

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

**EFEITOS DA INTERAÇÃO E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS
Cry1 E Vip3A DE *Bacillus thuringiensis* EM *Diatraea
saccharalis* (Fabr., 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

**Camila Chiaradia Davolos
Engenheira Agrônoma**

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

**EFEITOS DA INTERAÇÃO E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS
Cry1 E Vip3A DE *Bacillus thuringiensis* EM *Diatraea
saccharalis* (Fabr., 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

Camila Chiaradia Davolos

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Coorientador: Prof. Dr. Baltasar Escriche

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

2014

D245e Davolos, Camila Chiaradia
Efeitos da interação e toxicidade das proteínas Cry1 e Vip3A de
Bacillus thuringiensis em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794)
(Lepidoptera: Crambidae) / Camila Chiaradia Davolos. – – Jaboticabal,
2014
iv, 63 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Co-orientador: Baltasar Escriche

Banca examinadora: Bergmann Moraes Ribeiro, Jackson Antonio
Marcondes de Souza, Norton Rodrigues Chagas Filho, Odair
Aparecido Fernandes

Bibliografia

1. Controle microbiano. 2. Plantas transgênicas. 3. Bioensaios de
interação. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 595.78:632.93

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CAMILA CHIARADIA DAVOLOS – nascida em Araras - SP, em 17 de julho de 1982. Ingressou no curso de Agronomia em fevereiro de 2002 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal. Foi bolsista de Iniciação Científica (FAPESP) vinculada a um projeto temático durante a graduação e recebeu o título de Engenheira Agrônoma em janeiro de 2007. No mesmo ano ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na mesma instituição, com bolsa de estudo e projeto de Auxílio à Pesquisa financiados pela FAPESP. Recebeu o título em 17 de julho de 2009. Ingressou no curso de doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas em março de 2010 com bolsa de estudo da FAPESP. Executou parte de sua tese na Universidade de Valencia - Espanha, durante o período de setembro de 2011 a julho de 2012.

“Não são mais aptos nem mais inteligentes os que sobrevivem, senão os que se adaptam melhor às mudanças”

Charles Darwin

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”

Albert Einstein

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”

Nelson Mandela

À toda minha família pelo carinho e incentivo durante a execução desta tese. Especialmente aos meus pais, **Maria Carolina** e **Luiz Alberto** pelo afeto, incentivo e apoio durante minha vida profissional e pessoal.

A meu marido, **Caio Doria Guzzo**, por me acompanhar com muito amor e paciência durante essa trajetória.

DEDICO

Ao prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos pelos ensinamentos, oportunidades e confiança durante esses 9 anos.

*“O que alguém, como mestre, semeia,
no devir do tempo perpetua”*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pelos ensinamentos, confiança, amizade e oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores Baltasar Escriche (coorientador desta tese), Juan Ferre e Salvador Herrero, chefes do laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade de Valencia por abrirem as portas do laboratório, permitindo o desenvolvimento de parte desta tese, com muito crescimento e aprendizado.

Aos professores da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (FCAV), especialmente aos pertencentes ao curso de pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pelas disciplinas oferecidas e ensinamentos proporcionados. A todos os funcionários da instituição pelo agradável convívio e alegria nos serviços prestados.

À profa. Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos, por permitir o uso de seu laboratório para as análises de quantificação protéica, pelo carinho e amizade durante esse período de convivência.

Aos membros da banca pertencentes à UNESP-FCAV, prof. Dr. Jackson Antonio Marcondes de Souza e prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes pelo acompanhamento durante o desenvolvimento de minha formação com ensinamentos muito valiosos e pelas contribuições nesta tese. Aos membros de outras instituições prof. Dr. Bergmann Moraes Ribeiro e Dr. Norton Rodrigues Chagas Filho pela arguição e correção deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Entomologia do Grupo São Martinho, na pessoa de Josy Aparecida dos Santos, pelo fornecimento de material biológico durante esses 4 anos de tese.

À Eliane Cristina da Cunha Alves (Li), pela amizade, conselhos, ensinamentos, paciência e disponibilidade no auxílio experimental.

À Dra. Ana Maria Guidelli Thuler, que desde minha iniciação científica me acompanha e auxilia no preparo de projetos, apresentações e experimentos. Sempre me acalmou e direcionou para que pudesse tomar as melhores decisões. Agradeço a você e toda sua família pela amizade e carinho.

À Dra. Paula C. B. Crialesi-Legori companheira do curso de mestrado e doutorado, por todas as etapas que sofremos e vencemos juntas. Muito obrigada, foi muito bom dividir essa fase de mudanças e crescimento com você.

