

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS Cry1Ia10 E Vip3Aa DE
Bacillus thuringiensis E TOXICIDADE PARA LARVAS DE
Spodoptera spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Vivian Boter Bergamasco
Bióloga

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**INTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS Cry1Ia10 E Vip3Aa DE
Bacillus thuringiensis E TOXICIDADE PARA LARVAS DE
Spodoptera spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Vivian Boter Bergamasco

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Coorientadora: Janete Aparecida Desidério

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia

Jaboticabal - São Paulo - Brasil

Junho de 2012

B493i Bergamasco, Vivian Boter
Interações das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis* e toxicidade para larvas de *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) / Vivian Boter Bergamasco. — Jaboticabal, 2012
viii, 96 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério - Co-orientadora, Gislayne L. T. Vilas-Bôas, João Roberto Spotti Lopes, Lucia Maria Carareto Alves, Rosangela Zacarias Machado

Bibliografia

1. Ensaios de competição *in vitro*. 2. Ligação a receptor. 3. Expressão gênica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575: 633.51

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VIVIAN BOTER BERGAMASCO –

nascida em Monte Azul Paulista - SP, em 08 de outubro de 1984. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP Campus de Jaboticabal - SP no ano de 2003. Foi bolsista de Iniciação Científica FAPESP por dois anos e formou-se bacharel em Ciências Biológicas, com ênfase em Biotecnologia, em Janeiro de 2007. Recebeu em 2009 o título de Mestre em Microbiologia Agropecuária e, no mesmo ano, iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agropecuária, desenvolvendo sua pesquisa na área de controle biológico com a bactéria *Bacillus thuringiensis*.

*À Deus e minha família, alicerces da minha vida,
meus pais Palmiro Bergamasco e Vilma T. Boter Bergamasco
e meu irmão Vagner Boter Bergamasco,
por todo amor que houver nessa vida...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos, pela orientação ao longo desses anos e ensinamentos;

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério Sena, pela co-orientação, incentivo, amizade e confiança em mim depositada, além de contribuições valiosas em minha formação;

À Profa. Dra. Gislayne L. T. Vilas-Bôas, Prof. Dr. João Roberto Spotti Lopes, Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves, Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, Prof. Dr. Hélio José Montassier, Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo e Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza, pelas correções, contribuições e sugestões no trabalho;

À MSc. Deise Reis de Paula Mendes, pela paciência, amizade e companheirismo na condução deste trabalho;

À MSc. Renata I. D. Tezza, Lúcia Lopes, MSc. Fernanda A. Sebastião e Dra. Larissa S. Martins pela grande amizade, incentivo, ajuda e longas conversas... nos momentos em que mais precisei.

À Dra. Janaína Fernandes Gonçalves, MSc. Juliana Xavier Cordeiro e MSc. Andressa Peres de Oliveira, pela amizade sincera, apoio e por todas as conversas, mesmo de longe;

À equipe do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada e do Laboratório de Imunoparasitologia, pelos momentos de boa convivência e de profissionalismo.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária;

À equipe do Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ – USP e do Laboratório de Ecologia Aplicada do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP, por cederem as posturas de *Spodoptera* spp.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, pela minha formação profissional e pessoal e pela oportunidade de aprimoramento.

Aos docentes do programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro;

À toda minha família, que de perto, como minha prima Dra. Gisele Larosa e tia Zezé Boter, ou de longe acompanhou meus passos e me deu apoio;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e àqueles que, por qualquer razão, não foram mencionados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELA	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O controle de pragas do gênero <i>Spodoptera</i>	4
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (<i>Bt</i>) e as toxinas Cry e Vip	8
2.3. Características e modo de ação das toxinas Cry e Vip	10
2.4. Receptores para as toxinas Cry e Vip.....	16
2.5. Toxicidade e ligação das toxinas de <i>Bt</i> em espécies da ordem Lepidoptera.....	23
2.6. Resistência de pragas a toxinas <i>Bt</i> expressas em culturas transgênicas.....	25
III. OBJETIVO GERAL	31
3.1. Objetivos Específicos	31
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Clones contendo os genes <i>cry1Ia10</i> e <i>vip3Aa</i>	32
4.2. Indução dos genes <i>cry1Ia10</i> e <i>vip3Aa</i>	34
4.3. Análise das proteínas por SDS-PAGE	35
4.4. Confirmação da expressão das proteínas por “Western Blotting”	36
4.5. Bioensaios	37
4.7. Purificação e ativação das protoxinas Vip3Aa e Cry1Ia10	39
4.8. Marcação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 com biotina	40
4.9. Teste de ligação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas às BBMV's.....	41
4.10. “Ligand-blotting” com BBMV's íntegras.....	42
4.11. “Ligand-blotting” com BBMV's tratadas com Fosfolipase C (PIPLC).....	43
4.12. Ensaios de competição entre Cry1Ia10 e Vip3Aa biotiniladas	44
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Expressão e análise das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10	46

5.2. Bioensaios	48
5.3. Purificação, ativação das protoxinas e marcação com biotina	56
5.4. Detecção dos receptores por “Ligand-Blotting”	59
5.5. Análises da competição entre Cry1Ia10 e Vip3Aa biotiniladas	64
VI. CONCLUSÕES.....	70
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
VIII. REFERÊNCIAS	72

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1. Principais espécies do gênero <i>Spodoptera</i> encontradas no Brasil	5
Figura 2. Representação esquemática da estrutura da toxina Cry3A	11
Figura 3. Representação esquemática da estrutura da toxina Cry1Ia de <i>B. thuringiensis kurstaki</i>	13
Figura 4. Receptores moleculares das proteínas Cry1A.	17
Figura 5. Modo de ação das toxinas Cry	20
Figura 6. Esquema do modelo proposto para o modo ação das proteínas Cry	21
Tabela 1. Aprovações de cultivos comerciais geneticamente modificados pela CTNBio (CTNBio, 2012).....	28
Figura 7. Modelo proposto para a união de algumas toxinas Cry na membrana epitelial do intestino médio de <i>Plutella xylostella</i>	30
Figura 8. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET 28a (Novagen).....	32
Figura 9. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).....	33
Figura 10. Detecção da proteína Cry1Ia10 e Vip3Aa em gel de SDS PAGE 10%.....	46
Figura 11. Detecção por Western Blotting das bandas proteicas presentes nos lisados das proteínas incubadas com anticorpo monoclonal anti-His	47
Tabela 2. Bioensaio de dose/resposta das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa separadas e da combinação das mesmas (proporção de 1:1) em quatro diferentes espécies de <i>Spodoptera</i> spp., avaliado após 7 dias.....	50
Figura 12. Correlação entre o efeito dos tratamentos com as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 e os controles negativos e o peso médio das lagartas de <i>Spodoptera</i> spp. sobreviventes, avaliado após 7 dias.....	51
Figura 13. Curvas de mortalidade das quatro espécies de <i>Spodoptera</i> pela ação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 isoladas e Vip3Aa+Cry1Ia10.....	55

Figura 14. Análise por SDS PAGE 10% das frações das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa purificadas em colunas HisTrap HP	57
Figura 15. Análise da expressão, purificação e ativação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 em gel de SDS PAGE 10%.....	58
Figura 16. Análise por “Dot Blot” das frações das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas.....	58
Figura 17. Detecção do receptor putativo para as toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas em BBMV's íntegras de <i>Spodoptera</i> spp. por “Ligand-blotting”	60
Figura 18. Detecção do receptor putativo para as toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas em BBMV's tratadas com fosfolipase C de <i>Spodoptera</i> spp. por “Ligand-blotting”	61
Figura 19. União das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 às BBMV's de <i>S. frugiperda</i> (A), <i>S. albula</i> (B), <i>S. cosmioides</i> (C) e <i>S. eridania</i> (D)	65
Figura 20. Modelo proposto para o modo de ação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 para as quatro espécies de <i>Spodoptera</i> a partir dos resultados obtidos no presente trabalho	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	adenilato ciclase
ALP	Fosfatase alcalina
APN	Aminopectidase-N
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BBMV	“Brush Border Membrane Vesicles” (BBMV) ou Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMA)
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CDR	Caderina
CL50	Concentração que mata 50% da população testada
CL90	Concentração que mata 90% da população testada
cm ²	Centímetros quadrado
°C	Graus Celsius
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ditiotreitol
EGTA	Ácido etileno glicol-tetra-acético
g	Gramma
GCR	Glicoconjugado de 270-kDa
GPI	Glicosilfosfatidil-inositol
Imidazol	1,3-diazo-2,4-ciclopentadieno
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	Quilo bases = 1000 pares de base
kDa	Quilodalton
L	Litro

LB	Meio de cultura Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
p/v	Peso/volume
pb	Pares de base
PBS	Salina tamponada com fosfato (pH 7,4)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIPLC	Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
PKA	Proteína quinase
PMSF	Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
v/v	Volume/volume
VMMA	Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMA) ou “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMV)
X-Gal	5-cromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
μ M	Micromolar (micromol por litro)
μ l	Microlitro
μ g	Micrograma

INTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS Cry1Ia10 E Vip3Aa DE *Bacillus thuringiensis* E TOXICIDADE PARA LARVAS DE *Spodoptera* spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO

As pragas polípagas do gênero *Spodoptera* são consideradas algumas das mais importantes causadoras de prejuízos e de ampla distribuição em toda a América. Com o emprego intensivo de plantas geneticamente modificadas, contendo genes de *Bacillus thuringiensis* que codificam proteínas inseticidas, há a possibilidade do surgimento de insetos resistentes. Para driblar o desenvolvimento da resistência, podem-se utilizar plantas piramidadas expressando proteínas inseticidas com modo de ação distintas. Com essa finalidade, o presente estudo verificou o modo de ação das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, *S. albula*, *S. eridania* e *S. cosmioides*, correlacionando a interação dessas toxinas aos receptores de membrana do epitélio intestinal pela união das toxinas biotiniladas às Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMA) ou “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMV) de intestino médio das larvas desses insetos. Em todas estas espécies foi detectada, por “Ligand-Blotting”, um receptor putativo de cerca de 65 kDa. Em ensaios de competição *in vitro* com as proteínas biotiniladas, verificou-se que Vip3Aa e Cry1Ia10 não competem pelo mesmo receptor, e que Vip3Aa é mais eficiente que Cry1Ia10, quando testadas individualmente. Quando combinadas, observou-se a ação sinérgica das toxinas para *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*. Entretanto, para *S. eridania* há a competição pelo mesmo receptor, e Cry1Ia10 é mais eficiente que Vip3Aa, porém com ação antagônica, quando testadas conjuntamente. Esses resultados sugerem que o uso desses genes na obtenção de plantas piramidadas pode não vir a ser efetivo para driblar a resistência em todas as espécies do mesmo gênero de insetos-praga.

Palavras-chave: Ensaios de competição *in vitro*; Ligação a receptor; *Spodoptera frugiperda*; *Spodoptera albula*; *Spodoptera eridania*; *Spodoptera cosmioides*.

Bacillus thuringiensis Cry1Ia10 AND Vip3Aa PROTEIN INTERACTIONS AND THEIR TOXICITY IN *Spodoptera* spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

ABSTRACT

Poliphagous pests belonging to the genus *Spodoptera* are considered some of the most important and harmful pests due to its wide distribution over the American continent. Presently with the increase of the usage of genetically modified plants, containing *Bacillus thuringiensis* genes, which code for insecticide proteins, there is the possibility of the surge of resistant insects. To overcome this possibility, it has been proposed to use pyramided plants expressing toxins with different mode of action. Within mind the present study has verified the mode of action of the proteins Cry1IAa and Vip3Aa against neonate larvae of *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. eridania* and *S. cosmioides* and the interaction between these toxins towards membrane receptors of the intestinal epithelium apical cells. It was then analyzed the biotinilated toxins union to the Brush Border Membrane Vesicles (BBMV) of the larvae from these insects. On all of them it was observed using the ligand blotting procedure a putative receptor with approximately 65 kDa in weight. Using in vitro competition assays with the biotinilated toxins, it was possible to observe that the protein Vip3Aa does not compete with the protein Cry1Ia and that the toxin Vip3Aa is more efficient than Cry1Ia when assayed individually. When analyzed together it was possible to observe a synergic action of these proteins over *S. frugiperda*, *S. albula* and *S. cosmioides*. However, for *S. eridania* it was observed competition between these two proteins (Cry1Ia and Vip3A) and a common receptor. Also for this last observation the Cry1IAa protein had a stronger action than the Vip3Aa although with antagonic action when tested together. The results seem to indicate that the use of these genes together, aiming transgenic pyramided plants may not be so effective as need to avoid the surge of resistance by the analyzed pests.

Keywords: *In vitro* competition assays; Receptor union; *Spodoptera frugiperda*; *Spodoptera albula*; *Spodoptera eridania*; *Spodoptera cosmioides*.

I. INTRODUÇÃO

Spodoptera spp. (Lepidoptera: Noctuidae) são pragas importantes que causam danos significativos à diversos cultivares (SANTOS, 2001). Este gênero ataca culturas do algodoeiro, milho, soja e têm sido referido com frequência em cultivos de mamona, sorgo, tomate, hortaliças e frutíferas. Estas pragas danificam, através da alimentação, diferentes órgãos das plantas, ocasionando prejuízos significativos (KING & SAUNDERS, 1984; NORA et al., 1989; BAVARESCO et al., 2003; SANTOS, 2007). Algumas espécies, como *S. frugiperda* (J.E. Smith), *S. albula* (Walker), *S. cosmioides* (Walker) e *S. eridania* (Cramer), são de ampla distribuição nas regiões tropicais das Américas. Atualmente, vêm sendo submetidas ao controle por proteínas Cry e Vip de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), em decorrência do uso de bioinseticidas e da adoção de culturas *Bt*, isto é, com transgenes que codificam toxinas inseticidas de *B. thuringiensis*.

S. frugiperda é sensível a diversas proteínas Vip3 e Cry1, mas já há evidência de tolerância à algumas Cry1A (<http://www.glfsc.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>). As proteínas Cry1I possuem ação específica às ordens Lepidoptera e Coleoptera e, diferentemente de outras proteínas Crys, são solúveis, pois não se acumulam em cristais (TAILOR et al., 1992), assim como as toxinas Vip3A, que são produzidas na fase vegetativa e apresentam especificidade a vários insetos da ordem Lepidoptera.

A ligação das toxinas Cry ativadas à membrana epitelial das células do intestino médio se realiza por meio de receptores ou sítios de união específicos. Esta união é essencial para a toxicidade ao inseto, em que diferentes receptores para diferentes toxinas podem estar presentes (HOFMANN et al., 1988). Diferentes proteínas receptoras para toxinas Cry foram identificadas, tais como proteína tipo caderina (CDR), fosfatase alcalina (ALP) ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), aminopeptidase-N (APN) ancorada a GPI, glicoconjugado de 270-kDa (GCR) e proteína P252 de 250 kDa (BRAVO et al., 2011). Conforme o modelo proposto por BRAVO et al. (2004), monômeros das toxinas Cry se unem a caderinas no epitélio do intestino médio de

larvas de lepidópteros, alterando sua conformação, o que resulta na oligomerização da toxina e aumenta sua afinidade de ligação a APN (PARDO-LOPEZ et al., 2006) e a ALP (JURAT-FUENTES et al., 2004). A ação da toxina Vip3A ativada ocorre no epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry e, devido à sua forma solúvel, essas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores, resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997).

O desenvolvimento de resistência às proteínas Cry1A em cepas de insetos de laboratório pode estar ligado, ou não, a alterações no gene que codifica a caderina (TABASHNIK et al., 2005), sendo que não há relatos de alterações nos genes que codificam os ALP e APN. Essa resistência aos transgênicos eliminaria o benefício da redução da aplicação de inseticidas químicos, que são tóxicos ao meio ambiente e ao homem (MAIA, 2003).

Estudos que envolvem as diferentes proteínas Cry e Vip e suas interações com os receptores de membrana do epitélio intestinal de insetos-praga tornam-se de grande importância, pois não há relatos da competição por um mesmo receptor entre essas proteínas. As proteínas Vip3Aa e Cry1Ia possuem características semelhantes e não há relatos de testes entre elas, o que deve ser feito para determinar se suas propriedades peculiares manteriam a vantagem de serem diferentes das outras proteínas Cry e serem utilizadas para o manejo da resistência de pragas.

A utilização de toxinas que não competem entre si por um mesmo receptor pode diminuir as chances de desenvolvimento de resistência, além de poderem atuar de forma sinérgica, potencializando sua toxicidade às larvas dos insetos. Essa estratégia tem em vista a obtenção de culturas geneticamente modificadas piramidadas, isto é, culturas que expressam dois ou mais genes que codificam proteínas inseticidas, como diferentes Cry e Vip3A, assim como a obtenção de produtos bioinseticidas com o mesmo objetivo, para o manejo da resistência e para o controle de pragas de modo mais eficiente. Com esse propósito, o presente trabalho objetivou a análise da toxicidade de proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa expressas em *Escherichia coli* e o efeito sinérgico delas frente a larvas neonatas de *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. eridania* e *S. cosmioides*, assim como a correlação com o modo de ação dessas toxinas biotiniladas

em ensaios de competição pela união aos receptores contidos em Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMA) ou “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMV) de intestino médio desses insetos.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O controle de pragas do gênero *Spodoptera*

O controle de insetos-praga é um aspecto fundamental na produção agrícola, tanto para grandes como para pequenos produtores (MONNERAT & BRAVO, 1999). Esse controle está ligado ao uso intenso de insumos visando diminuir os danos e perdas da produção. Para se determinar a ação de controle destas pragas, é necessário conhecer o comportamento alimentar das espécies. Os insetos-praga polívoros, isto é, que se alimentam dos mais diversos cultivos plantados, como o gênero *Spodoptera*, são alguns dos principais causadores de perdas constantes dos produtores.

O gênero *Spodoptera* (Lepidoptera, Noctuidae) apresenta distribuição principalmente tropical e subtropical, mas algumas espécies ocorrem nos dois hemisférios e também em regiões temperadas, sendo representado na região neotropical por 16 espécies. Alguns estudos de biologia foram realizados com diferentes espécies de *Spodoptera* em diversos hospedeiros, demonstrando que esse gênero ataca diversas plantas cultivadas, como soja (ABDULLAH et al., 2000), milho (PITRE & HOGG, 1983) e algodoeiro (HABIB et al., 1983). As lagartas deste gênero possuem coloração geral que pode variar de amarelo-pardo a preto, com listras corpóreas longitudinais e reticulações com formas variadas (POGUE, 2002). No Brasil, as principais espécies desse gênero são a *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* e *S. eridania* (Figura 1). São encontradas em diferentes culturas, como milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oryza* spp.), trigo (*Triticum* spp.), alfafa (*Medicago sativa*), soja (*Glycine max*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), amendoim (*Arachis hypogaea*), tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*), algodão (*Gossypium hirsutum*), abóbora (*Cucurbita* spp.), espinafre (*Spinacia oleracea*) e couve (*Brassica oleracea*) (MONNERAT et al., 2007).

O algodoeiro é hospedeiro de um complexo de artrópodes, que podem ocasionar danos às mais diversas partes da planta. (SANTOS, 2001). Os principais lepidópteros-praga da cultura no Brasil são: a lagarta das maçãs (*Heliothis virescens* Fabricius); o curuquerê (*Alabama argillacea* Hübner); a lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella* Saunders) (DEGRANDE, 1998) e, mais recentemente, lagartas do complexo *Spodoptera* têm sido relatadas como pragas de importância em regiões algodoeiras do cerrado brasileiro (SANTOS, 1997; FERNANDEZ, 2002). As causas desse aumento populacional envolvem condições climáticas favoráveis (alta temperatura e baixa umidade relativa do ar), uso excessivo e inadequado de inseticidas, em especial do grupo dos piretróides e, principalmente, a sucessão de cultura ou o plantio próximo ou, ainda, em sucessão a gramíneas, como milho, milheto e sorgo (MIRANDA, 2006).

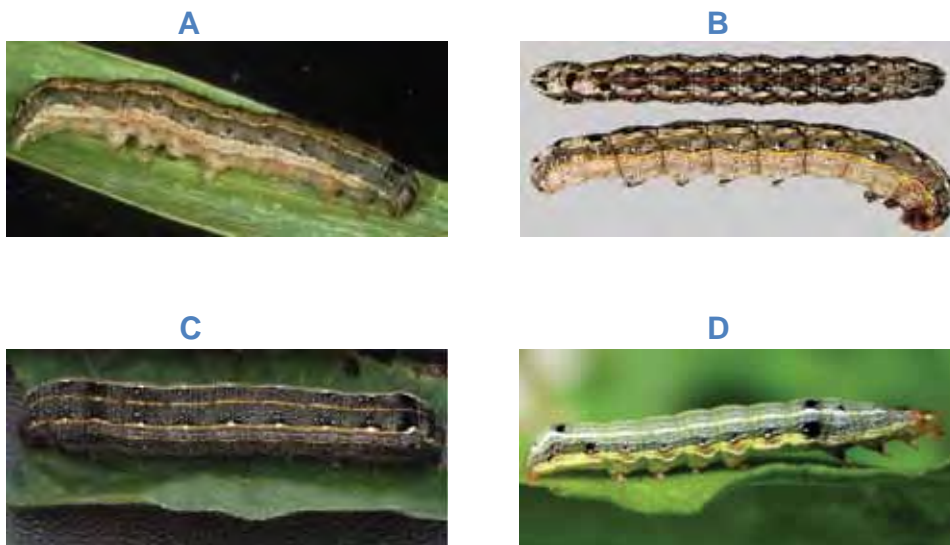


Figura 1. Principais espécies do gênero *Spodoptera* encontradas no Brasil. (A) *S. frugiperda*, (B) *S. albula*, (C) *S. cosmioides* e (D) *S. eridania*. Fonte: Frank Peairs, Colorado State University; Ronald Smith, Auburn University.

A existência de culturas irrigadas, principalmente nas regiões de cerrado, prolonga a possibilidade de sobrevivência dos insetos, aumentando o número de gerações nos diferentes agroecossistemas. Nessas condições, as mariposas estabelecem um processo migratório entre lavouras formadas por espécies vegetais semelhantes, mas implantadas em épocas diferentes, como também entre espécies vegetais diferentes. O prejuízo causado gera uma redução na produtividade de até 34%, mais de US\$ 400 milhões por ano (SOARES, 2010). As lagartas cortam as plantas jovens na base do caule, causam desfolhamento e perfuram os botões florais, flores e maçãs, podendo ser consideradas a praga principal com grande potencial de dano para a cultura (SANTOS, 2001). Além do algodoeiro, lagartas do gênero *Spodoptera* eventualmente são encontradas na cultura da soja (SOSA-GÓMEZ et al., 1993).

A *S. frugiperda* (J.E. Smith) é uma praga de difícil controle e um inseto polífono que ataca diversas culturas em muitos países. É nativa das zonas tropical e subtropical das Américas, sendo que sua distribuição abrange desde o sul do Canadá até a Argentina (LEIDERMAN & SAUER, 1953). A lagarta pode ter sua coloração variando de pardo escura, verde, até quase preta. Apresenta três finas linhas branco-amareladas na parte dorsal do corpo. Esse lepidóptero é considerado a principal praga do milho no Brasil, por começar a atuar a partir da emergência das plantas e continuar até a formação das espigas (COELHO et al., 2004). SERENA et al. (1991) observaram, no Rio Grande do Sul, o consumo foliar de lagartas *S. frugiperda*, em arroz irrigado cultivar BR-IRGA 409, provenientes do campo e laboratório. De acordo com MURGUIDO et al. (1990), o dano causado pela praga no arroz passa a ser significativo a partir do 4º ínstar. A importância econômica da *S. frugiperda* na cultura do algodoeiro tem crescido a cada ano, principalmente nas áreas agrícolas do Cerrado Brasileiro, onde ataques severos podem reduzir de forma significativa a produção (MIRANDA, 2006).

