

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

SINERGISMO ENTRE PROTEÍNAS Cry1 E Vip3Aa DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE
Spodoptera cosmioides (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

BRUNO BARBOSA

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério
Coorientador: Dr. Jardel Diego Barbosa Rodrigues

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal - SP
Dezembro/2023

B238a Barbosa, Bruno

 Sinergismo entre proteínas Cry1 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuide) / Bruno Barbosa. -- Jaboticabal, 2023

 48 p. : tabs., fotos

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

 1. Bactéria esporulante. 2. Controle biológico. 3. Inseto-praga. 4. Piramidação de genes. 5. Toxinas inseticidas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Título: Sinergismo entre proteínas Cry1 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae)

Acadêmico: Bruno Barbosa

Curso: Ciências Biológicas

Orientador: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Coorientador: Dr. Jardel Diego Barbosa Rodrigues

Departamento de Biologia Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” UNESP, Jaboticabal.

Período: 2º semestre de 2023.

CONCEITO: Aprovado

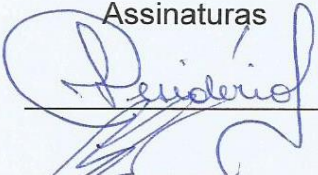
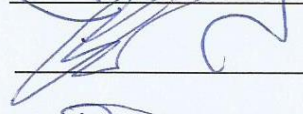
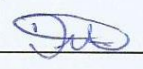
Este trabalho é recomendado para compor a base de dados Repositório: SIM ☒ NÃO ☐
Reprovado ☐

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

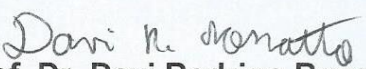
Membro: Me. Luis Angel Chicoma Rojas

Membro: Me. Daniel Carlos Machado

Assinaturas




Jaboticabal: 05/12/2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 14/12/2023


Prof. Dr. Davi Rodrigo Rossatto
Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Lusiene e Renaldo, a minha querida Avó Antônia e tia Rita, pessoas as quais tornaram essa conquista possível, graças ao apoio incondicional durante toda minha vida;

Aos meus cachorros, Rebeca (*in memorian*), Lara e bolota (*in memorian*) os quais sempre me fizeram companhia e nunca me deixaram sozinho;

Aos queridos amigos Jheniffer Michaela Alves, Otavio Augusto Lima, Thais Pellosi, Eric Barros, Luan Barros, Vinicius Rossatto, Kayo Uriel Bechara, Nayara Paixão, pelo convívio, amizade e por fazerem parte da jornada que me trouxe até este momento;

À professora Dra. Janete Aparecida Desidério por abrir as portas do laboratório e compartilhar seu conhecimento, amizade, incentivo e confiança.

Ao meu Coorientador, Dr. Jardel Diego Barbosa Rodrigues por ter paciência comigo, por compartilhar seu conhecimento e me incentivar durante todo esse tempo;

Aos membros da banca, doutorandos Luis Angel Chicoma Rojas e Daniel Carlos Machado por aceitarem participar deste momento e contribuírem para o crescimento intelectual, profissional e pessoal;

Aos companheiros do Laboratório de Genética de Bactéria e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), Raquel Oliveira Moreira, Thais Nayara Ferreira dos Santos e Higor de Oliveira Alves, pelo convívio no dia-a-dia, conversas animadas e risadas, amizades que surgiu na pesquisa e seguirá para além dela;

Ao técnico do laboratório LGBBA Gustavo Henrique de Campos que se dedicou em me auxiliar na realização deste projeto;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) por proporcionar toda estrutura e o espaço de aprendizagem;

A todos os funcionários do departamento de biologia da FCAV/UNESP pelo convívio agradável e assistência.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. Introdução	7
2. Objetivos	10
2.1. Geral	10
2.2. Específicos	10
3. Revisão de Literatura	11
3.1. <i>Spodoptera cosmioides</i>	11
3.2. Bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i>	12
3.2.1. Proteínas Cry	13
3.2.2. Proteína Vip	15
3.3. Modo de ação das proteínas em insetos da ordem lepidóptera	15
3.4. Interação sinérgica	16
3.5. Expressão heteróloga de proteínas	17
3.6. Resistência de populações de insetos à tecnologia Bt	18
3.7. Importância do uso da tecnologia Bt no controle biológico	19
4. Material e Métodos	21
4.1. População de inseto	21
4.2. Obtenção dos clones recombinantes	23
4.3. Indução da expressão da proteína Cry1 recombinante em <i>E. coli</i>	23
4.4. Indução da expressão da proteína Vip3Aa recombinante em <i>E. coli</i>	24
4.5. Análise das proteínas por SDS-PAGE	25
4.6. Bioensaios com <i>S. cosmioides</i> para estimar as CL ₅₀ e CL ₉₀	26
4.7. Ensaios de interação entre as proteínas frente a <i>S. cosmioides</i>	28
5. Resultados	30
5.1. Expressão das proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa.....	30
5.2. Quantificação das proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa.....	30
5.3. Bioensaios de toxicidade com <i>S. cosmioides</i>	31
5.4. Determinação da taxa de mortalidade	32
5.5. Efeito de combinação de toxinas de <i>B. thuringiensis</i> no controle de <i>S. cosmioides</i> ..	33
6. Discussão	34
7. Conclusão.....	37
8. Referências Bibliográficas	38

RESUMO

O gênero *Spodoptera* inclui algumas espécies importantes de insetos-praga polívoros e são consideradas uma das mais importantes causas de danos e estão amplamente distribuídas nas Américas. Dentre as espécies desse gênero encontra-se a *S. cosmioides* com crescente importância econômica na agricultura intensiva de áreas tropicais como o Brasil. Devido ao uso extensivo de plantas geneticamente modificadas contendo genes de *Bacillus thuringiensis* que codificam proteínas inseticidas, fez surgir, como consequência, insetos resistentes. Portanto, para prevenir o desenvolvimento de resistência em campo, podem ser utilizadas plantas piramidadas, que expressam múltiplas proteínas inseticidas que atuam por meio de modos de ação distintos. Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade isolada das diferentes proteínas Cry1 e Vip3Aa de *B. thuringiensis*, bem como a interação destas proteínas, visando o controle e o manejo do possível surgimento de resistência de *S. cosmioides*. As proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa foram obtidas a partir da indução de clones de *E. coli* recombinantes, obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA). As proteínas produzidas foram visualizadas em SDS-PAGE, quantificadas e incorporadas à dieta artificial, para estimar, por meio de bioensaios, as Concentrações Letais (CL) das quatro proteínas testadas individualmente e em conjunto. Os resultados das avaliações de toxicidade individuais revelaram que as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa apresentaram eficiência no controle de *S. cosmioides*. Com relação aos ensaios de interações, interações sinérgicas foram observadas nas combinações entre Cry1Ba/Cry1Ea, Cry1Ca/Cry1Ea e Vip3Aa/Cry1Ca. Estes resultados sugerem que a utilização destes genes para desenvolver novas construções para plantas piramidais pode ser eficaz no manejo da prevenção do desenvolvimento de resistência em *S. cosmioides*.

Palavras-chave: Bactéria esporulante, Controle biológico, Inseto-praga, Piramidação de genes, Toxinas inseticidas.

ABSTRACT

The *Spodoptera* genus includes some important species of polyphagous insect pests and is considered one of the most significant causes of damage, being widely distributed in the Americas. Among the species in this genus is *S. cosmioides*, which is gaining economic importance in intensive agriculture in tropical areas such as Brazil. Due to the extensive use of genetically modified plants containing *Bacillus thuringiensis* genes encoding insecticidal proteins, the emergence of resistant insects has occurred as a consequence. Therefore, to prevent the development of resistance in the field, pyramid plants can be used, expressing multiple insecticidal proteins that act through distinct modes of action. Thus, the objective was to evaluate the isolated toxicity of different Cry1 and Vip3Aa proteins from *B. thuringiensis*, as well as the interaction of these proteins, aiming at the control and management of the potential emergence of resistance in *S. cosmioides*. The Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea, and Vip3Aa proteins were obtained by inducing recombinant *E. coli* clones previously obtained by our research group at the Laboratory of Bacteria Genetics and Applied Biotechnology (LGBBA). The produced proteins were visualized on SDS-PAGE, quantified, and incorporated into artificial diet to estimate Lethal Concentrations (LC) through bioassays for the four proteins tested individually and in combination. The results of individual toxicity assessments revealed that Cry1Ca and Vip3Aa proteins were effective in controlling *S. cosmioides*. Regarding interaction assays, synergistic interactions were observed in combinations of Cry1Ba/Cry1Ea, Cry1Ca/Cry1Ea, and Vip3Aa/Cry1Ca. These results suggest that the use of these genes to develop new constructions for pyramid plants may be effective in managing the prevention of resistance development in *S. cosmioides*.

Keywords: Sporulating bacteria, Biological control, Insect pest, Gene pyramiding, Insecticidal toxins.

1. Introdução

Os sistemas agrícolas vêm sendo intensificado em todo o mundo. Algumas áreas, principalmente nos trópicos, permitem a conclusão de mais de um ciclo de cultivo por ano. O uso contínuo da terra com culturas sucessivas ao longo do ano pode aumentar a disponibilidade de plantas verdes e facilitar a persistência de pragas em áreas agrícolas (BUENO et al., 2012; SKENDŽIĆ et al., 2021). O aumento das fontes de alimentos disponíveis para os insetos também incentiva surtos de pragas, permitindo que espécies de insetos polípagos, outrora consideradas pragas secundárias, ganhem maior importância econômica e se tornem pragas chave de vários agroecossistemas (PEDIGO et al., 2021).

O gênero *Spodoptera* inclui algumas espécies importantes de insetos polípagos que são pragas primárias e secundárias de muitas culturas, tais como: algodoeiro, milho, soja, mamona, sorgo, tomate, hortaliças e frutíferas. Estas pragas danificam, através da alimentação, diferentes órgãos das plantas, ocasionando redução na produtividade (HERERRO, et al., 2016). Dentre as espécies desse gênero encontra-se a *S. cosmioides* com crescente importância econômica na agricultura intensiva de áreas tropicais como o Brasil. Essa espécie de praga têm a capacidade de produzir gerações sucessivas ao longo do ano e, devido a sua polifagia pode contribuir para a sua rápida adaptação a diferentes agroecossistemas, enfatizando sua relevância para o manejo integrado de pragas (MIP).

Apesar do Brasil adotar o MIP, o controle químico ainda é um dos métodos mais utilizados. O uso exagerado destes compostos contribui para o aumento nos custos de produção, podendo representar até 25% (EMBRAPA, 2023), além de contribuir para danos ao meio ambiente. Por estes motivos, tem-se intensificado o desenvolvimento de novas estratégias e métodos alternativos para o controle biológico de pragas agrícolas para que se consiga promover a redução da quantidade de agrotóxicos lançados ao meio ambiente. Desta forma, o uso de inseticidas biológico e plantas geneticamente modificadas (GM) estão avançando no mercado global e ganhando cada vez mais espaço nas lavouras.

A bactéria mais utilizada no controle de numerosos insetos-praga é a espécie *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915). A principal característica desta bactéria é a produção de inclusões cristalinas de natureza proteica durante a fase de

esporulação denominada de proteínas Cry ou δ -endotoxinas e toxinas produzidas durante a fase vegetativa de crescimento que são secretadas fora das bactérias chamadas de proteínas Vip (BRAVO et al., 2017). Essas proteínas são altamente específicas aos insetos alvos e constituem a base de diferentes produtos utilizados como inseticida biológico (TABASHNIK et al., 2015). Ao ingerir tais proteínas, o elevado pH intestinal da larva suscetível ativa a protoxina que se liga a receptores específicos, induzindo lesões que destroem as células intestinais e levam o inseto à morte por inanição alimentar (BRAVO et al., 2017).

Todos os continentes do mundo relataram a comercialização de culturas geneticamente modificadas (GM) (MATHUR et al., 2017). A plantação global de culturas GM aumentou 3,3% em 2022, atingindo 202,2 milhões de hectares, impulsionada por maiores áreas de todas as principais culturas cultivadas em 27 países. Desse total, foram aprovados 237 eventos transgênicos de plantas com resistência a insetos (AGBIOINVESTOR, 2023; ISAAA, 2023).

Embora as pulverizações e culturas Bt tenham proporcionado benefícios econômicos e ambientais substanciais (TABASHNIK et al., 2010; LU et al., 2012), sua utilização em larga escala fez surgir, como consequência, sucessivos casos de evolução de resistência (LIU et al., 2010; STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014; LI, et al., 2014; OMOTO et al., 2016; BANERJEE et al., 2017). Há ainda o agravante da ocorrência de resistência cruzada (BERNARDI et al., 2015). Todos estes relatos de surgimento de resistência nos colocam diante da necessidade de identificar moléculas que sejam amplamente eficazes, e que apresentem modo de ação diferente, no sentido de interagirem com diferentes receptores no intestino das larvas, e que possam ser utilizadas com segurança contra as conhecidas e emergentes pragas agrícolas (LABREUCHE et al., 2017).

