estoque) foi inoculada em placa de Petri (90 x15 mm) contendo meio de cultura TB sólido ("Terrific Broth") (12 g de triptona; 24 g de extrato de levedura; 2,31 g de KH_2PO_4 ; 12,54 g de K_2HPO_4 ; 4 mL de glicerol; q.p.s. 1000 mL), glicose 2% (v/v) e ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e incubada por 24 h a 30°C. Em seguida, preparou-se um pré-inóculo em erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 20 mL de meio TB, glicose 2% (v/v) e ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), onde uma colônia do material cultivado previamente em meio TB sólido foi transferida para cultivo a 37°C, por 12 h sob agitação de 200 rpm. Após esse período 2,5 mL desse cultivo foi transferido para um erlenmeyer de capacidade para 1 L contendo 250 mL de meio TB com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubados durante 60 h à temperatura de 28°C sob agitação constante de 200 rpm.

As células bacterianas cultivadas foram coletadas por centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) por 8 min a 5.930 Xg. Para o início da lise celular foram adicionados 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5 mM EDTA e 100 mM NaCl) por grama de massa celular e submetido à vigorosa agitação em aparelho tipo 'vortex'. Adicionou-se 800 μg de lisozima por grama de massa celular e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 20 min seguida da adição de 4 mg de desoxicolato de sódio por grama de massa celular, incubando-se por 10 min a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 200 μL de uma solução de DNase I (1 mg.mL^{-1}) por grama de massa celular seguida de incubação por 30 min a 37°C sob agitação.

Para o completo rompimento celular, as amostras foram submetidas à sonicação por 20 s, com mesmo tempo de intervalo, por três vezes consecutivas e, em seguida, o material foi centrifugado a 39.200 Xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e iniciou-se o procedimento de limpeza celular com tampão de lavagem (20 mM Tris/HCl pH7,5 contendo 1M NaCl e 1% Triton X 100), onde adicionou-se 20 mL para 10g de massa celular, misturado por agitação em aparelho do tipo 'vortex' e centrifugado a 39.200 Xg por 10 min a 4°C. Esse passo foi realizado três vezes. Uma solução de PBS (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; pH 7,4 contendo 0,8% (p/v) NaCl) também foi utilizada por três vezes consecutivas para finalizar o procedimento de lavagem, nas mesmas condições citadas anteriormente.

A solubilização da proteína foi realizada pela adição de 10 mL por grama de massa celular com tampão de solubilização (50 mM NaHCO₃, pH 10,0 contendo 100 mM NaCl e 10 mM Ditioneitol), sendo incubado por no mínimo 2 h a 37°C a 200 rpm. A proteína solubilizada foi recuperada por centrifugação por 15 min a 39.200 Xg a 4°C e armazenada a -20°C.

4. 3. Cultivo dos clones de *E. coli* WK6 e expressão das proteínas Vip3A

Os clones de *E. coli* WK6 portadores dos genes *vip3A* foram cultivados e as proteínas expressas segundo protocolo descrito por Chakroun et al. (2012). Estes foram cultivados em placa de Petri (90 x15 mm), contendo meio LB (2x) sólido e ampicilina (100 µg mL⁻¹), sendo incubada a 37°C por 12 h. Uma colônia isolada de células foi transferida para um pré-cultura líquida em erlenmeyer com capacidade para 125 mL contendo 20 mL de meio LB (2x) e ampicilina (100 µg mL⁻¹), sendo este incubado a 37°C sob agitação de 250 rpm até o momento em que a densidade óptica (D.O₅₉₅) da cultura atingisse 1,2 de absorbância (aproximadamente após 5 h) , medida em aparelho espectrofotômetro (BECKMAN, modelo 17 DU-640B) . Em seguida, uma alíquota de 2 mL desta pré-cultura foi transferida para um erlenmeyer com capacidade para 1 L contendo 200 mL de meio LB (2x) e ampicilina (100 µg mL⁻¹) sendo, posteriormente, incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm até que a D.O.₅₉₅ atingisse 0,6 de absorbância (aproximadamente após 4 h), onde adicionou-se 1 mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ao cultivo para indução da expressão da proteína recombinante, sendo este incubado pelo período de 12 h sob agitação de 190 rpm.

Para confirmar que a indução da expressão foi devida à adição de IPTG, um cultivo foi realizado nas mesmas condições, porém, na ausência do IPTG, como controle.

O cultivo celular contendo as proteínas induzidas e o cultivo sem indução foram submetidos à centrifugação a 17.400 Xg por 30 min, o sobrenadante de cada cultivo foi descartado e as células foram ressuspensas e lisadas com o auxílio de tampão (20 mM de fosfato - pH 7,4 e 0,5 M NaCl.), 300 µL de lisozima (100 mg.mL⁻¹), 100 µL de DNaseI (1 mg.mL⁻¹), 10 µL de PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)

(0,1M) e incubadas por 30 min à 37 °C com agitação constante de 50 rpm. Em seguida, as amostras foram submetidas à sonicação por 60 s com intervalo de 15 s de pausa, sendo, posteriormente, centrifugadas a 17.400 Xg a 4°C por 30 min, recuperando-se o sobrenadante contendo o lisado proteico. Este foi armazenado em freezer a -20°C.

4. 4. Confirmação da expressão e quantificação das proteínas Cry1 e Vip3A

A expressão das proteínas Cry1 e Vip3A foram visualizadas em gel de poliacrilamida na concentração de 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Para preparação do gel de poliacrilamida foram necessárias duas etapas: primeiramente um gel de separação preparado a 12% e, após solidificação, preparou-se um gel de empilhamento a 5% de acrilamida. Os reagentes utilizados nestas preparações encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Reagentes utilizados para a confecção dos géis.

Reagentes	Gel de Empilhamento (mL)	Gel de Separação (mL)
Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)	0,5	-
Tris-HCl (2,25 M pH 8,8)	-	0,8
Acrilamida - Bis (30:0,08%)	0,33	1,66
SDS (4 %)	0,125	0,115
TEMED (tetramethylethylenediamine)	0,006	0,015
Persulfato de Amônio (10%)	0,02	0,065
H ₂ O	1,105	2,43

Uma alíquota contendo 20 µL do lisado proteico de cada clone e 10 µL de tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol; 5% β-mercaptanol e 0,02% de azul de bromofenol) foi aquecida por 5 min a 99°C para

desnaturação das proteínas. Após esse procedimento, uma alíquota de 15 µL desta solução aquecida foi aplicada em gel de poliacrilamida utilizando-se como marcador de tamanho de massa molecular a solução “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas, Vilnius, Lituania) segundo recomendações do fabricante. A cuba vertical Bio-Rad, modelo Mini-protean® II Cell (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA) foi preenchida com tampão de eletrodo (0,192 M glicina, 0,025 M Tris e 0,1% SDS) e submetida a corrente constante de 60 mA, 200 V por 90 min. Após a eletroforese, as bandas polipeptídicas foram detectadas por meio da coloração do gel com *Coomassie-Brilliant Blue* 0,02% (metanol 30%, ácido acético 10%, sulfato cúprico 0,1% e água), durante 15 min, seguida de sucessivas lavagens de solução descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e água).

Para a quantificação das bandas referentes às proteínas em estudo, novos géis de poliacrilamida foram preparados contendo cinco diferentes concentrações de Soro Albumina Bovina - BSA (0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg mL⁻¹), amplamente utilizada como padrão para relação de tamanho de massa molecular entre as proteínas. As bandas proteicas foram quantificadas com o auxílio do “software Bionumerics” (Applied Maths), onde previamente digitaliza-se o gel, alimentando-se o “software” com valores correspondentes às concentrações determinadas para cada alíquota de BSA presente no gel. Baseados nos valores de concentrações do BSA o “software” exibe uma curva de densitometria estimando a concentração de cada amostra proteica em análise.

4. 5. Suscetibilidade de *A. gemmatalis* e *C. includens* às proteínas Cry1 e Vip3A

A avaliação da suscetibilidade das espécies de lepidópteros-praga frente às proteínas de *B. thuringiensis* foi realizada por meio de bioensaios. Ovos de *A. gemmatalis* e *C. includens* provenientes da criação de insetos estabelecida no Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP, Piracicaba-SP, foram fornecidos gentilmente pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra.

Os bioensaios foram realizados em placas de poliestireno com 128 orifícios (“Cell Wells, Corning Glass Works”, Corning, New York) contendo dieta artificial adaptada de Monnerat; Batista; de Medeiros, (2007) (Tabelas 2 e 3). As protoxinas obtidas por meio da extração proteica dos clones de *E. coli* foram diluídas em oito concentrações para cada proteína e aplicou-se em cada orifício das placas de bioensaio um volume constante de 50 μL da protoxina que corresponde a 25 $\mu\text{L cm}^{-2}$ da área de superfície da dieta artificial.

Tabela 2. Componentes da dieta artificial oferecida para *A. gemmatalis* e *C. includens*.

Reagentes	Quantidade
Germe de Trigo	20 g
Feijão tipo carioca	80 g (peso cru)
Ácido ascórbico	1,2 g
Ácido sórbico	0,6 g
Farelo de soja	10 g
Levedo de cerveja	12,5 g
Caseína	7,5 g
Ágar	6,5 g
Tetraciclina	0,1 g
Nipagin	1,15 g
Formaldeído	1,3 mL
Solução vitamínica (Tabela 3)	6 mL
Água destilada (100°C)	350 mL

Tabela 3. Componentes da solução vitamínica

Reagentes	Quantidades
Niacina	1 mg
Carbonato de Cálcio	1 mg
Tiamina	0,25 mg
Riboflavina	0,5 mg
Piridoxina	0,25 mg
Ácido Fólico	0,25 mg
Biotina	0,02 mg
Inositol	10 mg
Água (q.s.p.)	10 mL

Após completa absorção do lisado proteico na dieta artificial, uma lagarta neonata foi acondicionada em cada orifício, sendo utilizadas 16 lagartas de cada espécie para cada concentração testada. Este procedimento foi realizado em triplicata, totalizando 48 lagartas de cada espécie avaliadas para cada concentração. Os tratamentos foram vedados com plásticos atóxicos, contendo microfuros para permitir a troca de oxigênio, em cada orifício da placa de poliestireno.

Alguns tratamentos foram utilizados para controle do experimento, sendo estes adicionados de: água destilada, tampão de solubilização utilizado para lisados contendo proteínas Cry1, tampão de suspensão utilizado para lisados contendo proteínas Vip3A e lisados bacterianos provenientes de células de *E. coli* XL1-Blue e WK6 não portadoras do vetor de expressão contendo genes de *B. thuringiensis*.

As placas de bioensaios foram acondicionadas em sala climatizada apresentando $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 14:10 h (luz:escuro). Após sete dias de exposição das lagartas aos tratamentos, os dados foram coletados e avaliados quanto à concentração letal responsável pela mortalidade de 50% da população (CL_{50}), sendo estas estimativas realizadas pela análise de PROBIT, utilizando-se do programa POLO-Plus (LeOra Software, Berkeley, CA, U.S.A). O coeficiente angular (Slope), o qui-quadrado e os intervalos

de confiança foram determinados a partir dos dados de mortalidade obtidos nos bioensaios, com nível de significância de $p < 0,05$.

4. 6. Inibição do desenvolvimento das lagartas

Para avaliação do desenvolvimento das lagartas de *A. gemmatalis* e *C. includens* alimentadas com dieta artificial (Tabelas 4 e 5) contendo as diferentes protoxinas de *B. thuringiensis* testadas, utilizou-se a mesma metodologia descrita anteriormente. No entanto, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial contendo a protoxina na concentração responsável pela mortalidade de 50% da população (CL_{50}), assim, após sete dias de exposição aos tratamentos, o peso das lagartas sobreviventes às doses oferecidas foi mensurado com auxílio de uma balança analítica.

O peso das lagartas alimentadas com dieta artificial contendo água ao invés de protoxinas também foi mensurado e utilizado como controle para avaliar a ocorrência da inibição do desenvolvimento larval das espécies alimentadas com dieta e protoxinas.

Desta forma, o peso total das lagartas sobreviventes para cada tratamento foi dividido pelo número de indivíduos vivos mensurados, obtendo-se a média de peso referente às lagartas alimentadas com a CL_{50} de uma protoxina específica. Após obtenção das médias de peso de cada tratamento, estas foram aplicadas na fórmula descrita por Huang, Rogers Leonard e Gable, (2006) calculando a % de inibição do desenvolvimento das lagartas (% ID), onde:

$$\% ID = \left(\frac{MPC - MPT}{MPC} \right) \cdot 100$$

Neste caso, MPC representa a média do peso das lagartas controle e MPT representa a média do peso das lagartas referente aos diferentes tratamentos com as protoxinas de *B. thuringiensis*.

4. 7. Interação das proteínas no controle de *A. gemmatalis* e *C. includens*

A avaliação das interações referentes às proteínas Vip3A e Cry1 foram determinadas após a estimativa da CL_{50} estabelecidas para cada uma isoladamente.

Os bioensaios realizados a fim de desvendar combinações de proteínas eficientes no controle das espécies em estudo foram elaborados como já descrito anteriormente. No entanto, as diferentes concentrações utilizadas para este ensaio foram calculadas partindo-se das CL_{50} obtidas.