A *S. albula* (Walker) é uma praga polífaga, que pode atacar amendoim, soja, milho, hortaliças, tomate, sorgo, algodão, ervilha, beterraba e outras culturas (KING & SAUNDERS, 1984; SAVOIE, 1988). A cultura do amendoim é normalmente atacada por várias espécies de lepidópteros, entre elas *Spodoptera frugiperda*, *Mocis latipes*,

Anticarsia gemmatalis, *Stegasta bosquella*, *Stylopalpia costalimai*, cujas lagartas chegam a causar grandes danos. A espécie *Spodoptera albula*, que até 1989 era citada como *Spodoptera sunia*, ocorre desde o Brasil até a região sudoeste dos Estados Unidos (TOOD & POOLE, 1980). É espécie muito próxima de *Spodoptera eridania*, cuja caracterização específica depende do exame da genitália. Essas lagartas têm hábitos noturnos, escondendo-se no solo, o que, aliado à arquitetura da planta, aparentemente tem dificultado o seu controle.

As lagartas de *S. cosmioides* (Walker) possuem alto grau de polifitofagia, danificando diversas culturas de interesse econômico, como amendoim, alfafa, algodão, arroz, aspargo, aveia, batata-inglesa, berinjela, beterraba, cafeeiro, cebola, couve, nabo, ervilha, feijão, gerânio, girassol, eucalipto, fumo, linho, macieira, milho, pimentão, soja, sorgo, tomate e trigo (BERTELS & BAUCKE, 1966; SANTOS et al., 1980; HABIB et al., 1983; BAVARESCO et al., 2001, 2003, 2004; PASTRANA, 2004; SPECHT et al., 2004). As lagartas possuem cabeça castanho-amarelada ou alaranjada, com coloração de corpo indo do cinza claro, ao castanho e ao preto. Possuem listras ocasionalmente mais claras, entre amarelo e ocre, entre as manchas segmentais triangulares pretas e pontos de coloração clara (ZENKER et al., 2007).

A *S. eridania* (Cramer) é citada por diversos autores, alimentando-se da folhagem de diferentes famílias de plantas de importância econômica (SOO HOO & FRAENKEL, 1966; SCRIBER, 1981). A espécie *S. eridania*, que tradicionalmente não era importante para a cultura do algodoeiro, está sendo considerada praga nas regiões de cultivo no cerrado. Nessa região, é frequente o sistema de rotação envolvendo as culturas de algodão e soja. As lagartas de *S. eridania* migram das plantas de soja para lavouras de algodão vizinhas. NORA et al. (1989) constataram a presença de *S. eridania* e *Spodoptera latifacia* (Walker) em pomares de maçã em Friburgo-SC, com posturas nas folhas e frutos. No 1º e 2º instares, as lagartas alimentaram-se das folhas, e no 6º instar atacaram os frutos. A porcentagem de frutos danificados em dois pomares foi 35,4% e 24,7%. Acredita-se que a disponibilidade de hospedeiros alternativos possa viabilizar o desenvolvimento e a permanência de *S. eridania* em áreas de cultivo de algodão e soja.

O controle dessas pragas tem sido realizado com inseticidas químicos que, além do custo elevado, possuem altos riscos de toxicidade e de impacto ambiental. Com o desenvolvimento de resistência das pragas e a crescente preocupação com a saúde humana e com a geração de resíduos químicos, a utilização de agentes entomopatogênicos, como o *B. thuringiensis*, é uma alternativa para controlar essas pragas economicamente importantes. Os avanços científicos e tecnológicos, obtidos pela recente introdução de ferramentas da biologia molecular, foram fatores que impulsionaram a adoção e o uso do controle biológico como uma alternativa à utilização dos defensivos químicos. Nesse sentido, o uso de bioinseticidas formulados à base de *B. thuringiensis* vem contribuindo para o início da substituição ou para a redução dos inseticidas químicos em diversas áreas e incentivando novas pesquisas sobre a utilização dessa bactéria na agricultura (VAN FRANKENHUYZEN, 1993). Principalmente devido a sua alta especificidade, o uso do *B. thuringiensis* não causa danos aos organismos não alvos e nem à fauna em geral (ESCUDEIRO, 2006).

2.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt) e as toxinas Cry e Vip

B. thuringiensis é uma bactéria cosmopolita, aeróbia, Gram-positiva, da família Bacillaceae. Foi pela primeira vez descrita por Berliner, em 1911, quando este pesquisador isolou o bacilo de *Anagasta kuehniella*. Posteriormente, ele o nomeou *B. thuringiensis* em homenagem à província de Thuringia (Alemanha), onde o primeiro inseto infectado foi encontrado (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). É um bacilo de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, catalase positivo, aeróbio facultativo, quimio-heterotrófico e possui temperatura ideal de crescimento de aproximadamente 30°C (MORAES & CAPALBO, 1981).

Essa bactéria é caracterizada pela produção de proteínas na forma de cristais com atividade inseticida e que apresenta duas fases principais durante seu ciclo de vida: uma de crescimento vegetativo, na qual a bactéria se multiplica por bipartição, e outra de esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporo. Durante a

fase de esporulação, *B. thuringiensis* produz proteínas inseticidas acumuladas em cristais parasporais na fase estacionária do seu ciclo de crescimento. Essas bactérias são consideradas de ocorrência ubíqua, por terem sido isoladas de todas as partes do mundo, de diversos ecossistemas e de vários substratos, como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (BRAVO et al., 1998). Essa ocorrência é devida, principalmente, à sua capacidade esporulante, o que lhe confere uma elevada resistência ao calor e à seca (MARTIN e TRAVERS, 1989).

As formulações à base de esporos e proteínas cristais inseticidas de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas como bioinseticidas há mais de 35 anos, e sua utilização é uma alternativa viável para o controle de insetos, diminuindo, assim, o problema de resistência dos insetos aos pesticidas químicos. Uma das vantagens na utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos susceptíveis, seu efeito não poluente ao meio ambiente, sua inocuidade aos vertebrados e ausência de toxicidade às plantas (WHITELEY & SCHNEPF, 1986).

B. thuringiensis produz inclusões proteicas cristalinas compostas por proteínas Cry (δ - endotoxinas) e Cyt, que são tóxicas para uma grande variedade de pragas agrícolas e para vetores de doenças, e podem ser visualizadas por microscopia óptica (BRAVO et al., 1998; MONNERAT & BRAVO, 2000). As diversas proteínas Cry são codificadas pelos genes *cry*, que atualmente são mais de 620 tipos diferentes genes *cry* sequenciados, e as suas proteínas são classificadas em 70 grupos organizados em diferentes subgrupos, de acordo com a identidade de aminoácidos (http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). Além das toxinas do cristal, várias cepas de *Bt* também produzem outras endotoxinas, como as endotoxinas citolíticas (Cyt), as proteínas vegetativas (Vip), as β -exotoxinas e as parasporinas.

O cristal inseticida de subespécie ou variedade de *B. thuringiensis* pode conter um tipo ou vários tipos de proteínas Cry. Este fato é devido à presença de uma ou várias cópias de um mesmo gene *cry* ou cópias de diferentes genes, cujos produtos formarão um mesmo cristal misto (LERECLUS et al., 1993), podendo ser encontrados até sete diferentes genes *cry* em um mesmo isolado de *B. thuringiensis* (MARTINEZ & CABALLERO, 2002). Esses genes podem estar localizados tanto no cromossomo como

em grandes plasmídeos (125 kb) (GONZÁLES et al., 1982) ou em ambos. Uma característica comum entre muitas subespécies de *B. thuringiensis* é a presença de um complexo arranjo de plasmídeos. O número e o tipo desses plasmídeos variam consideravelmente entre as linhagens (GONZÁLES & CARTON, 1981), mas são independentes do sorotipo e do patótipo. A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos: um deles depende dos fatores sigma específicos da fase da esporulação, onde estão classificados a maioria dos genes *cry*, e o outro, independente do processo de esporulação, como o *cry3*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998)

A identificação dos tipos e subtipos de genes contidos numa nova linhagem de *B. thuringiensis*, por meio da técnica de PCR e testes de bioensaios, utilizada em diversos trabalhos, como MONNERAT et al. (2007), THAMMASITTIRONG e ATTATHOM (2008) e SEIFINEJAD et al.(2008), pode ser empregada para prever seu potencial ao biocontrole, bem como a sua especificidade (WANG et al., 2003). Por essa razão, deve-se encorajar a busca e seleção de novos genes, cujas diferenças não tenham sido detectadas somente através do tamanho dos fragmentos obtidos após a amplificação, mas que possam ser detectadas através de sequenciamento. Dessa forma, a identificação se tornará mais rápida e eficiente, o que poderá acelerar a descoberta de genes com novas especificidades e, conseqüentemente, haverá um incremento dos programas de controle biológico à base de *B. thuringiensis*.

2.3. Características e modo de ação das toxinas Cry e Vip

A estrutura tridimensional das formas ativas das proteínas Cry consiste de três domínios (Figura 2). O domínio I (N-terminal) consiste de 7 α -hélices, sendo 6 hélices anfipáticas (α 1, α 2, α 3, α 4, α 6 e α 7), que envolvem uma hélice central e hidrofóbica (α 5). Esse domínio está envolvido na inserção da proteína na membrana e na formação do poro. O domínio II é formado por três folhas- β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula (SHIMIZU & MORIKAWA, 1996;

RUKMINI et al., 2000). O domínio III (C-terminal) consiste de duas folhas- β antiparalelas, formando um β -sanduíche. Esses dois domínios estão envolvidos no reconhecimento e ligação ao receptor. Além disso, acredita-se que o domínio III esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural da proteína (de MAAGD et al., 2001), protegendo a toxina de degradação durante o processamento proteolítico, controlando as interações toxina-toxina e pode estar agindo em conjunto com o domínio I, na formação do poro (RUKMINI et al., 2000).

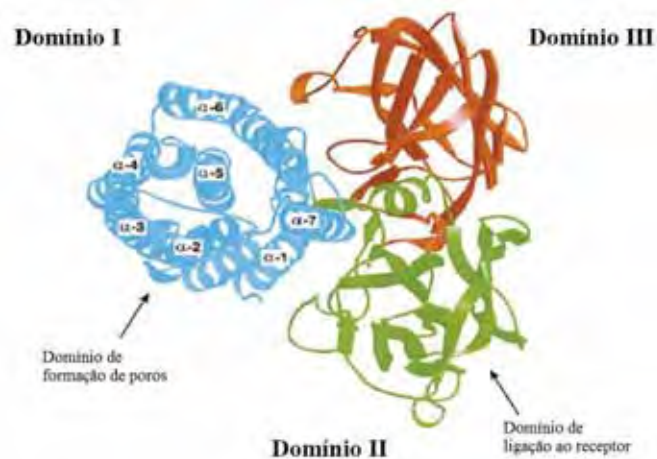


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da toxina Cry3A (LI et al., 1991). O domínio I (região azul) possui sete α -hélices e está relacionado à formação do poro. Domínio II (região verde) está relacionado com a ligação aos receptores de membrana. Esse domínio é formado por três folhas- β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula. O domínio III (região vermelha) corresponde à região C-terminal, que consiste de duas folhas- β antiparalelas, formando um β -sanduíche e acredita-se que esse domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural e a ligação ao receptor.

Quanto ao modo de ação das δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, o modelo atual tem sido estudado principalmente para ordem Lepidoptera, ainda que certos trabalhos mostrem características muito similares em outras ordens de insetos. Essas proteínas possuem alta toxicidade para larvas de diferentes ordens de insetos e de certas espécies de Nematoda, Protozoa e Acari (FEILTELSON, 1994). Geralmente, o tipo do gene *cry* presente em um isolado correlaciona a especificidade da proteína Cry produzida. Mas a patogenicidade e a especificidade de uma linhagem é determinada pelos tipos de genes *cry* funcionais que elas possuem. Algumas dessas proteínas apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, por exemplo, as Cry1I tóxicas para as ordens Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992) e Cry1B, que é ativa para as ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (ZHONG et al., 2000). Essa similaridade de ação pode ser explicada pela proximidade genética entre esses tipos de genes *cry*, demonstrado pelo dendrograma de similaridade entre três domínios das proteínas Cry (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/Crytree.pdf).

A primeira proteína Cry1I foi caracterizada por TAILOR et al. (1992), tendo muitos outros tipos de genes *cry1I* caracterizados e publicados (CHOI et al., 2000, GLEAVE et al., 1993, SONG et al., 2003, TOUNSI et al., 2003). Os genes *cry1I* codificam uma proteína com 719 aminoácidos e massa molecular em torno de 70 a 81 kDa, que são secretadas na fase vegetativa do crescimento de *B. thuringiensis* e que não se acumulam em cristais (TAILOR et al., 1992; GLEAVE et al., 1993; CHOI et al., 2000; SONG et al., 2003; ESCUDERO et al., 2006; GROSSI-de-SÁ et al., 2007). Estas têm sido classificadas como proteínas Cry1I devido à similaridade com aquelas do grupo Cry1 (CRICKMORE et al., 2012). Atualmente são cerca de 50 genes *cry1I* agrupados em 6 subclasses (*cry1Ia* a *cry1If*) (CRICKMORE et al., 2012). A eficiência de Cry1Ia tem sido demonstrada contra diversos insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera (TAILOR et al., 1992; ESCUDERO et al., 2006; GROSSI-de-SÁ et al., 2007; BERGAMASCO et al., 2011; MENDES, 2011). A predição da conformação da proteína Cry1Ia de *B. thuringiensis kurstaki*, depositada no Swiss Prot, evidenciando os três domínios, está ilustrada da Figura 3.

De acordo com os resultados descritos na literatura por KOSTICHKA et al. (1996), a análise da sequência deduzida de proteína do gene *cry1la10* do isolado T01328 revelou a presença de um domínio N-terminal, o qual atua como um peptídeo sinal (ESPINDOLA, 2003). Embora as sequências tenham alto grau de similaridade com outras proteínas Cry, os primeiros 34 aminoácidos mostram desprezível homologia. O domínio N-terminal do gene *cry1la* contém características como trechos de aminoácidos carregados positivamente (do M-1 a Q-10) seguidos por resíduos hidrofóbicos (do S-11 a A16) e uma região polar (a partir do K-17), as quais podem funcionar como um peptídeo sinal em espécies de *Bacillus* (SIMONEN & PALVA, 1993). Dessa maneira, pode-se concluir que esses dados indicam que a proteína Cry1la é produzida e secretada no início da fase estacionária (KOSTICHKA et al., 1996). MASSON et al. (1998), reportaram que *B. thuringiensis* sub. *aizawai* estirpe HD-133 expressa um gene *cry1la* durante o estágio inicial da esporulação, na fase estacionária.



Figura 3. Representação esquemática da estrutura da toxina Cry1Ia de *B. thuringiensis kurstaki* (http://swissmodel.expasy.org/repository/?pid=smr03&query_1_input=Q45752) evidenciando o domínio I (região azul), domínio II (região verde) e domínio III (região vermelha).

SHIN et al. (1995) reportaram que genes da classe *cry1I* podem estar silenciados em estirpes de *B. thuringiensis*, devido ao fato desses genes serem localizados a jusante ("downstream") de outros genes da classe *cry1*, sendo que a sequência terminadora dos genes *cry* se localiza no intervalo entre os genes *cry1* e *cry1I*.

O modo de ação das proteínas Cry foi determinado, principalmente, em larvas de lepidópteros (KNOWLES & DOW, 1993). As proteínas Cry provocam lise das células epiteliais intestinais das larvas de insetos susceptíveis pela formação de poros na região apical das microvilosidades (ARONSON & SHAI, 2001; de MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2005). Os sintomas que são observados a partir desse momento são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, por fim, morte (ARONSON et al., 1986). O mecanismo de ação das proteínas Cry é um processo que pode ser dividido em várias etapas, como descrito a seguir.

Os cristais produzidos por *B. thuringiensis*, ao serem ingeridos por larvas de insetos susceptíveis, são solubilizados no intestino médio (pH alcalino), liberando uma ou mais proteínas Cry (protoxinas). Além disso, é necessário um ambiente redutor, já que as pontes dissulfeto são abundantes na metade C-terminal das proteínas de 130 kDa. O intestino médio da maioria das larvas de insetos susceptíveis (lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros) apresenta alto pH e condições redutoras (KNOWLES, 1994). Entretanto, existem exceções, como o caso da proteína Cry3A, que se dissolve tanto em pH ácido (3,9 a 4,2) quanto em pH alcalino (9,5 a 11,3), permanecendo insolúvel em pH neutro (KOLLER et al., 1992).

Após os cristais ingeridos por larvas susceptíveis terem sido dissolvidos no ambiente alcalino do intestino, as protoxinas solúveis e inativas são clivadas por proteases do hospedeiro, originando proteínas ativas de 60-70 kDa (BRAVO et al., 2005). A ativação da toxina envolve a remoção proteolítica da porção N-terminal dos peptídeos (25-30 aminoácidos para a Cry1, por exemplo) e aproximadamente metade da proteína restante da porção C-terminal (no caso de protoxinas longas). O processamento é um fator que pode contribuir na determinação da especificidade. A toxina Cry1Ab da estirpe *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* tóxica para lepidópteros, por

exemplo, quando solubilizada com suco gástrico de *A. aegypti* e ativada com tripsina torna-se tóxica para esse inseto (BRAVO et al., 2007).

As proteínas Vip ou proteínas inseticidas de segunda geração, produzidas por *B. thuringiensis*, são expressas no estágio vegetativo de crescimento, diferentemente das δ -endotoxinas, cuja expressão é restrita à esporulação. Essas proteínas são secretadas pela célula e, não formam inclusões cristalinas, além de não terem similaridade na sequência de aminoácidos, são excluídas da nomenclatura das proteínas Cry (CRICKMORE et al., 2012). O gene *vip* codificador da proteína Vip inicia a expressão dessa proteína durante a fase de crescimento vegetativo e continua sendo expresso em culturas esporulantes. Altos níveis de expressão em combinação com alta estabilidade da proteína favorecem a produção de grande quantidade de proteína nos sobrenadantes de culturas esporulantes (ESTRUCH et al., 1996). Ao contrário das proteínas Cry, as quais se unem em cristais insolúveis dentro da célula mãe, Vip é secretada como proteína solúvel por algumas linhagens de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de crescimento, limitando sua aplicação no campo (ARORA et al., 2003).

As proteínas Vip, classificadas de Vip1 a Vip4, não possuem homologia com proteínas Cry conhecidas. Atualmente, existem 65 genes *vip3A*, agrupados de *vip3Aa* a *vip3Ah*. O gene *vip3Aa* codifica uma proteína com 791 aminoácidos e massa molecular de 88,5 kDa (ESTRUCH et al., 1996). As proteínas Vip possuem toxicidade da mesma magnitude que a das proteínas Cry contra insetos susceptíveis. No entanto, o espectro inseticida das proteínas Vip inclui, ainda, certas pragas importantes, as quais têm mostrado insensibilidade para as proteínas Cry (BHALLA et al., 2005). Vip3Aa possui atividade inseticida contra um grande espectro de insetos-praga de importância agrônômica da ordem Lepidoptera e revela alta bioatividade para lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*), lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*), lagarta-da-beterraba (*S. exigua*) (ESTRUCH et al., 1996), lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), lagarta-da-espiga (*Helicoverpa zea*) (DOSS et al., 2002), dentre outras. No caso de *A. ipsilon*, Vip3A proporciona 260 vezes superior atividade inseticida que algumas proteínas Cry1A

relatadas como sendo ativas contra esta praga (ESTRUCH et al., 1996; MACINTOSH et al., 1990).

A ação da proteína Vip3A tem sido examinada e mostra ter atuação no epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry. Porém, devido à sua forma solúvel, essas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível, resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997). Segundo DONOVAN et al. (2001), a proteína Vip3A pode ser sintetizada depois que esporos de *B. thuringiensis* são ingeridos por insetos, sugerindo que uma parte significativa da patogenicidade de *B. thuringiensis* contra *S. exigua* seja devida à produção de proteína Vip3A dentro de lagartas. A mortalidade seria, então, resultante da ação da proteína Cry em conjunto com a germinação de esporos, crescimento e desenvolvimento de células bacterianas depois da ingestão pelas lagartas. A descoberta da proteína Vip3A foi muito importante para o controle biológico de insetos pragas, pois, segundo MONERAT & BRAVO (2000), atualmente não só se aproveitam as misturas de esporos e cristais, obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante.

2.4. Receptores para as toxinas Cry e Vip

As proteínas ativas ligam-se aos receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das larvas de insetos susceptíveis (de MAAGD et al., 2001; BRAVO et al., 2005). A inserção da toxina promove a formação de poros na região apical das microvilosidades. A união a esses sítios é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo (MONNERAT & BRAVO, 2000). As metodologias mais utilizadas são os estudos cinéticos de união utilizando proteínas marcadas com biotina e vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA) ou “brush border membrane vesicles” (BBMVs).

A cinética de união das toxinas Cry às vesículas da membrana da microvilosidade apical dos insetos suscetíveis é bifásica, composta de um passo reversível e outro irreversível (VAN RIE et al., 1989). O primeiro passo envolve a interação entre a toxina e seu sítio de união (união reversível), que é um requisito básico para que ocorra toxicidade, mas não suficiente (SCHNEPF et al., 1998). No entanto, a união irreversível a receptores específicos e a inserção na membrana parecem estar mais ligadas com a toxicidade (VAN RIE et al., 1989; MONNERAT & BRAVO, 2000). A interação inicial está relacionada à ligação entre a toxina e o carboidrato do receptor, enquanto a irreversível está associada com uma interação proteína-proteína (LIANG et al., 1995).

Em relação às toxinas Cry1A, pelo menos quatro diferentes receptores (Figura 4) foram descritos em diferentes larvas de lepidópteros: a proteína do tipo caderina (CADR), uma fosfatase alcalina (ALP) ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma aminopeptidase-N (APN) ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e um glicoconjugado de 270 kDa (GCR) (BRAVO et al, 2007).

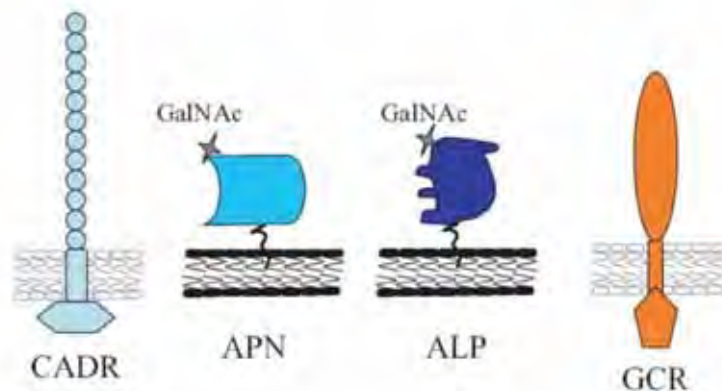


Figura 4. Receptores moleculares das proteínas Cry1A. Receptor do tipo caderina (CADR); receptor aminopeptidase-N (APN); receptor fosfatase alcalina (ALP); receptor glicoconjugado de 270 kDa (GCR). GalNAc= N-acetilgalactosamina, reconhecida pelo domínio III de toxinas Cry (BRAVO et al., 2007).

As proteínas caderinas são glicoproteínas transmembrânicas com um domínio citoplasmático e um ectodomínio extracelular com uma série de repetições de caderinas. O domínio extracelular contém sítios de ligação de cálcio e sequências para a ligação de caderinas. Em lepidópteros, os receptores do tipo caderina têm sido muito estudados como receptores para as proteínas Cry1A. A primeira caderina de 210 kDa (denominada BT-R1) que demonstrou interação com essas proteínas foi isolada e caracterizada das BBMV's de *Manduca sexta* (VADLAMUDI et al., 1995). Além disso, outros receptores do tipo caderina já foram identificados em outras espécies de lepidópteros, por exemplo, as BtR175 de 175 kDa, isoladas das BBMV's de *Bomby mori*, e as HelvCaLP isoladas de uma população resistente à proteína Cry1Ac de *Heliothis virescens* (PIGOTT & ELLAR, 2007).

As APN e as ALP são proteínas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), e estão incluídas dentro de plataformas de lipídios ("lipid rafts") que estão ordenadas em espaços diferenciados dentro de microdomínios das membranas celulares. Essas plataformas de lipídios são constituídas por glicoesfingolipídios, colesterol e com proteínas ancoradas a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e, possivelmente, estão envolvidas em vias de transdução de sinal. De acordo com MASSON et al. (1995), a toxina Cry1Ac liga-se ao receptor APN através do domínio III que reconhece, especificamente, a N-acetilgalactosamina (GalNAc). Após a ligação a receptores específicos, a toxina Cry se une rápida e irreversivelmente à membrana plasmática das células epiteliais, com subsequente abertura ou formação de poros, ocorrendo, assim, um desequilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, ocasionando perda da integridade da membrana do intestino das larvas de insetos suscetíveis (VAN RIE et al., 1989; IHARA et al., 1993; LIANG et al., 1995; RABINOVITCH et al., 2000).