A ligação das toxinas de *B. thuringiensis* aos receptores do intestino médio dos insetos é uma etapa necessária para a toxicidade (HERRERO et al., 2016). A alteração da ligação às toxinas tem sido associada a altos níveis de resistência em populações de insetos (FERRÉ; VAN RIE, 2002; TABASHNIK et al., 2015). Neste contexto, se diferentes toxinas de *B. thuringiensis* partilham o mesmo sítio de ligação, uma alteração deste sítio poderia conferir resistência cruzada a todas as toxinas que partilham o mesmo sítio. Portanto, o estudo das moléculas envolvidas

na ligação de *B. thuringiensis* toxinas é crucial para o desenho correto de estratégias de manejo de controle de pragas.

Prevenir ou retardar a evolução da resistência em insetos-praga através da adoção de estratégias de gestão da resistência é fundamental para o uso sustentável de culturas transgênicas Bt. As estratégias para o manejo da resistência em culturas Bt resistentes a insetos incluem: estratégia de altas doses, estratégia de doses moderadas, expressão de toxinas temporal ou temporalmente específica, estratégia de refúgio, pirâmide/empilhamento de genes, misturas, rotações ou mosaicos de plantas transgênicas (SUSHMITA et al., 2016). Entre estas, as plantas piramidadas têm o potencial de retardar a resistência de forma mais eficaz do que a implantação sequencial de plantas contendo uma única toxina Bt ou em mosaicos. A resistência pode ser retardada por um período prolongado, mesmo reduzindo o tamanho do refúgio, se dois ou mais genes codificadores de toxinas inseticidas com modo de ação diferentes estiverem agrupados em uma única planta. Se as toxinas forem utilizadas de forma independente, existe um possível risco de resistência cruzada entre as toxinas.

Até o momento, apenas um número limitado de combinações de proteínas Cry e Vip foram avaliados em estudos de interação de toxicidade utilizando a espécie de *S. cosmioides*; por exemplo, Cry1Ia10 e Vip3Aa (BERGAMASCO et al. 2013). O conjunto limitado de dados de interações de proteínas Cry e Vip de *B. thuringiensis* em *S. cosmioides* dificulta a identificação de proteínas de Bt que podem ser úteis para uso em combinação em biopesticidas ou culturas transgênicas. Neste estudo, avaliamos os efeitos de interação de todas as combinações binárias possíveis de três proteínas Cry1 e uma proteína Vip3 contra larvas neonatas de *S. cosmioides* por meio de bioensaios.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a toxicidade isolada das diferentes proteínas Cry1 e Vip3Aa de *B. thuringiensis*, bem como a interação destas proteínas, visando o controle e o manejo do possível surgimento de resistência de *S. cosmioides*.

2.2. Específicos

- Expressar as proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa de *B. thuringiensis*.

- Verificar a toxicidade isolada de cada proteína frente as lagartas neonatas de *S. cosmioides* por meio de bioensaios.

- Verificar o potencial sinérgico ou antagônico das combinações das proteínas Cry1 e Vip3Aa através de bioensaios para o referido inseto-praga.

3. Revisão de Literatura

3.1. *Spodoptera cosmioides*

Spodoptera cosmioides foi descrita por Walker em 1958, inicialmente considerada sinônimo de *S. latifascia*, descrita pelo mesmo autor em 1956. Mas com estudos moleculares, morfológicos, fisiológicos e comportamentais foram diferenciadas e revalidada sua identificação, dentre esses estudos identificou sua distribuição geográfica como sendo restrita ao território Sul-Americano (SILVAIN; LALANNE-CASSOU, 1997; ZACHÉ et al., 2012).

As mariposas adultas de *S. cosmioides* (Figura 1) possuem asas membranosas recobertas por escamas, a asa posterior branca e anterior parda com desenhos em formato de mosaico nas fêmeas e amareladas nos machos. Possuindo hábitos noturnos, com postura de ovos sobre a face inferior das folhas e cada fêmea pode ovipositar entre 150 a 500 ovos (BAVARESCO et al., 2002; PAPA; CELOTO, 2014).

Figura 1: *Spodoptera cosmioides* - adulto em vista dorsal (fêmea).



Fonte: Embrapa, disponível em: (<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/5334001/spodoptera-cosmioides---adulto-em-vista-dorsal-femea>)

Lagartas recém eclodidas tem a coloração marrom clara e cabeça preta, a medida que crescem sua tonalidade muda para parda a negro-acinzentada, com três listras longitudinais predominantemente alaranjadas, em que uma é dorsal e outras duas são laterais, com pontos brancos (Figura 2). Na parte superior dos pontos brancos são encontrados triângulos pretos em direção ao dorso do inseto. No último instar irão apresentar cores escuras, com uma faixa mais escura entre o terceiro e o primeiro par de pernas torácicas e abdominais, respectivamente, além de mais duas faixas na extremidade do abdômen. A fase larval pode durar de 15 a

35 dias, enquanto o ciclo do ovo ao adulto entre 28 a 78 dias (BAVARESCO et al., 2002; ZENKER et al., 2007; SPECHT; ROQUE-SPECHT, 2016).

Figura 2: *Spodoptera cosmioides* - larva em vista dorsal.



Fonte: Embrapa, disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/5336001/spodoptera-cosmioides---larva-em-vista-dorsal>

Esse inseto-praga é classificado como polífaga, pois possui uma grande gama de plantas com potencial para serem hospedeiras, chegando a 40 famílias e 126 espécies, e muitas possuindo um grande valor econômico (SPECHT; ROQUE-SPECHT, 2016), sendo as culturas mais conhecidas: algodoeiro, milho, soja, mamona, sorgo, tomate, hortaliças e frutíferas. Esta espécie de praga tem a capacidade de danificar, através da alimentação, diferentes órgãos das plantas, ocasionando redução na produtividade das culturas (SILVA et al., 2017). Alguns fatores contribuem para o aumento da ocorrência da espécie como praga, tais como: rápida adaptação, devido há grande disponibilidade de recurso alimentar, favorecida pela sucessão de culturas e baixa suscetibilidade às tecnologias Bt (SILVA et al., 2016; HOFFMANN et al., 2019).

3.2. Bactéria *Bacillus thuringiensis*

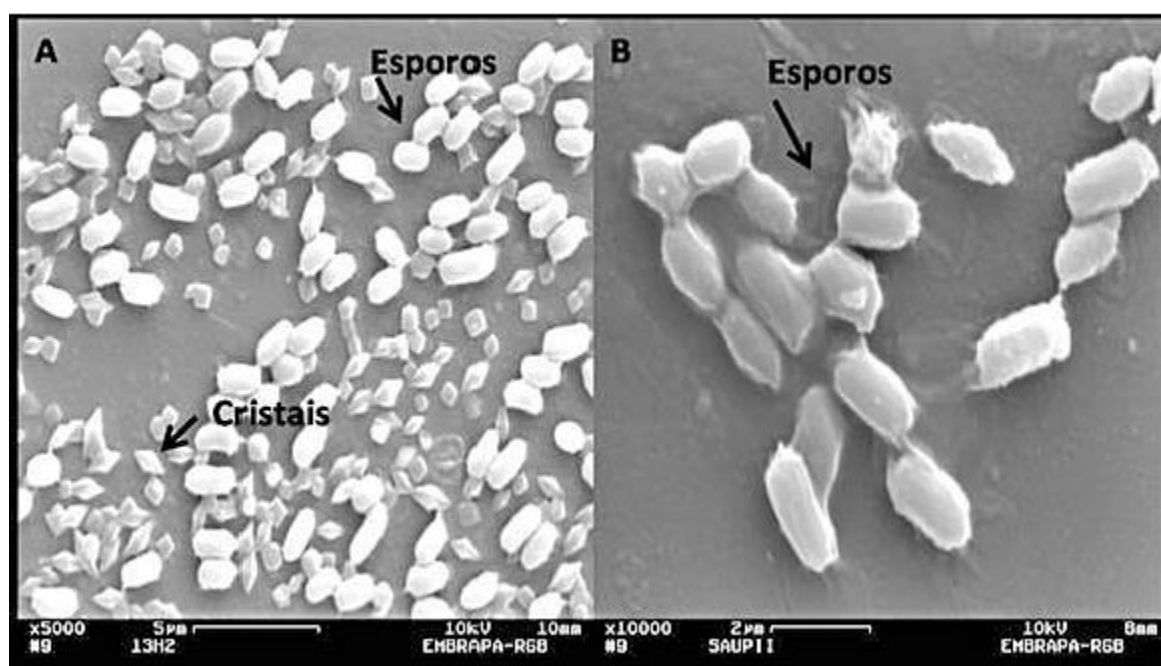
O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de solo, anaeróbica facultativa, Gram-positiva e flagelada. Com tamanho de 1 a 1,2 µm de largura e 3 a 5 µm de comprimento, capaz de produzir esporos em condições desfavoráveis que são resistentes ao calor, dessecação e substâncias desinfetantes (RABINOVITCH et al., 2000).

O biólogo japonês Shigetane Ishiwatari que durante sua pesquisa sobre a doença da murcha nos bichos-da-seda isolou a bactéria, em 1901, e nomeou de

Bacillus sotto. Anos depois, Ernst Berliner isolou a mesma bactéria na traça da farinha mediterrânea e a denominou de *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915).

A principal característica da bactéria Bt é sua capacidade de produzir cristais proteicos durante sua fase de esporulação (Figura 3), sendo formados devidos a genes transportados em plasmídeos que são controlados por RNA polimerase, a qual é sintetizada especificamente durante a esporulação (ARONSON, 2002). Mattes (1927) isolou a cepa Bt descoberta por Berliner e testou contra a broca europeia do milho (*Ostrinia nubilalis*) obtendo um resultado promissor.

Figura 3: Esporos e cristais produzidos por *Bacillus thuringiensis*.



Fonte: *Bacillus thuringiensis* (Bt) na Agricultura, disponível em:
<https://agro.genica.com.br/2019/10/18/bacillus-thuringiensis/>

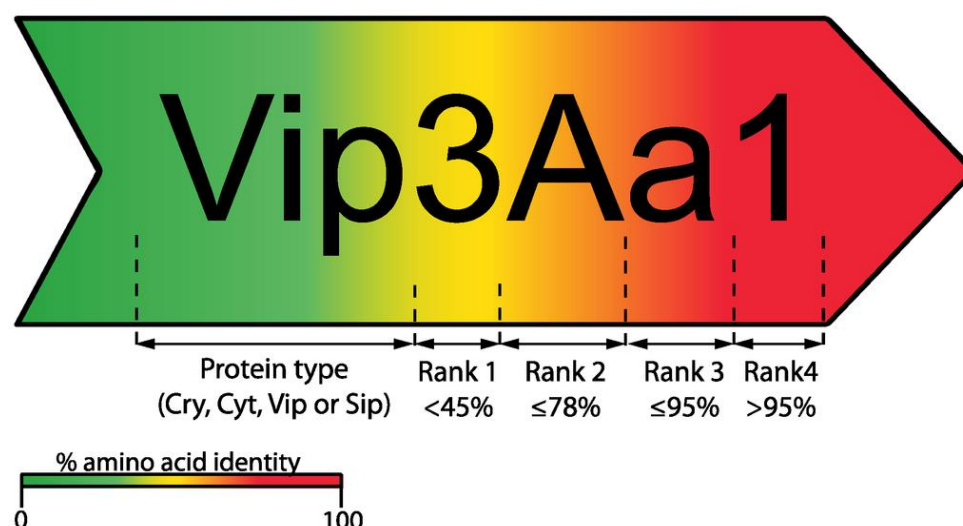
Além das δ -endotoxinas, o Bt também é capaz de produzir outros fatores entomopatogênicos, como α -exotoxinas, β -exotoxinas, fosfolipases, parasporinas, proteínas inseticidas vegetativas (Vip), entre outras (CRICKMORE et al., 2023), que podem ou não atuar em sinergia com as toxinas Cry.

3.2.1. Proteínas Cry

Quando genes que codificam proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* foram sendo relatados, foi proposta uma nomenclatura para as proteínas codificadas. Essas proteínas foram identificadas e designadas pelo termo Cry (tipo

de proteína) com números arábicos (1ª e 4ª classificações), uma letra maiúscula (2ª classificação) e uma letra minúscula (3ª classificação) (Figura 4). Este sistema precisa de nomes de quatro classificações para proteínas Bt é atribuído de acordo com a porcentagem de identidade de aminoácidos aos pares em comparação com toxinas anteriores. As proteínas Bt compartilham menos de 45, 78 e 95% de similaridade na classificação primária, secundária e terciária, respectivamente (CRICKMORE et al. 1998; PALMA et al., 2014; CRICKMORE et al., 2021).

Figura 4: Visão geral esquemática do atual sistema de nomenclatura usado pelo Comitê de Nomenclatura de Toxinas Bt para δ -endotoxinas (Cry e Cyt) e toxinas secretáveis (Vip e Sip). Neste exemplo, os números indicam diferentes proteínas Vip mudando a classificação 1 dependendo da porcentagem de similaridade de aminoácidos (para proteínas Vip esta classificação pode mudar até o momento entre Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4). A mesma regra se aplica às classificações 2, 3 e 4, atribuindo um dígito/letra de identificação diferente.



Fonte: Palma et al. (2014).

Até o momento, foram descritos mais de 500 genes *Cry*, classificados em 74 grupos (*Cry1* à *Cry74*), o quais são organizados em subgrupos, por exemplo a proteína *Cry1* possui quatorze classes, podendo variar de *Cry1A* até *Cry1N*. De forma geral, as proteínas *Cry* podem ter os tamanhos moleculares variando de 130 a 140 kDa, mas após a sua ativação seu tamanho é reduzido para aproximadamente 70 kDa, devido a perda de aminoácidos (CRICKMORE et al., 2023).