Os dados de mortalidade obtidos com as diferentes concentrações testadas foram avaliados para estimar a CL_{50} observada para a combinação de proteínas, utilizando-se da análise de PROBIT, por meio do programa POLO-Plus.

A metodologia proposta por Tabashnik (1992) foi utilizada para avaliar os resultados obtidos com os ensaios de interações proteicas, assim, estimou-se a CL_{50} esperada para a mistura de proteínas.

Inicialmente foi determinada a proporção relativa entre as CL_{50} de cada proteína utilizada na combinação. A mortalidade esperada, na ausência de interações, foi estimada assumindo a hipótese de uma ação semelhante simples, utilizando a fórmula proposta por Tabashnik (1992), que deriva da equação 11.8 de Finney (1971), onde:

$$CL_{50(m)} = \left[\frac{p_a}{CL_{50(a)}} + \frac{p_b}{CL_{50(b)}} \right]^{-1}$$

$CL_{50(m)}$ corresponde a CL_{50} esperada da mistura de proteínas, $CL_{50(a)}$ e $CL_{50(b)}$ são as respectivas concentrações letais individuais referentes as proteína, p indica a proporção de a (p_a) e b (p_b) na mistura.

Depois de estimada a $CL_{50(m)}$ calculou-se a razão entre a CL_{50} esperada sobre a CL_{50} observada ($CL_{(esp)}/CL_{(obs)}$), para desta forma, determinar qual a interação presente na combinação de protoxinas. A razão entre as CL_{50} indica quando o fator de sinergismo (FS) está presente em uma interação sinérgica referente às protoxinas em combinação. Ou seja, um valor de $FS > 1$ indica a ocorrência de sinergismo entre as protoxinas, $FS < 1$ indica uma interação antagônica e $FS = 1$ indica toxicidade aditiva (Wu et al. 1994).

4. 8. Ação das enzimas digestivas de *A. gemmatalis* e *C. includens* na ativação das protoxinas Cry1 e Vip3A *in vitro*.

Lagartas de 5º ínstar de *A. gemmatalis* e *C. includens* foram acondicionadas em gelo para imobilização e após 10 min, com auxílio de uma pinça, a lagarta foi

posicionada para retirada da extremidade anal do corpo com uma tesoura de ponta fina. O intestino da lagarta foi retirado utilizando-se de uma pinça, sendo, posteriormente, lavado superficialmente com tampão MET gelado (300 mM Manitol, 5 mM EGTA, 20 mM Tris). Acondicionou-se 10 intestinos em cada tubo de centrifuga com capacidade para 1,5 mL, sendo estes submetidos à centrifugação por 10 min a 6000 Xg. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outro tubo de centrifuga, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para a preservação da atividade enzimática presente no suco entérico de cada espécie.

Para o ensaio de proteólise com o suco entérico, realizou-se um teste prévio para se determinar a quantidade de suco necessário para proporcionar a visualização da clivagem da proteína de forma gradual (cinética de clivagem). Realizou-se, inicialmente, uma diluição do suco entérico na proporção de 1:10 com solução Tris HCl 20 mM pH 8,6. Todas as proteínas utilizadas neste estudo estavam na concentração de 1 mg mL⁻¹, sendo empregadas na proporção de 2:1 (120 µL de protoxina e 60 µL de suco intestinal diluído 1:10) quando incubadas com o suco entérico. Durante a clivagem, as amostras foram incubadas a 30°C em leve e constante agitação. Alíquotas de 20 µL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (30 s, 90 s, 3 min, 6 min, 12 min, 20 min e 30 min) e transferidas para novos tubos devidamente identificados, contendo 10 µL de tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β-mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol). Estas foram submetidas a aquecimento por 10 min a 99°C, sendo, posteriormente, resfriadas em gelo por 5 min e armazenadas a -80°C.

Para visualização da proteólise, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), usando o marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas, Vilnius, Lituania) segundo recomendações do fabricante.

5. RESULTADOS

5. 1. Expressão das proteínas Cry1 e Vip3A recombinantes em *E. coli*

A metodologia aplicada para expressão de proteínas de *B. thuringiensis* recombinantes em *E. coli* possibilitou a obtenção de diferentes proteínas Cry1 e Vip3A, permitindo, assim, a análise específica do potencial inseticida de cada uma delas, bem como de suas interações, no controle de *A. gemmatilis* e *C. includens*.

Desta forma, a expressão proteica foi visualizada por meio da técnica de SDS-PAGE (Figura 5), que permitiu a confirmação da presença de uma banda proteica com tamanho molecular de, aproximadamente, 135 kDa, correspondente às proteínas da família Cry1 e uma banda de, aproximadamente, 88 kDa, referente às proteínas Vip3A.

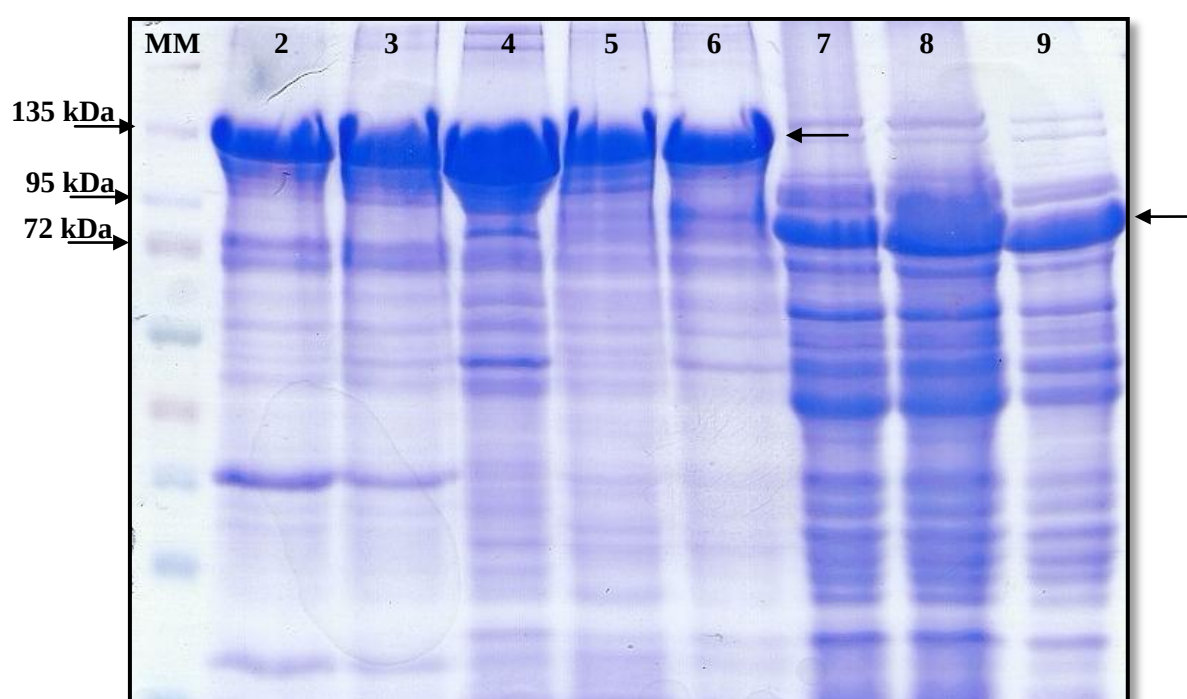


Figura 5. Gel de SDS-PAGE (12%) evidenciando a expressão das proteínas Cry1 e Vip3A (indicada por setas). **MM:** Marcador de massa molecular “SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); **Canaletas:** 2. Cry1Aa; 3. Cry1Ab; 4. Cry1Ac; 5. Cry1Ca; 6. Cry1Ea; 7. Vip3Aa; 8. Vip3Ae; 9. Vip3Af.

Após confirmação da expressão proteica, as bandas referentes às proteínas em estudo foram quantificadas em mg.mL^{-1} por meio de densitometria com auxílio do “software BioNumerics”, utilizando-se de concentrações conhecidas de BSA (Soro Albumina Bovina) como padrão de comparação (Figura 6).

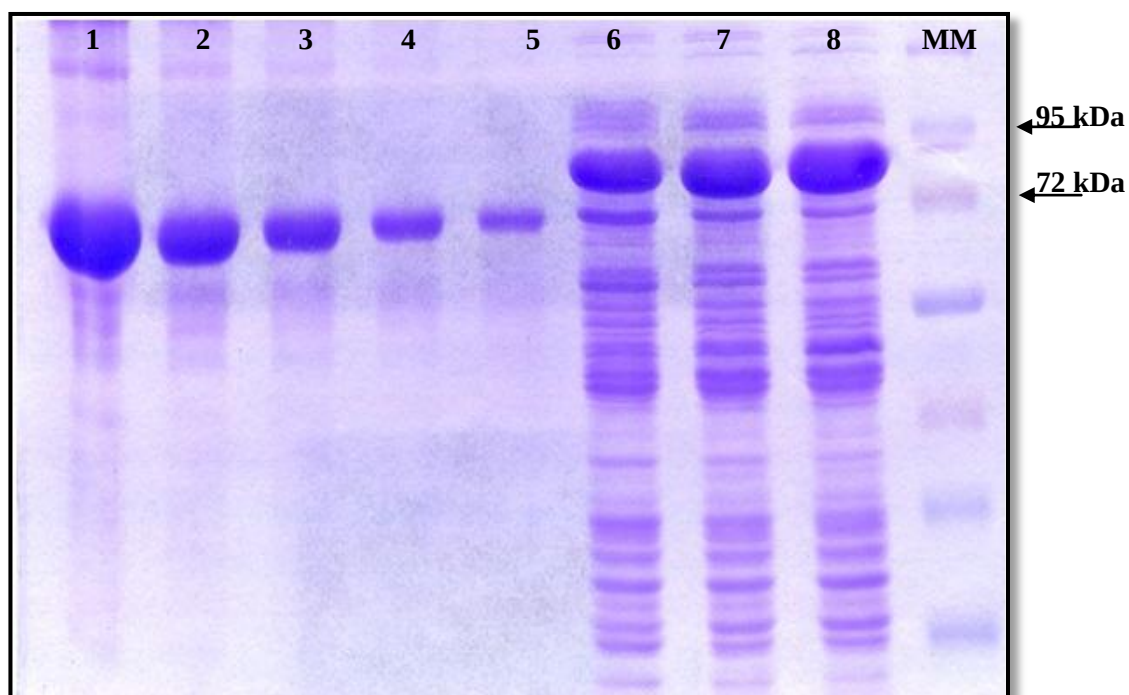


Figura 6. Gel representativo de SDS-PAGE (12%) evidenciando a expressão de proteínas de *B. thuringiensis* juntamente com diferentes concentrações de BSA. **Canaletas:** 1. 0,88 mg.mL^{-1} de BSA; 2. 0,44 mg.mL^{-1} de BSA; 3. 0,22 mg.mL^{-1} de BSA; 5. 0,11 mg.mL^{-1} de BSA; 6. 0,05 mg.mL^{-1} de BSA; 7. Vip3Aa; 8. Vip3Ae; 9. Vip3Af e **MM:** Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas).

5. 2. Suscetibilidade de *A. gemmatilis* e *C. includens* às proteínas Cry1 e Vip3A

A toxicidade das proteínas Cry1 e Vip3A de *B. thuringiensis* recombinantes em *E. coli* foi avaliada contra lagartas neonatas de *A. gemmatilis* e *C. includens* após a expressão e quantificação das mesmas.

Os resultados obtidos para *A. gemmatalis* (Tabela 4) indicaram a proteína Cry1Ac como a mais efetiva na mortalidade desta espécie, seguida da proteína Cry1Aa que se apresentou, aproximadamente, duas vezes menos tóxica que a primeira.

As proteínas Vip3A demonstraram semelhança entre si na toxicidade à lagarta da soja, pois, o intervalo de confiança de Vip3Aa, Vip3Ae e Vip3Af encontram-se sobrepostos, não diferindo estatisticamente. O mesmo pode ser observado para Cry1Ab e Cry1Ca que compartilham do mesmo intervalo de confiança, porém apresentaram-se menos tóxica que as proteínas Vip3A.

No entanto, as proteínas com menor efetividade na mortalidade de *A. gemmatalis* foram Cry1Ab e Cry1Ea com, aproximadamente, setenta vezes valor de CL_{50} superior ao obtido para as proteínas Cry1Ac.

Tabela 4. Suscetibilidade de lagartas neonatas de *A. gemmatalis* às proteínas Cry1 e Vip3A de *B. thuringiensis*.

Proteína	$b \pm EP^b$	CL_{50} (IC min – max) ^c
Cry1Aa	$4,5 \pm 0,7$	1,8 (1,5 – 2,2)
Cry1Ab	$1,5 \pm 0,4$	40 (25 – 107)
Cry1Ac	$1,6 \pm 0,3$	0,75 (0,4 – 1,2)
Cry1Ca	$2,1 \pm 0,3$	23,4 (16 – 32,4)
Cry1Ea	$2,2 \pm 0,3$	52,2 (40 – 68,6)
Vip3Aa	$1,1 \pm 0,2$	5,4 (3,1 – 9,7)
Vip3Ae	$1,0 \pm 0,2$	5,0 (2,7 – 10)
Vip3Af	$2,7 \pm 0,5$	3,6 (2,6 – 5,3)

^a Os valores representam a média de três réplicas com 16 lagartas cada (n=48).