Várias proteínas formadoras de poros (TFP) formam uma estrutura oligomérica solúvel antes de sua inserção na membrana. No caso da toxina Cry1Ab, que se liga aos receptores do tipo caderina em *M. sexta*, ocorre uma clivagem adicional na porção N-terminal da proteína (hélice α -1), quando ela se liga ao receptor. Esse processo facilita a formação de um "pré-poro", que é uma estrutura oligomérica responsável pela inserção da proteína na membrana e sua toxicidade (GÓMEZ et al., 2002; RUSSEAL et

al., 2004). A formação dessa estrutura oligomérica já foi demonstrada para uma grande quantidade de proteínas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa e Cry3 (GÓMEZ et al., 2002; RAUSELL et al., 2004; MUÑOZ-GARAY et al., 2006). Muitos trabalhos sugerem que, após a ligação da proteína ao receptor caderina e a formação do oligômero, ocorre uma segunda interação com outro receptor (fosfatase alcalina ou aminopeptidase), que facilita a inserção da toxina na membrana (PARDO- LÓPEZ et al., 2006; JURAT-FUENTES & ADANG, 2006). Durante esse evento, há um leve desdobramento da toxina, provocado pelo pH do ambiente, que também auxilia nessa inserção. A estrutura oligomérica, ou pré-poro, é então inserido na membrana formando realmente o poro e levando à turgidez e lise celular (BRAVO et al., 2004).

O modo de ação das proteínas Cry é explicado de forma resumida na Figura 5. A partir do processo de formação do poro, as toxinas Cry aumentam a permeabilidade das microvilosidades apicais a cátions, ânions, água e moléculas de maior tamanho. Isso causa um colapso na diferença de potencial da membrana, ocasionando uma má redistribuição dos cátions entre o lúmen e o citoplasma. Além disso, ocorre alcalinização do citoplasma, interferindo no metabolismo celular normal e, conseqüentemente, ocorre morte celular e destruição do epitélio (WOLFERSBERG, 1992). Assim que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* têm acesso à hemolinfa (DU & NICKERSON, 1996), ambiente no qual germinam. Tais eventos conduzem à lise das células epiteliais do intestino dos insetos e, finalmente, à morte dos insetos por inanição e septicemia (DAI & GILL, 1993; MONNERAT & BRAVO, 2000).

Apesar do modelo descrito acima ser o mais aceito, existe outro modelo proposto para o modo de ação das proteínas Cry. Enquanto o primeiro modelo caracteriza-se pela formação de poros na membrana epitelial de células intestinais, o segundo modelo caracteriza-se pela transdução de sinais. Além disso, a hipótese que defende a formação de poros tem sido estudada em nematoides e em várias ordens de insetos (BRAVO et al., 2007). A grande maioria dos resultados desses estudos confirma o modelo de formação dos poros (BRAVO et al., 2007). O modelo de transdução de sinal

foi proposto em estudos realizados somente em células de insetos (ZHANG et al., 2006).

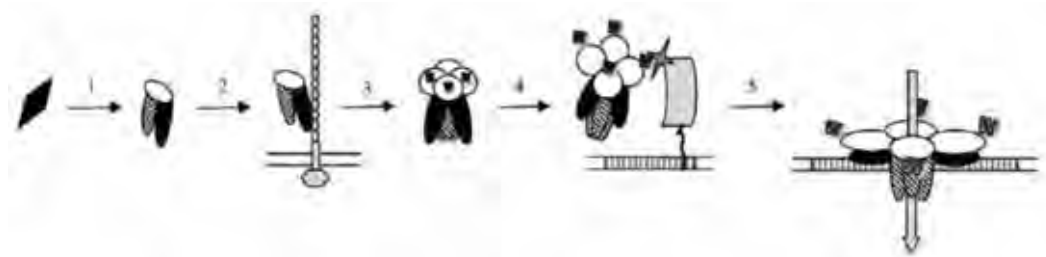


Figura 5. Modo de ação das toxinas Cry. (1) Solubilização e ativação da proteína. (2) Ligação da toxina monomérica com o primeiro receptor (CADR), mudança conformacional da toxina e clivagem da hélice α -1. (3) Formação oligomérica. (4) Ligação da toxina ao segundo receptor GPI-APN ou GPI-ALP) e mudança conformacional da proteína. (5) Inserção da estrutura oligomérica na membrana e formação do poro (BRAVO et al., 2007).

O primeiro passo nos dois modelos é idêntico, isto é, os cristais proteicos são ingeridos pelas lagartas e, em seguida, solubilizados no intestino médio pelo pH alcalino. Desse modo, as protoxinas são clivadas por proteases intestinais, dando origem a proteínas de 60 kDa, aproximadamente. Assim, as proteínas ativas ligam-se aos receptores do tipo caderinas, que estão presentes nas microvilosidades intestinais. A partir disso, os dois modelos tornam-se diferentes.

O modelo proposto (Figura 6) retrata uma série de eventos associados à membrana celular. A ligação de proteínas Cry1Ab aos receptores BT-R1 (do tipo caderina) estimula regiões específicas de uma proteína G que imediatamente torna-se ativa. Em seguida, a proteína G aciona a adenilato ciclase (AC), que é responsável pela produção de cAMP. O acúmulo de cAMP ativa a proteína quinase (PKA). Essas enzimas influenciam a transcrição de genes responsáveis pela produção de proteínas que desestabilizam o citoesqueleto celular e canais iônicos presentes na membrana. O defeito na integridade estrutural e funcional da célula provoca um inchaço celular e,

posteriormente, sua morte (ZHANG et al., 2006). Esse modelo é muito similar aos modelos de várias toxinas de bactérias. Essas toxinas afetam as células hospedeiras pela sua ligação aos receptores da membrana plasmática e manipulação de reações críticas, que são responsáveis por várias respostas celulares (ZHANG et al., 2006).

Diferentes toxinas se ligam a diferentes receptores em diversas espécies de insetos e com intensidade variada, o que explica a sua especificidade. A união das toxinas à membrana epitelial das células do intestino médio, ainda que necessária, não é suficiente para determinar que uma proteína Cry seja tóxica contra um determinado inseto. Assim, as toxinas se unem com alta afinidade a sítios de união situados em vesículas preparadas a partir de células da borda em escova (BBMV-“Brush Border Membrane Vesicles”) do intestino de *S. exigua*, mas resultaram em pouca toxicidade a esses insetos (LUO et al., 1999).

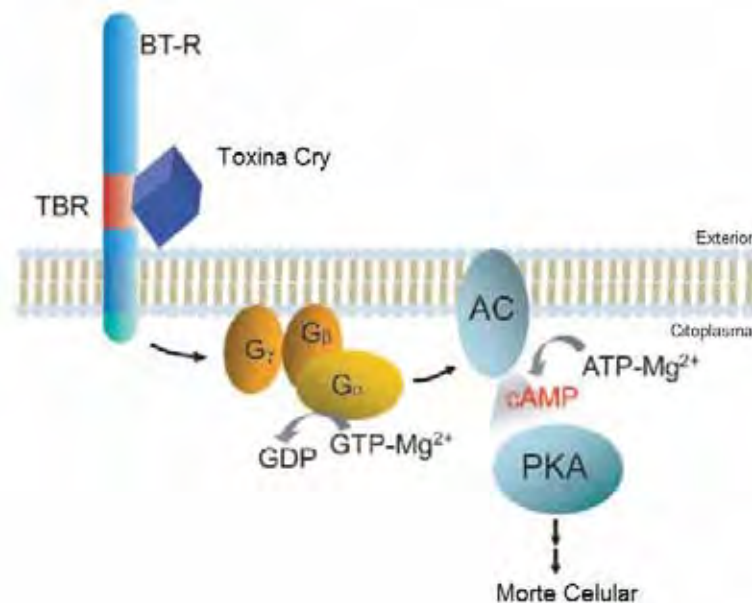


Figura 6. Esquema do modelo proposto para o modo ação das proteínas Cry. As proteínas Cry ligam-se aos receptores BT-R1, estimulando a proteína G e a adenilato ciclase, que são responsáveis pela produção de cAMP. Essa molécula ativa a enzima proteína quinase que promove desestabilização do citoesqueleto e dos canais iônicos, provocando, assim, a morte celular (ZHANG et al., 2006).

Mediante o estudo da interação entre toxinas Cry e BBMV, preparadas a partir de diferentes insetos, tem-se conseguido determinar a especificidade das toxinas Cry em diversas espécies de pragas. Segundo HERRERO & FERRÉ (2001), os resultados obtidos para os ensaios de ligação da toxina Cry1Ac em *P. xylostella* e *S. exigua*, mostraram que ambas as metodologias BBMV, com centrifugação e com filtração, foram eficientes para os estudos de ligação. No entanto, níveis significativamente maiores de ligação específica de Cry1Ac marcado com ^{125}I foram obtidos usando-se o método de centrifugação, usando-se BBMV preparadas ou a partir de larvas inteiras ou de intestinos dissecados de larvas.

LEE et al. (2003) compararam o modo de ação da proteína Vip3A com Cry1Ab em experimentos de ativação proteolítica, ligação a BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles") e habilidade para formar poros em dois diferentes ensaios *in vitro*. Os autores verificaram que Vip3A difere, em várias etapas, quanto ao modo de ação, utilizando um alvo molecular diferente e formando distintos canais iônicos, comparada à Cry1Ab. A interação das proteínas Vip com os receptores do intestino das larvas de diferentes lepidópteros tem colocado essas proteínas como uma segunda geração de toxinas de *B. thuringiensis*, com excelente potencial para o manejo da resistência.

Nesse sentido, genes *cry* de *B. thuringiensis* vêm sendo isolados e clonados em *E. coli* ou em *B. thuringiensis* mutantes para genes *cry* (*cry-B*), por vários pesquisadores, já algum tempo (KUMAR et al., 2005; HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2008; BERGAMASCO, 2009) e, assim como atualmente com os genes *vip3* (LEE et al., 2003; BHALLA et al., 2005; SENA et al., 2009, ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011 a b) tidos como responsáveis pela expressão de proteína altamente tóxicas a um amplo espectro de insetos da ordem Lepidoptera. Tanto as toxinas Cry1I, quanto as Vip3A são solúveis e não formam cristais proteicos em *B. thuringiensis*. Esse fato dificulta o isolamento destas proteínas solúveis, sendo indispensável a clonagem e expressão em *E. coli* para obter as proteínas expressas e utilizá-las em bioensaios para determinar sua CL₅₀, verificando-se isoladamente a sua toxicidade às pragas estudadas. As suas características inseticidas também podem ser exploradas com sucesso se essas

proteínas forem expressas em plantas transgênicas (LAGNAOUI et al., 2001, LIU et al., 2004).

Os genes que codificam Vip3Aa e Cry1I possuem um peptídeo sinal anterior ao códon inicial, determinando o mesmo mecanismo de secreção. Esses genes têm tamanhos semelhantes, assim como as suas proteínas codificadas, apesar de não terem similaridade na sequência de aminoácidos. Entretanto não há relatos de testes entre as proteínas Vip3Aa e Cry1I, o que deve ser feito para determinar se suas propriedades peculiares manteriam a vantagem de serem diferentes das outras proteínas Cry e serem utilizadas para o manejo da resistência de pragas.

2.5. Toxicidade e ligação das toxinas de *Bt* em espécies da ordem Lepidoptera

Insetos lepidópteros pertencentes à família Noctuidae, tais como espécies de *Spodoptera*, são importantes pragas que são fracamente susceptíveis à maioria das endotoxinas. As informações a respeito da susceptibilidade de *S. frugiperda* à família de proteínas Cry são limitadas, apesar de serem encontrados numerosos trabalhos enfocando a interação entre as toxinas e sítios de ligação, bem como o papel das modificações dos sítios de ligação na resistência dos insetos (FERRE & VAN RIE, 2002). Portanto, o conhecimento sobre as interações toxina-receptores é o elemento-chave para designar estratégias específicas para prevenir a resistência cruzada em *S. frugiperda*.

Estudos de VAN FRANKENHUYZEN (2009) comprovam a abrangente inserção dessas toxinas em diferentes táxons e denotam o específico espectro de atividade dessas proteínas. Todavia, a despeito do crescente aumento na lista de genes cry identificados, foi constatado que a maioria (91%) das toxinas foi testada contra um número limitado de espécies (10 ou menos), e cerca de 28% das toxinas catalogadas até então ainda não foram testadas. Além disso, espécies e toxinas testadas não estão igualmente distribuídas entre as ordens de insetos e famílias de proteínas. Entre três

maiores ordens de insetos, os lepidópteros foram os mais testados, sendo 59 holotipos de toxinas experimentados contra 71 espécies, num total de 1.182 bioensaios. A espécie *Plutella xylostella* foi a mais utilizada nesses bioensaios (9,8% deles), seguida da *S. exíqua* (8,7%) e *Heliotis virescens* (6,4%). As famílias de toxinas Cry1, Cry2 e Cry9 respondem por 96,2% dos bioensaios com lepidópteros, sendo que apenas Cry1 corresponde a 80%.

Em relação às análises de toxicidade, ligação e permeabilidade das toxinas, LUO et al. (1999), utilizando BBMV, a partir de *S. frugiperda* e *S. exíqua*, e comparando os resultados com aqueles obtidos nos bioensaios, verificaram que Cry1Fa foi altamente tóxica, e Cry1Ac foi não tóxica para larvas de *S. exíqua* e *S. frugiperda*. Entretanto Cry1Ca foi altamente tóxica para *S. exíqua* e fracamente tóxica para *S. frugiperda*. Ao contrário, Cry1Bb foi ativa contra *S. frugiperda*, mas pouco ativa contra *S. exíqua*. Nos experimentos de ligação, os autores demonstraram que Cry1Ac ligou-se irreversivelmente às BBMV de *S. exíqua* e *S. frugiperda*. Entretanto, Cry1Ac não permeabilizou BBMV a partir das espécies de *Spodoptera*. Os resultados sugerem que alguns componentes da membrana são necessários para a formação de poros, induzida por Cry1Ac, e que a ligação da toxina Cry1 é necessária, mas não suficiente para a toxicidade.

TABASHNIK et al. (1997) demonstraram que populações de *P. xylostella* tornaram-se altamente resistentes às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac devido a aplicações de bioinseticidas à base de Bt. O surgimento de resistência nas populações de *P. xylostella* foi devido a modificações nos receptores para as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac. As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac não conseguiram se ligar aos seus receptores, porém a ligação da proteína Cry1Aa aos receptores não foi alterada, apesar dessa linhagem possuir uma alta taxa de resistência a essa proteína (TABASHNIK et al., 1997). Estudos recentes confirmaram que a resistência dessa população de insetos não está relacionada a mutações no gene da caderina (BAXTER et al., 2005) e nem a mutações em genes responsáveis pelos outros receptores, como aminopeptidases, fosfatase alcalinas ou glicolípídios (BAXTER et al., 2008). Existe a possibilidade de que

a população resistente tenha uma mutação nos genes de outras proteínas que possam funcionar como receptores primários das toxinas (BRAVO & SOBERÓN, 2008).

2.6. Resistência de pragas a toxinas *Bt* expressas em culturas transgênicas

Resistência é definida como a capacidade, adquirida por meio de um processo evolutivo, de um organismo sobreviver em resposta à pressão de seleção imposta pela exposição a algum agente tóxico (ILSI/HESI, 1998). Pragas-alvo evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade a longo prazo (HAWTHORNE, 1998). Os casos de resistência não se limitam a inseticidas sintéticos, mas incluem uma ampla gama de produtos naturais, incluindo reguladores de crescimento e agentes de controle biológico, entre eles as toxinas produzidas por *B. thuringiensis* (*Bt*).

Formulações contendo a toxina *Bt* tinham sido usadas por mais de quarenta anos como inseticidas sem nenhuma evidência de resistência em situações de campo; o primeiro relato de falhas de formulações *Bt* no controle de pragas ocorreu nas Filipinas com a traça-das-crucíferas (*P. xylostella*). Outros relatos apontaram falhas de controle da traça das crucíferas em áreas dos EUA, Japão, América Central e China, com formulações baseadas em *B. thuringiensis*, principalmente Dipel® e Xentari® (VAN RIE e FERRÉ, 2000). Populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros têm desenvolvido resistência à toxina *Bt* em condições de laboratório (NEPPL, 2001). Esses resultados alertam para a possibilidade de insetos desenvolverem resistência a culturas inseticidas contendo toxinas.

Com o advento da biotecnologia, genes que codificam proteínas com propriedades inseticidas foram isolados de *B. thuringiensis*. Esses genes foram modificados para se expressarem adequadamente em plantas, a fim de controlar pragas-alvo em culturas, como tomateiro (FISCHHOFF ET al., 1987), algodoeiro

(PERLAK et al., 1990), batata (PERLAK et al., 1993) e milho (ARMSTRONG et al., 1995).

Desde 1996, várias culturas transgênicas, conhecidas como plantas-*Bt*, surgiram para controlar de forma eficiente as pragas e diminuir a utilização de inseticidas químicos (KLETER et al., 2007). Apesar de essas culturas serem uma alternativa interessante no controle de pragas, elas podem ocasionar alguns problemas, como o surgimento de populações resistentes (TABASHNIK et al., 2008). Em plantas geneticamente modificadas, as lagartas, ao se alimentarem do tecido foliar, ingerem a proteína de *B. thuringiensis* que atua nas células epiteliais do tubo digestivo das mesmas (MEYERS et al., 1997). Esta promove a ruptura osmótica irreversível das células e causa a morte dos insetos, antes que eles consigam causar danos econômicos à cultura (PIETRANTONIO et al., 1993; GILL, 1995).

A resistência de diversos híbridos de milho modificado, contendo a proteína Cry1Ab para as lagartas de *S. frugiperda* e *Diatraea grandiosella*, foi avaliada em bioensaios de laboratório e testes de campo por WILLIAMS et al. (1997). Em laboratório, utilizou-se o tecido vegetal liofilizado adicionado à dieta artificial para avaliar o efeito da proteína *Bt* nos lepidópteros. Observaram baixa sobrevivência das duas espécies em dieta com tecido liofilizado dos híbridos de milho modificado. Em campo, os híbridos geneticamente modificados apresentaram menores danos. Os estudos demonstraram a ação tóxica da proteína Cry1Ab para *S. frugiperda* e *D. grandiosella*.

LYNCH et al. (1999), em teste de campo com o milho doce BT11 (proteína Cry1Ab), confirmaram os efeitos adversos da proteína presente nas folhas e espigas no desenvolvimento biológico de *S. frugiperda* e de *Helicoverpa zea*. Os dados de campo indicaram adequada proteção de folhas e espigas aos danos dessas pragas no milho BT11. BUNTIN et al. (2001) avaliaram a eficácia dos milhos MON810 e BT11, que expressam a proteína Cry1Ab, no controle de *S. frugiperda* e *H. zea* na safra de 1998. Ambos os milhos reduziram consistentemente as infestações e danos nos cartuchos e nas espigas das plantas, respectivamente para *S. frugiperda* e *H. zea*. Os autores observaram, no entanto, que apesar da significativa redução na infestação dos lepidópteros, lagartas de ambas as espécies se estabeleceram em várias espigas do

milho modificado, embora tenham se desenvolvido mais lentamente e causado menor dano em relação ao milho convencional. Os autores concluíram que os milhos MON810 e BT11 foram efetivos para evitar significativas perdas na produtividade devido ao ataque de ambas as pragas.

O uso de cultivares contendo eventos combinados é crescente a nível mundial. Representa uma tendência que busca atender a demanda de produtores ao combinar duas características de importância agrônômica em um mesmo híbrido. Nesse sentido, diversos híbridos de milho e algodão contendo eventos combinados *via* melhoramento genético clássico estão aprovados em diversos países. A combinação de dois eventos para o controle de pragas da mesma ordem entomológica tem por objetivo somar o espectro de ação das duas proteínas provenientes de *B. thuringiensis*, bem como servir como mais uma ferramenta para o manejo de resistência das pragas às proteínas individuais. No mundo, as culturas que mais se utilizam de transgenia são a soja, o milho e o algodão. No Brasil, entre 2009 e 2011, a CTNBio aprovou a solicitação de várias empresas multinacionais para liberação comercial de culturas como milho e algodão, como detalhado na Tabela 1.

No Brasil, MARTINELLI (2001) avaliou o padrão de resistência dos milhos transgênicos BT11 e ICP4, que expressam proteínas *Bt*, para *S. frugiperda* e *H. zea*, em condições de campo. De acordo com os dados obtidos foi possível observar danos em folhas do milho modificado, porém em nível reduzido se comparado ao milho convencional. Os danos nas folhas ocorreram mais precocemente no milho convencional do que nos milhos BT11 e ICP4, sendo que nestes a progressão da intensidade de dano foi menor que nos híbridos convencionais. O autor concluiu que ambos os milhos BT11 e ICP4 foram eficientes na proteção da planta em relação ao dano de *S. frugiperda* e de *H. zea*.

Híbridos de milho doce geneticamente modificados, como o milho BT11 (proteína Cry1Ab), foram testados em campo, para a avaliação da eficiência no controle de *O. nubilalis*, *H. zea* e *S. frugiperda*. Os dados obtidos indicaram que o milho BT11 proporcionou consistente padrão de resistência, independente do complexo de pragas, densidade da praga e localização geográfica (BURKNESS et al., 2002).

Tabela 1. Aprovações de cultivos comerciais geneticamente modificados pela CTNBio (CTNBio, 2012).

Cultivo	Evento	Características
SOJA	MON 87701 x MON 89788	Resistência a insetos (Cry1Ac) e ao herbicida glifosato
MILHO	MON 810 YieldGuard	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ab)
MILHO	BT11	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ab) e tolerância ao glufosinato de amônio
MILHO	MON 810 x NK603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ab) e tolerância ao herbicida glifosato
MILHO	Bt11 x GA21	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ab), tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato
MILHO	MON89034	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1A.105 e Cry2Ab2)
MILHO	MON 89034 x NK603	Resistente a insetos e tolerante ao glifosato (Cry1A.105 e Cry2Ab2)
MILHO	Bt11xMIR162xGA21	Resistente a insetos (Cry1Ab e Vip3Aa20) e tolerante ao glifosato e ao glufosinato
MILHO	MON 89034 x TC150 NK603	Resistente a insetos (Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry1F) e tolerante ao glifosato e ao glufosinato de amônio
MILHO	TC1507 x MON 8010 NK603	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1F, Cry1Ab), tolerância aos herbicidas glufosinato de amônio e glifosato
MILHO	TC1507 e MON810	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1F, Cry1Ab) e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio
MILHO	MON 89034 x MON 88017	Resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato (Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1)
ALGODÃO	MON 531 – BOLLGARD I	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ac)
ALGODÃO	281-24-236/3006-210-23 (Widestrike)	WideStrike - Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1F e Cry1Ac) e tolerância ao herbicida glufosinato de amônio
ALGODÃO	MON 15985 - BOLLGARD II	Resistência a insetos da ordem Lepidoptera (Cry1Ac e Cry2Ab2)
ALGODÃO	GHB 119 x T304-40	TwinLink - Resistente a insetos (Cry1Ab e Cry2Ae) e tolerante ao glufosinato de amônio

O desenvolvimento da resistência a plantas transgênicas *Bt* anularia os benefícios dessa nova tecnologia empregada em milhões de hectares em todo o mundo. Entre os benefícios do cultivo de plantas *Bt* está a redução no uso de inseticidas de alta toxicidade para o homem, como os organofosforados e piretroides, como é o caso do algodão *Bt* nos EUA (MAIA, 2003). A evolução da resistência a toxinas *Bt*, expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é afetada por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, à bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo (MAIA, 2003).

Quanto às bases bioquímicas da resistência, qualquer alteração no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* poderá acarretar no desenvolvimento da resistência: 1) modificação no sítio de ligação da toxina à membrana; 2) mudança na atividade proteolítica no intestino do inseto; 3) aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. A primeira alteração é a que gera os maiores níveis de resistência. Ela tem sido descrita tanto em populações resistentes capturadas em campo como em populações selecionadas artificialmente em laboratório. Esta alteração tem sido detectada em cepas resistentes a uma ou várias toxinas da família Cry1A de *P. interpunctella* (VAN RIE et al., 1990), *P. xylostella* (FERRÉ et al., 1991) e *H. virescens* (LEE et al., 1995).