A classificação das proteínas *Cry* é feita por apresentarem estrutura de três domínios. O domínio I é a sete alfa-hélices relacionado a formação do poro; o

domino II é formado por três beta-antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico e é responsável pela ligação aos receptores de membrana; o domino III é a região C-terminal constituído por duas folhas beta-antiparalelas que formam um beta-sanduíche, essa região provavelmente é a responsável pela estabilidade estrutural e ligação ao receptor (SCHNEPF et al., 1998; CRICKMORE et al., 2021).

3.2.2. Proteína Vip

As proteínas inseticidas vegetativas (Vips) são comumente encontradas encontrada nas cepas de Bt, e são frequentemente estudadas como auxiliares na ação inseticidas das proteínas Cry (NÚÑEZ-RAMÍREZ et al., 2020). Ao total existe quatro famílias de proteínas Vip, as proteínas binárias Vip1 e Vip2, proteína Vip3 e proteína Vip4. Destacando-se a Vip3 como as mais estudadas por seu amplo espectro de ação contra lepidópteros praga (CRICKMORE et al., 2023).

As proteínas Vip3 possuem massa moléculas de 89 kDa e aproximadamente 789 aminoácidos, sendo organizada em cinco domínios em forma de pirâmide. A região N-terminal possui os domínios I, II e III formando o núcleo e o ápice da molécula, já a porção C-Terminais, domínio IV e V, são expostos ao solvente (NÚÑEZ-RAMÍREZ et al., 2020).

3.3. Modo de ação das proteínas em insetos da ordem lepidóptera

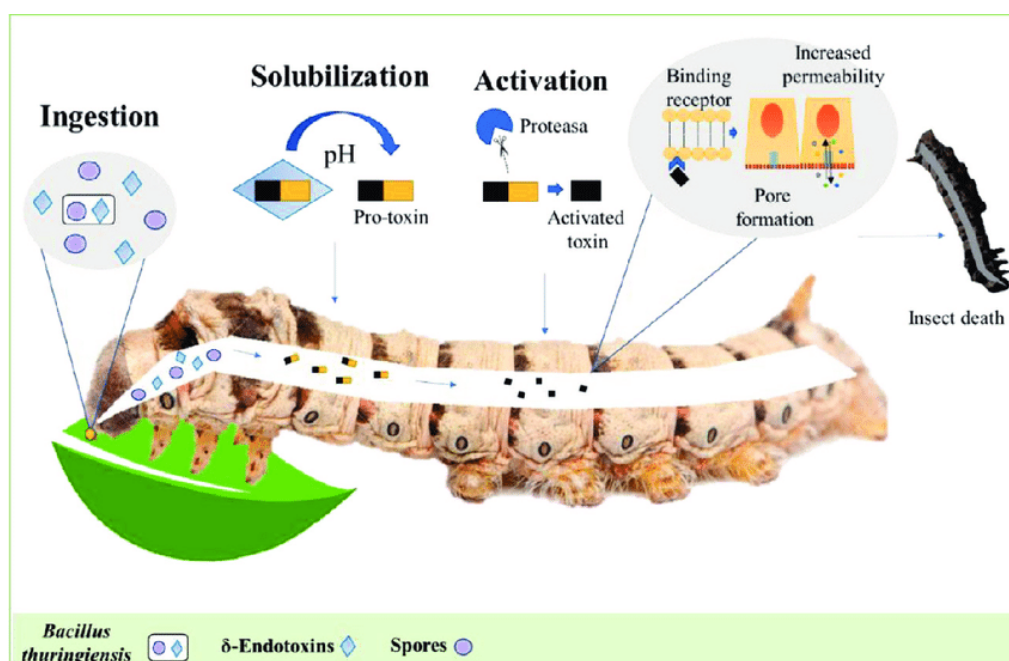
Proteínas Cry são conhecidas por sua especificidade contra insetos, em que essa característica é determinada através da sua ligação específica com as proteínas superficiais localizadas nas microvilosidades das células do intestino médio das larvas (Figura 5). Nos insetos da ordem lepidópteros, foram identificadas que as proteínas de ligação a Cry1 são semelhantes a caderina, aminopeptidase-N (APN) conjugado em glicosilfosfatidil (GPI) de 270kDa, fosfatase alcalina (ALP) conjugado em GPI de 250kDa. (PIGOTT; ELLAR, 2007).

Sua ação ocorre após a ingestão, ocasionado a ruptura dos cílios na borda em escova das células epiteliais do intestino, seguido de inchaço e lise celular. Em sequência o conteúdo intestinal é liberado na cavidade corporal contendo os esporos bacterianos, que permite a reprodução bacteriana (SANAHUJA et al., 2011)

Já a proteína Vip3, após proteólise, forma dois fragmentos de 19 a 22 kDa e 62 a 66 kDa, coligados aos domínios I e II – V, respectivamente (QUAN et al., 2021;

LÁZARO-BERENGUER et al., 2022). Esses fragmentos ficam ligados e se reorganizam na proteína ativa, se ligando à membrana peritrófica através do domínio V. A interação dos domínios II e III interagindo com receptores das vesículas da membrana da borda escovada ainda não foram totalmente elucidadas (QUAN et al., 2021; JIANG et al., 2023). Após essa interação com receptores, os domínios I e III induzem a citotoxicidade formando poros que permitiram a internalização da molécula (JIANG et al., 2023).

Figura 5: Mecanismo de ação das proteínas Cry segundo o modelo de ligação sequencial.



Fonte: Fernández-Chapa et al. (2019).

3.4. Interação sinérgica

Sinergismo é uma ação coordenada ou correlacionada de duas ou mais estruturas, agentes ou processos fisiológicos de modo que a ação combinada seja maior do que a soma de cada ação separadamente (OLSZOWY-TOMCZYK, 2020). Interações sinérgicas entre proteínas inseticidas Bt foram relatadas pela primeira vez quando se descobriu que a atividade mosquitocida de misturas de diversas proteínas Cry de *Bt* subsp. *israelensis* (Bti) foi maior que o das proteínas isoladas (ANGSUTHANASOMBAT et al., 1992; PONCET et al., 1995).

Efeitos sinérgicos foram relatados entre proteínas Cry e Vip de Bt contra larvas da ordem Lepidoptera, como: *Spodoptera frugiperda* (FIGUEIREDO et al.,

2019), *Mythimna separata* (YANG et al., 2018), contra *Diatraea saccharalis* (LEMES et al., 2014), e entre proteínas Cry contra larvas de *Helicoverpa armigera* (LI; BOUWER, 2014) e *Chilo partellus* (SHARMA et al., 2010). Outro efeito chave da interação entre duas moléculas é o antagonismo que é caracterizado por uma toxicidade observada significativamente reduzida em comparação com a toxicidade esperada da mistura, e foi observado entre proteínas Bt Cry em várias espécies de lepidópteros (IBARGUTXI et al., 2008; GAO et al, 2010; LEMES et al., 2014).

A interação entre diferentes proteínas Cry e Vip pode diferir marcadamente entre espécies de insetos, com grandes diferenças encontradas entre espécies no mesmo estudo usando as mesmas preparações de toxinas (IBARGUTXI et al., 2008; GAO et al, 2010. BERGAMASCO et al., 2013). Em estudo que avaliou as interações entre as protoxinas Cry e Vip Bergamasco et al. (2013) relataram que a mistura de proteínas Cry1Ia10 com Vip3Aa (proporção de 1: 1) apresentou um claro efeito sinérgico contra larvas de *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*. Contra *S. eridania*, a mesma mistura exibiu uma interação antagônica. Tais diferenças nos efeitos de interação mostram a importância de avaliar os efeitos de interação em diferentes espécies de insetos. Sendo assim, conhecer a natureza da interação entre as proteínas de Bt (Cry e Vip) é importante no desenvolvimento de misturas e/ou culturas transgênicas que sejam eficientes no controle de insetos-praga das culturas agrícolas.

3.5. Expressão heteróloga de proteínas

Diante do desafio para obtenção de proteínas em escala e qualidade necessárias para atender as demandas de aplicações experimentais, terapêuticas e comerciais foram elaborados numerosos métodos de produção de proteína heterólogas. Entre os diversos organismos utilizados nesses métodos estão as bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

O organismo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes é a *Escherichia coli*, isso se deve ao fato que seu genoma é bem caracterizado, possui uma maquinaria celular bem estabelecida e foram realizados inúmeros aperfeiçoamentos nas ferramentas e protocolos disponíveis para sua manipulação gênica (BROWN, 2010). Em 1981 ocorreu a manipulação do primeiro gene Cry de Bt, o qual foi clonado e expressado em *E. coli*. (SCHNEPF; WHITLEY, 1981).

Mas todo esse processo de manipulação de DNA recombinante está disponível desde 1970, incluindo a amplificação de gene através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (TASIOR et al., 2021). Foi Kary Bank Mullis quem desenvolveu essa técnica em 1983, que permite replicar DNA *in vitro* para produzir grandes quantidades de um único fragmento de DNA específico, utilizando-se de oligonucleotídeos iniciadores (primers) direcionados para o alvo (WHITE et al., 1989).

Com o gene de interesse isolado, é selecionado uma molécula de DNA autorreplicante, conhecida como vetor, para incluir essa sequência extraída. Esta inserção de gene é realizada com a união das extremidades compatíveis do vetor com as extremidades do gene, através da enzima DNA-ligase, sendo o plasmídeo o vetor mais utilizado (NELSON; COX, 2010).

Desde então várias proteínas de Bt foram sendo eficientemente expressas seguindo o sistema de expressão heteróloga, tais como: Cry1Ia10 e Vip3Aa (BERGAMASCO et al., 2013), Cry1 e Cry9 (LI; BOUWER, 2014), Cry1 e Vip3 (LEMES et al., 2014), Cry1Ie e Cry1Ah (YANG et al., 2018), Cry1, Cry2 e Vip3 (FIGUEIREDO et al. 2019), Cry1, Cry2, Cry9 e Vip3 (BARANEK et al., 2020; 2023), dentre outras.

3.6. Resistência de populações de insetos à tecnologia Bt

A resistência em campo ao *B. thuringiensis* foi descrita pela primeira vez em populações de *Plutella xylostella* (TABASHNIK et al., 1990). A partir disso, pesquisas foram surgindo abordando o tema sobre a resistência às pragas das culturas Bt. Dados apontam que dos casos analisados de evolução da resistência às toxinas Bt em condições de campo, três deles referem-se ao gênero *Spodoptera*, sendo um em Porto Rico (STORER et al., 2010) e dois no Brasil (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016), evidenciando ser um gênero onde facilmente ocorre a evolução da resistência.

Um dos principais riscos ambientais associados a crescente utilização de cultivos Bt está no potencial de evolução da resistência em pragas alvo. As pragas adquirem resistência aos produtos utilizados, ocasionando uma seleção de populações resistentes, o que torna evidente a necessidade de novos métodos de controle mais seguros (MORAES et al., 2015). Sabe-se, mais de 500 espécies de insetos se tornaram resistentes a inseticidas convencionais e já existe

comprovação de que eles também podem adaptar-se à toxina *Bt*. Um dos casos mais conhecidos sobre evolução da resistência em lavouras com tecnologia Bt é na população de *S. frugiperda* que em menos de 10 anos de uso das plantas GM com produção de proteínas Cry1Ab e Cry1F já foram documentados resistência (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016).

Para evitar essa adaptação, uma estratégia utilizada atualmente é a piramidação de genes em que ocorre a combinação de dois ou mais genes na mesma planta (QIN, et al., 2022; RAJPUT et al., 2022). Nesta estratégia, as proteínas utilizadas devem apresentar modo de ação diferente contra o inseto-praga (RAJPUT et al., 2022). Já que o inseto pode desenvolver alguma mudança genética adaptativa contra um determinado tipo de gene, porém não irá sofrer a ação do outro gene inseticida presente na planta. Evitando assim o surgimento da resistência e/ou resistência cruzada contra determinada proteína expressa pela planta (CARRIÈRE et al., 2015).

3.7. Importância do uso da tecnologia Bt no controle biológico

O controle biológico é uma estratégia fundamental do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e desempenha um papel importante na supressão sustentável e econômica de populações de insetos-praga (BALE et al., 2008; NARANJO et al., 2015). À medida que a população global continua a expandir-se, a utilização de uma abordagem integrada à gestão de pragas é extremamente importante para a segurança alimentar, a sustentabilidade agrícola e a proteção ambiental. A bactéria *B. thuringiensis* é um importante agente utilizado no controle biológico (VALTIERRA-DE-LUIS et al., 2020), as culturas geneticamente modificadas (GM) com gene de Bt que proporcionam proteção contra o ataque de insetos-praga, são ferramentas importantes que complementam um plano diversificado de gestão integrada de pragas (MIP).

Novas ferramentas moleculares oferecem oportunidades para o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas (GM) expressando genes inseticidas de *B. thuringiensis* que controlam as principais pragas e requerem menor uso de inseticidas químicos (KLÜMPER; QAIM, 2014; GURR; YOU, 2016; BROKES; BARFOOT, 2020). As primeiras culturas geneticamente modificadas desenvolvidas no final da década de 1980 expressavam proteínas inseticidas (Cry) da bactéria Bt devido à sua especificidade conhecida e ao excelente histórico de

segurança das formulações microbianas de Bt (FISCHHOFF et al., 1987; PERLAK et al., 1990). As plantas Bt resistentes a pragas são agora amplamente utilizadas em escala global (ISAAA, 2023). Há evidências de que as culturas Bt podem reduzir as populações-alvo de pragas em larga escala (WAN et al., 2012; DIVELY et al., 2018; ZHANG et al., 2018), resultando na redução de danos em culturas geneticamente modificadas e não geneticamente modificadas na região.