^b Coeficiente angular da reta $\pm$ Erro Padrão.

^c Os valores são expressos em $ng.cm^{-2}$ com 95% de intervalo de confiança (IC).

A avaliação da toxicidade obtida para *C. includens* (Tabela 5) demonstra que Vip3Af foi a mais tóxica para o controle desta espécie. Posteriormente, destacam-se as proteínas Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea, porém, por apresentarem intervalos de confiança sobrepostos, são consideradas igualmente efetivas estatisticamente.

Embora Cry1Ea apresente-se semelhante a estas proteínas, também possui valores semelhantes a Cry1Aa. No entanto, a proteína Cry1Aa partilha dos mesmos valores de intervalos de confiança referentes à CL_{50} de Cry1Ab e Vip3Aa. Dentre todas as proteínas testadas para *C. includens*, a menor toxicidade foi observada para Vip3Ae, com aproximadamente sessenta vezes valor superior a CL_{50} observada para Vip3Af.

Tabela 5. Susceptibilidade de lagartas neonatas de *C. includens* as proteínas Cry1 e Vip3A de *B. thuringiensis*.

Proteína	$b \pm EP^b$	CL_{50} (IC min – max) ^c
Cry1Aa	$3,0 \pm 0,5$	27 (21 – 33,5)
Cry1Ab	$3,9 \pm 0,5$	35 (27,5 – 43,7)
Cry1Ac	$4,7 \pm 1,1$	13,3 (10 – 17)
Cry1Ca	$1,6 \pm 0,3$	7,7 (4 – 13)
Cry1Ea	$3,0 \pm 0,5$	17,7 (13 – 23)
Vip3Aa	$2,8 \pm 0,5$	35,5 (27,5 – 45,5)
Vip3Ae	$2,2 \pm 0,3$	80,8 (61 – 110,7)
Vip3Af	$1,2 \pm 0,3$	1,4 (0,64 – 2,5)

^a Os valores representam a média de três réplicas com 16 lagartas cada (n=48).

^b Coeficiente angular da reta $\pm$ Erro Padrão.

^c Os valores são expressos em $ng.cm^{-2}$ com 95% de intervalo de confiança.

Após estimar a CL_{50} de cada proteína, foi possível gerar um gráfico de comparação do padrão geral da eficiência inseticida frente à *A. gemmatilis* e *C. includens* (Figura 7) e, desta forma, poder relacionar, dentre estas proteínas, as que melhor controlam as espécies estudadas.

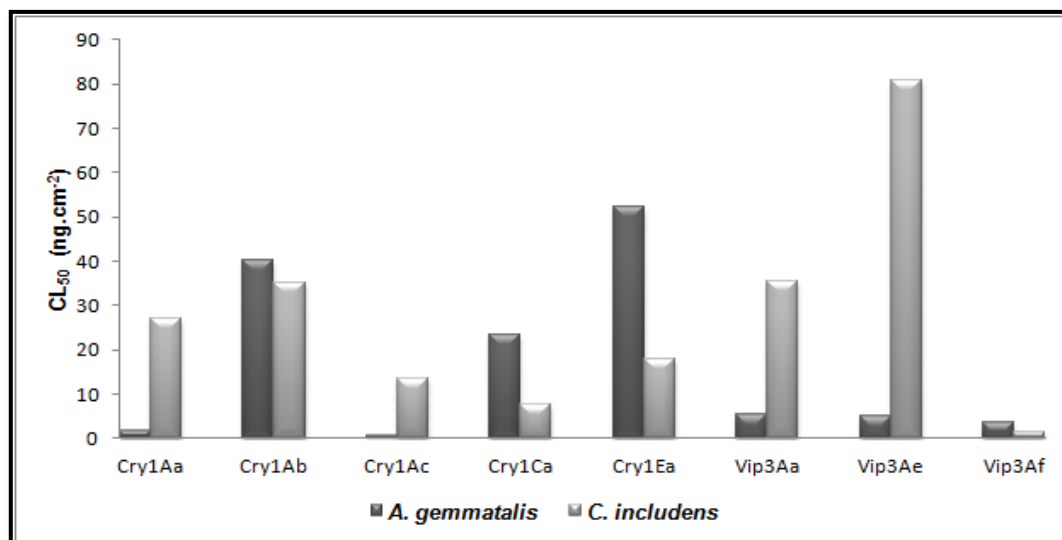


Figura 7. Eficiência inseticida à CL₅₀ das protoxinas avaliadas para *A. gemmatalis* e *C. includens*.

A comparação do padrão geral de toxicidade das proteínas de *B. thuringiensis* em estudo sugere que há diferença significativa na toxicidade das proteínas avaliadas para cada espécie, onde Cry1Aa, Cry1Ac, Vip3Aa e Vip3Ae são mais eficiente no controle de *A. gemmatalis* do que para *C. includens*, enquanto que, para esta última, as proteínas Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Af apresentaram-se mais efetivas.

Nota-se significativa diferença entre as CL₅₀ obtida para cada proteína em cada espécie, com exceção de Vip3Af, que se mostrou extremamente eficiente tanto para o controle de *A. gemmatalis* como para *C. includens*, mesmo apresentando maior toxicidade para a última, seguida da proteína Cry1Ac que foi também eficiente para ambas as espécies, apresentando-se mais eficiente para *A. gemmatalis*.

Os resultados obtidos com a inibição do desenvolvimento larval (Figura 8) indicou que as proteínas Vip3Aa, Vip3Ae e Cry1Ca provocaram a inibição do desenvolvimento de aproximadamente 95% das lagartas sobreviventes de *A. gemmatalis* e o mesmo para Cry1Aa em *C. includens*.

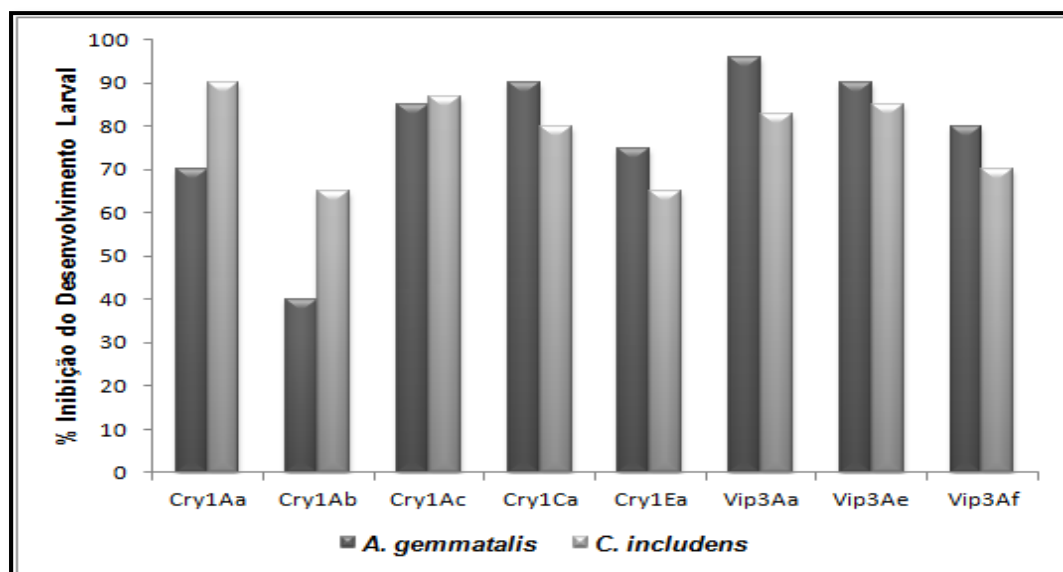


Figura 8. Porcentagem da inibição do desenvolvimento larval (%ID) de *A. gemmatalis* e *C. includens* frente as CL₅₀ obtidas com as proteínas de *B. thuringiensis*.

Todas as proteínas afetaram o desenvolvimento da maioria das lagartas sobreviventes em estudo, no entanto, a proteína Cry1Ab foi a que menos inibiu o desenvolvimento de *A. gemmatalis* e *C. includens* com apenas 40% e 65 %, respectivamente. A proteína Cry1Ea também apresentou 65% de inibição do desenvolvimento das lagartas de *C. includens*.

5. 3. Interação das proteínas no controle de *A. gemmatalis* e *C. includens*

Os resultados indicaram quais combinações apresentaram fator de sinergismo com melhor eficiência no controle das espécies de pragas-alvo. Desta forma, para o controle de *A. gemmatalis* pode-se verificar que, para três combinações de proteínas Vip3A e Cry1, houve a ocorrência de sinergismo, são elas: Vip3Aa+Cry1Ab (FS=5,8), Vip3Aa+Cry1Ea (FS=1,1) e Vip3Ae+Cry1Ab (FS=1,4) (Tabela 6). A combinação Vip3Aa+Cry1Ab apresentou um fator de sinergismo aproximadamente cinco vezes mais eficiente que Vip3Aa+Cry1Ea e Vip3Ae+Cry1Ab, as quais também demonstraram atuar em sinergismo no controle da espécie.

Tabela 6. Avaliação de sinergismo, ao nível de CL₅₀, de combinações de proteínas Vip3A e Cry1 para *A. gemmatalis*.

Combinações de Proteínas	Proporções ^a	b ± EP ^b	CL ₅₀ (ng.cm ⁻²)		
			Observada (IC ₉₅)	Esperada ^c	FS ^d
Vip3Aa+Cry1Aa	3 : 1	2,4 ± 0,6	26 (18,2 – 37,7)	3,6	0,1
Vip3Aa+Cry1Ac	7 : 1	1,8 ± 0,4	39 (27 – 66,4)	3,04	0,08
Vip3Aa+Cry1Ab	1 : 7	1,2 ± 0,3	3,8 (1,7 – 6,3)	22,2	5,8
Vip3Aa+Cry1Ca	1 : 4	1,4 ± 0,3	20 (10 – 37)	14,04	0,7
Vip3Aa+Cry1Ea	1 : 10	2,6 ± 0,6	26,5 (17,1 – 36,2)	29,2	1,1
Vip3Ae+Cry1Aa	3 : 1	2,6 ± 0,5	31,3 (24 – 44)	3,5	0,1
Vip3Ae+Cry1Ac	7 : 1	1,3 ± 0,3	18,4 (11 – 39,2)	2,9	0,1
Vip3Ae+Cry1Ab	1 : 8	2,0 ± 0,3	15,9 (11 – 22,8)	22,5	1,4
Vip3Ae+Cry1Ca	1 : 5	1,7 ± 0,4	68,3 (45 – 146,2)	14,5	0,2
Vip3Ae+Cry1Ea	1 : 10	2,7 ± 0,6	35 (25 – 48)	28,1	0,8
Vip3Af+Cry1Aa	2 : 1	1,2 ± 0,3	25 (13 – 78,4)	2,7	0,1
Vip3Af+Cry1Ac	5 : 1	1,0 ± 0,1	17 (9 – 30,3)	2,2	0,1
Vip3Af+Cry1Ab	1 : 11	1,8 ± 0,4	51,9 (34,5 – 105,8)	21,7	0,4
Vip3Af+Cry1Ca	1 : 7	1,4 ± 0,3	273,6 (172 – 509,3)	13,8	0,05
Vip3Af+Cry1Ea	1 : 15	2,8 ± 0,5	35 (27 – 46)	28,3	0,8

^a As proporções de proteínas foram determinadas de acordo com a Tabela 3 (CL₅₀),

^b Coeficiente angular da reta ± Erro Padrão,

^c Mortalidade esperada,

^d FS = Fator de sinergismo calculado como a razão entre a CL esperada sobre observada, onde valores > 1 indicam sinergismo entre as proteínas, valores < 1 indicam antagonismo entre as proteínas e valores = 1 indicam a ocorrência de toxicidade aditiva.

As demais combinações avaliadas para *A. gemmatalis* apresentaram valores inferior ao requerido para determinar fator de sinergismo positivo (FS > 1), de acordo com o proposto por Wu et al. (1994), dentre estas, observa-se a ocorrência de forte antagonismo nas combinações Vip3Aa+Cry1Ac (FS=0,08) e Vip3Af+Cry1Ca (FS=0,05) apresentando um fator de doze vezes e vinte vezes, respectivamente, inferior

ao mínimo esperado para indicar a presença de sinergismo entre as proteínas. Este resultado sugere que estas combinações não deveriam existir em plantas geneticamente modificadas por se apresentarem antagônicas quanto ao controle da referida espécie.

A interação somente de proteínas Cry1, avaliadas para *A. gemmatilis* demonstrou a presença de sinergismo para três combinações, são elas: Cry1Aa+Cry1Ea (FS=1,4), Cry1Ab+Cry1Ac (FS=1,2) e Cry1Ab+Cry1Ca (FS=1,2) (Tabela 7). Estas não diferiram entre si, apresentando fator de sinergismo semelhante. Este resultado sugere que estas combinações possuem a mesma magnitude de controle para *A. gemmatilis*, e podem ser utilizadas como alternativa para retardar possível resistência do inseto às toxinas Cry1. As combinações que não apresentaram FS > 1 foram consideradas antagônicas para o controle desta espécie.

Tabela 7. Avaliação de sinergismo, ao nível de CL₅₀, de combinações de proteínas Cry1 para *A. gemmatilis*.