A resistência cruzada é definida como a resistência de uma toxina não presente no processo de seleção, e a resistência múltipla às toxinas de *B. thuringiensis* se define como o desenvolvimento de resistência a mais de uma das toxinas presentes nos produtos utilizados na seleção. Os estudos de ligação das proteínas Cry têm revelado uma estreita correlação entre o desenvolvimento de resistência cruzada ou resistência múltipla e a presença de sítios de ligação comuns para essas toxinas. Espécies de insetos que compartilham os mesmos sítios de ligação para determinadas toxinas, ao desenvolver resistência a uma das toxinas, podem desenvolver também resistência para o restante das toxinas que compartilham os mesmos sítios de ligação, como ocorre em *P. xylostella* (GRANERO et al., 1996; SENDRA, 2002) e *H. virescens*

(JURAT-FUENTES e ADANG, 2001). Esse fato foi demonstrado por FERRÉ et al. (2005), ilustrado na Figura 7.

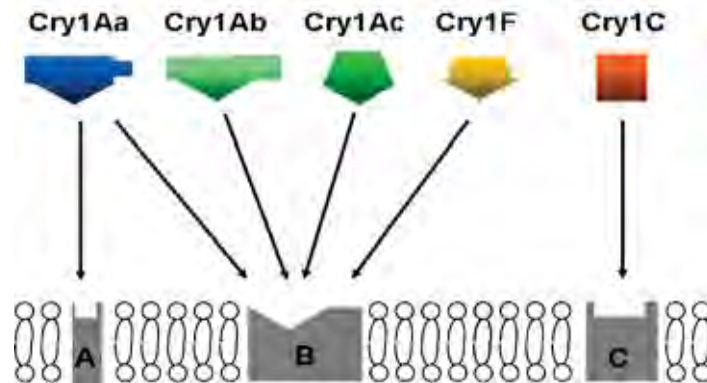


Figura 7. Modelo proposto para a união de algumas toxinas Cry na membrana epitelial do intestino médio de *Plutella xylostella* (FERRÉ et al., 2005).

Quanto ao mecanismo que implica na alteração da atividade proteolítica do intestino do inseto, OPPERT et al. (1997) mostraram que há ligação genética entre a resistência a Cry1Ac e a ausência de uma protease intestinal em uma cepa de *P. interpunctella*. Em *H. virescens* tem-se observado que as larvas resistentes mostram uma mais rápida recuperação do tecido epitelial após sua intoxicação com doses subletais da toxina Cry1Ac (MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 1999). Portanto, o estudo da atividade das toxinas de Bt contra populações susceptíveis e resistentes de lagartas, e suas interações com os receptores das células epiteliais desses insetos torna-se muito importante para a melhor compreensão do modo de resistência dos insetos.

III. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi analisar a toxicidade de proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa e o efeito sinérgico/antagônico destas frente à larvas neonatas de *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. eridania* e *S. cosmioides*, assim como correlacioná-las com o modo de ação dessas toxinas quanto à união e competição pelos receptores contidos em Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMA) ou “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMVs) desses insetos.

3.1. Objetivos Específicos

- Expressar, purificar e ativar as proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa a partir de clones em *E. coli* BL21 (DE3) recombinantes.
- Verificar a eficiência das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 na mortalidade das larvas neonatas de *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. eridania* e *S. cosmioides* por meio de bioensaios.
- Verificar a ação sinérgica ou antagônica das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 por meio de bioensaios para os referidos insetos.
- Analisar a ligação dessas toxinas biotiniladas aos receptores de membrana do epitélio intestinal das larvas das quatro espécies de *Spodoptera*.
- Analisar a união dessas toxinas pelos mesmos receptores em ensaios de competição *in vitro*, para as quatro espécies de *Spodoptera* estudadas.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Clones contendo os genes *cry1Ia10* e *vip3Aa*

A linhagem de *B. thuringiensis* doadora do gene *cry1Ia10* foi a *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* T01-328, isolada de solo de Cubatão-SP por SENA et al. (1994). Esse gene, sem a presença de peptídeo sinal, foi previamente inserido em vetor pGEM T-Easy (Promega) e sequenciado, utilizando-se a estratégia “Gene Walking” (ESPINDOLA, 2003). A linhagem pertence à coleção do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) da FCAV-UNESP/Jaboticabal-SP. O gene completo (2160 pb) foi clonado ao vetor de expressão pET28a (Novagen) entre os sítios de restrição *NheI* e *NotI* (BERGAMASCO et al., 2011). Esse vetor adiciona uma sequência de histidina (6x His) à extremidade N-terminal da proteína recombinante expressa (Figura 8).

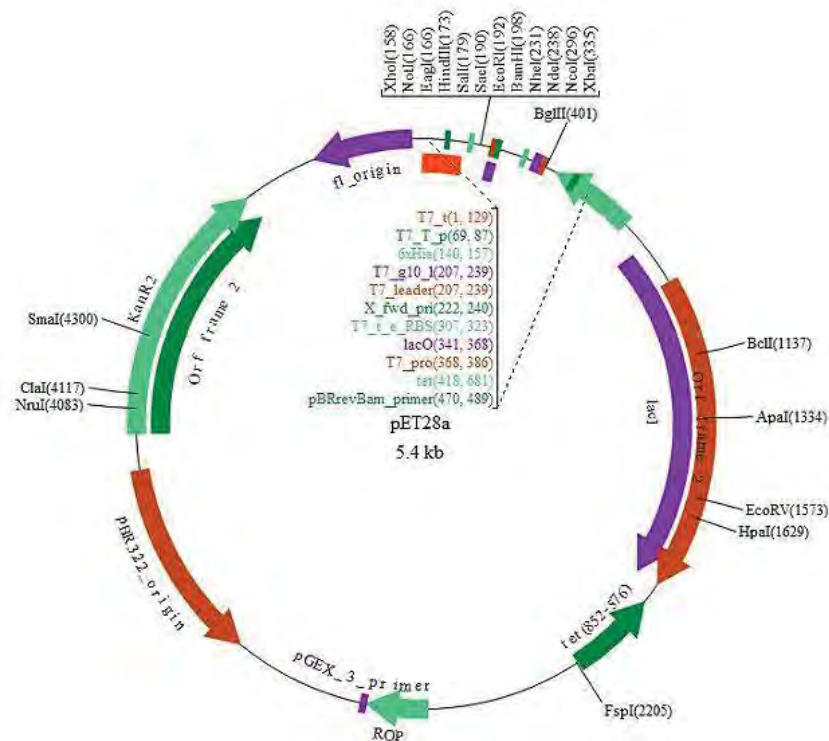


Figura 8. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET 28a (Novagen).

A linhagem doadora do gene *vip3Aa* foi a *B. thuringiensis* var. *kustaki* HD-1, cedida pela Embrapa de Sete Lagoas-MG. Esse gene completo (2350 pb) foi isolado e clonado ao vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen), nas extremidades T-Easy (MENDES, 2011). Esse vetor expressa a proteína recombinante fusionada sequência de histidina (6x His) + SUMO proteína (ubiquitina) na porção N-terminal da proteína (Figura 9).

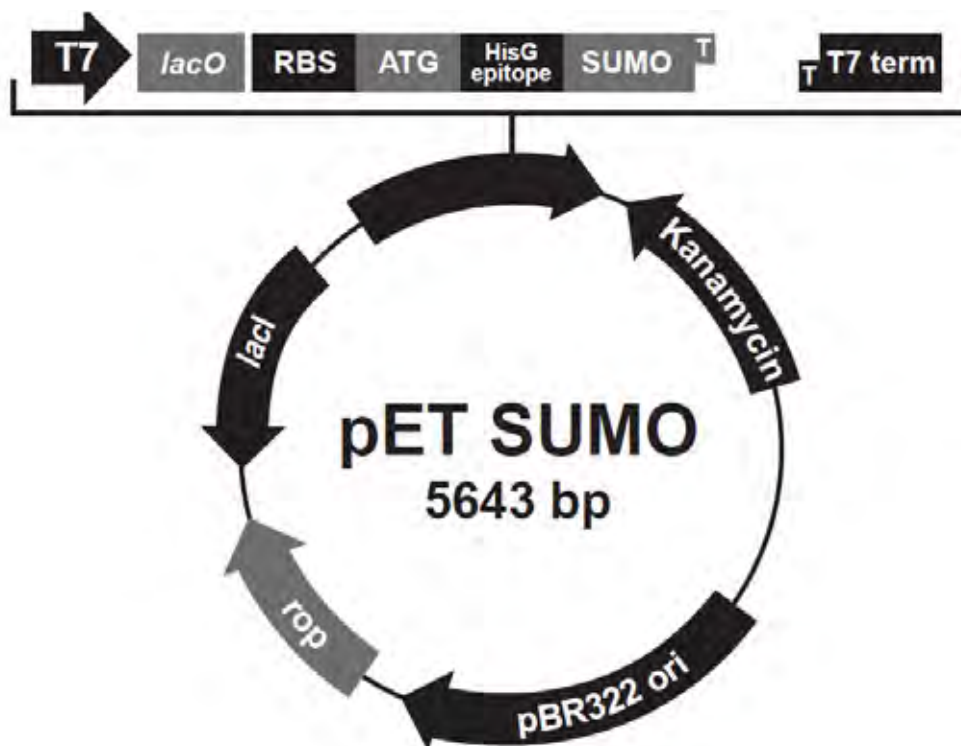


Figura 9. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).

Ambos os vetores de expressão contêm um gene de resistência ao antibiótico canamicina, além de inserirem uma polihistidina à extremidade da proteína recombinante, utilizada para a detecção e purificação da proteína expressa. Os vetores contendo os genes foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli*

BL21(DE3) por meio de choque térmico, conforme HANAHAN et al. (1983). Uma alíquota dos clones transformantes foi assepticamente estocada com glicerol estéril (40%) a -80°C (MENDES, 2011; BERGAMASCO et al., 2011).

4.2. Indução dos genes *cry1la10* e *vip3Aa*

Para a indução dos genes e expressão das proteínas recombinantes Cry1la10 e Vip3Aa, 200 µl do estoque de cada clone foram inoculados em placas de Petri com o meio de cultura LB sólido (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g de ágar, água destilada q. s. p. 1L, pH 7,2), suplementado com 50 µg/ml de canamicina, 100 mM de IPTG e 40 mg/ml de X-GAL e incubadas a 37°C por 12 h. Uma colônia branca isolada de cada estoque foi inoculada em uma pré-cultura, contendo 20 ml de meio LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, água destilada q. s. p. 1L, pH 7,2), com 50 µg/ml de canamicina e que foi cultivada sob agitação a 250 rpm a 37°C, durante 16 h. Esse pré-inóculo foi transferido para 200 ml de meio LB com 50 µg/ml de canamicina e mantido sob agitação até a OD₆₀₀ 0.6, sendo que, nesse momento, adicionou-se IPTG para a indução da expressão a uma concentração final de 1 mM para Vip3Aa e 5 mM para Cry1la10.

A cultura foi mantida a 25°C para Vip3Aa e a 30°C para Cry1la10, por 24h em agitação de 190 rpm. As células foram, então, coletadas por centrifugação a 7.400 x g por 30 min e lisadas por uma solução Tampão de Lise [20 mM de tampão fosfato, 0,5 M de NaCl, pH 7,4, 100 mg/ml de lisozima, 1mg/ml de DNase, Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila (PMSF) 1% (v/v)], incubando-se por 30 min com agitação de 100 rpm a 37°C. Em seguida, foram submetidas à sonicação (Sonics Vibra Cell, Sonics & Materials, VCX 500), com potência de saída de 40 Watts por 60 segundos com pausa de 10 s e mais 60 s de sonicação. Os sobrenadantes foram coletados após centrifugação a 7.400 x g a 4°C por 20 min e utilizados na análise de expressão e nos bioensaios (MENDES, 2011; BERGAMASCO et al., 2011).

4.3. Análise das proteínas por SDS-PAGE

A análise da produção da proteína de interesse foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% de acordo com LAEMMLI (1970). 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 (Bio-Rad). O gel de separação foi preparado na concentração de 10% 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 (50mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 30 mA e 300V por 90 min em temperatura ambiente.

Para amostras de 20 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 0,01% (m/v)]. A mistura foi aquecida por dois minutos a 100°C e aplicada em dois géis igualmente. Após o período de corrida das amostras em gel, as bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas em um dos géis pela coloração com Coomassie-Brilliant Blue 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 por 1 h. Os géis foram conservados em água destilada até serem analisados e fotodocumentados.

Compararam-se os padrões de bandas de proteínas apresentados pelos clones da *E. coli* BL21 (DE3) transformadas pelos vetores plasmidiais recombinantes com o padrão apresentado pelo controle negativo, determinado pelo lisado de *E.coli* BL21 (DE3) sem a transformação com os genes. Sua massa molecular foi aferida, comparando-se com o marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). A quantificação das bandas contendo as proteínas recombinantes Vip3Aa e Cry1Ia10 nos lisados foi feita pelo método de densitometria pelo uso do programa Bionumerics (Applied-Maths) com reta determinada por quatro concentrações diferentes de Soroalbumina bovina (BSA) (440, 220, 110 e 50 µg/ml). Esses lisados foram

utilizados para teste de toxicidade em bioensaios e para estudos de união à vesículas de membranas intestinais (BBMV), após a purificação e ativação das toxinas.

4.4. Confirmação da expressão das proteínas por “Western Blotting”

Na metodologia de “Western Blotting” (TOWBIN et al., 1979), um dos géis de SDS-PAGE, feito conforme descrito anteriormente e não corado, foi eletro-transferido em Mini Trans Blot (Bio-Rad) para uma membrana de PVDF (Amersham), utilizando-se um tampão de transferência (50 mM de Tris; 384 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol pH 8,3), sendo o processo realizado a 100 V por 45 min a 4°C.

Após a transferência, a eficiência da mesma foi verificada corando-se a membrana com 0,1% Ponceau S dissolvido em ácido acético 1% e fazendo-se, a seguir, a descoloração com água destilada. A membrana foi submetida ao bloqueio com 10 ml de PBS (salina tamponada com fosfato; 0,01 M tampão fosfato; 2,7 mM KCl_2 ; 137 mM NaCl; pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por 1h.

Em seguida, colocou-se a mesma em uma solução contendo o anticorpo primário IgG monoclonal de camundongo anti poli-histidina (Sigma) e PBS na proporção de 1:500, sob agitação suave por 1h, a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, a membrana foi incubada por 1 h sob leve agitação com o conjugado imunoenzimático de peroxidase com o anticorpo de coelho anti IgG de camundongo, utilizado para revelação do complexo antígeno-anticorpo, na diluição 1:500 em PBS, contendo 5% de leite em pó desnatado. Após, a membrana foi novamente lavada com PBS, e a reação de desenvolvimento da cor se desenvolveu com a mistura do cromógeno mais substrato específico FAST DAB (Sigma), contendo dietilamino-etil-benzidina (0,7mg) e peróxido de hidrogênio - ureia (1,6mg). Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e, posteriormente, dessecada em temperatura ambiente em local escuro.

4.5. Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP. As lagartas neonatas de *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides* foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ – USP. As lagartas neonatas de *S. frugiperda* foram cedidas pelo Laboratório de Ecologia Aplicada do Departamento de Fitossanidade da FCAV – UNESP.

Essas colônias de insetos são mantidas, nos respectivos laboratórios, em ambiente controlado a 28°C, umidade relativa de 70% e fotoperíodo de 14:10 h (luz:escuro), alimentados por dieta artificial descrita por PRAÇA et al. (2004). Para manutenção dessas colônias, alguns indivíduos selvagens são introduzidos periodicamente no ciclo laboratorial.

Os bioensaios foram executados utilizando-se a mesma metodologia para as larvas neonatas das quatro espécies de *Spodoptera*. Um volume constante de 50 µl dos tratamentos foram aplicados na superfície da dieta artificial (PRAÇA et al., 2004), contida em placas de poliestireno de 128 poços (Bio-Assay Tray – Bio-Serv). Para o teste de toxicidade, foram utilizados os lisados dos clones de *E. coli* BL21 (DE3), contendo as proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa devidamente quantificadas por densitometria (Bionumerics) (Applied-maths). Essas proteínas foram testadas individualmente, para determinação de suas atividades bioinseticidas e, conjuntamente, para se determinar a interação sinérgica ou antagônica.

Para a determinação da Concentração Letal a 50% (CL₅₀), sete diferentes concentrações das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa (0,05 ng/cm²; 0,5 ng/cm²; 1 ng/cm²; 5 ng/cm²; 25 ng/cm²; 50 ng/cm² e 500 ng/cm²) foram testadas individualmente, com a aplicação de 50 µl de cada diluição na dieta artificial. Nos bioensaios com as duas proteínas, foram testadas sete diferentes concentrações (0,0025 ng/cm²; 0,025 ng/cm²; 0,25 ng/cm²; 1 ng/cm²; 2,5 ng/cm²; 25 ng/cm² e 250 ng/cm²) combinando a proporção de 1:1 de cada uma das concentrações das proteínas, com a aplicação de 25 µl de

Vip3Aa + 25 µl de Cry1Ia10 de cada diluição na dieta artificial. O mesmo procedimento foi realizado para as duas testemunhas, uma consistindo de tampão de lise e a outra de lisado de *E. coli* BL21 (DE3) não transformada.

Foram utilizadas, para cada concentração de toxina, 1 lagarta por poço, consistindo de 16 lagartas neonatas por repetição, totalizando 5 repetições por tratamento, com delineamento experimental inteiramente casualizado. Os tratamentos foram incubados em B.O.D. a 28°C, com uma umidade relativa de 65 ± 5%, e um fotoperíodo de 14 h luz e 10 h escuro. Os bioensaios foram avaliados após sete dias, e as CL₅₀ foram geradas pelo programa Polo Plus (ROBERTSON et al., 2007), obtidas com a análise de “probit”, assim como a comparação das linhas de regressão pela avaliação de igualdade e paralelismo através do Teste da Razão de Máxima Verossimilhança (“Likelihood ratio”) e da análise do Teste de Tukey a 95% de significância. As lagartas sobreviventes foram pesadas individualmente e os pesos médios e desvio padrão dos tratamentos, assim como a comparação entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, foram calculados pelo programa ESTAT desenvolvido pela FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP

4.6. Coleta e preparação das Vesículas de Membrana da Microvilosidade Apical (VMMA) ou “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMV)

As vesículas (BBMV) foram obtidas a partir de intestinos médios de larvas de último instar de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides*. Os intestinos foram retirados com auxílio de pinças, lavados e conservados em solução tampão MET gelado (250 mM Manitol, 17 mM Tris-HCl e 5 mM ácido etileno glicol-tetra-acético (EGTA), pH 7,5), congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C (HERNÁNDEZ et al., 2004). A preparação das vesículas seguiu o método de precipitação diferencial de magnésio descrito por WOLFERSBERGER et al. (1987).

Cinco gramas dos intestinos, de cada uma das espécies estudadas, foram submetidas a um ciclo de 1 min de homogeneização, 1 min de pausa e mais 1 min de homogeneização a 2.250 rpm, em um aparelho homogeneizador Turrax (Marconi), juntamente com 10 ml de tampão MET gelado. Foram adicionados 10 ml de solução gelada de $MgCl_2$ a 24 mM e incubou-se a mistura em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 20.000 x g por 30 min a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensão em 5 ml de tampão MET gelado. Após todas essas centrifugações, as amostras foram submetidas a dois ciclos: 1 min de homogeneização a 2.000 rpm no aparelho homogeneizador Potter (Marconi) e 1 min de descanso. A seguir, foram acrescentados 5 ml de $MgCl_2$ a 24 mM ao homogeneizado e incubado em gelo durante 15 min. A reação foi centrifugada a 2.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 20.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento diluído em 5 ml de uma solução de Tampão MET: água bi-distilada (1:1) fria. As BBMV's purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), usando-se soroalbumina bovina (BSA) como padrão. A seguir, foram divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

4.7. Purificação e ativação das protoxinas Vip3Aa e Cry1Ia10

Os lisados contendo as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 foram purificados em colunas HisTrap HP (Amersham), pela afinidade níquel contida na coluna à polihistidina (6x His) contida nas proteínas recombinantes. No momento da purificação das proteínas, adicionaram-se ao sobrenadante 10 mM de Imidazol, centrifugando-se por 10 min a 7400 x g a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, e alíquotas dos lisados retiradas para a análise das proteínas por SDS-PAGE. Em seguida, o lisado foi submetido à coluna de purificação HisTrap HP – 1 ml (Amersham), carregada com 0,1 M de $NiSO_4$, devidamente preparada conforme instruções do

fabricante. A proteína foi eluída com tampão de eluição (50 mM tampão fosfato, pH 8,0, 0,5 M NaCl e 500 mM de imidazol). As frações de 1,0 ml foram coletadas e, posteriormente, analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE.

As protoxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 purificadas foram tripsinizadas com 1% de tripsina bovina (Sigma) a 37°C por 1 h, com agitação a 100 rpm e, em seguida, a enzima foi inativada com a adição de PMSF a 1 mM. Cerca de 2 ml das toxinas ativadas (1 mg/ml) foram dializadas em tampão carbonato 40 mM (pH 8,6) por 12 h. A eficiência da tripsinização foi confirmada por SDS-PAGE (ESCUADERO et al., 2006) e quantificada por densitometria, como descrito no item 4.3.

4.8. Marcação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 com biotina

As toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 ativadas e dializadas foram marcadas com biotina, usando-se o “Kit ECL Biotinylation Module” (GE Healthcare). A reação de marcação com biotina consistiu da incubação por 1h e 30 min de 1 mg de toxina com 20 µl do reativo de biotilação e 600 µl de Tampão Bicarbonato 0,8 M (pH 8,6), sob agitação suave e temperatura ambiente. Todo o volume da reação foi aplicado no centro da coluna G-25 (P10 Desalting) (GE Healthcare), já bloqueada com 5 ml de PBS contendo BSA 1% (m/v) e lavada com 20 ml de PBS. Eluíram-se as proteínas marcadas com 6 ml de PBS, e as amostras foram coletadas a cada 400 µl e estocadas a 4°C. A partir disso, as proteínas das frações foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Alíquotas de 10 µl das frações coletadas foram aplicadas em membranas de PVDF (GE Healthcare) para a análise por “Dot Blot”, para a verificação das frações contendo a proteína biotilada. Após a absorção das proteínas pela membrana, esta foi submetida ao bloqueio com 10 ml de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,02% Tween-20, sob agitação suave por 1h. A membrana foi, então, lavada por 3 vezes com PBS e, em seguida, foi incubada por 1 h em uma solução contendo o conjugado estreptavidina/peroxidase (HRP) (GE Healthcare), para ligação específica à

biotina. Após esta etapa, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBS e a reação de desenvolvimento da cor se desenvolveu com a mistura do substrato cromógeno FAST DAB com “Metal Enhancer” (Sigma). Para interrupção da reação de degradação enzimática, a membrana foi lavada com água deionizada e, posteriormente, dessecada em temperatura ambiente em local escuro.

4.9. Teste de ligação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas às BBMVs

Para verificação da qualidade das BBMVs obtidas e das proteínas biotiniladas, foram feitos testes de ligação entre elas e as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas. Estes testes consistiram em incubação de concentrações diferentes de BBMVs (10 µg, 20 µg e 30 µg) com concentrações das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas (25 ng, 50 ng e 100 ng). Para verificação da qualidade das BBMVs obtidas e das proteínas biotiniladas, foram feitos testes de ligação entre elas e as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas. Estes testes consistiram em incubação de concentrações diferentes de BBMVs (10 µg, 20 µg e 30 µg) com concentrações das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas (25 ng, 50 ng e 100 ng).

Proteínas biotiniladas foram misturadas e incubadas com as BBMVs. A seguir, as BBMVs foram lavadas duas vezes com 500 µl de tampão de união (tampão fosfato 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5, soro albumina bovina 0,1%) e centrifugadas a 2.000 x g e dissolvidas em 10 µl de água Milli-Q estéril. As amostras foram incubadas a 100°C durante 3 min juntamente com 5 µl de tampão de amostra Laemmli 4X e eletroforizadas em gel SDS-PAGE 9%. Após o término da eletroforese, foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare). As toxinas biotiniladas ligadas às BBMVs, nas membranas, foram detectadas com o conjugado estreptavidina/peroxidase (HRP) (GE Healthcare) e reveladas com uma solução FAST DAB “Metal Enhancer” (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante.