Nos últimos 30 anos, as características de utilização da tecnologia Bt progrediram de eventos únicos com um modo de ação contra uma ordem de insetos, para eventos piramidais e empilhados contendo múltiplos modos de ação contra a mesma ou diferentes ordens de pragas (ROMEIS et al., 2019). Essa nova estratégia vem sendo utilizada para diminuir o surgimento de casos de resistência pelos insetos.

Há muitos benefícios amplamente aceitos no uso de culturas geneticamente modificadas para controle de insetos, incluindo a capacidade de reduzir o uso de inseticidas menos eficazes e/ou menos ecológicos, alta especificidade em relação a pragas e uma estratégia de manejo de pragas de insetos mais conveniente para os produtores (BROOKES; BARFOOT, 2020). Um benefício adicional observado em alguns sistemas, como o milho Bt nos EUA (HUTCHISON et al., 2010; DIVELY et al., 2018) e o algodão Bt na China (WU et al., 2008) e nos EUA (CARRIÈRE et al., 2003), tem sido a supressão em toda a área das principais pragas alvo que reduziu a pressão das pragas e os custos de insumos tanto para os produtores que adotam culturas Bt como para os não adotantes na mesma área.

No mundo, há um total de 27 países que possuem alguma cultura transgênica liberada para plantio, dentre esses, os cinco países com maior extensão de áreas com culturas biotecnológicas são: Estados Unidos, Brasil, Argentina, Canada e Índia (ISAAA, 2023). No mercado brasileiro são sete plantas transgênicas liberadas para comercialização: algodão, milho, soja, trigo, feijão, cana-de-açúcar e eucalipto (CTNBIO, 2023). A utilização dessas culturas é muito proveitosa, tanto para o ecossistema quanto para o produtor, pois estudos demonstram que o uso da tecnologia transgênica reduz em 37% o uso de defensivos químicos e proporciona um aumento de 22% nos rendimentos e 68% nos lucros (KLÜMPER; QAIM, 2014).

4. Material e Métodos

4.1. População de inseto

A elaboração dos biensaíais de toxicidade com larvas de *Spodoptera cosmioides* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae) contou com a colaboração do Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, Piracicaba-SP, onde as populações estão estabelecidas e mantidas há mais de 10 anos, sendo renovada com população de campo a cada ano. Esse laboratório forneceu os ovos para criação e manutenção da *S. cosmioides* no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), localizado no Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV-UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP.

A criação e manutenção do ciclo do inseto-praga foi realizada em sala com ambiente controlado com temperatura a 26 °C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa entre 80% ($\pm 10\%$) e fotoperíodo de 12:12h (claro:escuro). Para isso, foi utilizado dieta artificial preparada conforme ingredientes descritos na Tabela 1 (GREENE, 1976) e Figura 6.

Tabela 1. Ingredientes utilizados na preparação da dieta artificial.

Ingredientes	Quantidade
Feijão branco	75g
Agar bacteriológico	23g
Germe de trigo	60g
Leite em pó	30g
Farelo de soja	30g
Levedo de cerveja	36,7g
Ácido ascórbico	3,60g
Ácido sórbico	1,80g
Nipagin	3g
Tetraciclina	0,12g
Solução Vitamínica	9mL
Formaldeído	4mL

Fonte: Greene, 1976.

Figura 6: Feijão branco e ágar bacteriológico autoclavados para confecção da dieta artificial.



Fonte: De autoria própria.

Os ovos foram colocados em potes transparentes (500 mL) com a base do pote para cima, preenchida com dieta artificial, e a tampa era sobreposta com papel toalha que recebiam os recortes de folhas de sulfite contendo as posturas dos adultos. Esses potes eram mantidos durante sete dias com as larvas, para em seguida ser realizado a separação.

O próximo passo é separação das lagartas em copos plásticos descartáveis (100 mL) com tampa, não havendo a necessidade de individualizá-las, já que a espécie de *S. cosmioides* não tem o hábito de realizar canibalismo. Dentro de cada copo também é adicionado bloco grande de dieta artificial do tamanho de 1 cm x 1 cm, pois essa espécie é conhecida por consumir uma grande quantidade de alimento durante o seu desenvolvimento larval. Sendo assim, em cada copo plástico recebeu duas lagartas e dois blocos de dieta artificial.

Quando o inseto entrava em fase de pupa, as mesmas eram recolhidas e lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira, em sequência era feito uma segunda lavagem com solução de cobre a 10%, afim de evitar contaminação. Ao final, após o processo de secagem, as pupas eram depositadas em novos potes transparentes envoltos em papel até a emergência dos adultos.

Com a emergência dos adultos, os mesmos são transferidos para gaiolas de ovoposição (40 cm de altura x 30 cm de diâmetro) coberta por tecido “voile”. O interior e o fundo da gaiola foram revestidos com papel sulfite A4 para servir de base para as posturas, sendo os mesmos trocados a cada dois dias. A alimentação dos insetos na fase adulta foi feita dentro da gaiola, com o fornecimento em recipientes plásticos (diâmetro 3,5 cm x 0,5 cm de altura) de uma solução de mel a 15%, embebida em algodão hidrofílico.

4.2. Obtenção dos clones recombinantes

Os clones de *E. coli* linhagem XL-1 Blue, expressando uma única proteína Cry1 de *B. thuringiensis* são pertencentes a coleção do LGBBA. Esses clones são portadores dos genes *Cry1Ba*, *Cry1Ca* e *Cry1Ea*, os quais foram clonados respectivamente nos vetores de expressão: pMH19, pBD150 e pBD160.

A linhagem doadora do gene *Vip3Aa* será a linhagem padrão *B. thuringiensis* HD-125, cedida pela Embrapa, Sete Lagoas-MG. Este gene foi clonado no vetor de expressão pET-SUMO (Invitrogen®), transformado em *E. coli* BL21(DE3) e mantidos em estoque com glicerol estéril (40%) a -80°C para a manutenção do mesmo (BERGAMASCO et al., 2013).

4.3. Indução da expressão da proteína Cry1 recombinante em *E. coli*

Para a obtenção de indução e expressão do gene *cry1* através do cultivo de *E. coli* XL-1 Blue foi utilizado uma alíquota de 12 µl de cada clone em estoque, o qual foi inoculado em uma placa de petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura TB sólido (“Terrific Broth” - TB) (12 g L⁻¹ de triptona; 24 g L⁻¹ de extrato de levedura; 2,31 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 12,54 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 4 mL L⁻¹ de glicerol), acrescido de ampicilina (100 µg mL⁻¹) e ágar (15 g L⁻¹) e incubada por 24 h a 37°C. Na sequência, após o período decorrido, se preparou o pré-inóculo em um erlenmeyer de 250mL, onde uma colônia isolada foi transferida para 20 mL de meio líquido TB com ampicilina (100 µg mL⁻¹) e glicose 2% (v/v), e incubada a 37°C, por 12 h sob agitação de 200 rpm. Após esse período foi preparado o inóculo transferindo-se 2,5 mL do pré-inóculo para outro erlenmeyer com capacidade de 1 L, contendo 250 mL de meio TB com ampicilina (100 µg mL⁻¹) e incubado por 60 h em uma temperatura de 28°C, sob agitação de 200 rpm.

Em sequência, para obtenção das células, foi realizado uma centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) por 8 minutos a 5.930 Xg. Para então ser iniciada a lise celular, com a adição de 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris/HCL pH 8,0; 5 mM EDTA e 100 mM NaCl) por grama de massa celular e submetido a agitação em aparelho tipo 'vórtex'. Seguido da adição de 800 µg de lisozima por grama de massa celular, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente, adicionou-se 4 mg de desoxicolato de sódio para cada grama de "pellet", incubando-se por 10 min a 37 °C. Em seguida foi adicionado 200 µl de solução DNase I (1 mg mL⁻¹), por grama de massa celular, e incubado por 30 min a 37°C sob agitação suave.

Para o completo rompimento celular, as amostras foram submetidas a sonicação (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500) aplicada por 20s, com tempo de intervalo igual, por três vezes consecutivas. O material então foi centrifugado a 39.200 Xg por 10 min a 4°C, descartando o sobrenadante e iniciando o processo de limpeza celular com tampão de lavagem (20 mM Tris/HCl pH 7,5 contendo 1M NaCl e 1% Triton X 100), adicionando-se 20 mL para cada 10g de massa celular, misturando através de agitação em um aparelho do tipo 'vórtex' e centrifugando a 39.200 Xg por 10 min a 4°C. Esse procedimento foi repetido três vezes. Para finalizar a lavagem, o "pellet" foi ressuspensionado e centrifugado por mais três vezes. Na ressuspensão utilizou-se uma solução de PBS (salina tamponada com fosfato - 10mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl) e a centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores.

Para a solubilização das proteínas foi realizado uma adição de 10 mL por grama de massa celular de tampão de solubilização (50 mM NaHCO₃, pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT). Posteriormente, o material foi agitado em aparelho do tipo "vortex" e incubado na posição horizontal à 37 °C, por 2 h, sob agitação de 200 rpm. Por fim, foi realizada uma centrifugação a 39.200 Xg, por 15 min, a 4°C. O sobrenadante contendo a protoxina foi alíquotado e armazenado a - 20°C até o uso.

4.4. Indução da expressão da proteína Vip3Aa recombinante em *E. coli*

Para a indução do gene e expressão da proteína recombinante Vip3Aa, 200 µl do estoque de cada clone foi inoculado em uma placa de Petri com o meio de cultura LB (2x) (20g de triptona, 10g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 15g de

ágar, água destilada q.s.p. 1L, pH 7,2), suplementado com antibiótico canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 16 h à temperatura de 37°C . O pré-inóculo foi preparado a partir da coleta de uma colônia isolada, a qual foi incubada em 10 mL de meio LB (2x) líquido suplementado com o antibiótico canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e mantido sob agitação de 200 rpm na temperatura de 37°C por 16 h.

Após esse período, 2,5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 250 mL de meio líquido LB (2x), suplementado com o antibiótico canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e novamente levado a 37°C sob agitação de 200 rpm até que a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ alcança-se um valor entre 0,5 e 0,8. A indução da expressão dos genes foi efetuada com a adição de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1mM e mantidas a 25°C durante 24 h em agitação constante de 190 rpm.

As células foram coletadas por centrifugação a $7.400 \times g$ a 4°C por 30 min e ressuspendidas com 12,5 mL de Tampão pET SUMO (50 mM fosfato de potássio, pH 7,8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10 % glicerol; 0,5 % Triton x 100; 10 mM imidazol) sob agitação vigorosa no aparelho tipo 'vórtex'. Para o rompimento das células foi adicionado 375 μL de lisozima (100 mg mL^{-1}), 125 μL de DNase I (1 mg mL^{-1}) e 5 μL de PMSF (Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, em seguida, incubadas por 30 min sob agitação 100 rpm a 37°C . Posteriormente, as amostras foram submetidas à sonicação (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), com potência de saída de 40 Watts por 180 s, sendo divididas em 3 etapas de 60 s com intervalos de 15 s. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a $7.400 \times g$ a 4°C por 20 min e utilizados na análise de expressão e nos bioensaios.

No intuito de confirmar a expressão proteica, uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) não transformada também foi submetida a todas as etapas de indução e extração proteica, juntamente aos clones recombinantes, para que seja considerada uma amostra de controle negativo.

4.5. Análise das proteínas por SDS-PAGE

A análise da produção das proteínas de interesse foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando-se mini-gel (60 x 80 x 1,0 mm) pelo sistema de corrida Mini PROTEAN II (Bio-Rad). O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 30: 0,8%) e 1% de SDS e de 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 0,5% SDS. A eletroforese foi realizada

em tampão Tris-Glicina (50 mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 30 mA e 200V por 90 min em temperatura ambiente.

Para amostras de 10 µL, foram adicionados 10 µL de tampão de amostra Laemmli 4X [Tris-HCl 0,125 M (pH 6.8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,02% (m/v)]. A mistura foi aquecida por cinco minutos a 100°C e aplicada em dois géis igualmente juntamente com o marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). Após o período de corrida das amostras nos géis, as bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas pela coloração dos géis com solução de Coomassie-BrilliantBlue R-250 0,1% (m/v) dissolvido em solução fixadora [metanol 50% (v/v) e Ácido Acético 10% (v/v)], deixados sob baixa agitação por até 20 min. O gel foi descorado por solução descorante [metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)] sob baixa agitação lenta por 1 h. Os géis foram conservados em água destilada para serem analisados e fotodocumentados.

A massa molecular das mesmas foi aferida comparando-se os perfis àquele do marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). A quantificação das proteínas recombinantes de Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa nos lisados de *E.coli* foi feita pelo método de densitometria. Para isso, foram preparados géis de poliacrilamida contendo cinco diferentes concentrações de soroalbumina bovina (BSA) (0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg mL⁻¹) e as respectivas proteínas. Estas foram quantificadas com o auxílio do programa ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Suécia), sendo o padrão para quantificação da concentração final a soroalbumina bovina (BSA). Para não estourar a curva de BSA as proteínas foram diluídas 4 vezes.