Combinações			CL ₅₀ (ng.cm ⁻²)		
de Proteínas	Proporções ^a	b ± EP ^b	Observada (IC ₉₅)	Esperada ^c	FS ^d
Cry1Aa+Cry1Ab	1 : 22	2,6 ± 0,5	46,4 (33,9 – 72,5)	20,8	0,4
Cry1Aa+Cry1Ac	2 : 1	3,7 ± 0,7	8,5 (6,6 – 11,2)	1,2	0,1
Cry1Aa+Cry1Ca	1 : 13	3,1 ± 0,6	88,9 (70,8 – 111,3)	12,6	0,1
Cry1Aa+Cry1Ea	1 : 29	1,3 ± 0,3	18,7 (8,5 – 32,1)	27	1,4
Cry1Ab+Cry1Ac	53 : 1	2,0 ± 0,5	16,15 (9,3 – 22,6)	20,3	1,2
Cry1Ab+Cry1Ca	2 : 1	1,9 ± 0,3	26,6 (18,6 – 39,1)	32,35	1,2
Cry1Ab+Cry1Ea	1 : 1	2,8 ± 0,6	92 (68,5 – 132,8)	45,3	0,5
Cry1Ac+Cry1Ca	1 : 31	1,6 ± 0,3	439,3 (292,7 – 740)	12,0	0,2
Cry1Ac+Cry1Ea	1 : 70	1,3 ± 0,3	55,4 (34,7 – 87,3)	26,5	0,5
Cry1Ca+Cry1Ea	1 : 2	1,5 ± 0,3	67,8 (44,1 – 111,1)	37	0,5

^a As proporções de proteínas foram determinadas de acordo com a Tabela 3 (CL₅₀),

^b Coeficiente angular da reta ± Erro Padrão,

^c Mortalidade esperada,

^d FS = Fator de sinergismo calculado como a razão entre a CL esperada sobre

observada, onde valores > 1 indicam sinergismo entre as proteínas, valores < 1 indicam antagonismo entre as proteínas e valores $= 1$ indicam a ocorrência de toxicidade aditiva.

Em *C. includens*, a análise de interação das proteínas Vip3A e Cry1 indicaram três combinações que atuaram em sinergismo (Tabela 8). Dentre estas, destaca-se Vip3Aa+Cry1Ea (FS=4,1) quatro vezes mais eficiente que o valor mínimo descrito por Wu et al. (1994) para relatar a presença de sinergismo, apresentando também sinergismo mais forte que as outras combinações sinérgicas: Vip3Ae+Cry1Aa (FS=2,8) e Vip3Ae+Cry1Ea (FS=2,5) e Vip3Af+Cry1Ac (FS=1,05).

Tabela 8. Avaliação de sinergismo, ao nível de CL₅₀, de combinações de pró-toxinas Vip3A e Cry1 para *C. includens*.

Combinações de Proteínas	Proporções ^a	b ± EP ^b	CL ₅₀ (ng.cm ⁻²)		
			Observada (IC ₉₅)	Esperada ^c	FS ^d
Vip3Aa+Cry1Aa	1 : 1	1,7 ± 0,3	33 (20,1 – 50)	30,6	0,9
Vip3Aa+Cry1Ac	3 : 1	2,1 ± 0,3	53 (35,3 – 76,4)	25	0,5
Vip3Aa+Cry1Ab	1 : 1	1,3 ± 0,2	72,75 (41 – 113)	32,5	0,5
Vip3Aa+Cry1Ca	5 : 1	3,5 ± 0,6	72,3 (55,4 – 94,1)	22,1	0,3
Vip3Aa+Cry1Ea	2 : 1	1,6 ± 0,2	6,5 (4 – 9,6)	26,5	4,1
Vip3Ae+Cry1Aa	3 : 1	1,6 ± 0,3	18,9 (12,4 – 29,7)	53,9	2,8
Vip3Ae+Cry1Ac	6 : 1	2,5 ± 0,6	80,2 (57,5 – 119,2)	46,8	0,6
Vip3Ae+Cry1Ab	2 : 1	1,3 ± 0,2	146 (91,5 – 244,5)	56,2	0,4
Vip3Ae+Cry1Ca	10 : 1	3,9 ± 0,7	62 (51 – 74)	43,3	0,7
Vip3Ae+Cry1Ea	5 : 1	1,7 ± 0,3	20,3 (14 – 30)	50,62	2,5
Vip3Af+Cry1Aa	1 : 19	2,6 ± 0,5	21,3 (15,3 – 29,1)	14,1	0,6
Vip3Af+Cry1Ac	1 : 10	1,3 ± 0,2	7,1 (3,7 – 12)	7,5	1,05
Vip3Af+Cry1Ab	1 : 25	1,3 ± 0,2	303,8 (187 – 545)	18,2	0,06
Vip3Af+Cry1Ca	1 : 6	1,4 ± 0,2	30,8 (19 – 50)	4,7	0,1
Vip3Af+Cry1Ea	1 : 13	2,2 ± 0,5	15,6 (11 – 24,4)	9,6	0,6

^a As proporções de proteínas foram determinadas de acordo com a Tabela 4 (CL₅₀),

^b Coeficiente angular da reta ± Erro Padrão,

^c Mortalidade esperada,

^d FS = Fator de sinergismo calculado como a razão entre a CL esperada sobre observada, onde valores > 1 indicam a sinergismo entre as proteínas, valores < 1 indicam antagonismo entre as proteínas e valores = 1 indicam a ocorrência de toxicidade aditiva.

Os resultados obtidos para combinações com as proteínas Cry1 em *C. includens* (Tabela 9) demonstraram a ocorrência de sinergismo para Cry1Aa+Cry1Ea (FS=1,5) e Cry1Ab+Cry1Ac (FS=1,2). A combinação Cry1Aa+Cry1Ac (FS=1,0) apresentou toxicidade aditiva para o controle desta espécie, assim, cada componente da mistura de proteínas atua de maneira semelhante à ação isolada no controle da espécie.

As demais combinações avaliadas atuaram de forma antagônica para o controle de *C. includens* (FS<1,0)

Tabela 9. Avaliação de sinergismo, ao nível de CL₅₀, de combinações de proteínas Cry1 para *C. includens*.

Combinações		CL ₅₀ (ng.cm ⁻²)			
de Proteínas	Proporções ^a	b ± EP ^b	Observada (IC ₉₅)	Esperada ^c	FS ^d
Cry1Aa+Cry1Ab	1 : 1	1,9 ± 0,3	37,5 (25,7 – 54)	30,5	0,8
Cry1Aa+Cry1Ac	2 : 1	2,9 ± 0,7	20 (15 – 29,5)	20,0	1,0
Cry1Aa+Cry1Ca	4 : 1	2,0 ± 0,4	23 (15 – 32,6)	18,0	0,8
Cry1Aa+Cry1Ea	1 : 1	1,5 ± 0,3	14,2 (8,6 – 24,6)	21,4	1,5
Cry1Ab+Cry1Ac	3 : 1	2,9 ± 0,7	19,8 (15 – 29,5)	24,8	1,2
Cry1Ab+Cry1Ca	5 : 1	1,1 ± 0,2	74,8 (42,8 – 127,6)	22,0	0,3
Cry1Ab+Cry1Ea	2 : 1	1,7 ± 0,2	54,3 (36,8 – 80,8)	26,4	0,5
Cry1Ac+Cry1Ca	2 : 1	1,8 ± 0,3	46,5 (32,5 – 67)	10,7	0,2
Cry1Ac+Cry1Ea	1 : 1	2,8 ± 0,5	34,3 (26,6 – 44,2)	15,2	0,4
Cry1Ac+Cry1Ea	1 : 1	2,8 ± 0,5	34,3 (26,6 – 44,2)	15,2	0,4
Cry1Ca+Cry1Ea	1 : 2	2,2 ± 0,4	21 (14,4 – 29,5)	12,3	0,6

^a As proporções de proteínas foram determinadas de acordo com a Tabela 4 (CL₅₀),

^b Coeficiente angular da reta ± Erro Padrão,

^c Mortalidade esperada,

^d FS = Fator de sinergismo calculado como a razão entre a CL esperada sobre observada, onde valores > 1 indicam sinergismo entre as proteínas, valores < 1 indicam antagonismo entre as proteínas e valores igual a 1 indicam a ocorrência de toxicidade aditiva

5. 4. Ação das enzimas digestivas de *A. gemmatalis* e *C. includens* na ativação das protoxinas Cry1 e Vip3A *in vitro*.

As protoxinas Cry1 foram completamente clivadas por proteases do intestino de *A. gemmatalis* e *C. includens* em apenas 30 min, apresentando-se na forma ativa da proteína que corresponde a, aproximadamente, 70 kDa (Figura 9).

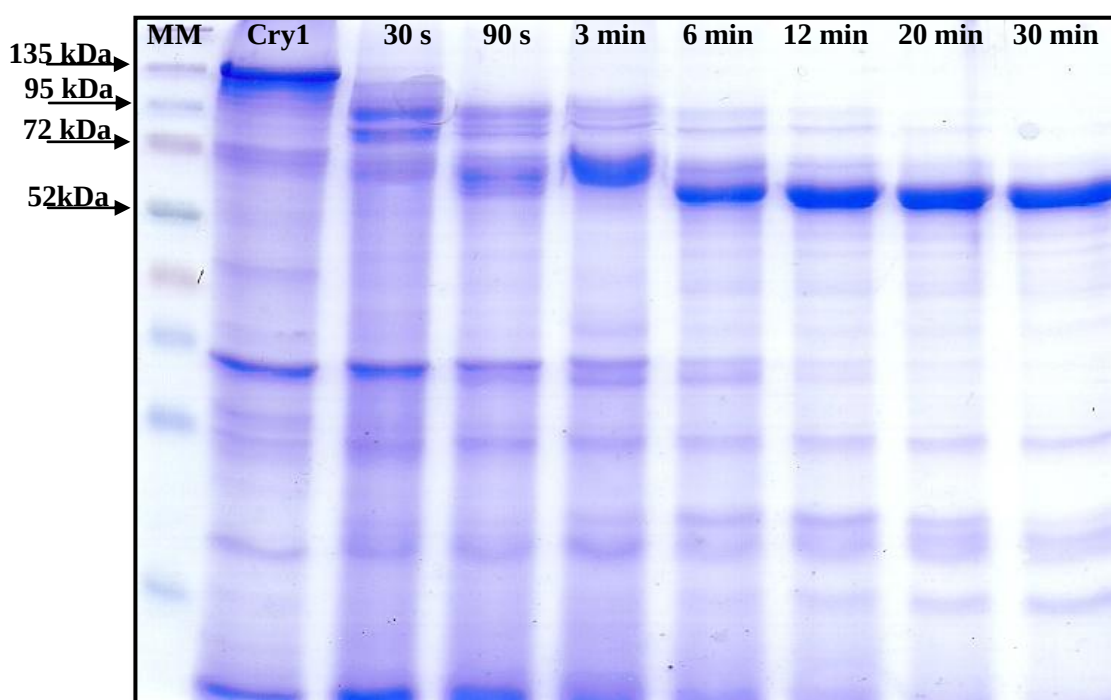


Figura 9. Gel de SDS-PAGE (12%) representando a ativação proteolítica das proteínas Cry1 para *A. gemmatalis* e *C. includens*. **MM**: Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). A canaleta designada **Cry1** indica a proteína incubada sem o suco entérico, as demais canaletas representam os diferentes tempos de incubação da proteína com o suco entérico.

O mesmo resultado foi observado para as proteínas Vip3A com o suco entérico de cada espécie em estudo, apresentando-se na forma ativa com, aproximadamente, 60 kDa (Figura 10).

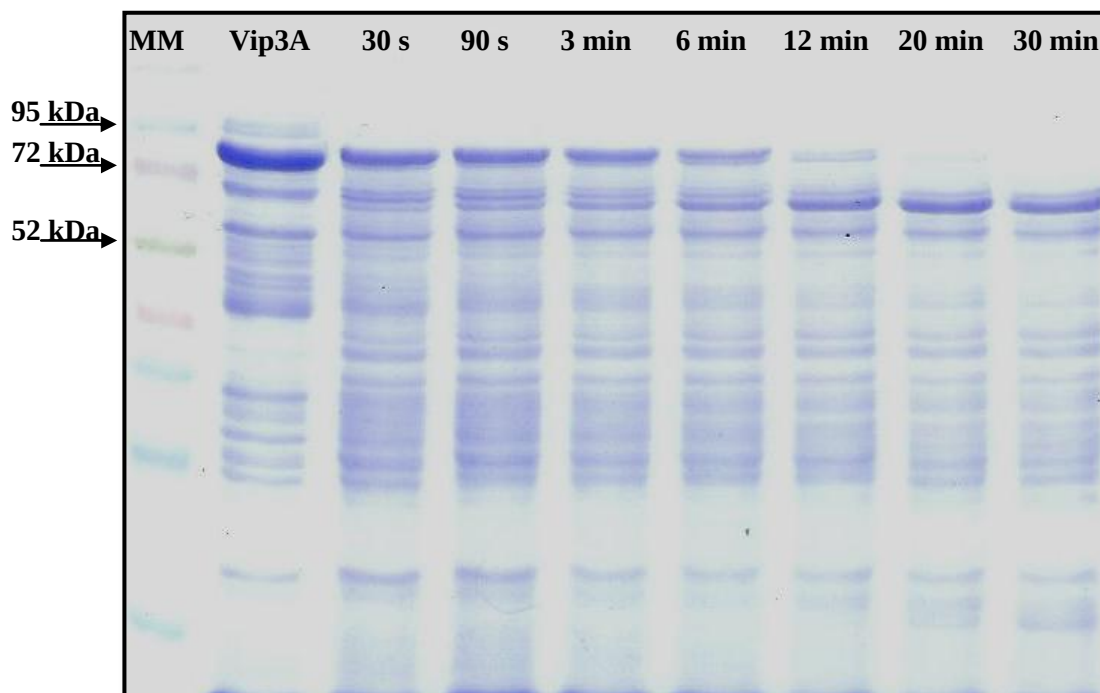


Figura 10. Gel de SDS-PAGE (12%) representando a ativação proteolítica das proteínas Vip3A para *A. gemmatalis* e *C. includens*. **MM**: Marcador de massa molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). A canaleta designada **Vip3A** indica a proteína incubada sem o suco entérico, as demais canaletas representam os diferentes tempos de incubação da proteína com o suco entérico.