4.10. “Ligand-blotting” com BBMV’s íntegras

O ensaio “Ligand-blotting” foi feito conforme ABDELKEFI-MESRATI et al. (2011a). BBMV’s de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides* quantificadas (20 µg) foram utilizadas em ensaios de ligação das proteínas Vip3Aa e Cry1IA10 aos receptores contidos em BBMV’s.

Esse ensaio de ligação consistiu em detectar qual o tamanho molecular dos receptores ligados à membrana (BBMV’s íntegras) que se ligam às proteínas biotinizadas Vip3Aa e Cry1IA10. Para isso, as BBMV’s das quatro espécies estudadas foram incubadas a 100°C durante 3 min juntamente com 5 µl de tampão de amostra Laemmli 4X, assim como uma alíquota de BSA utilizada como controle da ligação. Essas amostras foram analisadas em dois géis de SDS-PAGE a 9%.

Os géis foram utilizados para transferir as proteínas para membranas de PVDF (Amersham). A transferência foi realizada como descrito para o “Western Blotting” (item 4.4). As membranas foram incubadas por 16 h a 4°C com PBS. Em seguida, foram bloqueadas com 50 ml de PBS contendo Tween 20 0,1% (v/v) e BSA 1% (m/v) durante uma hora. Essa solução foi retirada das membranas e a mesma foi incubada com PBS contendo Tween 20 [0,1% (v/v)] durante 15 min. Após descartar a solução, adicionaram-se 500 µl de tampão de incubação [PBS, BSA 2% (m/v) e Tween 20 0,1% (v/v)] e incubou-se durante 10 minutos. Em seguida, o tampão foi retirado e 3 µg das proteínas Vip3Aa e Cry1IA10 tripsinizadas e biotinizadas foram adicionadas a cada membrana. O sistema ficou sob leve agitação à temperatura ambiente durante 2 h. Ao término desse período, as membranas foram incubadas com streptavidina conjugada com peroxidase (GE Healthcare), diluída 1:1500 em PBS, por uma hora, e revelada com uma solução de FAST DAB com “Metal Enhancer” (Sigma) de acordo com as especificações do fabricante.

4.11. “Ligand-blotting” com BBMVs tratadas com Fosfolipase C (PIPLC)

Essa análise permite verificar se as toxinas em estudo se unem a receptores que são ancorados por glicosilfosfatidil-inositol (GPI), como os do tipo fosfatase alcalina (ALP) ou aminopeptidase-N (APN), que estarão na porção solúvel após o tratamento com Fosfolipase C (PIPLC), ou se elas se unem a receptores integrais de membrana, como do tipo caderina, que permanecem ligados à membrana das BBMVs após o tratamento com Fosfolipase C (PIPLC).

O ensaio para a verificação do tamanho do receptor consistiu da ligação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 aos receptores não unidos às BBMVs de intestinos de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides*. Esse ensaio caracterizou-se pela purificação dos receptores ancorados pelo glicosilfosfatidil-inositol (GPI) à membrana das BBMVs, através da clivagem específica do fosfatidil-inositol pela fosfolipase C. Esse tratamento quebra a ligação dos receptores ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI), liberando-os da ligação à membrana intestinal. Após essa liberação, foi detectado o tamanho molecular destes receptores pela ligação às proteínas biotiniladas Vip3Aa e Cry1Ia10.

Para o tratamento dos receptores, 300 µg de BBMVs foram ressuspensos em 500 µL de tampão PBS 2 (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM e Na₂HPO₄ 10mM, pH 7,2). Em seguida, três unidades de fosfolipase C de *Bacillus cereus* foram adicionadas à solução. Incubou-se a solução por 16 h a 30 °C. Os receptores foram recuperados por centrifugação a 11.000 x g por 20 min e quantificados pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e estocado a 4 °C. O sobrenadante, contendo os receptores solúveis (que não estavam mais ancorados à membrana pelo glicosilfosfatidil-inositol (GPI)), foi utilizado no ensaio de ligação, assim como às BBMVs tratadas (o precipitado), as quais contêm os receptores não ancorados e ligados à membrana intestinal.

O ensaio de ligação caracterizou-se pela ligação das proteínas biotiniladas Vip3Aa e Cry1Ia10 (3 µg) aos receptores tratados com fosfolipase C (10 µg) e às

BBMVs tratadas (10 µg). Estas amostras foram incubadas a 100°C durante 3 min juntamente com 5 µl de tampão de amostra Laemmli 4X, assim como uma alíquota de BSA utilizada como controle da ligação, e analisadas em dois géis de SDS-PAGE a 9%.

As proteínas contidas nos géis foram transferidas para membranas de PVDF (Amersham). A transferência foi realizada como descrito para o Western Blotting (item 4.4). As membranas foram incubadas por 16 h a 4°C com PBS. Em seguida, foram bloqueadas com 50 ml de PBS contendo Tween 20 0,1% (v/v) e BSA 1% (m/v) durante uma hora. Essa solução foi retirada das membranas e foram incubadas com PBS contendo Tween 20 [0,1% (v/v)] durante 15 minutos. Após descartar a solução, foram adicionados 500 µL de tampão de incubação [PBS, BSA 2% (m/v) e Tween 20 0,1% (v/v)] e incubou-se durante 10 minutos. Em seguida, o tampão foi retirado e 3 µg das proteínas tripsinizadas e biotiniladas foram adicionadas a cada membrana. O sistema ficou sob leve agitação à temperatura ambiente, durante 2 h. Ao término desse período, as membranas foram lavadas com PBS e incubadas com streptavidina conjugada com peroxidase (GE Healthcare), diluída 1:1500 em PBS, por 1 hora, e revelada com uma solução de SIGMAFAST DAB with Metal Enhancer (Sigma) de acordo com as especificações do fabricante.

4.12. Ensaios de competição entre Cry1Ia10 e Vip3Aa biotiniladas

Os ensaios de competição foram feitos conforme SENA et al. (2009). Vip3Aa (50 ng) e Cry1Ia10 (50 ng) biotiniladas foram incubadas com BBMVs (20 µg) de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides* por 1 hora em 100 µl de tampão de união (tampão fosfato 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,5, soro albumina bovina 0,1%).

Proteínas competidoras foram misturadas e incubadas com as BBMVs previamente incubadas com as proteínas biotiniladas. Para os testes de competição homóloga, utilizou-se a proteína ativada sem marcação com biotina (10 µg ou 200 x em excesso) para BBMVs incubadas por 1 hora com a mesma proteína biotinilada. Nos

ensaios de competição heteróloga, a proteína marcada com biotina foi incubada por 1 hora com um excesso de 200, 500 e 1.000 vezes do competidor não marcado, na presença de BBMV's de cada espécie de inseto. A seguir, as BBMV's foram lavadas duas vezes com 500 µl de tampão de união e centrifugadas a 2.000 x g e dissolvidas em 10 µl de água Milli-Q estéril. Utilizaram-se como controles positivos amostras contendo as proteínas biotiniladas com BBMV e sem competidor e outra amostra contendo somente a proteína biotinilada, sem BBMV. As amostras foram incubadas a 100°C durante 3 min juntamente com 5 µl de tampão de amostra Laemmli 4X e eletroforizadas em gel SDS-PAGE 9%. Após o término da eletroforese, foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare). As toxinas biotiniladas ligadas às BBMV's, nas membranas, foram detectadas com o conjugado estreptavidina/peroxidase (HRP) (GE Healthcare) e reveladas com uma solução FAST DAB "Metal Enhancer" (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. As bandas detectadas foram quantificadas pelo método de densitometria pelo uso do programa Bionumerics (Applied-Maths), comparadas à amostra do controle positivo contendo as proteínas biotiniladas com BBMV.

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Expressão e análise das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10

A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi feita por SDS-PAGE (Figura 10). Foram detectadas bandas de cerca de 100 kDa para Vip3Aa (cerca de 89 kDa da Vip3Aa e adição de 11 kDa da ubiquitina e poli-histidina presente no vetor pET-SUMO) e 81kDa para Cry1Ia10 nos lisados bacterianos induzidos com IPTG.

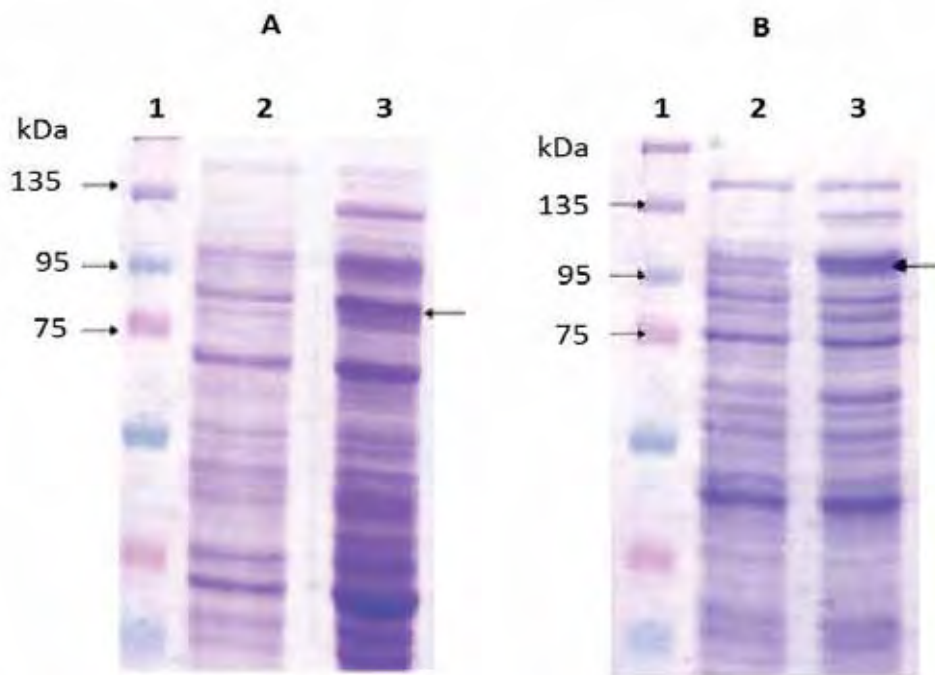


Figura 10. Detecção da proteína Cry1Ia10 (A) e Vip3Aa (B) em gel de SDS PAGE 10%. Canaletas: 1= Marcador molecular em kDa, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 2= Proteínas do lisado de células de *E. coli* BL21(DE3) não recombinante; 3= Proteínas do lisado de células dos clones recombinantes contendo as proteínas recombinantes, indicadas pelas setas.

A confirmação da expressão das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 em *E. coli* foi feita pelo método de Western Blotting, pela ligação da etiqueta de poli-histidina das proteínas recombinantes com o anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti poli-histidina (Sigma). Essa técnica identificou a proteína Cry1Ia10 de peso molecular de aproximadamente 81 kDa e a proteína Vip3Aa de peso molecular de 100 kDa, nos extratos de proteína bruta derivada do lisado de *E. coli* recombinante, ao passo que não houve nenhuma detecção com relação ao lisado preparado com células de *E. coli* (Figura 11).

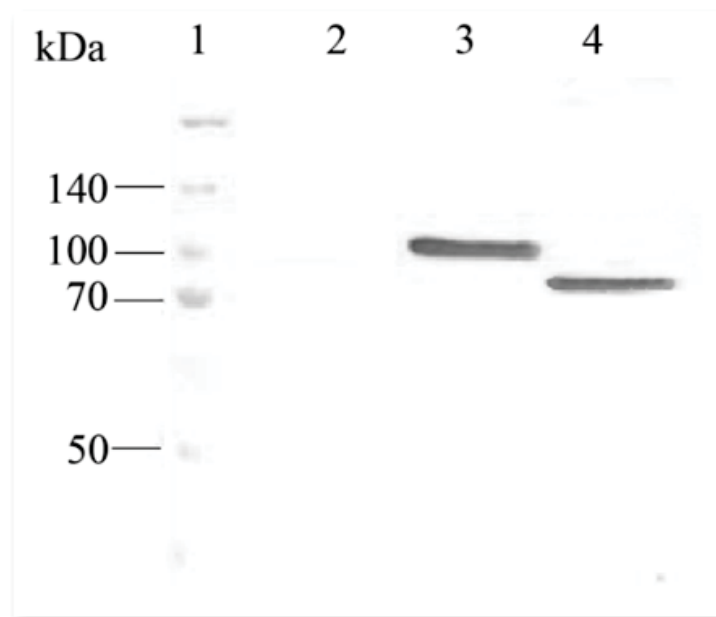


Figura 11. Detecção por Western Blotting das bandas proteicas presentes nos lisados das proteínas incubadas com anticorpo monoclonal anti-His. Canaletas: 1- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2- Controle negativo: lisado de *E. coli* BL21 (DE3); 3- Lisado contendo Vip3Aa; 4- Lisado contendo Cry1Ia10.

A expressão em *E. coli* da proteína Cry1Ia e Vip3Aa produz corpos de inclusão quando são expressos nessa bactéria, não sendo secretadas no meio de cultura, o que não ocorre em *B. thuringiensis*. Devido ao fato de que em *B. thuringiensis* essas proteínas são secretadas no meio de cultura, impede o seu uso em aplicações de bioinseticidas (ESCUDEIRO et al., 2006). Contudo, suas características inseticidas podem ser exploradas com sucesso se as proteínas forem expressas em plantas transgênicas (LIU et al., 2004). Para tal uso, deve-se comprovar a atividade inseticida dessas proteínas e testar os lisados de *E. coli* recombinantes, contendo as bandas proteicas das proteínas expressas. A expressão das proteínas Vip3Aa, de aproximadamente 100 kDa, e Cry1Ia10, de aproximadamente 81 kDa, corroboraram os resultados anteriormente obtidos (BERGAMASCO et al. 2011; MENDES, 2011), confirmando a correta expressão das proteínas pela *E. coli*. A quantificação de Vip3Aa e Cry1Ia10 foi feita pelo método de densitometria pelo uso do programa Bionumerics (Applied-Maths), para serem utilizadas nas diluições das doses testadas nos bioensaios.

5.2. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com larvas neonatas de diferentes espécies de *Spodoptera* e os lisados de *E. coli* BL21 contendo as doses das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10, antes da purificação com a coluna HisTrap HP. Nos bioensaios, a CL_{50} e a CL_{90} para as referidas toxinas Cry1Ia10 e Vip3Aa foram aferidas individualmente e combinadas (1:1) (Tabela 2). Pela análise de Razão da Verossimilhança (“Likelihood Ratio”), as inclinações das retas obtidas entre cada tratamento foram comparadas entre si, para verificação das hipóteses de Paralelismo e Igualdade entre as retas (ROBERTSON et al., 2007). Essa análise determinou a diferença entre as retas, rejeitando uma possível igualdade e paralelismo entre estas, confirmando a significância estatística dos resultados obtidos no bioensaio, assim como verificado pela

análise do Teste de Tukey a 95% de significância.

Larvas neonatas de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides* mostraram-se sensíveis a essas proteínas, apresentando baixos níveis de CL_{50} , tanto quando testadas individualmente quanto combinadas. Vip3Aa foi mais eficiente que Cry1Ia10, quando testadas individualmente em *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*. Entretanto, para *S. eridania*, Cry1Ia10 é significativamente mais eficiente que Vip3Aa. Os maiores valores de CL_{50} para Vip3Aa e Cry1Ia10 testadas individualmente foram observados para *S. frugiperda*. A exposição das larvas neonatas dessas espécies aos controles negativos (tampão de lise e *E. coli* BL21 não transformada) não causaram mortalidade, chegando de segundo até terceiro ínstar. Diferentemente do controle, as larvas sobreviventes dos tratamentos com as toxinas se mantiveram no primeiro ínstar até a avaliação. Isso foi exemplificado pela diferença do peso médio das lagartas sobreviventes entre os tratamentos e as testemunhas, como ilustrado na Figura 12. Esse resultado demonstra o efeito subletal destas toxinas, importante no controle do crescimento populacional pelo prolongamento do ciclo de vida dos indivíduos sobreviventes dessas pragas.

Dentre as espécies analisadas neste trabalho, foi observada uma maior sensibilidade à Vip3Aa em *S. cosmioides*, cerca de oito vezes mais suscetível que *S. frugiperda*, que foi a menos sensível. Nos bioensaios realizados, Vip3Aa foi altamente tóxica às quatro espécies de *Spodoptera*, estando abaixo dos valores encontrados no banco de dados "Specificity Database" (<http://www.glfsc.forestry.ca/bacillus>) o qual aponta o valor de CL_{50} de 49,3 ng/cm² para larvas neonatas de *S. frugiperda*, com deposição da toxina na superfície da dieta (SENA et al., 2009). LEE et al. (2003) indicam o valor de 55,9 ng/cm² para larvas desta espécie. A toxicidade de Vip3Aa a distintas espécies da ordem Lepidoptera têm sido avaliadas. No trabalho de DOSS et al. (2002), a proteína Vip3Aa1 foi mais ativa para *S. litura* do que para *Agrotis ipsilon* e *Plutella xylostella*, tendo as CL_{50} de 45 ng/cm², 80 ng/cm² e de 220 ng/cm², respectivamente. A proteína Vip3Aa16 demonstrou sua eficiência contra *S. littoralis*, com CL_{50} de 305 ng/cm² (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011a). Em outro trabalho com

essa mesma proteína, constatou-se a ação para larvas de primeiro ínstar de *Ephestia kuehniella*, com CL_{50} de 36 ng/cm² (ABDELKEFI-MESRATI et al.,2011 b).

Tabela 2. Bioensaio de dose/resposta das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa separadas e da combinação das mesmas (proporção de 1:1) em quatro diferentes espécies de *Spodoptera* spp., avaliado após 7 dias.

Tratamento por espécie	CL_{50} (ng/cm ²) (IC Min. - Máx.) ¹	$b \pm (EP)$ ²
<i>S. frugiperda</i>		
Cry1Ia10 *	69.52 (30.235 – 140.130)	0.839 ± 0.167
Vip3Aa *	24.66 (9.731 – 44.510)	1.233 ± 0.207
Cry1Ia + Vip3Aa	5.67 (3.832 – 8.764)	0.809 ± 0.063
<i>S. albula</i>		
Cry1Ia10	15.03 (11.421 – 20.122)	0.984 ± 0.083
Vip3Aa	3.90 (2.787 – 5.464)	0.857 ± 0.063
Cry1Ia + Vip3Aa	1.47 (1.008 – 2.188)	0.780 ± 0.058
<i>S. cosmioides</i>		
Cry1Ia10	10.51 (7.919 – 14.197)	0.977 ± 0.076
Vip3Aa	2.78 (2.304 – 3.370)	1.736 ± 0.135
Cry1Ia + Vip3Aa	1.08 (0.790 – 1.505)	1.018 ± 0.075
<i>S. eridania</i>		
Cry1Ia10	1.93 (1.479 – 2.507)	1.380 ± 0.101
Vip3Aa	3.44 (2.641 – 4.529)	1.053 ± 0.081
Cry1Ia + Vip3Aa	7.23 (4.614 – 12.103)	0.695 ± 0.055

*Resultados obtidos por MENDES (2011). ¹ (IC Min. - Máx.): Intervalo de confiança (IC 95%); ² $b \pm (EP)$: Coeficiente angular da reta e Erro Padrão.

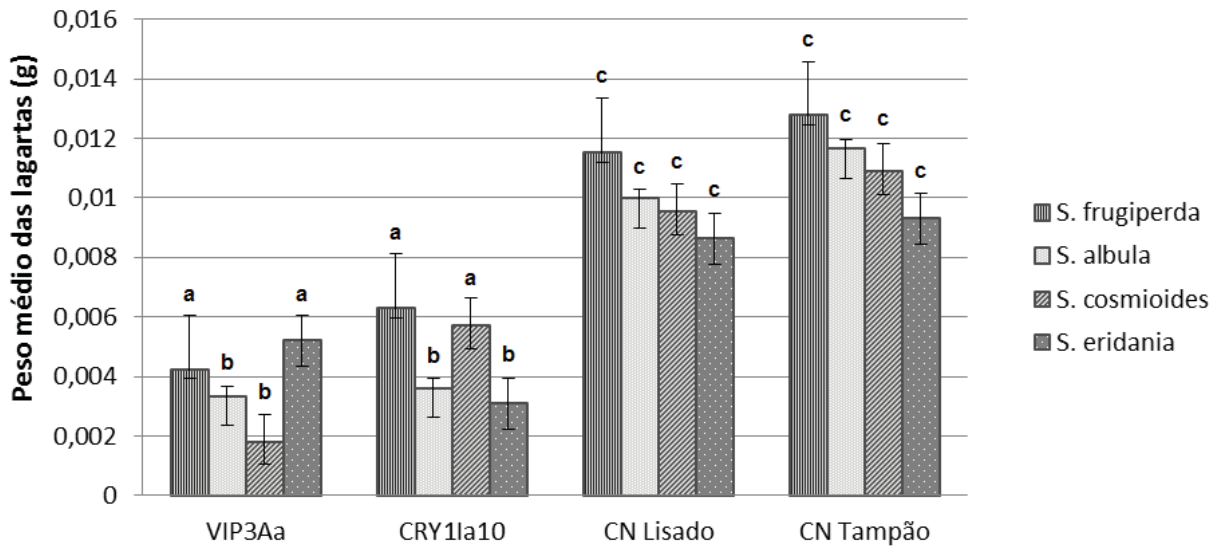


Figura 12. Correlação entre o efeito dos tratamentos com as proteínas Vip3Aa e Cry1la10 e os controles negativos e o peso médio das lagartas de *Spodoptera* spp. sobreviventes, avaliado após 7 dias. As letras diferentes na coluna diferem, significativamente, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Além da Vip3Aa, outras proteínas Vip3 exibiram toxicidade a espécies da ordem Lepidoptera. ABDELKEFI-MESRATI et al. (2009) também verificaram a mortalidade de 96% para larvas de terceiro instar de *Prays oleae*, em bioensaios com a proteína Vip3LB. Vip3Aa e Vip3Ab exibiram elevado índice de mortalidade (100%) também para *Agrotis ipsilon* e *Spodoptera exigua*. (ESTRUCH et al., 1996; LOGUERCIO et al., 2002). No caso da *A. ipsilon*, a proteína Vip3A proporciona 260 vezes atividade inseticida superior a algumas proteínas Cry1A relatadas como sendo ativas contra esta praga (ESTRUCH et al., 1996). MILNE et al. (2008) consideraram como altamente suscetíveis à Vip3Aa as espécies de *S. exigua* e *A. ipsilon*, e menos suscetíveis as espécies de *Tricloplusia ni*, *Heliotis virescens*, *Choristoneura fumiferana* e *Lymantria dispar* em bioensaios usando inibição de crescimento como resposta à dose. A toxina

Vip3A-S184 demonstrou a CL_{50} de 0,16 $\mu\text{g/ml}$ contra *Helicoverpa armigera*, enquanto para *S. litura* a CL_{50} foi de 0,27 $\mu\text{g/ml}$. Entretanto exibiu baixo nível de toxicidade para *S. exigua* com CL_{50} de 0,74 $\mu\text{g/ml}$ (CHEN et al., 2003).

Além disso, nas espécies avaliadas neste trabalho, Cry1Ia10 foi 36 vezes mais tóxica para *S. eridania* em comparação a *S. frugiperda*, que apresentou a menor sensibilidade. As CL_{50} observadas para Cry1Ia10 mostraram alta toxicidade às quatro espécies de *Spodoptera* spp., estando abaixo do valor encontrado no banco de dados "Specificity Database" (<http://www.glf.c.forestry.ca/bacillus>), o qual indica o valor de 289 ng/cm^2 para larvas neonatas de *S. frugiperda* (MARTINS et al., 2008). A proteína recombinante Cry1Ia12 também mostrou toxicidade frente a larvas de primeiro ínstar de *S. frugiperda*, sendo a CL_{50} de 5 $\mu\text{g/ml}$ (GROSSI-DE-SÁ et al., 2007). Essa alta toxicidade também foi demonstrada por BERGAMASCO et al. (2011), que avaliaram a toxicidade de Cry1Ia10 contra larvas neonatas de *S. frugiperda* e obtiveram uma CL_{50} de 17 ng/ml . A toxicidade da proteína Cry1Ia também foi demonstrada por DAMMAK et al. (2010), exibindo toxicidade contra *P. oleae* com LC_{50} de 189 ng/cm^2 . Nos estudos de LI-MING et al. (2007), a proteína Cry1Ia foi utilizada em bioensaios, e a CL_{50} de 0,268 $\mu\text{g/ml}$ e 2,227 $\mu\text{g/ml}$ foi determinada, respectivamente, para *Ostrinia fumacalis* e *P. xylostella*. A diferença entre os valores de toxicidades pode ser devido às diferentes fases larvais, metodologia de bioensaio e às populações distintas dessas espécies.