4.6. Bioensaios com *S. cosmioides* para estimar as CL₅₀ e CL₉₀

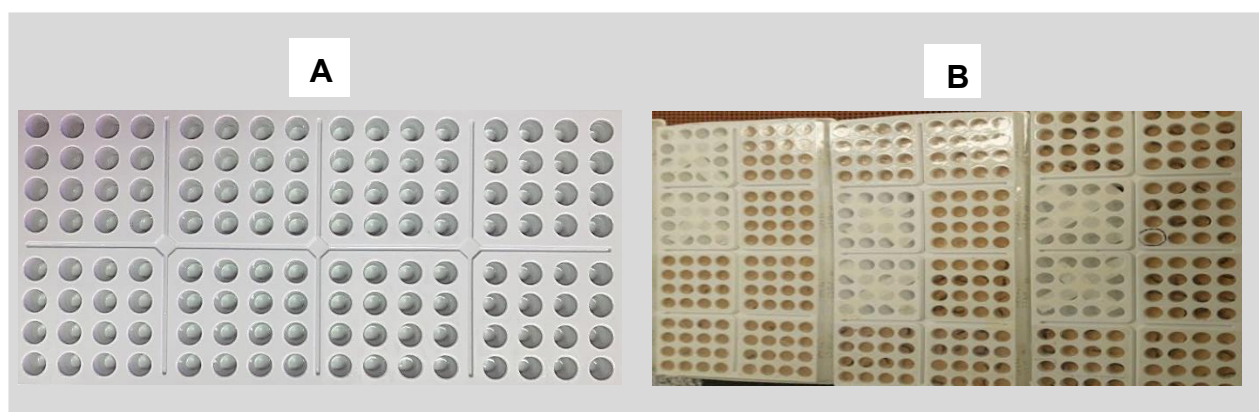
Os bioensaios foram realizados em placas de poliestireno com 128 poços de 2 cm² (Bio-Assay Tray – Bio-Serv) contendo dieta artificial para *S. cosmioides* (Figura 7). As protoxinas obtidas por meio da extração proteica dos clones de *E. coli* foram diluídas em sete concentrações. De acordo com ensaios preliminares, as concentrações utilizadas para as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa foram (0,5; 1; 5; 25; 50; 250 e 500 ng cm⁻²), já para as proteínas Cry1Ba e Cry1Ea foi utilizado as seguintes concentrações (25; 50; 100; 200; 400; 800 e 1.600 ng cm⁻²). Em cada

poço das placas de bioensaios contendo dieta artificial foi aplicado, sobre a superfície da dieta, um volume constante de 50 μL de protoxina de cada proteína.

Após a completa absorção do lisado proteico na dieta artificial, uma única lagarta neonata foi acondicionada em cada poço. Cada parcela foi constituída de 16 lagartas neonatas de *Spodoptera cosmioides*, sendo utilizado três repetições por concentração, totalizando 48 lagartas/concentração. As placas foram seladas com filme de vedação de plásticos atóxicos, contendo microfuros em cada poço para permitir a troca de oxigênio (Figura 7). Alguns tratamentos foram utilizados como controle negativo para a mortalidade natural, sendo estes compostos de: água deionizada, tampão de solubilização utilizado para lisados contendo proteínas Cry1, tampão pET SUMO utilizado para lisados contendo proteína Vip3Aa e lisados bacterianos provenientes de células de *E. coli* BL21(DE3) não transformadas.

As placas de bioensaios foram acondicionadas em sala climatizada apresentando 26°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa de 80 ($\pm 10\%$), e fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro). A mortalidade foi registrada após sete dias de implantação dos bioensaios. O software Polo-Plus (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) foi usado para estimar os valores de CL_{50} e CL_{90} em bioensaios de concentração-resposta por análise Probit (FINNEY, 1971) e para obter os valores de inclinação da reta e o qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativa se as estimativas de CL_{50} e CL_{90} não estivessem dentro dos intervalos de confiança.

Figura 7: Materiais usados nos bioensaios. (A) Bandeja de poliestireno de 128 poços. (B) Bandeja contendo dieta artificial com as proteínas de *Bacillus thuringiensis* contendo filme de vedação onde as larvas de *S. cosmioides* permaneceram em ambiente controlado durante 7 dias.



Fonte: De autoria própria.

4.7. Ensaios de interação entre as proteínas frente a *S. cosmioides*

Os testes para comparar os valores observados e esperados foram realizados simultaneamente com as combinações entre as proteínas de *Bacillus thuringiensis*, a saber: Cry1Ba/Cry1Ca; Cry1Ba/Cry1Ea; Cry1Ca/Cry1Ea; Vip3Aa/Cry1Ba; Vip3Aa/Cry1Ca e Vip3Aa/Cry1Ea. Inicialmente, para procurar interações entre as proteínas foi realizado um teste em uma única concentração de cada proteína. A concentração de cada protoxina na mistura foi selecionada de forma que fosse a de seu respectivo valor de CL₅₀. A mortalidade esperada na ausência de interações foi estimada assumindo a hipótese de ação independente simples (FINNEY, 1971). Sob esta hipótese, a proporção (P) de larvas morrendo por exposição a uma mistura de duas toxinas foi calculada como:

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2) \quad (1)$$

onde P₁ e P₂ representam as proporções de larvas mortas para as toxinas 1 e 2, respectivamente. Esta fórmula é equivalente à equação 11.33 de Finney (1971). Usamos os valores de mortalidade observados obtidos no valor teórico de CL₅₀ com toxinas únicas para calcular a mortalidade esperada de misturas de toxinas. A significância dos desvios entre a mortalidade esperada e observada foi determinada usando o teste exato de Fisher.

Um segundo teste para interações foi realizado usando ensaios de concentração-resposta em que as proporções das duas proteínas na mistura correspondiam a razão entre seus respectivos valores de CL₅₀. A mortalidade esperada na ausência de interações foi estimada assumindo a hipótese de ação similar simples Finney (1971) usando a fórmula de Tabashnik (1992), que deriva da equação 11.8 de Finney (1971):

$$CL_{50}(m) = \frac{1}{\frac{ra}{CL_{50(a)}} + \frac{rb}{CL_{50(b)}}} \quad (2)$$

Onde, a CL₅₀(m) representa a estimativa de concentração letal média da mistura de proteínas; ra e rb são as proporções relativas dos componentes a e b

na mistura e a $CL_{50}(a)$ e $CL_{50}(b)$ são as concentrações letais individuais de cada proteína.

Depois de estimada a $CL_{50}(m)$ calculou-se a razão entre a CL_{50} esperada sobre a CL_{50} observada ($CL_{50}(esp)/CL_{50}(obs)$), 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).

5. Resultados

5.1. Expressão das proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa

As proteínas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* foram detectadas por meio das bandas de massa molecular de cerca de 140, 134 e 133 kDa para Cry1Ba, Cry1Ca e Cry1Ea, respectivamente (Figura 1A) e de 100 kDa para Vip3Aa (Figura 1B). Para a proteína Vip3Aa foi adicionado o peso de 13 kDa referente à cauda de 6 histidinas (6xHis) e a proteína SUMO, ambas adicionadas pelo vetor de expressão pET SUMO na região N-terminal da proteína.

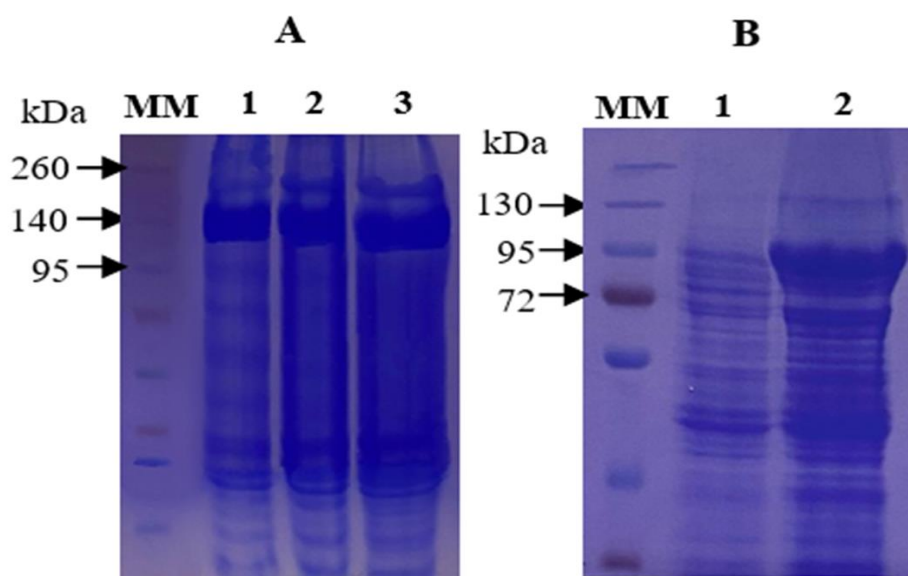


Figura 1. Detecção das proteínas Cry1 e Vip3Aa em gel de SDS-PAGE 12%. (A) MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = Cry1Ba; 2 = Cry1Ca; 3 = Cry1Ea. (B) MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = *E. coli* BL21(DE3) não recombinante; 2 = Vip3Aa.

5.2. Quantificação das proteínas Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa

Após a obtenção da indução da expressão das proteínas e corrida eletroforética, as mesmas foram quantificadas em mg mL^{-1} utilizando a densitometria através do “ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Suécia)”, utilizando a já conhecida curva de BSA (soro Albumina Bovina) como padrão de comparação, para uso das proteínas nos bioensaios. Foram obtidas as seguintes concentrações: $0,60 \text{ mg mL}^{-1}$ (Cry1Ba); $0,52 \text{ mg mL}^{-1}$ (Cry1Ca) e $0,71 \text{ mg mL}^{-1}$ (Cry1Ea) (Figura 2A) e $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ (Vip3Aa) (Figura 2B).

Os valores obtidos pela quantificação multiplicado pelo fator de diluição (4 vezes) se mostraram adequados e viabilizaram a diluição das proteínas em suas respectivas concentrações teste, para preparo do bioensaio de toxicidade.

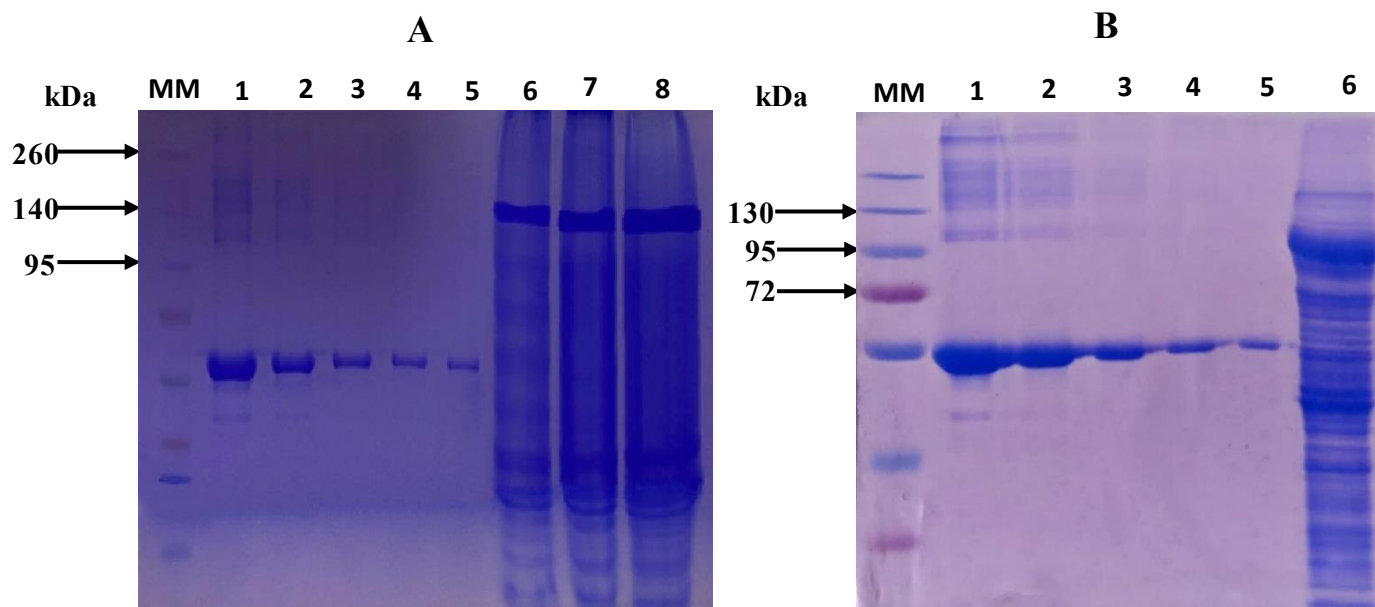


Figura 2. Quantificação das proteínas Cry1 e Vip3Aa em gel SDS-PAGE 12%. (A) MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1, 2, 3, 4 e 5 = BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg mL⁻¹, respectivamente; 6 = Cry1Ba; 7 = Cry1Ca; 8 = Cry1Ea. (B) MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1, 2, 3, 4 e 5 = BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg mL⁻¹, respectivamente; 6 = Vip3Aa.