Os resultados obtidos nesta avaliação demonstram a eficácia de cada espécie em clivar as proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, quando estas são ingeridas pelos insetos na sua forma inativa (protoxina).

6. DISCUSSÃO

O sistema de expressão empregado para a obtenção de proteínas recombinantes de *B. thuringiensis* em clones de *E. coli* foi eficiente e permitiu a utilização de cinco proteínas da família Cry1 e três da família Vip3A em análises isoladas de toxicidade para as espécies de lepidópteros-praga da cultura da soja, *A. gemmatilis* e *C. includens*.

O perfil de expressão proteica obtido é compatível com o descrito na literatura, apresentando tamanho de massa molecular de 130 a 135 kDa para as proteínas Cry1 (LIGHTWOOD; ELLAR; JARRETT, 2000) e, aproximadamente, 88,5 kDa para as proteínas Vip3A (LOGUERCIO et al., 2002).

Após a visualização e confirmação da expressão proteica, em gel de SDS-PAGE, estas foram quantificadas por densitometria e diferentes concentrações das proteínas foram preparadas para realizar bioensaios de avaliação da suscetibilidade de *A. gemmatilis* e *C. includens* às diferentes proteínas de *B. thuringiensis*.

Do ponto de vista estatístico, os bioensaios são experimentos planejados para estimar o potencial de um ou mais estímulos relativos a um padrão, usando a informação proporcionada pela resposta mensurada sobre o material biológico (FINNEY, 1979). Neste caso, a concentração letal responsável pela mortalidade de uma população em avaliação estima a potência do efeito da toxina oferecida ao inseto-alvo.

As testemunhas utilizadas como controle dos ensaios de suscetibilidade realizados neste estudo não apresentaram mortalidade, permitindo desta forma, afirmar que a mortalidade encontrada em lagartas alimentadas com dieta artificial, contendo diferentes proteínas Cry1 e Vip3A, é devida ao potencial inseticida atribuído para cada proteína.

Todas as proteínas avaliadas neste estudo foram eficientes no controle de *A. gemmatilis* e *C. includens*, no entanto, algumas se destacaram. Dentre estas, a proteína Cry1Ac encontra-se inserida e os resultados obtidos para esta proteína corrobora os relatos de toxicidade às espécies de lepidópteros descritas na

literatura, principalmente pelo fato do gene *cry1Ac* estar presente na soja transgênica (MON87701) liberada para comercialização no Brasil desde 2010.

Recentemente, foi lançada no mercado brasileiro a Soja Intacta RR2 ProTM pela empresa Monsanto, esta possui resistência contra algumas lagartas, dentre estas destacam-se *A. gemmatalis* e *C. includens*, devido ao gene *cry1Ac* inserido no genoma da planta. A proteína Cry1Ac também se encontra presente no algodão transgênico (Bollgard[®]), cultura que, eventualmente, também é alvo da espécie *A. gemmatalis* e mais frequentemente de *C. includens*.

Embora Cry1Ac tenha se destacado dentre as demais proteínas avaliadas neste estudo, esta foi mais efetiva para *A. gemmatalis* do que para *C. includens*. Semelhante a este resultado, estudos realizados com uma linhagem transgênica de soja, expressando altos níveis de proteína a partir do gene *cry1Ac*, demonstraram mortalidade total em lagartas de *A. gemmatalis* e redução significativa da população de *C. includens*, em ensaios de suscetibilidade e de alimentação realizados em laboratório (STEWART et al., 1996) e no campo (WALKER et al., 2000).

A proteína Cry1Aa também se destacou no controle de *A. gemmatalis*, apresentando-se duas vezes menos tóxica do que Cry1Ac. De modo semelhante, estudo conduzido por Fiuza et al. (2013) em avaliação da suscetibilidade de *A. gemmatalis* frente a diferentes toxinas Cry, relataram que as proteínas Cry1Ac e Cry1Aa foram as mais efetivas no controle do inseto-praga.

A menor efetividade das proteínas analisadas para esta espécie foi atribuída à Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea. Fiuza et al. (2003) também relataram uma menor efetividade de Cry1Ea em ensaios de toxicidade com *A. gemmatalis*.

As proteínas Vip3A demonstraram toxicidade semelhante contra *A. gemmatalis*, e mostraram-se mais eficientes que as proteínas Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea. Alguns estudos relatam que algumas proteínas Vip3A podem atuar com mais eficiência no controle de pragas cujas proteínas Cry1 não apresentem o melhor controle (ESTRUCH et al., 1996; YU et al., 1997). Semelhante resultado pode-se observar nos dados obtidos com *C. includens*, pois a proteína Vip3Af demonstrou ser mais efetiva no controle desta espécie do que as proteínas Cry1 testadas.

Os resultados obtidos com *C. includens* sugerem que dentre todas as proteínas avaliadas quanto à suscetibilidade, Vip3Af foi a mais eficiente, no entanto,

Vip3Ae e Vip3Aa não atuaram da mesma forma, apresentando-se inferior à primeira em termos de toxicidade à espécie. Esta observação pode estar relacionada com a diferença estrutural encontrada entre as proteínas ou mesmo pela especificidade a diferentes receptores no intestino do inseto (SCHNEPF et al., 1998; DE MAAGD et al., 2001).

O padrão geral de suscetibilidade entre as duas espécies (Figura 6), indica que as proteínas testadas não atuam de maneira semelhante na toxicidade de *A. gemmatalis* e *C. includens*.

A proteína Cry1Ac, em destaque na toxicidade das duas espécies de insetos-praga alvo deste estudo, apresentou-se, aproximadamente, dezessete vezes mais efetiva em *A. gemmatalis* do que *C. includens*. Essa diferença de suscetibilidade também foi reportada para inseticidas biológicos a base de *B. thuringiensis*, onde *A. gemmatalis* foi 1,5 a 5,6 vezes mais suscetível que *C. includens* (MORALES et al., 1995).

Avaliando tecido liofilizado de soja Cry1Ac (tic 107), Macrae et al. (2005) relataram que houve completa mortalidade de *A. gemmatalis*, no entanto, a população de *C. includens* foi menos controlada.

Em estudo realizado com a soja MON 87701 X MON 89788, portadora do gene *cry1Ac*, foi observado completa mortalidade de *A. gemmatalis* e 95% em *C. includens*, não atendendo o conceito de alta dose, pois a planta expressa um nível 25 vezes superior ao necessário para mortalidade de lagartas neonatas, dessa forma, a maioria dos insetos heterozigotos (que carregam alelos de resistência) seriam mortos. Estes dados indicam que *C. includens* apresenta, potencialmente, um risco maior de evoluir para resistência à soja MON 87701 X MON 89788 (BERDARDI et al., 2012).

Estes relatos corroboram os encontrados neste estudo, pois a suscetibilidade de uma espécie a determinada proteína não corresponde à mesma em outra espécie, assim, é evidente a especificidade de cada proteína em diferentes espécies de insetos-praga mesmo estes sendo pertencentes à mesma ordem (Lepidóptera). Este fato se deve à existência de diferentes sítios de ligação ou diferentes receptores no intestino dos insetos para as proteínas Cry da mesma família (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007) entre outros fatores.

As proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* avaliadas neste estudo mostraram-se eficazes na toxicidade contra *A. gemmatilis* e *C. includens*, possibilitando estimar a concentração de proteína que é capaz de provocar a mortalidade de 50% da população de cada espécie. No entanto, as lagartas sobreviventes a estas doses também foram avaliadas quanto ao seu desenvolvimento, pois é de grande importância determinar qual o potencial inibitório que estas proteínas causam frente às espécies expostas a determinadas proteínas.

Os resultados indicam que lagartas alimentadas com toxinas de *B. thuringiensis* apresentaram seu desenvolvimento inibido. A proteína Cry1Ac, que apresentou os melhores resultados na toxicidade das espécies foi responsável pela inibição do desenvolvimento de, aproximadamente, 90% de lagartas das duas espécies sobreviventes a CL₅₀.

Estes resultados corroboram os relatados por Ashfaq, Young e Mcnew (2001), que avaliaram o desenvolvimento de *C. includens* em plantas de algodão *Bt* (Cry1Ac) por sete dias. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que as sobreviventes foram afetadas negativamente apresentando lento crescimento e redução no peso de pupa, este controle provoca o aumento no período do desenvolvimento e pode levar a uma redução na população de larvas, devido a maior exposição a inimigos naturais (ASHFAQ; YOUNG; McNEW, 2001).

Semelhante a estes dados, Nyouki et al, (1996) relataram uma extensão no desenvolvimento de *C. includens* quando expostas a concentrações sub-letais de proteínas de *B. thuringiensis* em dieta artificial. Outros autores relatam uma redução no peso em diferentes espécies como: *Pectinophora gossypiella*, *Heliothis virescens* (JENKINS et al. 1993, HALCOMB et al. 1996, MEYERS et al. 1997) e *Spodoptera frugiperda* (ADAMCZYK et al. 1998), em lagartas sobreviventes a alimentação com algodão *Bt*. Para a espécie *A. gemmatilis*, Parrott et al. (1994) observaram que a expressão do gene nativo *cry1Ab* impediu a alimentação e crescimento de larvas.

A inibição do desenvolvimento larval também foi observada em lagartas alimentadas com as proteínas que menos controlaram as espécies de insetos-praga, como o caso de Cry1Ea em *A. gemmatilis* que apresentou 75% de inibição em lagartas sobreviventes a CL₅₀. Para *C. includens*, a proteína Vip3Ae foi a menos

efetiva na mortalidade, mas inibiu em 85% o desenvolvimento das lagartas e desta forma, apresenta-se mais influente neste quesito do que Vip3Af, a mais eficiente na mortalidade da espécie.

A ação das toxinas, bem como vários outros agentes inseticidas ativos no intestino de insetos suscetíveis envolvem geralmente uma lise celular (BLACKBURN et al., 1998; MOELLENBECK et al., 2001). Para δ -endotoxina, canais iônicos provocados pela união das proteínas aos receptores intestinais dos insetos foram estabelecidos (PEYRONNET et al., 2001; SANGADALA et al., 1994; SCHUWARTZ et al., 1997), no entanto, mecanismos adicionais podem ser responsáveis por outros aspectos de toxicidade observados, tais como alterações do comportamento, parada alimentar das larvas, regurgitação e paralisia intestinal (ARONSON; SHAI, 2001; ENGLISH et al., 1994; FAST, 1981).

Os ensaios de suscetibilidade e inibição do desenvolvimento larval foram de extrema importância para o conhecimento de possibilidades para o controle de *A. gemmatilis* e *C. includens*. Desta forma, levando em consideração a evolução da resistência que futuramente poderá ser relatada para estas toxinas, é importante elucidar meios para retardar esta evolução.

Alguns casos de desenvolvimento de resistência de insetos-praga a toxinas Cry foram relatados (TABASHNIK et al., 2000) e, desta forma, a combinação de proteínas inseticidas apresenta-se como eficiente alternativa para o manejo de resistência, visto que combinações efetivas poderiam integrar cultivos de transgênicos. As proteínas Vip3A não possuem homologia de sequência ou estrutural com as Cry e, desta forma, reconhecem diferentes receptores no intestino médio de larvas suscetíveis (ABDELKEFI - MESRATI et al., 2011). Avaliar a combinação de diferentes proteínas para o controle de insetos-praga possibilita alternativas para serem utilizadas no manejo de resistência.

Diversos estudos têm indicado que as proteínas Cry podem agir sinergicamente aumentando a toxicidade destas contra insetos suscetíveis (CRICKMORE et al, 1995; WIRTH; DELÉCLUSE; WALTON, 2001; XUE et al., 2005) e estes estudos ajudam na busca de genes *cry* mais apropriados para serem introduzidos no genoma de plantas cultivadas de grande interesse econômico.

Moar et al. (1995) relataram que a presença de esporos de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* reduziu o desenvolvimento de resistência a proteína Cry1C em *S. frugiperda*. Como esta estirpe é uma fonte potencial do gene Vip3A (DONOVAN; DONOVAN; ENGLEMAN, 2001; DOSS et al., 2002), é possível que a expressão de Vip3A pode ter contribuído para estas observações.