Em estudos anteriores, foi analisada a diferença entre a toxicidade para Lepidoptera dentre as diversas proteínas Cry (ESCUDERO et al., 2006) e entre Cry e Vip3 (SENA et al., 2009). No estudo de ESCUDERO et al. (2006), em bioensaios com Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba e Cry1Ia7, observou-se que *Leptinotarsa decemlineata* foi a mais sensível à Cry1Ia7, com CL_{50} de 10 $\mu\text{g/ml}$, enquanto para *Earias insulana*, *Lobesia botrana* e *P. xylostella* foram mais sensíveis à Cry1Ac, Cry1Ab e Cry1Ba, respectivamente. O trabalho de MARTINS et al. (2008) demonstrou a ação de Cry1Ia purificada contra larvas neonatas *S. frugiperda*, assim como não demonstrou resultados significativos, quando testada contra *P. xylostella* e *Anticarsia gemmatalis*. SENNA et al. (2009) avaliaram a toxicidade das proteínas Vip3Aa, Vip3Af, Cry1Ab e Cry1Fa em *S. frugiperda*, e CL_{50} das mesmas foram, respectivamente, de 49,3 ng/cm^2 , de 21 ng/cm^2 ,

de 867 ng/cm² e de 170 ng/cm² para Cry1Fa, demonstrando que as proteínas Vip3A foram mais tóxicas que as proteínas Cry1 estudadas, para a população de *S. frugiperda* estudada. Esse mesmo fato foi observado nas populações de *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides* do presente trabalho, no qual a toxina Vip3Aa foi mais tóxica que Cry1Ia10, sendo apenas menos tóxicas para a população de *S. eridania*.

No entanto, ao se analisar as CL₅₀ da combinação das duas toxinas, obtiveram-se menores doses, quando comparadas às CL₅₀ individuais de Vip3Aa e Cry1Ia10, comprovando a ação sinérgica ou aditiva entre essas proteínas em *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides* (Tabela 1). As curvas de mortalidade das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 isoladas e Vip3Aa+Cry1Ia10 ilustradas na Figura 13, demonstra o deslocamento da curva Vip3Aa + Cry1Ia10 para a esquerda, significando efeito sinérgico. A ação sinérgica também foi evidenciada por LEE et al. (1996), em que as combinações das proteínas Cry1Ab-Cry1Ac e Cry1Aa-Cry1Ac foram sinérgicas para *Lymantria dispar*. Os mecanismos do sinergismo ainda não foram completamente elucidados (SHARMA et al., 2010). Há uma hipótese de que a formação dos poros por diferentes toxinas causa uma descompensação osmótica das células, causando uma maior mortalidade (LEE et al., 1996), ou que a formação de hetero-oligômeros, isto é, a oligomerização entre diferentes toxinas também melhoraria a habilidade de união do que homo-oligômeros (CHAKRABARTI et al., 1998), além da possibilidade do aumento da toxicidade pela prevenção de uniões não específicas (SCHNEPF et al., 1998).

Contudo, para essa população de *S. eridania*, foi verificada ação antagônica quando as toxinas foram testadas conjuntamente, evidenciada pelo aumento significativo da CL₅₀, que foi superior à soma das CL₅₀ de Cry1Ia10 e Vip3Aa individuais (Tabela 1). As curvas de mortalidade das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 isoladas e Vip3Aa+Cry1Ia10 ilustradas na Figura 13, demonstra o deslocamento da curva Vip3Aa + Cry1Ia10 para a direita, significando efeito antagônico. Esse tipo de antagonismo também foi verificado por LEE et al. (1996), em que a combinação das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab foi três vezes menos efetiva do que o esperado para *L. dispar*. Uma das possibilidades do tipo de competição entre Vip3Aa e Cry1Ia10 em *S. eridania* pode ter como base as propriedades da resposta das interações com receptores, descrita por

VANDEN HEUVEL et al. (2002). Nessa resposta, esse tipo de resultado pode ser devido a um antagonismo por agonismo parcial ou dualismo, no qual as duas toxinas podem apresentar afinidades semelhantes pelos mesmos receptores, porém com atividades intrínsecas diferentes e atuam, inicialmente, de forma sinérgica, devido à grande disponibilidade de receptores. Porém, quando se esgotam os receptores, elas passam a atuar de forma antagônica, ou seja, o agonista parcial ocupa os receptores e não atuam de forma muito eficaz, atrapalhando a ação do agonista total (VANDEN HEUVEL et al., 2002). Outra possibilidade é de que essas proteínas formam hetero-oligômeros que têm ação menos eficaz em *S. eridania* do que as proteínas em homo-oligômeros ou monômeros. Para que seja definido qual o mecanismo desse antagonismo, deve-se melhor caracterizar os receptores envolvidos nessa ação.

A expressão de genes de vários microrganismos em *E. coli* tem sido largamente utilizada com sucesso e, trabalhando com esta técnica, obteve-se um novo gene *cry11a* de um isolado brasileiro clonado, expresso em *E. coli* BL21 (DE3). Essa estratégia também permitiu a expressão da proteína Vip3Aa, com propriedades inseticidas interessantes, particularmente pela sua forma solúvel, assim como as proteínas Cry11a. A toxicidade dessas proteínas foi verificada frente a pragas da ordem Lepidoptera, com diversos níveis de toxicidade para cada espécie estudada. Esses resultados demonstram claramente que as toxinas de *B. thuringiensis* Vip3Aa e Cry11a10 são altamente ativas contra essas populações de *Spodoptera* spp., sendo Vip3Aa mais tóxica a *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*, com atividade sinérgica com Cry11a10, e que Cry11a10 é a mais efetiva contra *S. eridania*, com ação antagônica com Vip3Aa. Este fato demonstra a ação diferenciada dessas proteínas às espécies do mesmo gênero de inseto-praga.

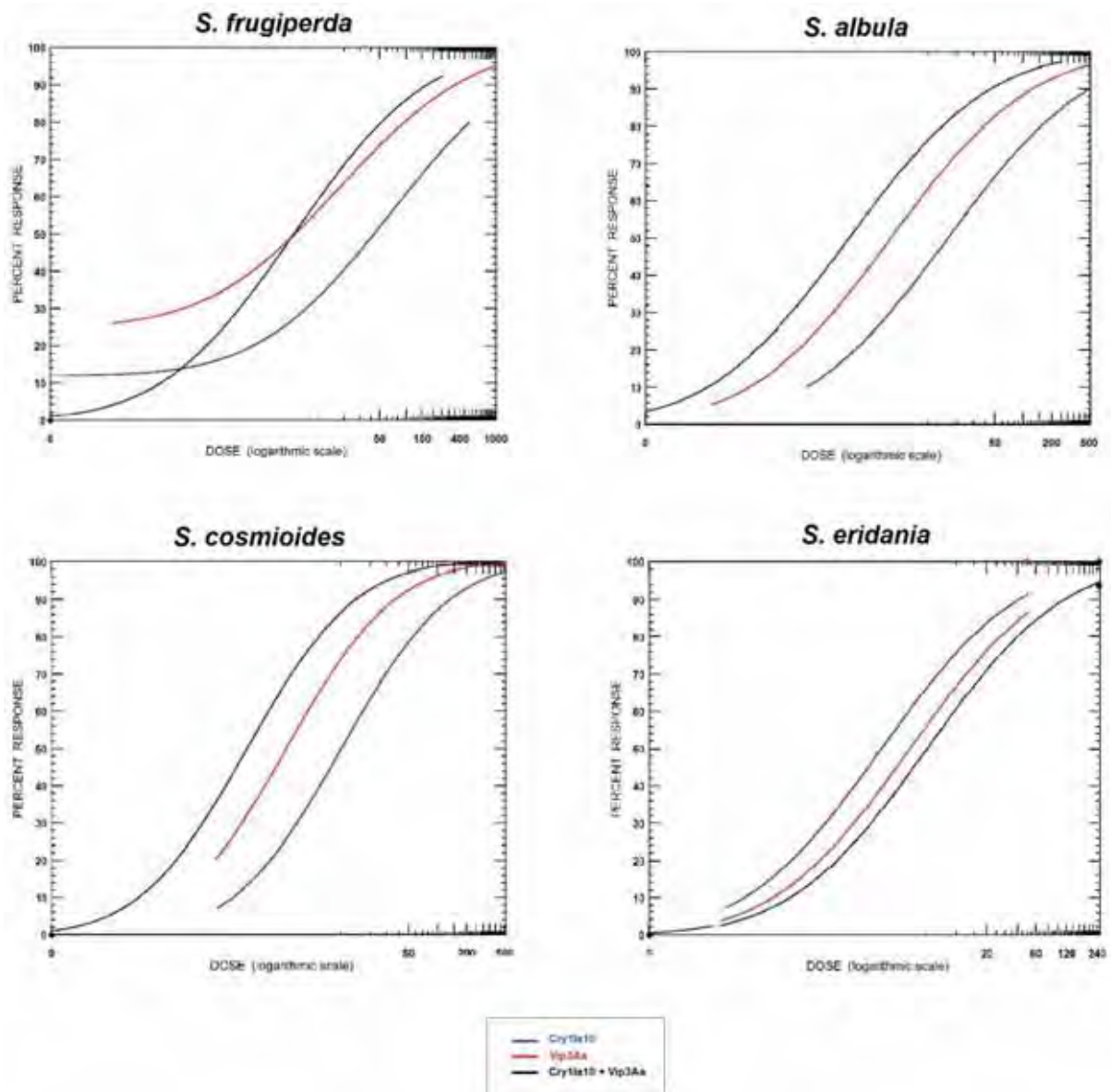


Figura 13. Curvas de mortalidade das quatro espécies de *Spodoptera* pela ação das proteínas Vip3Aa e Cry11a10 isoladas e Vip3Aa+Cry11a10. O deslocamento da curva Vip3Aa + Cry11a10 para esquerda demonstra o efeito sinérgico e para a direita o efeito antagônico.

5.3. Purificação, ativação das protoxinas e marcação com biotina

Após a análise da expressão, os lisados bacterianos, contendo as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10, foram purificados em colunas HisTrap HP (Figura 14). Na purificação, não houve completo êxito, visto que as frações (Frações 1 e 2) com maior concentração das proteínas Cry1Ia e Vip3Aa contêm outras bandas de proteínas, indicando inespecificidade na ligação dessas proteínas ao níquel da coluna. Mesmo não tendo as frações somente com a proteína de interesse, as bandas referentes às proteínas Cry1Ia e Vip3Aa, das frações mais puras (Frações 3 e 4), foram quantificadas por desintometria para os experimentos com marcação por biotina das proteínas purificadas e ativadas.

As proteínas purificadas foram ativadas com tripsina. A ativação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 no presente estudo corroboraram os dados publicados (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2009; LEE et al., 2003), resultando em toxinas ativadas de aproximadamente 62 kDa tanto para Vip3Aa quanto para Cry1Ia10 (Figura 15). Essas toxinas foram biotiniladas para utilização em ensaios de união com BBMV das espécies estudadas.

A ativação das proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa por tripsina é um passo essencial para que se possa determinar sua atividade tóxica *in vitro*. Esse procedimento é feito para que se consiga reproduzir o evento de proteólise da protoxina em toxina ativa, que ocorre *in vivo* no lúmen do intestino médio das larvas. O processo de proteólise é essencial para a atividade de Vip e Cry devido à incapacidade dessas proteínas não processadas se unirem às BBMV *in vitro* nos ensaios de união. Essa ativação pode ser feita com o suco intestinal das larvas dos insetos analisados ou com tripsina. A escolha da ativação por tripsina, no presente trabalho, é baseada em LEE et al. (2003), que determinou que tanto o suco intestinal quanto a tripsina formam predominantemente uma toxina Vip3A de 62 kDa. Esse tamanho de fragmento também foi verificado para tripsinização de Vip3Lb (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2009), assim como o de 60 kDa verificado por ESCUDERO et al. (2006) na ativação de Cry1Ia7 por tripsina.

As toxinas ativas, de aproximadamente 62 KDa tanto para Vip3Aa quanto para Cry1Ia10, foram biotiniladas. As frações das proteínas marcadas com biotina eluídas da coluna P10 Desalting foram detectadas pela análise por “Dot Blot” e evidenciaram as melhores frações (frações de 10 a 13), como visualizado na Figura 16. Essas frações foram utilizadas nas próximas etapas nos ensaios de união com BBMV's das espécies estudadas.

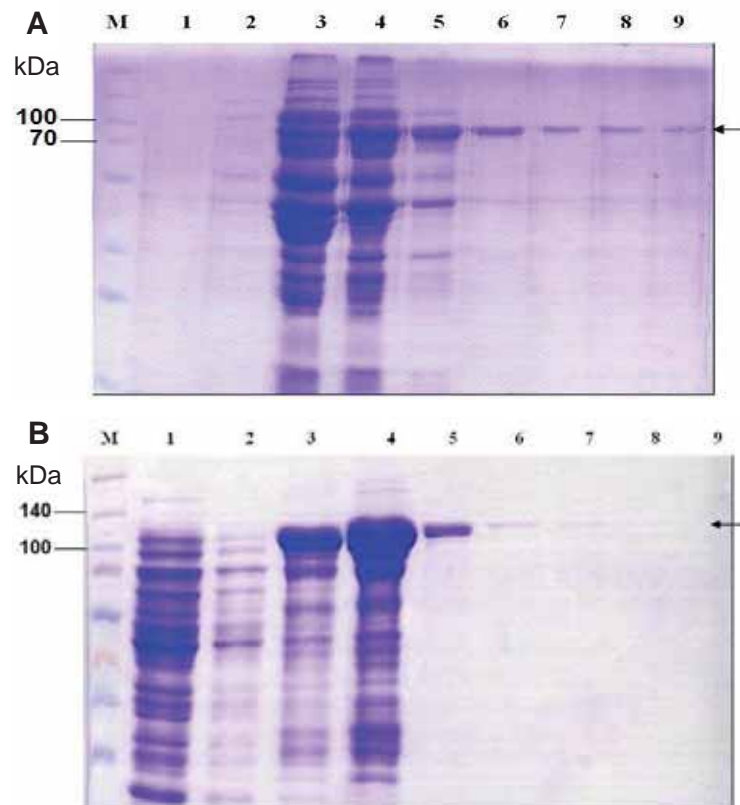


Figura 14. Análise por SDS PAGE 10% das frações das proteínas Cry1Ia10 (A) e Vip3Aa (B) purificadas em colunas HisTrap HP (Amersham), carregadas com níquel. Canaletas: M= Marcador molecular em KDa, Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 1= tampão de equilíbrio passado pela coluna após a passagem da proteína; 2= tampão de equilíbrio após a eluição da proteína; 3= 1ª fração da purificação; 4= 2ª fração da purificação; 5= 3ª fração da purificação; 6= 4ª fração da purificação; 7= 5ª fração da purificação; 8= 6ª fração da purificação; 9= 7ª fração da purificação. Proteínas Cry1Ia10 e Vip3Aa estão indicadas pela seta.

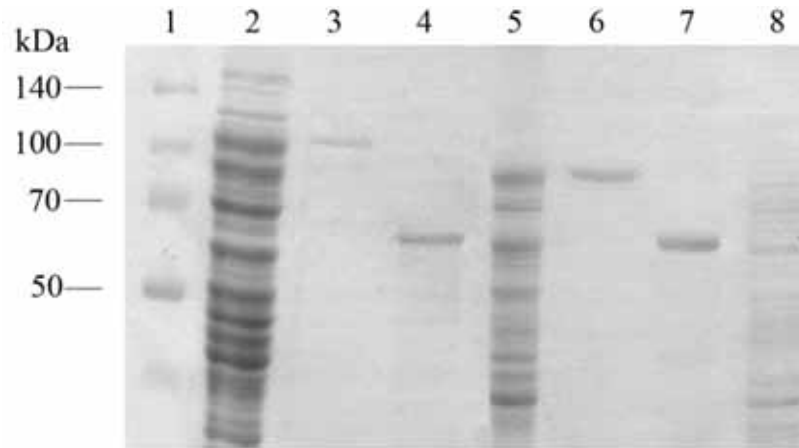


Figura 15. Análise da expressão, purificação e ativação das proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 em gel de SDS PAGE 10%. Canaletas: 1- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2- Lisado contendo a proteína Vip3Aa; 3- Proteína Vip3Aa purificada; 4- Proteína Vip3Aa tripsinizada; 5- Lisado contendo a proteína Cry1Ia; 6- Proteína Cry1Ia purificada; 7- Proteína Cry1Ia tripsinizada; 8- Controle negativo: lisado de *E. coli* BL21 (DE3).

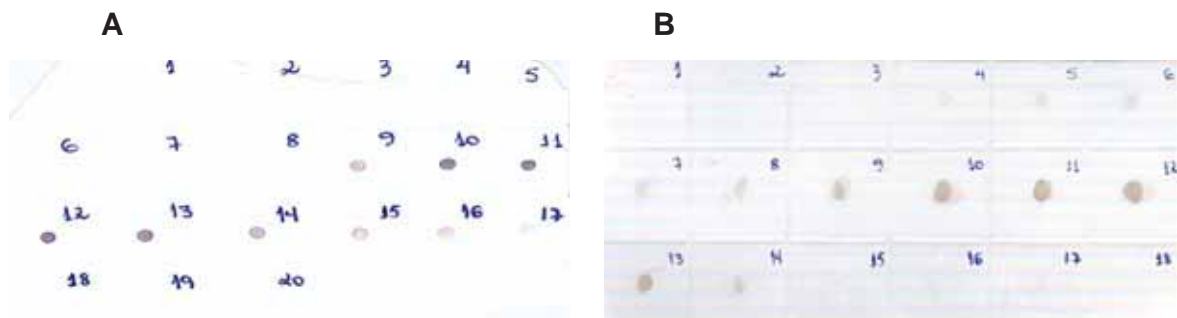


Figura 16. Análise por “Dot Blot” das frações das proteínas Vip3Aa (A) e Cry1Ia10 (B) biotiniladas. Os números são a sequência das frações biotiniladas eluídas da coluna P10 Desalting.

No teste de ligação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas às BBMVs, o melhor resultado (dado não mostrado) foi obtido com 20 µg de BBMVs e 50 ng das proteínas biotiniladas, utilizado nos experimentos a seguir. Esta escolha é estabelecida pela não diferença entre a ligação destas concentrações e de maiores concentrações de BBMVs e proteínas, devido à saturação da ligação dos receptores e assim, a não diferenciação na intensidade da banda obtida com 20 µg de BBMVs e 50 ng das proteínas com as bandas de outras concentrações.

5.4. Detecção dos receptores por “Ligand-Blotting”

A análise “Ligand-blotting” permitiu demonstrar a união das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas aos receptores putativos presentes nas BBMVs por meio da detecção de uma banda evidenciada pelo anticorpo específico para biotina. Nesse ensaio, a marcação da banda na membrana indica que a proteína biotinilada conseguiu se ligar aos seus receptores, enquanto a falta de marcação indica que a proteína biotinilada não conseguiu se ligar aos receptores, isto é, não há reconhecimento entre eles.

Tanto a toxina Vip3Aa quanto a Cry1Ia10 biotiniladas ligaram-se em receptores putativos de cerca de 65 kDa nas BBMVs íntegras de *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* e *S. eridania* (Figura 17). Esse mesmo resultado foi verificado na ligação com as proteínas solúveis (sobrenadante) das BBMVs tratadas com fosfolipase C de *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* e *S. eridania* (Figura 18).

Essa análise evidenciou a ligação com receptores ancorados ao glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se solubilizaram após o tratamento com fosfolipase C, confirmado pela não ligação das proteínas biotiniladas aos receptores de membrana mantidos na parte insolúvel das BBMVs. A ligação dessas duas toxinas à banda proteica de 65 kDa indica que há possíveis receptores de tamanho molecular semelhantes na membrana apical do intestino médio nas quatro espécies de lagartas testadas.

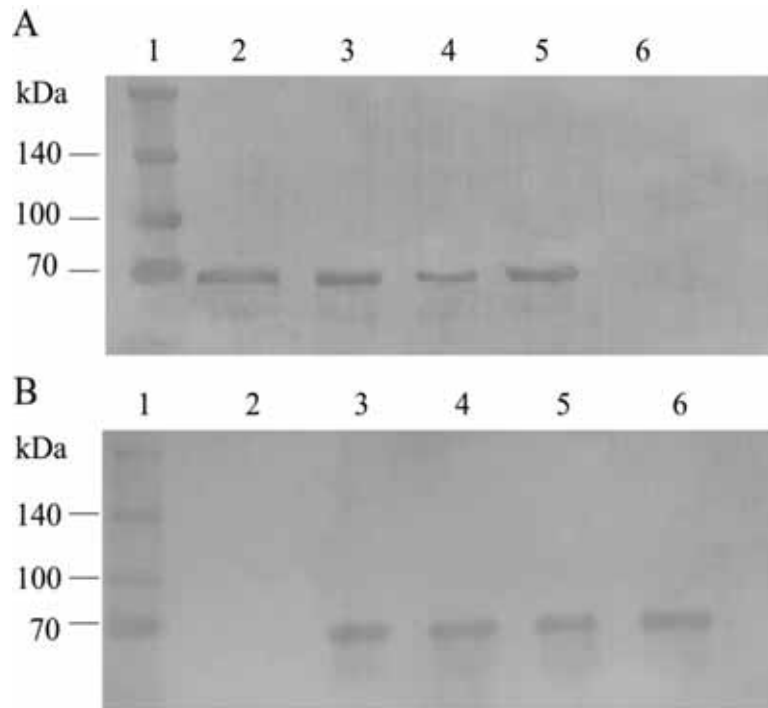


Figura 17. Detecção do receptor putativo para as toxinas Vip3Aa (A) e Cry1Ia10 (B) biotinizadas em BBMVs íntegras de *Spodoptera* spp. por “Ligand-blotting”. (A) Canaletas: 1- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2- BBMV de *S. frugiperda*; 3- BBMV de *S. albula*; 4- BBMV de *S. eridania*; 5- BBMV de *S. cosmioides*; 6- BSA como controle negativo. (B) Canaletas: 1- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2- BSA como controle negativo; 3- BBMV de *Spodoptera frugiperda*; 4- BBMV de *S. albula*; 5- BBMV de *S. eridania*; 6- BBMV de *S. cosmioides*.

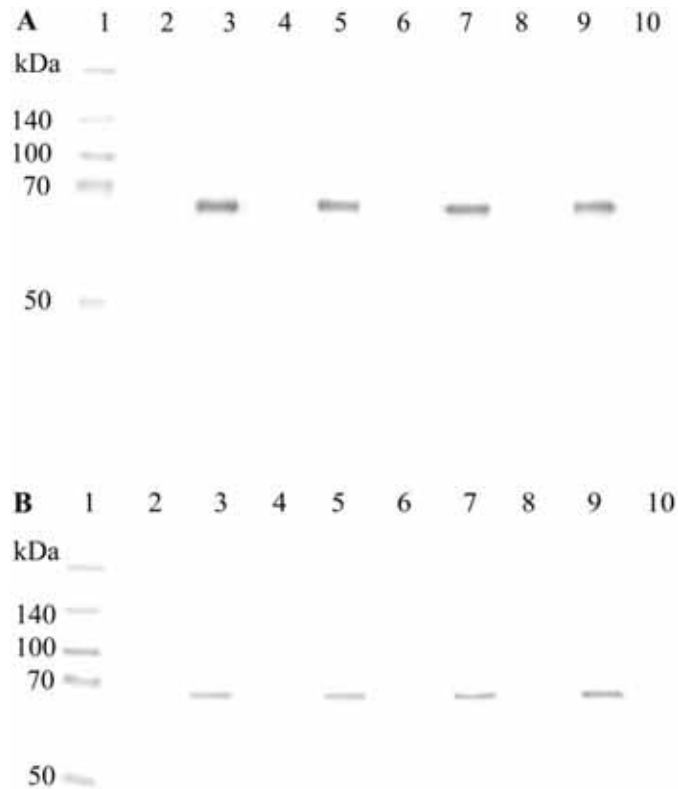


Figura 18. Detecção do receptor putativo para as toxinas Vip3Aa (A) e Cry1Ia10 (B) biotiniladas em BBMV tratadas com fosfolipase C de *Spodoptera* spp. por “Ligand-blotting”. (A) Canaletas: 1- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas); 2- BSA como controle negativo; 3- Fração solúvel da BBMV de *S. frugiperda* tratada com fosfolipase C; 4- Fração não solúvel da BBMV de *S. frugiperda* tratada com fosfolipase C; 5- Fração solúvel da BBMV de *S. albula* tratada com fosfolipase C; 6- Fração não solúvel da BBMV de *S. albula* tratada com fosfolipase C; 7- Fração solúvel da BBMV de *S. cosmioides* tratada com fosfolipase C; 8- Fração não solúvel da BBMV de *S. cosmioides* tratada com fosfolipase C; 9- Fração solúvel da BBMV de *S. eridania* tratada com fosfolipase C; 10- Fração não solúvel da BBMV de *S. eridania* tratada com fosfolipase C.