5.3. Bioensaios de toxicidade com *S. cosmioides*

Através dos bioensaios realizados de concentração-resposta foi possível estimar os valores de CL₅₀ das quatro toxinas, sendo os resultados mostrados na Tabela 2. Para CL₉₀ não foi possível estimar os valores de duas das quatro proteínas testadas. As toxicidades de diferentes toxinas testadas contra larvas neonatas de *S. cosmioides* variaram consideravelmente, com valores de CL₅₀ variando de 3,46 a 2096,9 ng cm⁻², já para CL₉₀ a variação foi de 53,13 e 170,81 ng cm⁻² para as proteínas Vip3Aa e Cry1Ca, respectivamente, e para as proteínas Cry1Ba e Cry1Ea não foi possível estimar a CL₉₀ mesmo em concentrações tão altas quanto 1.600 ng cm⁻².

As proteínas de *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca e Vip3Aa foram promissoras quanto a toxicidade a larvas de *S. cosmioides*, apresentando similaridade ao nível

de CL₅₀ e CL₉₀. As toxinas Cry1Ba e Cry1Ea apresentaram baixa toxicidade contra larvas do referido inseto-praga, uma vez que a estimativa da CL₅₀ foi muito elevada e significativamente diferente de Cry1Ca e Vip3Aa, e para CL₉₀ não foram observadas estimativas (Tabela 2). Os controles negativos não causaram mortalidade nas condições dos ensaios.

Tabela 3. Estimativa das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) das proteínas Cry1 e Vip3Aa sobre larvas neonatas de *Spodoptera cosmioides*.

Proteínas	CL ₅₀ (IC min.-max.) ^a	CL ₉₀ (IC min.-max.) ^a	(b ± SE) ^b	(X ²) ^c
Cry1Ba	2096,9 (1216,3 - 6867,8)b	NE	1,15 ± 0,26	0,43
Cry1Ca	3,46 (1,30 - 7,09)a	170,81 (67,26 - 836,80)a	0,75 ± 0,09	5,52
Cry1Ea	1978,6 (1156,3 - 5554,1)b	NE	1,12 ± 0,22	2,18
Vip3Aa	4,09 (1,32 - 9,64)a	53,13 (20,53 - 188,83)a	1,15 ± 0,11	2,25

^aValores expressos em ng cm⁻² com intervalo de confiança (IC 95%).

^bCoefficiente angular da reta e Erro padrão.

^cQui-quadrado (P>0,05).

NE: Não Estimado. Menos de 90% de mortalidade foi obtida mesmo em concentrações tão altas quanto 1.600 ng cm⁻².

5.4. Determinação da taxa de mortalidade

Diferentes combinações de proteínas Cry1 e Vip3Aa foram testadas em uma única concentração (a de seus respectivos valores de CL₅₀), e a mortalidade observada foi comparada com a mortalidade esperada, assumindo nenhuma interação (Tabela 3). Pelo teste de mortalidade foi possível verificar que as combinações das toxinas Cry1Ba/Cry1Ea, Cry1Ca/Cry1Ea e Vip3Aa/Cry1Ca apresentaram valores de mortalidade observada acima do que era esperado, sugerindo possível mecanismo de sinergismos entre as interações (Tabela 3).

Interação significativa foi encontrada com a combinação de Cry1Ba com Cry1Ca (P<0,05). Nesse caso, essa interação foi negativa (ou seja, antagônica), pois a mortalidade observada foi menor do que era esperada. Outras interações antagônicas foram encontradas entre Vip3Aa/Cry1Ba e Vip3Aa/Cry1Ea, tais combinações produziram baixa efeito de toxicidade nas larvas neonatas de *S. cosmioides*.

Tabela 3. Mortalidade de larvas neonatas de *Spodoptera cosmioides* a protoxinas Cry1 e Vip3Aa analisadas de forma isoladas e combinadas.

Proteínas/ Combinações	(Concentrações) ^a	n	Mortalidade (%)		Teste Exato de Fisher ^d	X ² (p) ^e
			(Observada) ^b	(Esperada) ^c		
Vip3Aa	4,09	48	53	50		
Cry1Ba	2096,9	48	43	50		
Cry1Ca	3,46	48	51	50		
Cry1Ea	1978,6	48	46	50		
Cry1Ba/Cry1Ca	2096,9+3,46	48	41	72	0,0019**	9,478 (0,0021**)
Cry1Ba/Cry1Ea	2096,9+1978,6	48	75	69	0,3252	0,464 (0,4959)
Cry1Ca/Cry1Ea	3,46+1978,6	48	83	73	0,2334	0,943 (0,3314)
Vip3Aa/Cry1Ba	4,09+2096,9	48	69	73	0,4113	0,2017 (0,6534)
Vip3Aa/Cry1Ca	4,09+3,46	48	80	76	0,4043	0,236 (0,6272)
Vip3Aa/Cry1Ea	4,09+1978,6	48	71	74	0,5000	0,0522 (0,8204)

^aAs concentrações de proteínas foram escolhidas de modo a igualar seus respectivos valores de CL₅₀. Os valores são expressos em ng cm⁻².

^bCada valor representa a média de três réplicas de 16 larvas por réplica (n = 48).

^cMortalidade esperada considerando ação simples e independente.

^dValores em q P>0,05 indicam diferenças não significativas.

^eQui-quadrado e valores de P.

5.5. Efeito de combinação de toxinas de *B. thuringiensis* no controle de *S. cosmioides*

As interações de proteínas propostas na determinação da taxa de mortalidade foram investigadas, adicionalmente, por análises de concentração-resposta, na busca de confirmar as possíveis interações entre as toxinas Cry e Vip3Aa. As proporções das duas proteínas usadas nas misturas eram tais que correspondiam à proporção entre seus respectivos valores de CL₅₀. Os valores de CL₅₀ observados foram comparados com os valores esperados, assumindo que não há interação (Tabela 4).

Foram observadas interações sinérgicas entre Cry1Ba/Cry1Ea, Cry1Ca/Cry1Ea e Vip3Aa/Cry1Ca (FS = 1,04; 1,10 e 1,36, respectivamente). A CL₅₀ observada das combinações Cry1Ba/Cry1Ca, Vip3Aa/Cry1Ba e Vip3Aa/Cry1Ea, foi maior do que era esperada, demonstrando um antagonismo para essas interações de proteínas, com valores FS abaixo de 1,0 (Tabela 4).

Tabela 4. Interações entre proteínas Cry1 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis* no controle de larvas neonatas de *Spodoptera cosmioides*.

Proteínas	CL ₅₀ (IC min.-max.) ^a Observada	CL ₅₀ (Esperada) ^b	FS ^c	(b ± SE) ^d	(X ²) ^e
Cry1Ba/Cry1Ca (500:1)	13,34 (7,35 - 28,84)	1,89	0,14	0,72 ± 0,13	1,65
Cry1Ba/Cry1Ea (1:1)	974,35 (598,81 - 2937,73)	1017,9	1,04	1,27 ± 0,30	0,16
Cry1Ca/Cry1Ea (1:500)	1,66 (0,46 - 3,74)	1,84	1,10	0,98 ± 0,13	3,70
Vip3Aa/Cry1Ba (1:500)	4,88 (2,57 - 9,01)	2,07	0,42	0,70 ± 0,12	1,24
Vip3Aa/Cry1Ca (1:1)	1,38 (0,57 - 2,52)	1,87	1,36	0,72 ± 0,12	2,06
Vip3Aa/Cry1Ea (1:500)	2,61 (1,27 - 4,65)	2,01	0,77	0,72 ± 0,12	1,60

^aValores expressos em ng cm⁻² com intervalo de confiança (IC 95%).

^bMortalidade esperada considerando simples ação similar.

^cFS: Fator de Sinergismo, calculado como a razão da LC₅₀ esperada sobre a LC₅₀ Observada.

^dCoefficiente angular da reta e Erro padrão.

^eQui-quadrado (P>0,05).

6. Discussão

O controle biológico a base de Bt (biopesticidas ou expressas em culturas Bt) são geralmente eficientes quando larvas de ínstaras iniciais estão presentes, pois as larvas mais velhas são mais tolerantes (SANAHUJA et al., 2011). Portanto, bioensaios para determinar o potencial entomopatogênico de proteínas de *B. thuringiensis* são realizados com larvas neonatas (primeiro ínstar) e normalmente com proteínas inseticidas individuais, sendo útil para estimar sua contribuição teórica para o controle de pragas. No entanto, sabe-se que algumas combinações de proteínas inseticidas podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos (LEMES et al., 2014; LI; BOUWER, 2014; YANG et al., 2018; BARANEK et al., 2020). Portanto, ao escolher combinações de genes que codificam proteínas inseticidas a serem expressas em plantas, é sensato considerar as possíveis interações entre as proteínas inseticidas e as diferenças no seu modo de ação.

Dentre as proteínas testadas no presente estudo, as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa foram as mais ativa contra *S. Cosmioides* tanto em nível de CL₅₀, quanto em CL₉₀. Ambas foram significativamente diferentes que as proteínas Cry1Ba e Cry1Ea, sendo, aproximadamente, 500 vezes mais tóxicas no nível de CL₅₀. Em nível de CL₉₀, as proteínas Cry1Ba e Cry1Ea não obtiveram estimativas (Tabela 2). Nossos dados estão de acordo com aqueles relatados por outros autores. Em um estudo que avaliou a toxicidade de proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 para *Spodoptera*

frugiperda, as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa foram as mais tóxicas frente as larvas do referido inseto-praga (FIGUEIREDO et al., 2019). Bergamasco et al. (2013) estimaram um valor de CL₅₀ de 2,78 ng cm⁻² para Vip3Aa frente a larvas neonatas de *S. cosmioides*, que é mais próximo do valor encontrado no presente estudo. Esses dados indicam a eficiência de uso isolado das proteínas Cry1Ca e Vip3Aa no controle de *S. cosmioides*.

Como segunda geração de proteínas inseticidas, o desenvolvimento das Proteínas Inseticidas Vegetativas (Vips) vem ganhando cada vez mais destaque nas pesquisas com proteínas Bt. Até o momento, quatro grupos de toxinas Vip eficazes foram encontrados (CRICKMORE et al., 2020; SYED et al., 2020). No entanto, devido ao modo de ação diferente e à ausência de semelhança na sequência de aminoácidos com as proteínas cristalinas inseticidas, as Vips são boas candidatas para evitar o surgimento da resistência. Relatos anteriores mostraram que a proteína Vip3Aa em combinação com outras toxinas pode melhorar a toxicidade ao inseto alvo por meio de sinergismo e consequentemente, retardar o desenvolvimento de resistência para algumas espécies de insetos-praga (BERGAMASCO et al., 2013; CRIALESI-LEGORI et al., 2014; LEMES et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2019). De acordo com esses achados, analisamos o sinergismo entre as proteínas Cry1 e Vip3 pelo método descrito por Tabashnik (1992), por ser adequado para análise de toxinas semelhantes ou diferentes.

Desde a descoberta das toxinas Vip, foi sugerido um possível sinergismo entre elas e as delta-endotoxinas, devido essas toxinas possuírem modo de ação diferentes e consequentemente, se ligarem a receptores distintos no intestino médio do inseto (HERRERO et al., 2016). A sinergia e a alta atividade da composição contendo toxinas Cry1 e Vip3Aa contra larvas neonatas de *S. cosmioides* foram observadas em doses muito mais baixas do que para toxinas administradas separadamente, com exceção das combinações entre Cry1Ba/Cry1Ca, Vip3Aa/Cry1Ba e Vip3Aa/Cry1Ea que apresentaram um efeito antagônico e uma taxa de mortalidade observada menor do que a taxa esperada (Tabelas 3 e 4). Vários mecanismos podem estar associados ao antagonismo, é possível que as proteínas interajam fisicamente de uma maneira que se sequestram, formando um complexo que produz ambas as proteínas inativas. Alternativamente, a formação do complexo poderia apenas mascarar um epítipo

na proteína mais tóxica, impedindo-a de interagir com o receptor de membrana. O antagonismo também pode resultar de interações estéricas, onde ambas as toxinas se ligam a diferentes epítomos na mesma molécula de membrana (LEE et al., 1996; RINCO'N-CASTRO et al., 1999). Portanto faz-se necessário novos estudos para determinar o motivo do efeito antagônico entre Cry1Ba/Cry1Ca, Vip3Aa/Cry1Ba e Vip3Aa/Cry1Ea observado em *S. cosmioides*.

O efeito sinérgico e antagônico da combinação Vip3 e proteínas Cry foi observado para algumas espécies de insetos-praga, e esse tipo de interação depende das proteínas e da espécie de inseto: *Anticarsia gemmatilis*, *Chrysodeixis includens* (CRIALES-LEGORI et al., 2014), *S. albula*, *S. cosmoides*, *S. frugiperda* (BERGAMASCO et al., 2013), *S. exigua*, *C. suppressalis* (YU et al. 2012), *Diatraea saccharalis* (LEMES et al., 2014) e *S. frugiperda* (FIGUEIREDO et al., 2019). A diversidade de respostas demonstra a necessidade de considerar os resultados dos bioensaios de interação entre as toxinas para uma eficiente recomendação de combinação promissora. Além disso, o estudo da interação oligomérica entre Vip3 e Cry1 pode ajudar a esclarecer o efeito da combinação dessas proteínas nas larvas em trabalhos futuros.