Atualmente, a nova geração de plantas *Bt* busca a expressão de mais de um gene de *B. thuringiensis*, sendo a prática conhecida como pirâmide de genes, existente quando ambas as proteínas possuem alta atividade biológica (IVES et al., 2011). A vantagem da pirâmide de genes está na provável evolução da resistência de forma mais lenta em comparação ao uso de uma única proteína inseticida na planta (ROUSH, 1998).

As proteínas Vip são tóxicas para diversos lepidópteros-praga e não apresentam homologia de sequência ou estrutural com as δ -endotoxinas. Assim, toxinas Vip podem ser eficazes contra insetos resistentes a toxinas Cry, e proporcionar uma combinação de proteínas que pode ser explorada em transgênicos. Os genes *vip* podem ser introduzidos em culturas que também expressam proteínas Cry na forma de pirâmides. A pirâmide de genes é importante, pois raramente um inseto será resistente a mais de uma toxina presentes na mesma planta. Desta forma, as toxinas a serem utilizadas em construção de plantas pirâmides devem ser avaliadas separadamente em nível de resistência pré-existente de cada toxina (ROUSH, 1998; ZHAO et al., 2003).

O método utilizado neste estudo foi descrito por Tabashnik (1992), quando analisou o sinergismo das proteínas Cyt2Aa3 e Vip3Aa29, que segundo Yu et al. (2012) trata-se de uma metodologia adequada para análises de toxinas semelhantes ou diferentes. No presente estudo, a metodologia empregada permitiu indicar a presença de sinergismo que, muitas vezes, ocorre quando se associam dois produtos que apresentam diferentes mecanismos de ação.

Nesta associação pode haver uma ação de complementaridade entre os mesmos, facilitando a ação física / bioquímica entre os componentes. Desta forma, o sinergismo atua quando o efeito da mistura é superior à soma dos efeitos dos produtos aplicados isoladamente. A combinação pode também ter efeito aditivo, presente quando o resultado da associação equipara-se à soma dos efeitos dos

produtos aplicados isoladamente e antagônico, quando a interação representa um efeito inferior à soma dos efeitos dos produtos aplicados isoladamente (HATZIOS; PENNER, 1985; GRESSEL, 1990; GREEN; STREIBIG, 1993).

A presença de sinergismo é de grande importância, pois deve aumentar a eficiência de controle, permitindo o uso de doses menores de cada um dos componentes da associação (HATZIOS; PENNER, 1985), além de retardar a evolução da resistência.

Em *A. gemmatalis*, a combinação Vip3Aa+Cry1Ab exibiu um forte sinergismo, apresentando valor cinco vezes maior do que o esperado para uma combinação sinérgica. LEE et al. (2003), compararam o mecanismo de ação da proteína Vip3A com Cry1Ab, *in vitro*, em *Manduca sexta* e verificaram que Vip3A difere em várias etapas, quanto ao modo de ação, utilizando um alvo molecular diferente e formando distintos canais iônicos, comparada à Cry1Ab. Os autores sugerem que a interação das proteínas Vip com os receptores do intestino das larvas de diferentes lepidópteros tem colocado essas proteínas como uma segunda geração de toxinas de *B. thuringiensis*, com excelente potencial para o manejo da resistência.

Sabe-se que muitas são as diferenças encontradas entre espécies de lepidópteros, no entanto, alguns expressam resultados semelhantes para determinadas toxinas. Neste caso, não se pode afirmar que em *A. gemmatalis* o sinergismo encontrado é devido ao alvo molecular diferente como foi relatado para *M. sexta*, mas é um indicativo para explicar essa interação e recorrer a futuros estudos para elucidar tal hipótese.

Além do sinergismo apresentado pela combinação Vip3Aa+Cry1Ab, outras duas também demonstraram eficiência para *A. gemmatalis*, Vip3Aa+Cry1Ea e Vip3Ae+Cry1Ab, no entanto, estas apresentaram sinergismo semelhante estatisticamente entre si e inferior ao encontrado na combinação Vip3Aa+Cry1Ab.

Em linhagens de soja que expressam a proteína inseticida Cry1Ab foi relatado eficácia parcial no controle de *A. gemmatalis* (PARROTT et al., 1994). Assim, uma combinação desta proteína, que já se encontra inserida em plantas, com Vip3Aa ou Vip3Ae, Cry1Ac ou Cry1ca poderia aumentar o potencial de controle para esta espécie e também atuar no retardo da evolução de resistência pelos insetos.

A combinação Vip3Aa+Cry1Ea também apresentou sinergismo para *C. includens* no presente estudo, no entanto para esta espécie, o sinergismo foi mais intenso, aplicando-se um valor quatro vezes maior ao requerido para fator de sinergismo. Este resultado é de grande importância para o controle e manejo da resistência das espécies em estudo, pois uma única combinação de proteínas Vip3A e Cry1 mostrou-se eficiente no controle de *A. gemmatalis* e *C. includens* simultaneamente.

Para *C. includens* Vip3Ae+Cry1Aa e Vip3Ae+Cry1Ea também se mostraram sinérgicas, no entanto em *A. gemmatalis* estas combinações foram antagônicas. Ainda em *C. includens*, Vip3Af+Cry1Ac demonstraram atuar em conjunto de forma aditiva, neste caso não houve potencialização do efeito inseticida, no entanto é uma opção para piramidar proteínas em plantas para o manejo de resistência a insetos.

As interações testadas para as proteínas Cry1 indicaram duas combinações em sinergismo para *A. gemmatalis* e *C. includens* simultaneamente, são elas: Cry1Aa+Cry1Ea e Cry1Ab+Cry1Ac. Estas também são opções interessantes para introdução em plantas transgênicas com intuito de controlar populações das duas espécies.

O sinergismo de Cry1Ab+Cry1Ac também foi relatado por Sharma et al. (2010) no qual foi verificado através de bioensaios com insetos de uma população de *Chilo partellus* que estas proteínas apresentam atividade tóxica cinco vezes maior juntas quando comparado à sua utilização isolada, indicando que elas têm efeito sinérgico contra a espécie avaliada.

Outras combinações apresentaram sinergismo para as espécies alvo deste estudo, no entanto não atuaram para as duas simultaneamente. Para *A. gemmatalis* a combinação sinérgica foi Cry1Ab+Cry1Ca e para *C. includens* foi Cry1Aa+Cry1Ac.

Algumas combinações proteicas foram relatadas na literatura para outras espécies, mas não há relato de combinação alguma para o controle e/ou manejo de resistência a insetos para as espécies *A. gemmatalis* e *C. includens*.

Lee et al. (1996) demonstraram que as toxinas Cry1Aa e Cry1Ac apresentaram atividade sinérgica contra lagartas de *Lymantria dispar*, aumentando em 4,9 vezes sua toxicidade quando os insetos foram alimentados com a mistura das proteínas e, neste caso, foi verificado que a combinação das duas toxinas levou

também à uma maior formação de poros do que as toxinas individuais, demonstrando portanto a possibilidade de interação sinérgica entre proteínas Cry1A potencializando sua atividade tóxica. Neste mesmo estudo, os autores relataram antagonismo para a combinação Cry1Aa+Cry1Ab. Esta mesma combinação também demonstrou antagonismo para *A. gemmatilis* e *C. includens* no presente estudo.

O mecanismo relacionado ao antagonismo não é conhecido. É possível que as toxinas possam interagir fisicamente de modo a formar um complexo, bloqueando, assim, um ou mais dos locais ativos sobre uma ou mais moléculas. Alternativamente, o antagonismo pode ser um resultado da competição por espaço (não entre receptores) sobre a superfície da célula (LEE et al., 1996; RINCO'N-CASTRO; BARAJAS-HUERTA; IBARRA, 1999), estes relatos são apenas hipóteses e estudos devem ser realizados para desvendar esse mecanismo .

Dentro da classe de proteínas Cry1, insetos resistentes a uma toxina são frequentemente, mas não necessariamente, resistentes a outras (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Estes dados sugerem que provavelmente existe um mecanismo de atuação diferente para cada proteína, que permite várias possibilidades de novas combinações a serem utilizadas na construção de plantas piramidadas para o controle de insetos-praga.

Mundialmente encontram-se culturas transgênicas piramidadas com genes de *B. thuringiensis* liberadas para comercialização e ou previstas para breve liberação, dentre essas destacam-se: algodão Widestrike[®] pela empresa Dow (EUA) que está implantando o gene *vip3A* em plantas que já contém os genes *cry1Ac* e *cry1F* (ANON, 2010a); o milho Agrisure Viptera[™] que expressa os genes *vip3A* e *cry1B* e deverá ser disponibilizada em breve no mercado (ANON, 2010b) e prevista para 2016, nos EUA, o lançamento da terceira geração de algodão *Bt*, da Monsanto, para ser comercializado como Genuity Bollgard III, este será responsável pela expressão de Vip3A, Cry1Ac e Cry2Ab (MAHON; DOWNES; JAMES, 2012).

Pesquisas também estão sendo realizadas neste âmbito, como é o caso da empresa Bayer CropScience que concedeu à Syngenta uma licença mundial para utilização da tecnologia de controle de insetos VipCot (Cry1Ab e Vip3A) em algodão. (Anon, 2010b).

O sinergismo presente em combinação de toxinas tornou-se um dos métodos mais eficazes para aumentar a toxicidade de *B. thuringiensis* e retardar a evolução da resistência a insetos-praga. Várias teorias têm sido propostas para explicar o mecanismo molecular de sinergismo, incluindo: a melhoria da união da toxina, inserção na membrana (PÉREZ et al., 2005) e a destruição da matriz peritrófica do intestino médio do inseto para aumentar a permeabilidade da toxina (SAMPSON; GOODAY, 1998; FANG et al., 2007).

Alguns trabalhos descrevem a evolução da resistência devido a diferenças na produção de proteases intestinais de populações de insetos suscetíveis e resistentes (OPPERT et al., 1994). Desta forma, o presente estudo avaliou a atividade proteolítica desempenhada pelo suco entérico de *A. gemmatalis* e *C. includens* sobre as proteínas de Cry1 e Vip3A. Esta avaliação determina a capacidade de cada espécie em tornar as protoxinas de *B. thuringiensis* em toxinas ativas quando em contato com suco intestinal do inseto.

As proteínas Cry1 são sintetizadas como grande precursores (protoxinas) de aproximadamente 130 kDa, estas são clivadas por proteases no intestino do inseto para uma forma de toxina ativa de aproximadamente 65 kDa (RUKMINI; REDDY; VENKATESWERLU, 2000). Yu et al. (1997) demonstraram que a proteína Vip3A é processada pelo extrato do suco intestinal de lepidópteros suscetíveis em aproximadamente 62 kDa.

Os resultados obtidos indicam que tanto *A. gemmatalis* quanto *C. includens* são capazes de ativar todas as proteínas avaliadas neste estudo, de maneira eficiente.

Estudos relataram que linhagens de *A. gemmatalis* resistentes a proteínas Cry obtiveram maior CL₅₀ do que as linhagens suscetíveis. Porém, quando as protoxinas foram ativadas *in vitro* com quimiotripsina, a CL₅₀ das linhagens resistentes foi menor do que a CL₅₀ da linhagem suscetível. Esses resultados sugerem que a resistência adquirida pelas lagartas é devido a problemas na ativação proteolítica das protoxinas (HERRERO; OPPERT; FERRÉ, 2001). Lee et al. (2003) propuseram que o passo de ativação é necessário para a bioatividade da toxina e pode ser considerado essencial para a formação de poros no intestino, apresentando-se como passo importante para o modo de ação de Vip3A.

O conhecimento acerca da atividade inseticida de cada proteína de *B. thuringiensis* é muito importante para o controle de insetos-praga, no entanto, quando existe a possibilidade de controle de duas espécies-praga simultaneamente, utilizando-se de combinações de proteínas, a evolução da resistência que poderia surgir em curto prazo é retardada para as duas espécies.

Portanto, a obtenção da CL_{50} das proteínas inseticidas de forma efetiva, sugerem que várias são as possibilidades de controle e manejo de resistência a diferentes espécies. Desta forma, futuros estudos devem ser realizados para ampliar o conhecimento de como essas proteínas atuam dentro do intestino das espécies avaliadas. A seleção de genes inseticidas que atuam em sinergismo no controle de insetos-praga possibilita a construção de culturas geneticamente modificadas, que expressam mais de uma proteína, e podem controlar mais de uma praga simultaneamente, além de sua atuação em sinergismo para o manejo de resistência.

Este trabalho indicou possíveis combinações que atuam em sinergismo no controle e manejo de resistência para *A. gemmatilis* e *C. includens* simultaneamente.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente estudo sugerem que:

- Dentre as proteínas avaliadas isoladamente Cry1Ac destaca-se no controle de *A. gemmatalis* e Vip3Af no controle de *C. includens*.
- Todas as proteínas avaliadas apresentam inibição do desenvolvimento larval para ambas as espécies.
- As combinações Vip3Aa+Cry1Ea, Cry1Aa+Cry1Ea e Cry1Ab+Cry1Ac são indicadas para o controle e manejo da resistência de *A. gemmatalis* e *C. includens*, simultaneamente.
- As combinações Vip3Aa+Cry1Ab, Vip3Ae+Cry1Ab e Cry1Ab+Cry1Ca mostram-se sinérgicas no controle de *A. gemmatalis* e as combinações Vip3Ae+Cry1Aa, Vip3Ae+Cry1Ea, Vip3Af+Cry1Ac e Cry1Aa+Cry1Ac apresentam sinergismo para *C. includens*.
- A ativação proteolítica pelo suco entérico de *A. gemmatalis* e *C. includens* demonstra que esta etapa não está relacionada às diferenças encontradas na eficiência de mortalidade aos insetos em estudo.

8. REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 2, p.250-254, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2010.10.002>>.

ADAMCZYK, J. J.; HOLLOWAY, J. W.; CHURCH, G. E.; LEONARD, B. R.; GRAVES, J. B. Larval survival and development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on normal and transgenic cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) endotoxin. **Journal of Economic Entomology**. v. 91, p. 539- 545, 1998.

ALYOKHIN, A. Scant evidence supports EPA's pyramided *Bt* corn refuge size of 5%. **Nature Biotechnol**, v.529, p.577-578, 2011.

ANDOW, D. A. The risk of resistance in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Triest, v. 4, p. 142-199, 2008.

ANON (2010a). Syngenta, Dow Agrosiences sign cotton technology licensing agreement. Disponível em: <http://www2.syngenta.com/en/media/mediareleases/en_100105.html> Acesso em 21 de Nov. 2013.

ANON (2010b). Syngenta and Bayer CropScience sign global cotton technology licencing agreement, 2010b. Disponível em: <http://www2.syngenta.com/en/media/mediareleases/en_100714.html> Acesso em 21 de Nov. 2013.

ARENAS, L.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* em the mechanism os action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 23, n. 285(17), p. 12497-12503, 2010.

ARONSON; A. I.; SHAI, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique feature of their mode of action. Mini Review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 1-8, 2001.

ARORA, N.; SELVAPANDIYAN, A.; AGRAWAL, N.; BHATNAGAR, R. K. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v. 310 (1), p. 158-162, 2003.

ASHFAQ, M.; YOUNG, S.Y.; McNEW, A.W. Larval mortality and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on a transgenic *Bacillus thuringiensis*-cotton cultivar expressing Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n.5, p. 1053-1058, 2001.

BHALLA, R.; DALAL, M.; PANGULURI, S. K.; JAGADISH, B.; MANDAOKAR, A. D.; SINGH, A. K.; KUMAR, P. A. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 467-472, 2005.

BERNARDI, O.; MALVESTITI, G.S.; DOURADO, P.M.; OLIVEIRA, W.S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G.U.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Assessment of the high – dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v.68, p.1083-1091, 2012.

BLACK, R. J. Complexo soja: fundamentos, situação atual e perspectiva. In: CÂMARA, G. M. S. (Ed.). **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba: ESALQ, p.1-18, 2000.

BLACKBURN, M.; GOLUBEVA E.; BOWEN D.; FFRENCH-CONSTANT R. H. A toxina inseticida romance de *Photorhabdus luminescens*, um complexo de toxina

(TCA), e seus efeitos histopatológicos no intestino médio de *Manduca sexta*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3.036-3.041, 1998.

BRAGA, P. V.; OLIVEIRA, W. S.; MARTINELLI, S.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; OLIVEIRA, M. Estudo de Caso da Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidade para regiões tropicais**. Ed. Suprema, p. 347-390, 2011.

BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas : ITAL, p. 1-6, 1981.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leadins to insertion into membrane microdomains. **Biochemistry et Biophysical Acta**. v. 1667, p. 38-46, 2004.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT L.I.; IATROU K.; GILL, S.S. (Ed). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amstrerdam: Elsevier B V. p. 175-206, 2005.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. V. 49, p. 423-435, 2007.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? **Trends in Biotechnology**, St. Louis, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.

CHAKROUN, M.; BEL, Y.; CACCIA, S.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; ESCRICHE, B. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p.334-339, 2012.

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

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_11_08_54_13_boletim_portugues_novembro_2013_-_ok.pdf> Acesso em: 13 nov. 2013.

COSTA NETO, P. R.; ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, v. 23, p. 4, 2000.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, p. 249-254, 1995.

CROW, J. F. Genetics of insecticide resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 2, p. 227-246, 1957.

CROFT, B. A.; VAN DE BANN, H. E. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 4, p. 277-300, 1988.

CTNBio – **Comissão Técnica Nacional de Biosegurança**. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br>>. Acesso em: 04 out. 2013.

DE FREITAS, M. de C. M. **A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção Brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola.**

Enciclopédia Biosféra. Centro Científico Conhecer. Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.

DE MAAGD, R.A.; BAKKAR, P.L.; MASSON, L.; ADANG, M.J.; SANGANDALA, S.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified amino peptidase N. **Molecular Microbiology**, v. 31, no. 2, p. 463 - 471, 1999.

DE MAAGD, R. A.; ALEJANDRA, B.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, London, v. 17, p. 193–199, 2001.

DE MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**. v.37, p. 409-443, 2003.

DONOVAN, W. P.; DONOVAN, J. C.; ENGLEMAN, J. T. Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. **Journal Invertebrate Pathology**, v.78, p. 45-51, 2001.

DOSS, V. A.; KUMAR, K. A.; JAYAKUMAR, R.; SEKAR, E. V. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (*vip3V*) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli* . **Protein Expression and Purification**, v. 26, p. 82-88, 2002.

DUHRUA, S.; GUJAR, G.T. Field-envolved resistance to *Bt* toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from Índia. **Pest Management Science**, Sessex, v. 67, n.8, p. 898-803, 2011.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na região central do Brasil 2000/01**. Londrina:

Embrapa Soja/Fundação MT, 2000. 245p. -- (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.146).

ENGLISH, L. H.; ROBBINS, H. L.; VON TERSCH, M.A.; KULESZA, C. A.; AVE, D.; COYLE, D.; JANY, C. S.; SLATIN, S. L. Mode of action CryIIA: a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxina. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 24 :1025-1035, 1994.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FAST, P. G. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*, p. 223-248. In H. D. BURGESS (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. **Academic Press**, New York, NY, 1981.

FANG, J.; XU, X.; WANG, P.; ZHAO, J-Z; SHELTON, A. M.; CHENG, J.; FENG, M-G; SHEN, Z. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.73, p.956-961, 2007.

FELLAND, C. M.; PITRE, H. N.; LUTRELL, R. G.; HAMER, J. L. Resistance to pyrethroid insecticides in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) en Mississippi. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 35-40, 1990.

FERRÉ, J.; VAN RIE J. Biochemistry and genetics of insect resisitance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 501–533, 2002.

FERREIRA, B. S. C.; PANIZZU, A. R. Distribuição de ovos e lagartas de *Anticarsia gemmatilis* Hübner em Plantas de soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 7, p. 54-59, 1978.

FISCHHOFF, D. A. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, London, v. 5, .n 8, p. 807-813, 1987.

FEITELSON, J. S. PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Biotechnology**, v. 10, p. 271-275, 1992.

FINNEY. D. J. Probit analysis. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 333 1971.

FINNEY D. J. Bioassay and the practice of statistical inference. **International Statistical Review**, Amsterdam, v.47, p. 1-12, 1979.

FIUZA, L. M.; KNAAK, N.; SILVA, R. F. P.; HENRIQUE, J. A. P. Receptors and Lethal Effect of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to the *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae). **ISRN Microbiology**. 2013. <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/940284>>.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: Fealq, p. 920, 2002.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. **PlosOne**, 2011. < DOI: 10.1371/journal.pone.0022629>

GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. de; CORSO, I. C.; FERREIRA, B. S. C.; VILLAS BÔAS, G. L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: EMBRAPA – CNPSo, 1981. 44p. (Embrapa – CNPSo. Circular Técnica, 5).

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRATONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of entomology**, Stanford, v. 37, p. 615-636, 1992.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. **Chichester: John Wiley and Sons**, p. 350, 2000.

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, R.; ALMAGRO, J. C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the Sequential Interaction with Cadherin and Aminopeptidase-N Receptors in *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, 2006.

GREEN, J. M.; STREIBIG, J. C. Herbicide mixtures. In: STREIBIG, J. C.; KUDSK, P. **Herbicide bioassays**. Florida: CRC Press, p. 117-135, 1993.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle Microbiano de Insetos**. Editado por S. B. Alves. 2. Ed. FEALQ, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

GRESSEL, J. Synergizing herbicides. **Reviews of Weed Science**, Champaign, v. 5, p.49–82, 1990.

HALCOMB, J. L.; BENEDICT J. H.; COOK B.; RING R. Survival and growth of bollworm and tobacco budworm on nontransgenic and transgenic cotton expressing a CryIA insecticidal protein (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 25, p. 250-255, 1996.

HAMADIAN, E. I.; PITRE, H. N. Pvoosition ad larval behavior of soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean with different row spacing and plant grow stages. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v. 19, p. 29-44, 2002.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, ARMELLE; NIELSEN-LE ROUX, C. (eds). Entomopathogenic

Bacteria: From Laboratory to Field Application. Netherland. **Kluwer Academic Plubishers**. p. 41-64, 2000.

HATZIOS, K. K.; PENNER, D. Interactions of Herbicides with Other Agrochemicals in Higher Plants, **Reviews of Weed Science**, WSSA, v. 1, p. 1-63, 1985.

HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; BAXTER, S. W. ZAHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B. E. The diversity os *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, n. 3, p. 192-197, 2007.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Fifferents mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1085-1089, 2001.

HERRERO, S.; GONZALEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; BAKKER, P.L.; DE MAAGD, R.A. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **Biochemical Journal**, v.384, p.507-513, 2004.

HERZOG, D.C. Sampling soybean looper on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D.C. (Ed). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, p. 140-168, 1980.

HINDS, W. E.; OSTERBERGER. The soybean caterpillar in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, v. 24, p. 1168-1173, 1931.

HÖFTE, H. WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, v. 53, n. 2, p.242-255, 1989.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D.

L.; OLIVEIRA, E. B. de. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000, 70p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 30).

HOMRICH, M. S.; PASSAGLIA, L. M. P.; PEREIRA, J. F.; BERTAGNOLLI, P. F.; PASQUALI, G.; ZAIDI, M. A.; ALTOSAAR, I.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Resistance to *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae) in transgenic soybean (*Glycine max* (L.) Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar IAS5 expressing a modified Cry1Ac endotoxin. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 2, p. 522-531, 2008.

HU, C. Y.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Embryo culture and embryo rescue for wide cross hybrids. In: GAMBORG, O. L.; PLHILIPS (eds) **Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Fundamental Methods**. Springer, Berlin, p. 129-141, 1995.

HUANG, F.; ROGERS LEONARD, B.; GABLE, R.H. Comparative Susceptibility of European Corn Borer, Southwestern Corn Borer, and Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab Protein in a Commercial *Bacillus thuringiensis* Corn Hybrid. **Journal Economic Entomology**, vol. 99(1), p.194 – 202, 2006.

JAMES, C. **Global status of commercialized transgenic crops**. ISAAA Brief n° 27 ISAAA: Ithaca, NY, 2002.

JAMES, C. **Global status of commercialized Biotech/GM Crops**. ISAAA Brief n° 42. ISAAA: Ithaca, NY, 2010.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM crops**. ISAAA Brief n° 43. ISAAA: Ithaca, NY, 2011.

JANMAAT, A. F.; MYERS, J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*, **Proceedings of the Royal Society of London, Series B**, London, v. 270, n. 1530, p. 2263-2270, 2003.

JOHNSON, D. E.; McGAUGHEY, W. H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indian meal moth larvae. **Current Microbiology**, v.33, p.54-59, 1996.

JOST, D. J.; PITRE, H. N. Soybean looper and cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) populations in cotton and soybean cropping systems in Mississippi. *Journal of Entomological Science*, v.37, p.227-235, 2002.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROTO, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for the insect resistance. **Plant Science**, Shannon, v. 131, n.1, p. 1-11, 1998.

IVES, A. R.; GLAUM, P. R.; ZIEBARTH, N. L.; ANDOW, D. A. The evolution of resistance to two-toxin pyramid transgenic crops. **Ecological Applications**, Tempe, v.21, n.2, p. 503-515, 2011.

JENKINS, J. N.; PARROTT, W. L.; MCCARTY JR, J. C.; CALLAHAN, F. E.; BERBERICH, S. A.; DEATON, W. R. Growth and survival of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic cotton containing a truncated form of the delta endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 181- 185, 1993.

KHALSA, M. S.; KOGAN, M.; LUCKMANN, W. H. Autographa precations in relation to soybean: Life history, and food intake and utilization under controlled conditions. **Environmental Entomology**. Lanham, v. 8, n 1, p. 117-122, 1979.

KIIHL, R. A. S.; GARCIA, A. The use of the long-juvenile trait in breeding soybean cultivars. In: **WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE**, v. 4, p. 994-1000, 1989.

KOGAN, M.; COPE, D. Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. 3. Food intake, utilization and growth in the soybean looper, *Pseudoplusia includens*. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v.67, n. 1, p. 66-72, 1974.

KOGAN, M.; TURNIPSEED, S.G. Ecology and management of soybean arthropods. **Annuals Reviews Entomology**, v 2, p. 507-538, 1987.