Desse modo, essas proteínas são capazes de exercer sua atividade e, conseqüentemente, provocar a morte do inseto. Essa ação foi comprovada nos bioensaios realizados para as quatro espécies de *Spodoptera* estudada. Mas apenas a detecção da ligação das proteínas aos receptores não significa, necessariamente, que elas apresentam toxicidade, porém, se não ocorresse ligação de alguma das proteínas aos receptores, pode-se presumir que receptores específicos para a toxina que não conseguiu se ligar sofreu algum tipo de modificação, provocando, assim, o surgimento de resistência (DUMAS, 2009). XIE et al. (2005) demonstraram que a diminuição de ligação da proteína Cry1Ac aos receptores do tipo caderina em *H. virescens* pode provocar o surgimento de populações resistentes, realizando mutações em sítios específicos dos receptores, que ocasionaram diminuição na ligação da proteína aos seus receptores, e, conseqüentemente, uma diminuição na toxicidade da toxina. Esse fato não foi observado no presente estudo, demonstrando claramente a ligação das duas toxinas aos receptores das quatro espécies de *Spodoptera* estudadas.

Em estudo de BRAVO et al. (2007), foram identificados diferentes receptores para as toxinas Cry, em intestinos médios de larvas de insetos suscetíveis da ordem Lepidoptera, e demonstrada a importância das proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI) na interação das toxinas Cry1 nesta ordem de insetos. Entre essas proteínas estão fosfatases alcalinas com tamanho molecular entre 62 kDa e 68 kDa (FERNÁNDEZ et al., 2006; JURAT-FUENTES & ADANG, 2006 e 2004) e aminopeptidases-N de tamanho molecular entre 112 kDa e 120 kDa (HUA et al., 2004; PACHECO et al., 2009; RAJAGOPAL et al., 2003), podendo estar na forma de homodímero de 130 kDa, formado por monômeros de 65 kDa (MALIK et al., 2006). Além das proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI), os mais bem caracterizados para proteínas Cry são os receptores do tipo caderina, com tamanho molecular ao redor de 210 kDa (FLANAGAN et al., 2005; HUA et al., 2004; JURAT-FUENTES & ADANG, 2006).

Os resultados obtidos neste experimento corroboraram os obtidos por DUMAS (2009), nos quais as membranas contendo as BBMV's não tratadas com fosfolipase e as BBMV's tratadas com fosfolipase e os receptores purificados tanto das populações

susceptíveis e quanto das resistentes de *A. gemmatalis*, apresentaram ligações a receptores de massa molecular de 65 kDa, aproximadamente, quando submetidas à marcação com as proteínas biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2A. Este autor indica que os receptores das populações susceptível e resistente sejam os mesmos, porém ensaios enzimáticos devem ser realizados para que essa hipótese seja confirmada.

Fundamentado nessas informações, o receptor putativo de 65 kDa para Cry1Ia10 pode consistir em um monômero de aminopeptidases-N ou de fosfatases alcalinas, assim como para Vip3A. Mas, diferentemente das toxinas Cry, diversos receptores putativos foram detectados para a toxina Vip3A, entretanto estes ainda não foram caracterizados (SINGH et al., 2010). Em estudos com a toxina Vip3Aa16, verificou-se a ligação a receptores putativos de 65 kDa para *E. kuehniella* (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011b), e de dois receptores putativos de 55 e 100 kDa em *S. littoralis* (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011a). LEE et al. (2003) detectaram dois receptores putativos de 80 e 100 kDa em BBMV's de *Manduca sexta* para Vip3A-G. Também foi identificada a união de Vip3LB em um receptor putativo de 65 kDa no intestino médio de *P. oleae* (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2009).

Os modelos de receptores descritos em alguns trabalhos mostram que um inseto pode apresentar, em quantidade variável, diversas classes de receptores que podem ser reconhecidos por diferentes toxinas (MALIK et al., 2006; PERERA et al., 2009; RAJAGOPAL et al., 2003). Essa diversidade de receptores pode explicar a heterogeneidade em BBMV's utilizadas para determinar a afinidade da toxina Cry (MALIK et al., 2006) e que essa união ao receptor é essencial para a toxicidade.

Desse modo, pode-se inferir que os receptores putativos, de cerca de 65 kDa, detectados em *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* e *S. eridania* para Vip3Aa e Cry1Ia10, podem ser similares, entretanto podem não ser o mesmo receptor. Seus tamanhos coincidem com o tamanho de receptores do tipo fosfatase alcalina ancorada ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e com monômero de aminopeptidase ancorada ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI) descritos por outros trabalhos. Entretanto, novos testes serão realizados para que se comprove essa hipótese. E a caracterização desses

receptores putativos por atividade enzimática ou sequenciamento de seus aminoácidos poderão determinar as similaridades ou dissimilaridades entre eles e a compreensão dos mecanismos de união entre Vip3Aa e Cry1Ia nesses receptores.

5.5. Análises da competição entre Cry1Ia10 e Vip3Aa biotiniladas

Os ensaios de união foram realizados com as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia em BBMV's das quatro espécies de *Spodoptera* estudadas. Nesse ensaio, a marcação da membrana indica que a proteína biotinilada conseguiu se ligar aos seus receptores, enquanto a falta de marcação indica que a proteína biotinilada não conseguiu se ligar, isto é, as proteínas não-biotiniladas se ligaram aos receptores, impedindo, dessa maneira, a ligação das proteínas biotiniladas.

As toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 biotiniladas se ligam especificamente às BBMV's de *S. frugiperda*, *S. eridania*, *S. albula* e *S. cosmioides* (Figura 19, canaletas 2 e 8). Essa ligação específica foi comprovada pelo ensaio de competição homóloga com a adição de um excesso da mesma toxina não marcada, reduzindo substancialmente a união das toxinas marcadas às BBMV's (Figura 19, canaletas 3 e 7) e que não houve marcação quando as mesmas proteínas (biotiniladas e não-biotiniladas) foram incubadas com os receptores de todas as espécies estudadas. Isso ocorre devido ao fato das proteínas não biotiniladas possuírem uma concentração superior à concentração das proteínas biotiniladas.

No ensaio de competição heteróloga para *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides* (Figuras 19 A, B e C, canaletas 4, 5 e 6), a adição de um excesso da toxina competidora Cry1Ia10 não marcada não reduziu a união da toxina Vip3Aa marcada. Isto é, a proteína biotinilada conseguiu se ligar aos receptores dessas espécies, e essa ligação não foi deslocada pela presença do competidor, obtendo a membrana marcada por essa ligação. Esse resultado confirmou que não houve competição com a proteína Vip3Aa pelos receptores intestinais desses insetos. Devido a isso, os receptores nestas três espécies devem ser distintos para as proteínas analisadas.



Figura 19. União das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 às BBMVs de *S. frugiperda* (A), *S. albula* (B), *S. cosmioides* (C) e *S. eridania* (D). Canaletas: 1 – Vip3Aa biotinilada (controle sem BBMV); 2- Vip3Aa biotinilada ligada à BBMV (sem competidor); 3- Competição homóloga: Vip3Aa biotinilada e Vip3Aa não marcada (com excesso de 200 vezes); 4- Competição heteróloga: Vip3Aa biotinilada e Cry1Ia10 não marcada (com excesso de 200 vezes); 5- Competição heteróloga: Vip3Aa biotinilada e Cry1Ia10 não marcada (com excesso de 500 vezes); 6- Competição heteróloga; Vip3Aa biotinilada e Cry1Ia10 não marcada (com excesso de 1.000 vezes); 7- Competição homóloga: Cry1Ia10 biotinilada e Cry1Ia10 não marcada (com excesso de 200 vezes); 8- Cry1Ia10 biotinilada ligada à BBMV (sem competidor); 9- Cry1Ia10 biotinilada (controle sem BBMV).

Na competição heteróloga para *S. eridania* (Figura 19 D, canaletas 4, 5 e 6), por outro lado, a adição de um excesso da toxina competidora Cry1Ia10 não marcada reduziu parcialmente a união da toxina Vip3Aa marcada à BBMV dessa espécie. Entretanto, mesmo com um excesso de 1.000 vezes, não houve remoção total da proteína Vip3Aa marcada pelo competidor Cry1Ia10. Essa redução foi quantificada por densitometria, sendo que a competição reduziu, com excesso de 200, 500 e 1000 vezes, respectivamente 33%, 55% e 57,33%. Este fato confirma que houve competição,

mas que essa competição não se deve a uma afinidade total pelo mesmo receptor. O deslocamento da proteína Vip3Aa pode ser devido a um agonismo parcial ou antagonismo, ou seja, podem existir dois sítios receptores para essas proteínas, sendo um deles o mesmo sítio receptor entre elas. Porém, mesmo que a proteína Cry1Ia10 apresente baixa afinidade pelo receptor análogo, ela é suficiente para deslocar a união de Vip3Aa em parte dos receptores nas BBMVs do intestino médio dessa espécie de praga.

Essa mesma análise de união a receptores entre proteínas Cry e Vip foi feita por LEE et al. (2006), que determinou que para BBMVs de *H. virescens* e *Helicoverpa zea* não houve competição entre Vip3A e Cry1Ac, como também entre Vip3A e Cry2Ab2. Para GOUFFON et al. (2011), a competição entre a proteína Cry2Ae marcada radioativamente e as proteínas competidoras Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa, Vip3A, Cry2Ae e Cry2Ab em BBMVs de *H. virescens*, *H. zea* e *H. armigera* demonstraram que Cry2Ae não compete com as proteínas Cry1 e Vip3. Em trabalho realizado com *S. frugiperda*, SENA et al. (2009) demonstraram que as toxinas Cry1 e Vip3a analisadas ocupam sítios de união distintos, e que a proteína Cry1Fa ocupa o mesmo sítio de união que Cry1Ab, ao mesmo tempo que Vip3Af1 e Vip3Aa1 competem pelo mesmo receptor.

A ligação de diferentes proteínas Cry1Ia de *B. thuringiensis* ao epitélio intestinal de larvas de lepidópteros foi caracterizada, também, por união à BBMV. Em trabalho feito por IBARGUTXI et al. (2006), demonstraram a não competição da toxina Cry1Ia biotinizada e Cry1Ac em BBMV de *E. insulana*. No trabalho de ESCUDERO et al. (2006), Cry1Ia7 biotinizada não ocupou o mesmo sítio de união das toxinas Cry1Ab ou Cry1Ac no intestino de *E. insulana* e *Lobesia botrana*.

A ligação de diferentes proteínas cristal de *B. thuringiensis* às BBMVs de larvas de *S. frugiperda* foi estudada por ARANDA et al. (1996). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que as toxinas interagem com as microvilosidades das células epiteliais de *S. frugiperda* por duas diferentes vias. A primeira é típica das proteínas altamente tóxicas (como Cry1C e Cry1D); essa interação é saturada e específica. Ao contrário, algumas proteínas não tóxicas (semelhante a Cry1Ab) interagem não especificamente com as microvilosidades, assim a ligação dessa toxina não é afetada

pela presença de altas concentrações de competidor homólogo. A toxina Cry1C liga-se a duas proteínas do epitélio intestinal, enquanto Cry1Ab liga-se a uma única proteína de 150 kDa. A ligação dessa proteína foi observada, mas foi extremamente fraca, implicando que esse tipo de interação ocorre também *in vivo*, embora não esteja relacionada à toxicidade.

Em relação ao papel dos domínios II e III na interação com receptores específicos em BBMV de espécies de *Spodoptera*, AVISAR et al. (2004) verificaram que o domínio II de Cry1C pode competir com a ligação do domínio III, enquanto o último não interfere com a ligação do domínio II. Isso indica as interações sequenciais do domínio III e, então, do domínio II com o mesmo sítio na membrana. Não se observou competição do domínio II de Cry1C e Cry1E, confirmando a existência de diferentes sítios de ligação para o domínio das duas toxinas. HERRERO et al. (2004), também estudando os domínios de ligação, agora com *S. exigua*, verificaram que a afinidade do mutante pPB19 (mutação no domínio II da toxina Cry1Ca) foi fracamente afetada (duas vezes menor), comparada à toxina Cry1Ca, enquanto a afinidade dos mutantes com o domínio III alterado (pPB20 e pPB21) foi aproximadamente oito vezes maior. Esse estudo demonstrou como alterações na estrutura primária de Cry1Ca podem ser correlacionadas com alterações em diferentes etapas de seu modo de ação. Em ensaios de competição com BBMV de *Ostrinia furnacalis*, no estudo de GUO et al. (2011), uma proteína Cry1Ie truncada na porção N-terminal, denominada de toxina IE648, demonstrou que esta não compete com a proteína Cry1Ac, mesmo tendo uma alteração na sua estrutura.

Assim como não há relatos da competição por união a receptores entre toxinas Vip3 e Cry, não há relatos do mesmo tipo de competição entre toxinas Cry1Ia e outras toxinas Cry. Esse modo de ação diferenciado de outras toxinas Cry, faz com que Vip3Aa e Cry1Ia10 possam ter atividades similares ou até mesmo competir pela união de algum tipo de receptor. Dentre as quatro espécies de *Spodoptera*, apenas em *S. eridania* essas toxinas atuaram em antagonismo e houve inibição da ligação em receptores por competição entre as toxinas. Esse fato é o primeiro relato da inibição *in vivo* e *in vitro* entre proteínas Cry e Vip, verificado em uma espécie de *Spodoptera*.

Esses resultados estão sintetizados na Figura 20.

A análise de competição corroborou os resultados dos bioensaios, nos quais foi determinada a alta efetividade dessas toxinas a todas as quatro espécies estudadas, bem como os mecanismos de ação desiguais entre espécies de *Spodoptera*. As diferenças entre espécies desse gênero também foi verificada por SANTOS et al. (2009), onde as toxinas Cry1Aa e Cry1Ab foram ativas para *S. frugiperda* e *S. cosmioides* e não ativas à *S. eridania*, ao mesmo tempo que Cry2A somente foi efetiva à *S. eridania*. Os autores alertam sobre o risco da utilização das toxinas estudadas para o controle do complexo de *Spodoptera*, pois a susceptibilidade das espécies é diferente, o que pode vir a causar resistência de uma delas.

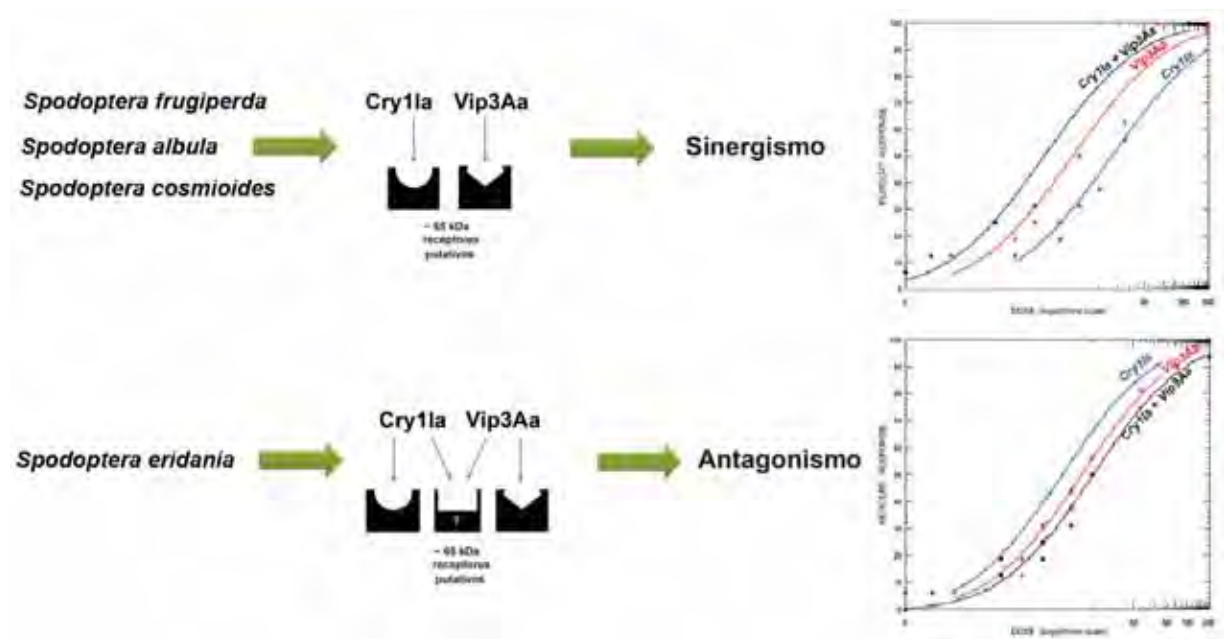


Figura 20. Modelo proposto para o modo de ação das toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 para as quatro espécies de *Spodoptera* a partir dos resultados obtidos no presente trabalho.

Os dados obtidos no presente estudo também devem servir de alerta para que sejam realizados estudos de susceptibilidade de cada inseto-alvo primário ou secundário frente a cada toxina candidata a ser utilizada no controle de pragas do mesmo gênero. Pragas secundárias e atualmente pouco importantes para a agricultura podem se tornar pragas primárias, caso o manejo de controle não seja bem feito. Usando as toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10, pode-se teorizar que, embora seja a mais suscetível, poderia se selecionar *S. eridania* e talvez elevar seu “status” de praga secundária para praga primária. Este fato seria solucionado utilizando-se plantas transgênicas “piramidais” expressando as toxinas Vip3Aa e Cry1Ia10 e outra toxina que seja altamente ativa e não competidora pelos mesmos receptores para *S. eridania*. Também poderia ser feita com utilização desta planta piramidada com os dois genes concomitante ao uso de bioinseticidas à base de estirpes nativas. Além da possibilidade do uso destas toxinas somente em bioinseticidas para aplicações nas culturas, o que facilitaria a modificação das toxinas utilizadas caso ocorra resistência das pragas. Este uso de toxinas com ações diferenciadas apresentaria uma diversidade de proteínas Cry e Vip que pode minimizar a pressão de seleção que induz à resistência do complexo *Spodoptera*, importante no Manejo Integrado de Pragas.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- Os clones dos genes *cry1Ia* e *vip3Aa* de *Bacillus thuringiensis* em sistema bacteriano da *Escherichia coli* BL21 (DE3), foram efetivos para expressão, purificação e ativação das proteínas Cry1Ia e Vip3Aa.
- As proteínas Cry1Ia e Vip3Aa foram eficazes no controle das larvas das quatro espécies de *Spodoptera* estudadas por bioensaios. Estas proteínas tem ação sinérgica a *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*, e antagônica a *S. eridania*, quando testadas conjuntamente nos bioensaios.
- Em *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* e *S. eridania*, as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia10 se ligam a receptores putativos, com aproximadamente 65 kDa, compatível com tamanho de receptores do tipo fosfatase alcalina ancorada ao GPI ou com monômero de aminopeptidase ancoradas ao GPI.
- Cry1Ia10 não compete pelo mesmo sítio de união que Vip3Aa em *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*, no entanto há uma competição parcial em *S. eridania*.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Devido aos mecanismos de ação desiguais nas espécies de *Spodoptera*, a indicação de uso de Vip3Aa e Cry1Ia10, combinados no controle dessas pragas polífagas, poderá ser feita após a caracterização de seus receptores por atividade enzimática ou sequenciamento de seus aminoácidos, para elucidar precisamente os mecanismos de união entre Vip3Aa e Cry1Ia nesses receptores.
- A combinação dos genes *vip3Aa* e *cry1Ia* pode ser utilizada na obtenção de plantas *Bt* piramidadas, visando ao manejo da resistência de *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*, visto que essas proteínas não competem pelo mesmo sítio receptor. Entretanto, para *S. eridania*, essa combinação de genes em plantas piramidadas poderia proporcionar certa resistência dessa praga, devido à uma mutação nesse sítio receptor comum entre Vip3Aa e Cry1Ia.
- Portanto, esses resultados evidenciam similaridades entre as proteínas Vip3Aa e Cry1Ia e sugerem que nem sempre a piramidação de plantas com determinados genes pode ser efetiva para suplantar a resistência de diferentes espécies do mesmo gênero de insetos-praga.

VIII. REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; JAOUA S.; TOUNSI S. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. **Journal of Invertebrate Pathology, San Diego**, v.107, 198 – 201, 2011 b.

ABDELKEFI-MESRATI, L.; ROUIS, S.; SELLAMI, S.; JAOUA S. *Prays oleae* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3LB differs from that of Cry1Ac toxin. **Molecular Biotechnology**, v. 43, 15-19, 2009.

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H., DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA , T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology, San Diego**, v. 2, p. 250-254, 2011 a.

ABDULLAH, M.D.; SARNTHOY, O.; CHAEYCHOMSRI, S.; SARNTHOY, O. Comparative study of artificial diet and soybean leaves on growth, development and fecundity of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 34, p. 339-344, 2000.

ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECAL.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, p. 203-212, 1996.

ARMSTRONG, C.L.; PARKER, G.B.; PERSHING, J.C.; BROWN, S.M.; SANDERS, P.R.; DUNCAN, D.R; STONE, T.; DEAN, D.A; De BOER, D.L; HART, J.; HOWE, A.R.; MORRISH, F.M.; PAJEAU, M.E.; PETERSEN,W.L.; REICH, B.J.; RODRIGUEZ, R.;

SANTINO, C.G.; SATO, S.J.; SCHULER, W.; SIMS, S.R.; STHELING, S.; TAROCHIONE, J.; FROMM, M. E. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, v. 35, p. 550-557, 1995.

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

ARONSON, A. L.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, Palo Alto, v. 50, p.1-24, 1986.

ARORA, N. et al. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 310, p. 158-162, 2003.

AVISAR, D.; KELLER, M.; GAZIT, E.; PRUDOVSKY, E.; SNEH, B.; ZILBERSTEIN, A. The role of *Bacillus thuringiensis* Cry1C and Cry1E separate structural domains in the interaction with *Spodoptera littoralis* gut epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.15779-15786, 2004.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORETSI, J.; RINGENBERG, R. Efeito de fontes de carboidratos sobre o desempenho reprodutivo de *Spodoptera cosmioides* (Walk., 1858) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, v.3, p.177-180, 2001.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORETSI, J.; RINGENBERG, R. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamão, soja e feijão. **Ciência Rural**, v.6, p.993-998, 2003.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M.S.; GRÜTZMACHER, A.D.; FORETSI, J.; RINGENBERG, R. 2004. Adequação de uma dieta artificial para a criação de

Spodoptera cosmioides (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em Laboratório. **Neotropical Entomology**, v.33, p.155-161, 2004.

BAXTER, S. W.; ZHAO, J. Z.; GAHAN, L. J.; SHELTON, A. M.; TABASHNIK, B. E.; et al. Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. **Insect Molecular Biology**, v. 14, p. 327-334, 2005.

BAXTER, S.; ZHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 125-135, 2008.

BERGAMASCO, V. B. **Identificação de genes *cry1* em isolados de *Bacillus thuringiensis* e expressão do gene *cry1la* em *Escherichia coli* visando o controle de pragas da cultura algodoeira.** 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009.