Estudos *in silico* revelou que a proteína de fusão Vip3Aa-Cry1Ac possui forte afinidade contra receptores de *Agrotis ipsilon*, *Pectinophora gossypiella*, *S. exigua* e *S. litura*. Portanto, deve ter alta atividade contra receptores de células de lepidópteros em geral e, conseqüentemente, tem potencial para ser uma proteína inseticida eficiente de amplo espectro (AHMAD et al., 2015). No entanto, o gene de fusão que codifica Cry1Ac-Vip3Aa14 levou à aquisição de proteína quimérica, que reteve a toxicidade de Cry1A, mas perdeu parcialmente a de Vip3Aa14 quando testada contra *Helicoverpa armigera*, *S. litura* e *Plutella xylostella* (SARASWATHY et al., 2008). Outra proteína quimérica obtida após a fusão de Vip3Aa7 com o terminal N de Cry9Ca melhorou a toxicidade contra larvas de *P. xylostella* (DONG et al., 2012).

Em nosso estudo, as combinações testadas apresentaram comportamento sinérgico e antagônico (Tabela 4). No caso de quantidade elevada de CL₅₀ individual de uma ou ambas as toxinas combinadas (Tabela 2 e 4), não foi observado fenômeno sinérgico. Provavelmente houve um dano significativo às células epiteliais intestinais causado por um componente e o segundo aditivo teve pouco

significado. O fato de combinação de proteínas atuarem de forma sinérgica ou antagonista frente a larvas neonatas de *S. cosmioides* pode indicar que existem diferentes tipos de interações dentro do hospedeiro.

O desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a insetos que expressam os genes que codificam a toxina *B. thuringiensis* proporcionou controle eficaz contra pragas importantes e redução de custos associados à pulverização (ABBAS, 2018). No entanto, a pressão constante das plantas com apenas uma toxina sobre os insetos causa a ocorrência de resistência. Tabashnik et al. (2013) revelaram uma eficácia reduzida das culturas Bt para algumas populações de espécies de pragas examinadas, em comparação com dados de 2005. Para retardar o início da resistência em insetos, podem ser utilizadas culturas piramidadas. A expressão simultânea de Vip3A e diferentes proteínas Cry em plantas é uma característica benéfica porque as culturas são mais eficazmente controladas contra pragas e, adicionalmente, o risco de desenvolvimento de resistência é reduzido, uma vez que as proteínas Vip ocupam diferentes receptores no epitélio intestinal dos insetos da ordem lepidóptera (CHAKROUN; FERRÉ, 2014; HERRERO et al., 2016; SYED et al., 2020; GUPTA et al., 2021). Sendo assim, acreditamos que a adição de toxina Vip3Aa combinada com proteína Cry1Ca e combinações entre delta-endotoxinas que não competem pelo mesmo sítio de ligação, tais como Cry1Ba/Cry1Ea e Cry1Ca/Cry1Ea podem contribuir para o melhor controle das larvas de *S. cosmioides* e reduz o risco de desenvolvimento de resistência.

7. Conclusão

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, de forma isolada, as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa demonstraram eficiência no controle de larvas neonatas de *S. cosmioides*. As interações envolvendo as combinações de proteínas Cry1Ba/Cry1Ea, Cry1Ca/Cry1Ea e Vip3Aa/Cry1Ca apresentaram um efeito sinérgico, podendo ser utilizadas no desenho de novas combinações de genes piramidais em culturas geneticamente modificadas, para o controle do referido inseto praga, bem como para manejo da resistência. Já as interações entre Cry1Ba/Cry1Ca, Vip3Aa/Cry1Ba e Vip3Aa/Cry1Ea demonstraram um antagonismo, não sendo recomendado para compor uma planta Bt piramidada. O fato das combinações entre as toxinas Bt apresentarem interações sinérgicas e antagônicas

sugerem que há diferentes tipos de interações dentro do hospedeiro, e consequentemente diferente modo de ação das proteínas testadas. Compreender o modo de ação das proteínas Bt é fundamental para aumentar e sustentar a sua eficácia contra pragas. Para tanto, usar proteínas que se ligam a locais independentes é uma estratégia cumulativa que pode melhorar o desempenho dos programas integrados de gestão de pragas.

8. Referências Bibliográficas

ABBAS, M.S.T. Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 28, n. 52, 2018. Doi: 10.1186/s41938-018-0051-2

AGBIOINVESTOR - AGRICULTURAL MARKET INTELLIGENCE; AGROCHEMICAL TRADE DATABASE. GM Monitor. Disponível em: <https://gm.agbioinvestor.com/>. Acessado em 18 out, 2023.

AHMAD, A.; JAVED, M.R.; RAO, A.Q.; KHAN, M.A.U.; AHAD, A.; DIN, S.U.; et al. In-Silico Determination of Insecticidal Potential of Vip3Aa-Cry1Ac Fusion Protein Against Lepidopteran Targets Using Molecular Docking. **Front Plant Sci**. 2015; 6: 1081. Doi: 10.3389/fpls.2015.01081

ANGSUTHANASOMBAT, C.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. **FEMS Microbiol. Lett.** 94, p. 63-68. 1992. Doi: 10.1016/0378-1097(92)90584-b

ARONSON, A. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 59, n. 3, p. 417–425, 2002. Doi: 10.1007/s00018-002-8434-6

BALE, J.S.; VAN LENTEREN, J.C.; BIGLER, F. Biological control and sustainable food production. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 363, p. 761-776. 2008. Doi: 10.1098/rstb.2007.2182

BANERJEE, R.; HASLER, J.; MEAGHER, R.; NAGOSHI, R.; HIETALA, L.; HUANG, F.; et al. Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Scientific Reports**. v.7, 10877, 2017. Doi: 10.1038/s41598-017-09866-y

BARANEK, J.; BANASZAK, M.; LORENT, D.; KAZNOWSKI, A.; KONECKA, E. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2 and Vip3 toxin combinations in *Spodoptera exigua* control: highlights on synergism and data scoring. **Entomologia Generalis**. v. 41 n. 1, p. 71–82, 2020. Doi: 10.1127/entomologia/2020/0995

- BARANEK, J.; JAKUBOWSKA, M.; GABALA, E. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* towards *Agrotis exclamationis* larvae—A widespread and underestimated pest of the Palearctic zone. **PLoS ONE**. 18(3): e0283077. 2023. Doi: 10.1371/journal.pone.0283077
- BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORESTI, J.; RINGENBERG, R. Biologia e exigências térmicas de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**. 31:49-54. 2002. Doi:10.1590/S1519- 566X2002000100007
- BERGAMASCO, V.B.; MENDES, D.R.P.; FERNANDES, O.A.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**. 2013; v. 112, n.2, p. 152-158. Doi: 10.1016/j.jip.2012.11.011
- BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**. 1915; v. 2, n. 1 p. 29-56. doi: 10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x
- BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.2, p.29-56, 1915. Doi: 10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x
- BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; et al. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided bt maize hybrids in Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0140130
- BRAVO, A.; PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GARCIA-GÓMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERÓN, M. Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action In: FIUZA, L.M.; POLANCZYK, R.A. CRICKMORE, N. (eds) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***. Springer, Cap.4, p. 53-66, 2017. Doi: 10.1007/978-3-319-56678-8_4
- BROOKES, G.; BARFOOT, P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996–2018: impacts on pesticide use and carbon emissions. **GM Crops & Food**. v. 11, n.4. 2020. Doi: 10.1080/21645698.2020.1773198
- BROWN, T. A. **Gene Cloning & DNA Analysis an introduction**, 6ª edição, Editora Wiley Blackwell, 338p. 2010.
- BUENO, A.F.; PANIZZI, A.R.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; SOSA-GOMEZ D.R.; GAZZONI, D.L.; et al. Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil, pp. 37–74 In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. [Eds], **SOJA: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. 1ed. Embrapa, Brasília, Distrito Federal, Brasil. 2012.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B.E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature biotechnology**. 33:161-168. 2015. Doi: 10.1038/nbt.3099

CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.S.M.; ANTILLA, L.; WHITLOW, M.; DENNEHY, T.J.; TABASHNIK, B.E. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 100, p. 1519–1523. 2003. doi: 10.1073/pnas.0436708100

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. *In vivo* and *in vitro* binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites using (125)I-radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**. 80(20), 6258–6265. 2014. Doi: 10.1128/AEM.01521-14

CRIALESI-LEGORI, P.C.B.; DAVOLOS, C.C.; LEMES, A.R.N.; MARUCCI, S.C.; LEMOS, M.V.F.; FERNANDES, O.A., et al. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesq. agropec. bras., Brasília**. v.49, n.2, p.79-87, 2014. Doi: 10.1590/S0100-204X2014000200001

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62, p. 807-813. 1998. Doi: 10.1128/MMBR.62.3.807-813.1998

CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T.R.; BONNING, B.C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. 2020; v. 186:107438. Doi: 10.1016/j.jip.2020.107438

CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T.R.; BONNING, B.C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 186, 107438. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>

CRICKMORE, N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso em: 19 set. 2023.

DIVELY, G.P.; VENUGOPALA, P.D.; BEAN, D.; WHALEN, J.; HOLMSTROM, K.; KUHAR, T.P.; et al. Hutchison Regional pest suppression associated with widespread Bt maize adoption benefits vegetable growers. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 115, p. 3320-3325. 2018. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.172069211>

DONG, F.; SHI, R.; ZHANG, S.; ZHAN, T.; WU, G.; SHEN, J. et al. Fusing the vegetative insecticidal protein Vip3Aa7 and the N terminus of Cry9Ca improves toxicity against *Plutella xylostella* larvae. **Appl Microbiol Biotechnol** 96: 921–929, 2012. Doi: 10.1007/s00253-012-4213-y

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: https://www.cnpa.embrapa.br/noticias/2013/noticia_20130807.html. Acessado em: 26 set, 2023.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 1 out. 2014. Doi: 10.1016/j.cropro.2014.06.019

FERNÁNDEZ-CHAPA, D.; JESICARAMÍREZ-VILLALOBOS, J.; GALÁN-WONG, L. Toxic Potential of *Bacillus thuringiensis*: An Overview. **IntechOpen**. 2019. Doi: 10.5772/intechopen.85756

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annu Rev Entomol.** 47:501-533. 2002. Doi: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145234

FINNEY, D.J. A statistical treatment of the sigmoid response curve. **Probit analysis. Cambridge University Press, London**, v. 633, 1971.

FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; McCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; et al. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Technology**. 5, p. 807-813. 1987. Doi: doi.org/10.1038/nbt0887-807

GAO, Y.Y.H.; FU, Q.; ZHANG, J.O.B.; LAI, F.; PENG, Y. ZHANG, Z. Screen of *Bacillus thuringiensis* toxins for transgenic rice to control *Sesamia inferens* and *Chilo suppressalis*. **J. Invertebr. Pathol.** 105, p. 11-15. 2010. Doi: 10.1016/j.jip.2010.05.002

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-Evolved Resistance to Bt Maize by Western Corn Rootworm. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1–7, 29 jul. 2011. Doi: 10.1371/journal.pone.0022629

GASSMANN, A.J.; PETZOLD-MAXWELL, J.L.; CLIFTON, E.H.; DUNBAR, M.W.; HOFFMANN, A.M.; INGBER, D.A; et al. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 111, 5141–5146. 2014. Doi: 10.1073/pnas.131717911

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of economic entomology**. V. 69, n. 4, p. 487-488. 1976. Doi: 10.1093/jee/69.4.487

GUPTA, M.; KUMAR, H.; KAUR, S. Vegetative Insecticidal Protein (Vip): A Potential Contender From *Bacillus thuringiensis* for Efficient Management of Various Detrimental Agricultural Pests. **Front Microbiol.** 12: 659736. 2021. Doi: 10.3389/fmicb.2021.659736

GURR, G.M.; YOU, M. Conservation biological control of pests in the molecular era: new opportunities to address old constraints. **Front. Plant Sci.** v. 6 p. 1255. 2016. Doi: doi.org/10.3389/fpls.2015.01255

HERRERO, S.; BEL, Y.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J. Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. **Current Opinion in Insect Science**. v. 15, p. 89-96. 2016. Doi: 10.1016/j.cois.2016.04.006

HERRERO, S.; GONZÁLEZ-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**. 384(3), 507–513. 2004. Doi:10.1042/bj20041094

HOFFMANN, L.V.; KRESIC, I.B.; PAZ, J.G.; BELA, D.A.; TCACH, N.E.; LAMAS, F.M.; et al. **Cotton production in Brazil and other South American countries**. In: JABRAN, K.; CHAUHAN, B.S. (eds.) Cotton Production. West Sussex: John Wiley & Sons Ltda., p. 277-295. 2019. Doi: 10.1002/9781119385523.ch13

HUTCHISON, W. D.; BURKNESS, E. C.; MITCHELL, P. D.; MOON, R. D.; LESLIE, T. W.; FLEISCHER, S. J.; et al. Area-wide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**. 330, p. 222-225. 2010. doi: 10.1126/science.1190242

IBARGUTXI, M.A.; MUÑOZ, D.; RUIZ de ESCUDERO, I.; CABALLERO, P. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab, and Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). **Biol. Control**. 47, p. 89-96. 2008. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2008.07.003

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. GM APPROVAL DATABASE. Disponível em: <https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>. Acessado em: 18 out, 2023.