KRYWUNCZYR, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 36, p. 139-140, 1980.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.; DEAN, D. H.; Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62(2), p. 583–586. 1996.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, p.4648-4657, 2003.

LEONARD, B. R.; BOETHE, D. J.; SPARKS, A. N.; LAYTON, M. B.; MINK, J. S.; PAVLOFF, A. M.; BURRIS, E.; GRAVES, J. B. Variation in response of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides in Louisiana. **Economic Entomology**. 83: 27-34, 1990.

LEPPLA, N. C. Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 69, n. 1, p. 45-48, 1976.

LIGHTWOOD, D. J.; ELLAR, D. J.; JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, p. 5174–5181, 2000.

LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E. Synergism of *Bacillus thuringiensis* by ethylenediamine tetraacetate in susceptible and resistance larvae of diamondback moth (Lepidoptera, Plutellidae). **Journal of Economic Entomology** v. 90, p. 287-292, 1997.

LOGUERCIO, L. L.; BARRETO, M. L.; ROCHA, T. L.; SANTOS, C. G.; TEIXEIRA, F. F.; PAIVA E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip – derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p.269–277, 2002.

LUTHY, P.; WOLFERSBERGR, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 167-180, 2000.

MACRAE, T. C.; BAUR, M. E.; BOETHEL, D. J.; BENTLEY, J.; FITZPATRICK, B. J.; GAO, A-G.; GAMUNDI, J. C.; HARRISON, L. A.; KABUY E, V. T.; MCPHERSON, R. M.; MIKLOS, J. A.; PARADISE, M. S.; TOEDEBUSCH, A. S.; VIEGAS, A. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 577-587, 2005.

MCGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 229, n. 4709, p. 193-195, 1985.

MAHON, R. J.; DOWNES, S. J.; JAMES, B. Vip3A Resistance Alleles Exist at High Levels in Australian Targets before Release of Cotton Expressing This Toxin, 2012, **PLoS ONE** 7(6): e39192. <doi:10.1371/journal.pone.0039192>.

MASCARENHAS, R. N.; BOETHEL, D. J. Development of diagnostic concentrations for insecticide resistance monitoring in soybean looper (Lepidoptera:Noctuidae) larvae using an artificial diet overlay bioassay. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 897-904, 2000.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Controle biológico. Jaguariúna, **EMBRAPA-CNPMA**, DOCUMENTO11, p. 264, 1998.

MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; VISÔTTO, L. E.; GUEDES, R. N. C.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J. A. O. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*, criada em diferentes dietas. **Revista Ceres**. N. 56. p 018-024, 2009.

MEYERS, H. B.; JOHNSON, D. R.; SINGER, T. L.; PAGE, L. M. Survival of *Helicoverpa zea* (Boddie) on Bollgard[®] cotton, pp. 1269 - 1271. In P. DUGGER and D. RICHTER (eds), Proceedings, Beltwide **Cotton Production Research Conferences**, January 1997, New Orleans, LA. National Cotton Council of America, Memphis, TN.

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

MITCHEL, E. R. Life history of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Georgia Entomol. Soc**, vol. 2, p. 53 – 57, 1967.

MOAR, W. J.; PUSZTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSCH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, MJ.; Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC

Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Environmental Microbiololy**, vol. 61(6), p. 2086–2092, 1995.

MOELLENBECK, D. J.; PETERS, M. L.; BING, J. W.; ROUSE, J. R.; HIGGINS, L. S.; SIMS, L.; NEVSHEMAL, T.; MARSHALL, L.; ELLIS, R. T.; BYSTRAK, P. G.; LANG, B. A.; STEWART, J. L.; KOUBA, K.; SONDAG, V.; GUSTAFSON, V.; NOUR, K.; XU, D.; SWENSON, J.; ZHANG, J.; CZAPLA, T.; SCHWAB, G.; JAYNE, S.; STOCKHOFF, B. A.; NARVA, K.; SCHNEPF, H. E.; STELMAN, S. J.; POUTRE, C.; KOZIEL, M.; DUCK, N Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. **Nature Biotechnology**, v. 19 (17), p. 668-672, 2001.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. **Controle Biológico**: v.3, p. 163-2000.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; DE MEDEIROS, P. T. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v.41, p. 291-295, 2007.

MORAES, R. R. de; LOECK, A. E.; BELARMINO, L. C. Flutuação populacional *Plusiinae* e *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, p. 51-56, 1991.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; KASTELIC, J. G.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PARO, F. E.; SOLDORIO, I. L. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 593-598, 1995.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annuals Reviews of Entomology**. v. 44, p. 257-289, 1999.

NYOUI, F. F. R.; FUXA, J. R.; Richter, A. R. Sporetoxin interactions and sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v. 31, p. 52-62, 1996.

OPPERT, B.; KRAMER, K. J.; JOHNSON, D. E.; MACINTOSH, S. C.; MCGAUGHEY, W. H. Altered protoxin inactivation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 198, p. 940–947, 1994.

PARROTT, W. A.; ALL, J. N.; ADANG, M. J.; BAILEY, M. A.; BOERMA, H. R.; STEWART JR, C. N. Recovery and evaluation of soybean plants transgenic for a *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal gene. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v. 30, p. 144-149, 1994.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for Field use of *Bt* genes in crop. **Trends in Biotechnology Association**, n.15, p.173 – 177, 1997.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PENG, D.; XU, X.; RUAN, L. YU, Z. SUN, M. Enhancing Cry1Ac toxicity by expression of the *Helicoverpa armigera* cadherin fragment in *Bacillus thuringiensis*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 383-389, 2010.

PÉREZ, C.; FERNANDEZ, L. E.; SUN, J.; FOLCH, J. L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América**, Washington, v. 102, p. 18303-18308, 2005.

PEYRONNET, O.; VACHON, V.; SCHWARTZ, J-L.; LAPRADE, R. Ion channels induced in planar lipid bilayers by the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in the presence of gypsy moth (*Lymantria dispar*) brush border membrane. **Jornal of Membrane Biology**, v. 184, p. 45-54, 2001.

PINTO, L. M. N.; BERLITZ, D. L.; FORTES, R. C.; FIUZA, L. M. Toxinas de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** n. 38, p. 24-31, 2009.

RANG, C.; GIL, P.; NEISNER, N.; VAN RIE, J.; FRUTOS, R. Novel Vip3 related protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 71 (10), p. 6276 – 6281, 2005.

REED, D. H.; FRANKHAM, R. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. **Evolution**, Lawrence, v.55, p. 1095-1103, 2001.

REID, J. C.; GREENE, G.L. The soybean looper: pupal weight, development time, and consumption of soybean foliage. **Florida Entomologist**, v. 56, p. 203- 206, 1973.

RINCO'N-CASTRO, M. C. D.; BARAJAS-HUERTA, J.; IBARRA, J. E. Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 Toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 5, p. 2049-2053, 1999.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, v, 24, p, 63-71, 2006.

ROUSH, R. T. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed wher pesticide mixtures have not? **Philosophical Transactions of the Royal Society Lond Biological Science**, London, v. 353, n. 1376, p. 1777-1786, 1998.

RUKMINI, V.; REDDY, C.Y.; VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin **Biochimie**, v. 82, p. 109-116, 2000.

SANGADALA, S.; WALTERS, F. S.; INGLÊS, L. H.; ADANG, M. J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and $^{86}\text{Rb}(+)\text{-K}^+$ efflux in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p.10088-10092, 1994.

SCHNEPF, H. E, CRICKMORE, N., VAN RIE, J.; LERECLUS, D., BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775–806. 1998.

SCHWARTZ, J.-L.; LU Y.-J.; SÖHNLEIN, P.; BROUSSEAU, R.; LAPRADE, R.; MASSON, L.; ADANG, E. M. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. **FEBS Letters**, v. 412, p. 270-276, 1997.

SHARMA, P.; NAIM, V.; LAKHANPAUL, S.; KUMAR, P. A. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 42-47, Jul 2010.

SAMPSON, M. N.; GOODAY, G. W. Involvement of chitinase of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insect. **Microbiology**, v. 144, p. 4187-4189, 1998.

SAMIR, N. M.; ELENA, M. U.; MIEKE, W. H.; STEFAN D.; IVAN M.; de MAAGD R. A. Carboxy-terminal effects on crystal formation and insecticidal properties of colorado potato beetle-active *Bacillus thuringiensis*-endotoxins. **Molecular Biotechnology**, v.32, p.185-196, 2006.

SANTOS, R. S. S, RIBEIRO, L. G, SANTOS, J. P, KOVALESKI, A. 2011. Caracterização e controle de pragas. In: NACHTIGALL, G. R. **Inovações Tecnológicas para o setor da Maçã – INOVAMAÇA**: Relatório técnico. Bento Gonçalves, Brasil. p. 137-166.

SATTAR, S.; BISWAS, P.K.; HOSSAIN, M.A.; MAITI, M.K.; SEM, S.K. BASU, A. Search for vegetative insecticidal proteins (VIPs) from local isolates of *Bacillus thuringiensis* effective against lepidopteran and homopteram insect pests. **Journal Biopestic.** v. 4, p. 216 – 222, 2008.

SENA, J. A. D.; HERNANDEZ-RODRIGUES, C. S.; FERRE, J.; Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Applied And Environmental Microbiology**, Washington v.75, p. 2236–2237, 2009.

SILVA, A. G. d'A.; GONSALVES, C. R.; GALVÃO, O. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, M. N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Rio de janeiro: Ministério da Agricultura, v.1, pt.2, p. 662, 1968.

STEWART JR, C. N.; ADANG, M. J.; ALL, J. N.; BOERMA, R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROT, W. A. Genetic transformation, recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryAc* gene. **Plant Physiology**, v. 112, p. 121-129, 1996.

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

TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58 (10), p. 3343–3346, 1992.

TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W.; HECKEL, D. G. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIF in the diamondback moth. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p.4627–4629, 1994.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; MALVAR, T.; HECKEL, D. G.; MASSON, L.; BALLESTER, V.; GRANELO, F.; MENSURA, J. L.; FERRÉ, J. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to the *Bacillus thuringiensis*, **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, n. 94, n. 24, p. 12780-12785, 1997.

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; de MAAGD, R. A.; DENNEHY, T. J. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectiniphora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p.4582–4584, 2000.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 1999-2002, 2008.

TABASHNIK, B. E. Communal Benefits of transgenics Corn. **Science**, v. 330, p. 189, 2010.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAM, L. J.; HECKEL, D. G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified *Bt* toxins against insects with different genetic mechanism of resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29(12), p. 1128-31, 2011. < doi: 10.1038/nbt.1988>.

TARRAGÓ, M. F. S.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, S.; BARBIN, D. Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia*

gemmatilis Hübner, e *Rachiplusia nu* (Guen.) em Santa Maria-RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.6, n.2, p.180-193, 1977.

VAN RENSBURG, J. B. J. First report of Field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to *Bt*-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, Pretoria, v. 24, n. 3, p. 147-151, 2007.

VAN RIE, J.; MCGAUHEY, W. H.; JOHNSON, D. E.; BARNETT, B. D. VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, Washington, v. 274, n. 4938, p. 72-74, 1990.

VÁZQUEZ, W. R. C. **Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo da area foliar da soja**. 1986, 164p. Tese (Doutor em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

WALKER, D. R.; ALL, J. N.; MCPHERSON, R. M.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cryIAc* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology** v. 93, p. 613-622, 2000.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A., HUGER, A.M. **Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlen Helt**, Berlim, Paul Parey, v. 233, p.37-50, 1986.

WIRTH, M. C.; DELÉCLUSE, A.; WALTON, W. E. Cyt1Ab and CyteBa1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* and *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* synergize *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and resistant *Culex quinquefasciatus*

(Diptera: Culicidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3280-3284, 2001.

WHITELEY, H. R.; SCHINEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). International programme on chemical safety. Environmental health criteria 217: **Microbial Pest Control Agent *Bacillus thuringiensis***. Geneva. 1999. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

WU, D.; JOHNSON, J.J.; FEDERECI, B.A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v.13, p.965–972, 1994.

XUE, J. L.; CAI, Q. X.; ZHENG, D. S.; YUAN, Z. M. The synergistic between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 460-465, 2005.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests, p.81-100. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds) Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, **Kluwer Academic**, 548p, 2000.

YU, C. G.; MULLINS, M. A.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G.; ESTRUCH, J. J. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.532-536, 1997.

YU, X.; LIU, T.; SUN, Z.; GUAN, P.; ZHU, J.; WANG, S.; LI, S.; DENG, Q.; WANG, L.; ZHENG A.; LI, P. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and

Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*
Current Microbiology, v. 64 (4), 326-331, 2012.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; LI, Y. X.; COLLINS, H. L.; ROUSH, R. T.; Earle, E. D.; Shelton, A. M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1493–1497, 2003.

ZAHIRI, N. S.; MULLA, M. S. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* on selection with rotation and mixture of *B. sphaericus* and *B. thuringiensis israelensis*. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 672–677, 2003.

ZHANG, L.; HUANG, F.; ROGERS LEONARD, B.; CHEN, M.; CLARK, T.; ZHU, Y. C.; WANG, D. S.; YANG, F.; NIU, Y. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and susceptible strains of sugarcane 3 borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. 2013.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.007>