BERGAMASCO, V.B.; GONÇALVES, J.F.; POLANCZYK, R.A.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F. Expression of a new *Bacillus thuringiensis cry1la* gene in *Escherichia coli* with strong activity against cotton pests. **Australian Journal of Basic and Applied Science**, v. 5, n.12, p. 526-533, 2011.

Bertels, A.; Baucke, O. Segunda relação das pragas das plantas cultivadas no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 17-46, 1966.

BHALLA, R., et al. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 243, p. 467-472, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L.I., LATROU, K., GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier BV, 2005. p.175-206.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F.J.; GUADALUPE, P.; NUNEZ-VALIDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

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

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, p. 423-431, 2011.

BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1667, p.38–46, 2004.

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

BUNTIN, G.D.; LEE, D.; WILSON, D.M.; McPHERSON, R.M. Evaluation of YieldGard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. **Florida Entomology**, v. 84, p. 37-42, 2001.

BURKNESS, E.C.; HUTCHION, H.C.; WEINZIERL, R.A.; WEDBERG, J.L.; WOLD, S.J.; SHAW, J.T. Efficacy and risk efficiency of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus*

thuringiensis toxin for lepidopteran pest management in the Midwestern US. **Crop Protection**, v.21, p.157-169, 2002.

CHAKRABARTI, S.K.; MANDAOKAR, A.; KUMAR, P.A.; SHARMA, R.P. Efficacy of lepidopteran specific δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 72, p. 336-337, 1998.

CHEN, J.; YU, J.; TANG, L.; TANG, M.; SHI, Y.; PANG, Y. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* fulllength and N-terminally truncated vip3A gene in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.310–316, 2003.

CHOI, S. K.; SHIN, B. S.; KONG, E. M.; RHO, H. M.; PARK, S. H. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* Cry1I-type crystal protein. **Current Microbiology**, v. 41, p. 65-69, 2000.

CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). 2012. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12482.html>>

COELHO, A.M.; CRUZ, J.C.; PEREIRA FILHO, I.A. Desafios para a obtenção de altas produtividades de milho. **Comunicado Técnico**, v. 99, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Sete Lagoas, 20 p. 2004.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p.807 - 813, 1998.

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/index.html> Acesso em: 24 de abril de 2012.

DAI, S. M.; GILL, S. S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis* CRIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, p. 273-283, 1993.

DAMMAK, M; TOUNSI, S.; ROUIS, S. E JAOUA, S. Comparative study of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia and Cry1Aa delta-endotoxins: Activation process and toxicity against *Prays oleae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 1, p. 39-43, 2010.

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

DEGRANDE, P.E. **Guia prático de controle das pragas do algodoeiro**. Dourados, UFMS, 60p. 1998.

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

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

DU, C.; NICKERSON, K.W. *Bacillus thuringiensis* HD73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3722-3726, 1996.

DUMAS, V. F. **Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: noctuidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae)**. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

ESCUADERO, I. R.; ESTELA, A.; PORCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J. A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and Insecticidal Characterization of a Cry1I Protein Toxic to Insects of the Families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4796–4804, 2006.

ESPINDOLA, R. **Seqüência completa do gene *cry1Ia* do isolado T01 328 de *Bacillus thuringiensis* provenientes do solo de Cubatão (SP-Brasil)**. 2003. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; CRAIG, J. A.; KOIZEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings National Academy Science**, Calcutlá, v.93, p.5389-5394, 1996.

FEITELSON, J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In: **Proceeding of XXVII Annual Meetinf of the Society Fro Invertebrate Pathology**, Montpellier, France, p. 184, 1994.

FERNANDEZ, M.G. **Distribuição espacial e amostragem seqüencial dos principais noctuídeos do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 2002. 140p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

FERNÁNDEZ, L.E., AIMANOVA, K.G., GILL, S.S., BRAVO, A., SOBERÓN, M.A. glicosilfosfatidil-inositol (GPI)- anchored alkaline phosphatases is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemical Journal**, v. 394, p. 77-84, 2006.

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

FERRÉ, J.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S. Estrategias de manejo de la resistencia para preservar la utilidad de las plantas Bt. **Boletín electrónico de la Sociedad Española de Genética**, n. 20, p. 13-17, 2005.

FERRÉ, J.; REAL, M.D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings National Academy Science**, Calcutlá, v. 88, p. 5119-5123, 1991.

FISCHHOFF D.A., BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; McCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G., DEAN, D.A.; KUSANO- KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Bio/Tecnology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FLANAGAN, R.D., CAO-GUO, Y., MATHIS, J.P., MEYER, T.E., SHI, X., SIQUEIRA, H.A.A., SIEGFRIED, B.D. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 35, p. 33-40, 2005.

GILL, S. S. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 69-74. 1995.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. **Bacillus thuringiensis**: biology, ecology and safety. Chichester: Jonh Wilev & Sons, 2000, p. 350.

GLEAVE, A. P., WILLIAMS, R., HEDGES, R. J. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of CryV-like insecticidal protein genes and characterization of a cryV gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1683-1687, 1993.

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SÁNCHEZ, M. Cadherinlike receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer prepore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*, v. 513, p. 242-246, 2002.

GONZÁLEZ Jr., J. M.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 79, n. 22. p. 6951-6955, 1982.

GONZÁLEZ Jr., J. M.; CARTON, B. C. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid**, New York, v. 3, n.1, p. 92-98, 1981.

GOUFFON, C.; VAN VLIET, A.; VAN RIE, J.; JANSENS, S.; JURAT-FUENTES, J. L. Binding sites for Cry2Ae toxin from *Bacillus thuringiensis* on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F or Vip3A toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 3182-8. 2011.

GRANERO, F.; V. BALLESTER, FERRE, J. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 224, p. 779–783, 1996.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MAGALHÃES, M. Q.; SILVA, M. S.; BUFFON, S. M.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y. T.; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm) to a Cry1Ia-type Toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 5, p. 773-782, 2007.

GUO, S.; ZHANG, C.; LIN, X.; ZHANG, Y.; HE, K.; SONG, F.; ZHANG, J. Purification of an active fragment of Cry1Ie toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Protein Expression and Purification**, v. 78, n. 2, p. 204–208, 2011.

HABIB, M.E.M.; PALEARI, L.M.; AMARAL, M.E.C. Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walk., 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.1, n.3, p.177-182, 1983.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 166, p. 557-580, 1983.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal Economic of Entomology**, Lanham., v. 91, p. 565-571, 1998.

HERNÁNDEZ, C.S.; RODRIGO, A.; FERRÉ, J. Lyophilization of lepidopteran midguts: a preserving method for *Bacillus thuringiensis* toxin binding studies. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, p. 182-187, 2004.

HERNANDEZ-MARTINEZ, P.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.97, p.245–250, 2008.

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

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

HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the

presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 85, p. 7844-7848, 1988.

HUA, G.; JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M.J. Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1a cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in *Drosophila* S2 cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 193-202, 2004.

IBARGUTXI, M.A.; ESTELA, A.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 437-442, 2006.

IHARA, H; KURODA, E.; WADANO, A.; HIMENO, M. Specific toxicity of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, p. 200-204, 1993.

INTERNATIONAL LIFE SCIENCE INSTITUTE – HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCE INSTITUTE. **An evaluation of the insect resistance management in Bt field corn: a science based framework for risk assessment and risk management: report of an expert panel.** Washington: ILSI Press, 1998. 78p.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. G. Importance of Cry1 d-Endotoxin Domain II Loops for Binding Specificity in *Heliothis virescens* (L.) **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 323-329, 2001.

JURAT-FUENTES, J.L.; GAHAN, L.J.; GOULD, F.L.; HECKEL, D. G.; ADANG, M. J. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Biochemistry**, Washington, v. 43, p. 14299-14305, 2004.

JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M.J. Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 92, p. 166–171, 2006.

KING, A.B.S.; SAUNDERS, J.L. **The Invertebrate Pests of Annual Food Crops in Central America**. London: Overseas Development Administration. 166 p. 1984.

KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. **BioEssays**, Cambridge, v. 15, p. 469-476, 1993.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, n. 2, p. 275-308, 1994.

KOLLER, C. N.; BAUER, L. S.; HOLLINGWORTH, R. M. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* (Bt) cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences. USA**, v. 96, p. 1840-1845, 1992.

KOSTICHKA, K.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.; MULLINS, A.D.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G.; ESTRUCH, J.J. Cloning of a cryV-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the cryV-encoded protein is expressed early in stationary phase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 2141–2144, 1996.

KUMAR, S.; BIRAH, A.; CHAUDHARY, B.; BURMA, P.K.; GUPTA, G.P.; PENTAL, D. Plant codon optimized cry genes of *Bacillus thuringiensis* can be expressed as soluble proteins in *Escherichia coli* BL21 Codon Plus strain as NusACry protein fusions. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 88, n. 1, p. 83-86, 2005.

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

LAGNAOUI, A.; CAÑEDO, V.; DOUCHES, D.S. Evaluation of *Bt-cry11a1(cryV)* transgenic potatoes on two species of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* and *Symmetrischema tangolias* (Lepidoptera: Gelechiidae) in Peru. **CIP Program Report 1999 – 2000**, p. 117–121, 2001.

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

LEE, M. K.; CURTISS, S. ALCANTARA, E.; DEAN, H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 583-586, 1996.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 339, p. 1043–1047, 2006.

LEE, M. K.; RAJAMOCHAN, F.; GOULD, F.; DEAN, D.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3836–3842, 1995.

LEIDERMAN, L. M.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milho. O Biológico, [s.l.], v. 19, n. 6, p. 105-113, 1953.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE et al. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide**: theory and practice. Chichester: John Wiley, 1993. p. 37-70.

LIANG, Y.; PATEL, S.S.; DEAN, D.H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA δ -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is

directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 24719-24724, 1995.

LI-MING, D.; LAN-LAN, H.; JIE, Z.; KANG-LAI, H.; KUI-JUN, Z.; DA-FANG, H.; FU-PING, S. Cloning, expression and activity of *cry1Ia* gene from *Bacillus thuringiensis* isolate. **Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 1053–1057, 2007.

LIU, K. Y.; ZHENG, B. L.; HONG, H. Z.; JIANG, C. F.; PENG, R.; PENG, J. X.; YU, Z. H.; ZHENG, J.; YANG, H. Characterization of cultured insect cells selected by *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 40, p. 312-317, 2004.

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

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M.J. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 457-464, 1999.

LYNCH, R.E.; WISEMAN, B.R.; PLAINSTED, D.; WARNIK, D. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing Cry1A(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 246-252, 1999.

MACINTOSH, S. C. et al. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 56, p. 258-266, 1990.

MAIA, A. H. N. **Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas**. 2003. 130 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MALIK, K.; RIAZUDDIN, S. A.; RIAZUDDIN, S. Identification, purification, cloning and expression of a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1a delta-endotoxins in the Brush Border Membranes of the *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 767-778, 2006.

MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *B. thuringiensis* isolates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2437-2442, 1989.

MARTINELLI, S. **Efeito de híbridos de milho Bt expressando toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berlier sobre insetos herbívoros e agentes de controle biológico em condições de campo**. 2001. 139 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

MARTINEZ, C.; CABALLERO, P. Contents of *cry* genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 4, p. 745-752, 2002.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; GOULD, F.; FERRÉ, J. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science Technology**, Oxford, v. 9, p. 239-246, 1999.

MARTINS, E. S.; AGUIAR, R. W. D. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis Boheman*) and fall armyworm

(*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 104, p. 1363-1371, 2008.

MASSON, L.; LU, Y.-J.; MAZZA, A., BROSSEAU, R.; ADANG, M.J. The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 20309-20315, 1995.

MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PUZSTAI-CAREY, M.; BROUSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ, V. FRUTOS, R. A holistic approach for determining the entomopathogenic potencial of *Bacillus thuringiensis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4782-4788, 1998.

MENDES, D. R. P. **Expressão dos genes *Vip3Aa* e *Cry1Ia* em *Escherichia coli* efetivos no controle de *Spodoptera frugiperda***. 2011. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

MEYERS, H.B.; JOHONSON, D.R.; SINGER, T.L.; PAGE, L.M. Survival of *Helicoverpa zea* Boddie on Bollgard[®] cotton. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 2., Memphis, 1977. **Proceedings**. Memphis: National Cotton Council, p.1269-1271, 1997.

MILNE, R.; LIU, Y.; GAUTHIER, D.; VAN FRANKENHUYZEN, K. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of Hd-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepdoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 99, n. 2, p. 166 – 172, 2008.

MIRANDA, J. E. Distribuição vertical de lagartas de *Spodoptera frugiperda* no algodoeiro. Comunicado Técnico, 277. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000. v3, p. 163-200.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, Amsterdam, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Manole, 1981.

MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; DARSZON, A.; DE MAAGD, R.A.; BAKKER, P.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Permeability changes of *Manduca sexta* midgut brush border membranes induced by oligomeric structures of different cry toxins. **Journal of Membrane Biology**, v. 212, p. 61–68, 2006.

MURGUIDO, C.; VERA, R.; ACOSTA, B. Modelo matemático del consumo de alimento de *Spodoptera frugiperda* y algunos aspectos de su biología en el arroz. **Ciencia y Técnica en la Agricultura, Protección de Plantas**, v. 13, p. 21-27, 1990.

NEPPL, C. C. **Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins**. 2001. 35f. Thesis (B.A.) – University of Chicago, Chicago, 2001.

NORA, I.; REIS FILHO, W.; STUKER, H. Danos de lagartas em frutos e folhas de macieira: mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares. **Revista Agropecuária Catarinense**, v. 2, p. 54-55, 1989.

OPPERT, B.; KRAMER, K. J.; BEEMAN, R. W.; JOHNSON, D.; MCGAUGHEY, W. H. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal Biological Chemistry**, v. 272, p. 23473–23476, 1997.

PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Enhancement of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins by fragments of a toxin-binding cadherin correlates with oligomer formation. **Peptides**, v. 30, p. 583–588, 2009.

PARDO-LÓPEZ, L.; GÓMEZ, I.; RAUSELL, C.; SANCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by N-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. **Biochemistry**, v. 45, n. 34, p. 10329-10336, 2006.

PASTRANA, J.A. **Los lepidópteros argentinos: sus plantas hospedadoras y otros sustratos alimenticios**. Buenos Aires, Sociedad Entomológica Argentina, 2004, 350p.

PERERA, O.P.; WILLIS, J.D.; ADANG, M.J.; JURAT-FUENTES, J.L. Cloning and characterization of the Cry1Ac-binding alkaline phosphatase (HvALP) from *Heliothis virescens*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 294-302, 2009.

PERLAK, F.J.; DEATON, T.A.; ARMSTRONG, R.L.; FUCHS, R.L.; SIMS, S.R.; GREENPLANTE, J.T.; FISCHHOFF, D.A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, v.8, p.939-943, 1990.

PERLAK, F.J.; STONE, T.B.; MUSKOPF, Y.M.; PTERSEN, L.; PARKER, G.B.; McPEHERSON, S.A.; WYMAN, J.; LOVE, S.; REED, G.; BIEVER, D.; FISCHHOFF, D. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. **Plant Molecular Biology**, v.22, p.313-321, 1993.

PIETRANTONIO, P.V.; FEDERICI, B.A. GILL, S.S. Interaction of *Bacillus thuringiensis* endotoxins with the insect midgut epithelium. In: THOMPSON, S.N.; FEDERICI, B.A. (Ed.) **Parasites and pathogens of insects**. New York: Academic Press, v.2, p.55-79, 1993.

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. 2007.

PITRE, H.N.; HOGG, D.B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. **Journal of the Georgia Entomological Society**, v. 18, p. 187-194, 1983.

- POGUE, G.M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 43, p. 1-202, 2002.
- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *B. thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.39, p. 11-16, 2004.
- RAJAGOPAL, R.; AGRAWAL, N.; SELVAPANDIYAN, A.; SIVAKUMAR, S.; AHMAD, S.; BHATNAGAR, R. K. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 971–978, 2003.
- RAUSELL, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; MIRANDA-CASSOLUENGO, R.; GÓMEZ, I.; RUDIÑO-PIÑERA, E.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Tryptophan spectroscopy studies and black lipid bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* is the membrane-insertion intermediate. **Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 166-74, 2004.
- ROBERTSON, J. L.; RUSSELL, R. M.; PREISLER, H. K.; SAVIN, E. **Bioassays with Arthropods**, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A., 2007.
- RUKMINI, V.; REDDY, C.Y.; VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin: role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie**, v. 82, p. 109–116, 2000.
- SANTOS, GP.; COSENZA, G.W.; ALBINO, J.C. Biologia de *Spodoptera latifascia* (Walker, 1856) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre folhas de eucalipto. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 24, p. 153-155, 1980.
- SANTOS, W. J. Manejo integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: **Algodão**. Fundação MT, Rondonópolis, MT, 1997, 107 p.(Boletim 02).

SANTOS, K.B.; NEVES, P.; MENEGUIM, A.M.; SANTOS, R.B.; SANTOS, W.J.; VILLAS BOAS, G.; DUMAS, V.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.B.; QUEIROZ, P.; BERRY, C.; MONNERAT, R. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 157-163, 2009.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: Embrapa-CPAO, **Algodão: tecnologia e produção**. Dourados, p. 181-226, 2001.

SAVOIE, K.L. Alimentación selectiva por especies de *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) en un campo de frijol con labranza mínima. *Turrialba* 38: 67-70, 1988.

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

SCRIBER, J.M. Sequential diets, metabolic costs, and growth of *Spodoptera eridantia* (Lepidoptera: Noctuidae) feeding upon dill lima bean and cabbage. *Oecologia*, v. 51, p. 175-80, 1981.

SEIFINEJAD, A.; SALEHI-JOUZANI, G. R.; HOSSEINZADEH, A.; ABDMISHANI, C. Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Biological Control**, Orlando, v. 44, n. 2, p. 216-226, 2008.

SENA, J. A. D. et al. Caracterização de um provável isolado de *Bacillus thuringiensis* proveniente do solo de Cubatão (SP). In: **4º SICONBIOL - Simpósio de Controle Biológico**, Gramado, Anais: Sessão de Pôsteres, p.129, 1994.

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

SENDRA, S. H. **Los receptores de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* y sus implicaciones en el desarrollo de resistencia.** Valência, Espanha, 2002. 111p. Tese de Doutorado. Facultat de Ciències Biològiques – Universitat Burjassot.

SERENA, S.A.; COSTA, E.C.; LINK, D.; FRANÇA, J.A.S.; GUEDES, J.V.C.; GRÜTZMACHER, A.D. Consumo foliar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em arroz irrigado. In: **Anais Reunião da Cultura do Arroz Irrigado**, Balneário Camboriú, v. 19, p. 216-217, 1991.

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.

SHIMIZU, T.; MORIKAWA, K. The β -prism: a new folding motif. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, p. 3-6, 1996.

SHIN, B. S.; PARK, S. H.; CHOI, S. K.; KOO, B. T.; LEE, S. T.; KIM, J. I. Distribution of *cryV*-type insecticidal protein genes in *Bacillus thuringiensis* and cloning of *cryV*-type genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2402–2407, 1995.

SIMONEN, M.; PALVA, I. Protein secretion in *Bacillus* species. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 57, p.109–137, 1993.

SINGH, G., SACHDEV, B., SHARMA, N., SETH, R., BHATNAGAR, R. K. Interaction of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with ribosomal S2 protein triggers larvicidal activity in *Spodoptera frugiperda*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 21, p. 7202–7209, 2010.

SOARES, S. Pragas do milho: da identificação ao tratamento. **Produz**, Belo Horizonte, n.51, p.59-63, 2010.

SONG, F. P.; ZHANG, J.; GU, A. X.; WU, Y.; HAN, L. L.; HE, K. L.; CHEN, Z. Y.; YAO, J.; HU, Y. Q.; LI, G. X.; HUANG, D. F. Identification of cry1I-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel cry1I-type gene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5207-5211, 2003.

SOO HOO, C. F. & FRAENKEL, G. The selection of food plants in a polyphagous insect, *Prodenia eridania* (Cramer). **Journal of Insect Physiology**, v. 12, p. 693-709, 1966.

SOSA-GOMEZ, D. R.; GAZZONI, L. D.; CORRÊA-FERREIRA, B.; MOSCARDI, F. Pragas da soja e seu controle, In: Arantes N P, Souza P I M (eds) **Cultura da soja nos cerrados**. Piracicaba, Potafós, p.299-331. 1993.

SPECHT, A. Noctuídeos (Lepidoptera, Noctuidae) do Museu Entomológico Ceslau Biezanko, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, RS. **Revista Brasileira Agrociência**. v.10, p.389-409, 2004.

TABASHNIK, B.T.; LIU, Y.-B.; FINSON, N.; MASSON, L.; HECKEL, D.G. One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 94, p. 1640– 1644, 1997.

TABASHNIK, B.E.; BIGGS, R.W.; HIGGINSON, D.M.; HENDERSON, S.; UNNITHAN, D.C.; UNNITHAN, G.C.; ELLERS-KIRK, C.; SISTERTON, M.S.; DENNEHY, T.J.; CARRIÈRE, Y.; MORIN, S. Association between resistance to Bt cotton and cadherin genotype in Pink bollworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 635– 644, 2005.

TAILOR, R. J. ; TIPPET, J. ; GIBB, G. ; PELLIS, S. ; PIKE, D. ; JORDAN, L. ; ELY, S. Identification and Characterization of a Novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Entomocidal to Coleopteran and Lepidopteran Larvae. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 9, May, p. 1211-1217. 1992.

THAMMASITTIRONG, A.; ATTATHOM, T. PCR-based method for the detection of *cry* genes in local isolates of *Bacillus thuringiensis* from Thailand. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 98, n. 2, p. 121-126, 2008.

TODD, E.L.; POOLE, R.W. Keys and illustrations for the armyworm moths of the Noctuid Genus *Spodoptera* Guenée from the Western Hemisphere. **Annals of the Entomological Society of America**, v.73, n. 722-738, 1980.

TOUNSI, S.; ZOUARI, N.; JAOUA, S. Cloning and study of the expression of a novel *cry1la*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford ,v. 95, p.23–28, 2003.

TOWBIN, H.T.; STAETHETIN, A.; GORDON, J. Eletroforetic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Produce abd some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U.S.A., Washington, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; SOUZA, M. T. de. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. v. 1, p. 201-230.

VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In ENTWISTLE P. F.; CORY J. S.; BAILEY M. J.; HIGGS S (Ed.): **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley and Sons, 1993. p 1-35.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, p. 1-16, 2009.

VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: CHARLES, J.F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX (ed.), **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications, p.219-237, 2000.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n. 5, p. 1378-1385, 1990.

VANDEN HEUVEL, J. P.; PERDEW, G. H.; GREENLEE, W. F.; MATTES, W. B. **Cellular and Molecular Toxicology**, first ed. Elsevier, Amsterdam, 646 p., 2002.

VADLAMUDI, R.K.; WEBER, E.; JI, I., JI, T.H.; BULLA L.A., Jr. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 5490-5494, 1995.

WANG, J. H.; Boets, A.; van Rie, J.; Ren, G.X. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 82, n. 1, p. 63-71, 2003.

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

WILLIAMS, W.P.; SAGERS, J.B.; HANTEN, J.A. Transgenic corn evaluated for resistance to fall armyworm and southwestern corn borer. **Crop Science**, v. 37, p. 957-962, 1997.

WOLFERSBERG, M. G. ATPase-energized epithelia and biological insect control. **The journal of Experimental Biology**, v. 172, p. 377-386, 1992.

WOLFERSBERGER, M.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, F.V.; GIORDANA, B.; HANOZET, M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 86 A, N. 2. p.301-308, 1987.

XIE, R.; ZHUANG, M.; ROSS, L.S.; GOMEZ, I.; OLTEAN, D.I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GILL, S.S. Single amino acid mutations in the cadherin receptor from *Heliothis virescens* affect its toxin binding ability to Cry1A toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 8416-8425, 2005.

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

ZENKER, M. M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Estágios imaturos de *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 24, n. 1, 2007.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N.B.; TAUSSIG, R.; BULLA, L.A., Jr. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.9897–9902, 2006.

ZHONG, C. H. ; ELLAR D. J.; BISHOP, A.; JOHNSON, C.; LIN, S.; HART, E. R. Characterization of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin which is toxic to insects in three orders. **Journal of invertebrates Pathology**, v. 76, n. 2, p.131-139. 2000.