JAKKA, S.R.K.; SHRESTHA, R.B; GASSMANN, A.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins by western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **Sci. Rep**. 6, 27860. 2016. Doi: 10.1038/srep27860

JIANG, K.; CHEN, Z.; ZANG, Y.; SHI, Y.; SHANG, C.; JIAO, X.; et al. Functional characterization of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* reveals the contributions of specific domains to its insecticidal activity. **Journal of Biological Chemistry**. v. 299, n. 3, p. 103000, 2023. Doi: 10.1016/j.jbc.2023.103000

KLÜMPER, W.; QAIM, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops

LABREUCHE, Y.; CHENIVESSE, S.; JEUDY, A.; LE PENSE, S.; BOULO, V.; ANSQUER, D.; et al. Nigritoxin is a bacterial toxin for crustaceans and insects. **Nature Communications**, v. 8, n. 1248, p. 1–9, 2017. Doi: doi.org/10.1038/s41467-017-01445-z

LÁZARO-BERENGUER, M.; PAREDES-MARTÍNEZ, F.; BEL, Y.; NÚÑEZ-RAMÍREZ, R.; ARIAS-PALOMO E.; CASINO, P.; et al. Structural and functional role of Domain I for the insecticidal activity of the Vip3Aa protein from *Bacillus*

thuringiensis. **Microbial biotechnology**. 15:2607-2618. 2022. Doi: 10.1111/1751-7915.14110

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*. **Appl Environ Microbiol**, 62: 583–586. 1996. Doi: 10.1128/aem.62.2.583-586.1996

LI, H.; BOUWER, G. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 121, p. 7-13. 2014. Doi: 10.1016/j.jip.2014.06.005

LI, L.; ZHU, Y.; JIN, S.; ZHANG, X. Pyramiding Bt genes for increasing resistance of cotton to two major lepidopteran pests: *Spodoptera litura* and *Heliothis armigera*. **Acta Physiol Plant**. 36, 2717–2727, 2014. Doi:10.1007/s11738-014-1642-5

LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y. C.; HUANG, F.; WANG, Y.; LI, H.; et al. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 155–161, 2010. Doi: 10.1002/ps.1849

LU, Y.; WU, K.; JIANG, Y.; GUO, Y.; DESNEUX, N. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. **Nature**. 487, 362–365, 2012. Doi: 10.1038/nature11153

MATHUR, V.; JAVID, L.; KULSHRESTHA, S.; MANDAL, A.; REDDY, A.A. World Cultivation of Genetically Modified Crops: Opportunities and Risks. In: Lichtfouse, E. (eds) Sustainable Agriculture Reviews. Sustainable Agriculture Reviews, vol 25. **Springer**, Cham. 2017. Doi: 10.1007/978-3-319-58679-3_2

MATTES, A. BILATERAL PYELO-URETEROGRAMS. **The Journal of the American Medical Association**. v. 88, n. 1, p. 16, 1927. Doi: :10.1001/jama.1927.02680270016004

MORAES, R.F.O.; TOSCANO, L.C.; PEREIRA, M.F.A.; PIETROBOM, V.L.; BARBOZA, C.A.M.S.; MARUYAMA, W.I. Beauveria bassiana em associação com milho geneticamente modificado no manejo de *Spodoptera frugiperda* e *Rhopalosiphum maidis*. **Scientific Article • Arq. Inst. Biol**. v.82, 1-7, 2015. Doi: 10.1590/1808-1657001052013

NARANJO, S.E.; ELLSWORTH, P.C.; FRISVOLD, G.B. Economic value of biological control in integrated pest management of managed plant systems. **Annu. Rev. Entomol**. 60 p. 621-645. 2015. Doi: 10.1146/annurev-ento-010814-021005

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª Edição, Artmed, São- Paulo, 1273 p. 2010.

NÚÑEZ-RAMÍREZ, R.; HUESA, J.; BEL, Y.; FERRÉ, J.; CASINO, P.; ARIAS-PALOMO, E. Molecular architecture and activation of the insecticidal protein Vip3Aa

from *Bacillus thuringiensis*. **Nature communications**. 11:1-9. 2020. Doi: 10.1038/s41467-020-17758-5

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.J.; DOURADO, P.M.; CRIVELLARI, A.; et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Manag Sci**. 72(9):1727-36. 2016. Doi: 10.1002/ps.4201

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**. 6, p. 3296-3325. 2014. Doi: 10.3390/toxins6123296

PAPA, G.; CELOTO, F.J. **Manejo de pragas**. In.: BORÉM, A.; FREIRE, E.C. (eds.) Algodão: do plantio à colheita. Viçosa, MG, Brazil: Editora UFV, p. 217-249. 2014.

PEDIGO, L.P.; RICE, M.E.; KRELL, R.K. **Entomology and pest management**. 7th ed., Waveland Press, Inc. 584p. 2021.

PERLAK, F.J.; DEATON, R.W.; ARMSTRONG, T.A.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**. 8, p. 939-943. 1990. Doi: 10.1038/nbt1090-939

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. Doi: 10.1128/MMBR.00034-06

PLoS One. v. 9, Article e111629. 2014. Doi: 10.1371/journal.pone.0111629

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT G. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, Cry IVB, and CryIVD toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **J. Invertebr. Pathol.** 66, p. 131-135, 1995. Doi: 10.1006/jipa.1995.1075

QIN, G.; WU, S.; ZHANG, L.; LI, Y.; LIU, C.; YU, J.; et al. An Efficient Modular Gateway Recombinase-Based Gene Stacking System for Generating Multi-Trait Transgenic Plants. **Plants**. 11:488. 2022. Doi: 10.3390/plants11040488

QUAN, Y.; LÁZARO-BERENGUER, M.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; FERRÉ, J. Critical Domains in the Specific Binding of Radiolabeled Vip3Af Insecticidal Protein to Brush Border Membrane Vesicles from *Spodoptera* spp. and Cultured Insect Cells. **Applied and Environmental Microbiology**. 87: e01787. 2021. Doi: 10.1128/AEM.01787-21

RABINOVITCH, L.; SILVA, C.M.B.; ALVES, R.S.A. **Controle biológico de vetores de doenças tropicais utilizando *Bacillus* entomopatogênicos**. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Eds). Controle Biológico, vol. 2, p.17-85. Embrapa Meio Ambiente, 2000.

RAJPUT, R.; NAIK, J.; MISRA, P.; TRIVEDI, P.K.; PANDEY, A. Gene Pyramiding in Transgenic Plant Development: Approaches and Challenges. **Journal of Plant Growth Regulation**. 14:1-19. 2022. Doi: 10.1007/s00344-022-10760-9

- RINCO'N-CASTRO, M.C.D.; BARAJAS-HUERTA, J.; IBARRA, J.E. Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 Toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Appl Environ Microbiol** 65: 2049–2053. 1999. Doi: 10.1128/AEM.65.5.2049-2053.1999
- ROMEIS, J.; NARANJO, S.E.; MEISSE, M.; SHELTON, A.M. Genetically engineered crops help support conservation biological control. **Biological Control**. v. 130, p. 136-154. 2019. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.10.001
- ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**. 5: 1-17. 2014. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
- SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnol. J.** 9, 283–300. 2011. Doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x
- SARASWATHY, N.; NAIN, V.; SUSHMITA, K.; KUMAR, P.A. A fusion gene encoding two different insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Indian J Biotechnol.** 7:204–209, 2008.
- SCHNEPF, H.E.; WHITLEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **PNAS**: v. 78, n. 5, p. 2893-2897. 1981. Doi: 10.1073/pnas.78.5.2893
- SCHNEPF, H.E.; WHITLEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 78, n. 5, p. 2893-2897. 1981. Doi: 10.1073/pnas.78.5.2893
- SHARMA, P.; NAIN, 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. 2010. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02856.x
- SILVA, D.M.; BUENO, A.F.; STECCA, C.S.; ANDRADE, K. NEVES, P.M.O.J., OLIVEIRA, M.C.N. Biology of *Spodoptera eridania* and *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae) on Different Host Plants. **Florida Entomologist**. 100(4):752-760, 2017. Doi: 10.1653/024.100.0423
- SILVA, G.V.; BUENO, A.D.F.; BORTOLOTO, O.C.; SANTOS, A.C.; POMARI-FERNANDES, A. Biological characteristics of black armyworm *Spodoptera cosmioides* on genetically modified soybean and corn crops that express insecticide Cry proteins. **Revista Brasileira de Entomologia**. 60:255-259. 2016. doi:10.1016/j.rbe.2016.04.005
- SILVAIN, J.; B. LALANNE-CASSOU. Distinction entre *Spodoptera latifascia* (Walker) et *Spodoptera cosmioides* (Walker), bona species (Lepidoptera, Noctuidae). **Revue Française d'Entomologie (Nouvelle Série)**, 19 (3-4): 95-97. 1997.

SKENDŽIĆ, S.; ZOVKO, M.; ŽIVKOVIĆ, I.P.; LEŠIĆ, V.; LEMIĆ, D. The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests. **Insects**. 12(5), 440. 2021. Doi: 10.3390/insects12050440

SPECHT, A.; ROQUE-SPECHT, V.F. Immature stages of *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae): developmental parameters and host plants. *Zoologia* 33:e20160053. 2016. Doi:10.1590/S1984-4689zool-20160053

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHIENZ, 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**, v. 103, n. 4, p. 1031–8, ago. 2010. Doi: 10.1603/ec10040

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHIENZ, 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**. v. 103, n. 4, p. 1031–8, ago. 2010. Doi: 10.1603/ec10040

SUSHMITA, K.; RAMESH, B.; PATTANAYAK, D.; KUMAR, P.A. Gene pyramiding: a strategy for insect resistance management in *Bt* transgenic crops. **Indian Journal of Biotechnology**. 2016; v. 15, n.3, p. 283-291.

SYED, T.; ASKARI, M.; MENG, Z.; LI, Y.; ABID, M.A.; WEI, Y.; et al. Current Insights on Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) as Next Generation Pest Killers. **Toxins**. 12(8): 522. 2020. Doi: 10.3390/toxins12080522

TABASHNIK, B. E.; ZHANG, M.; FABRICK, J. A.; WU, Y.; GAO, M.; HUANG, F.; et al. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, London, v.5, p. 15107, 2015. Doi: 10.1038/srep15107.

TABASHNIK, B.E. Evaluations of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**. 1992; v. 58, n. 10; p. 3343-3346. Doi: 10.1128/aem.58.10.3343-3346.1992

TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; SCHWARTZ, J.M.; CAPRIO, M.A.; JOHNSON, M. W. Diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis* in Hawaii. Diamondback moth and other crucifer pests: **Proceedings of the Second International Workshop**. Tainan, p. 175–183, 1990.

TABASHNIK, B.E.; SISTERTON, M.K.S.; ELLSWORTH, P.C.; DENNEHY, T.J.; ANTILLA, L.; LIESNER, L.; et al. Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. **Nat. Biotechnol.** 28, 1304–1307, 2010. Doi: 10.1038/nbt.1704

TASIOR, D.; MICHELI, A.; RUTHES, E. Metodologia molecular de identificação de proteínas Cry em bioinseticidas através de PCR (Polymerase Chain Reaction). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**. v. 4, n. 2, p.1.708-1.714, 2021. Doi: 10.34188/bjaerv4n2-013

- VALTIERRA-DE-LUIS, D.; VILLANUEVA, M.; BERRY, C.; CABALLERO, P. Potential for *Bacillus thuringiensis* and other bacterial toxins as biological control agents to combat dipteran pests of medical and agronomic importance. **Toxins**. 12:773. 2020. Doi: 10.3390/toxins12120773
- WAN, P.; HUANG, Y.; TABASHNIK, B.E. HUANG, M. WU K. The halo effect: Suppression of pink bollworm on non-Bt cotton by Bt cotton in China. **PLoS One**. 7, Article e42004. 2012. Doi: 10.1371/journal.pone.0042004
- WHITE, T.J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H.A. The polymerase chain reaction. **Trends in genetics**. v. 5, p. 185-189, 1989. Doi: 10.1016/0168-9525(89)90073-5
- WU, D, JOHNSON, J.J, FEDERICI, B.A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**. 1994; v.13, n. 6, p. 965-972. Doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00488.x
- WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. **Science**. 321, 1676–1678. 2008. doi: 10.1126/science.1160550
- YANG, J.; QUAN, Y.; SIVAPRASATH, P.; SHABBIR, M.Z.; WANG, Z.; FERRÉ, J.; et al. Insecticidal Activity and Synergistic Combinations of Ten Different Bt Toxins against *Mythimna separata* (Walker). **Toxins**. 10(11), 454, 2018. Doi:10.3390/toxins10110454
- ZACHÉ, B.; WILCKEN, C. F.; ZACHÉ, R. R. C.; SOUZA, N. M. de. Novo registro de *Trichospilus diatraeae* Cherian & Margabandhu, 1942 (Hymenoptera: Eulophidae), como parasitóide de *Spodoptera cosmioides* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Biota Neotropica**. vol. 12, no. 1, p. 319–322, 2012. Doi: 10.1590/S1676-06032012000100024
- ZENKER, M.M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Estágios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. 24:99-107. 2007. Doi:10.1590/S0101-81752007000100013
- ZHANG, W.; LU, Y.; VAN DER WERFT, W.; HUANG, J.; WU, F.; ZHOU, K.; et al. Rosegrant Multidecadal, county-level analysis of the effects of land use, Bt cotton, and weather on cotton pests in China. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 115, p. E7700-E7709. 2018. Doi: doi.org/10.1073/pnas.1721436115