Aos integrantes do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA): Ana Rita N. Lemes, André B. Horta, Bruna Marques, Camila Figueiredo, Cláudio D. Pavani, Isis Sebastião, Jaqueline C. Fernandes, Juliana R. Rossi, Maria Laura Viola e Suzana Marucci, pela convivência, companheirismo e colaboração ao longo do trabalho.

Às integrantes do Laboratório de Genética e Bioquímica (GBQ): Agata Jabukowska, Annabel Milan, Cristina M Crava, Gloria Navarro-Cerrillo, Leila Gasmi, Maissa Chakroun, María Martínéz-Solís, Melania D'Angiolo, Natalia Mara, Nuria, Patricia Hernández-Martínez, Rosa Gonzalez e Yolanda Bel, pelos ensinamentos, apoio e amizade durante minha estada na Universidade de Valencia. Vocês fizeram meus dias mais alegres e proveitosos quando longe de meu país.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudos e reserva técnica, proporcionando a participação em diferentes congressos e cursos, bem como a compra de insumos laboratoriais para consolidação desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e apoio durante o período que estive na Universidade de Valencia.

À família Doria Guzzo, nas pessoas de Paschoal e Cecília Helena pelo carinho, disponibilidade e apoio.

Enfim, a todos os amigos da Universidade Estadual Paulista, da Universidade de Valencia, das cidades de Araras, Jaboticabal, Burjassot e Valencia que, de alguma forma, contribuíram para minha formação científica e pessoal, meus sinceros agradecimentos.

“A amizade é um amor que nunca morre”

Érico Veríssimo

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	2
Referências.....	12
CAPÍTULO 2 – SUSCETIBILIDADE DE LARVAS DA BROCA-DA-CANA A DIFERENTES PROTEÍNAS Cry1	
Resumo.....	21
Abstract.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	26
Conclusões.....	29
Referências.....	29
CAPÍTULO 3 – Cry1 AND Vip3Aa TOXINS POTENTIAL TO CONTROL <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr., 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE), AN IMPORTANT PEST OF DIFFERENT CROPS	
Abstract.....	32
Introduction.....	33
Material and Methods.....	35
Results.....	37
Discussion.....	38
References.....	41

CAPÍTULO 4 – INTERAÇÕES DAS PROTEÍNAS Cry1 E Vip3Aa NA TOXICIDADE À *Diatraea saccharalis*

Resumo.....	47
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Material e Métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão.....	57
Referências.....	57
 CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 62

EFEITOS DA INTERAÇÃO E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS Cry1 E Vip3A DE *Bacillus thuringiensis* EM *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

RESUMO – O presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade de diferentes proteínas Cry1 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis* em larvas de *Diatraea saccharalis*, verificar o modo de união dessas proteínas aos receptores do inseto alvo e analisar a interação dessas proteínas no controle larval, buscando informações para subsidiar o uso de plantas geneticamente modificadas com genes *cry1* e *vip3Aa* de forma segura e duradoura. A análise de suscetibilidade larval revelou a proteína Cry1Ab como mais efetiva no controle, seguida das proteínas Cry1Ac, Vip3Aa, Cry1Ca e Cry1Fa. A população testada não foi suscetível à proteína Cry1Ea. A proteína Cry1Aa apresentou baixa toxicidade. Nos ensaios de união específica, as proteínas Cry1 ligaram-se a receptores presentes no intestino médio de *D. saccharalis* e um modelo com três diferentes receptores foi proposto com base nos ensaios de competição heteróloga. Um receptor comum para Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, outro para Cry1Fa e Cry1Ab e um receptor diferente para a proteína Vip3Aa. Dentre as interações avaliadas por bioensaios, as combinações proteicas: Cry1Ab:Cry1Ca e Cry1Fa:Cry1Ca apresentaram efeito sinérgico; as demais combinações revelaram efeitos antagônicos.

Palavras-chave: biotina, controle microbiano, ensaios de união, ensaios de competição, bioensaios de interação

INTERACTION EFFECTS AND TOXICITY OF Cry1 AND Vip3A PROTEINS FROM *Bacillus thuringiensis* TO *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ABSTRACT – The aim of this research was to evaluate the toxicity of different Cry1 and Vip3A proteins from *Bacillus thuringiensis* to *Diatraea saccharalis*, verify the proteins binding to receptors of the target insect and to analyze the protein interactions in larval control, seeking information to support safe and sustainable the use of transgenic *Bt* plants. The most toxic protein assayed was Cry1Ab followed by Cry1Ac, Vip3Aa, Cry1Ca and Cry1Fa. The population tested was not susceptible to Cry1Ea protein. Cry1Aa showed very low toxicity. Biotinylated Cry1 proteins showed specific binding to the midgut brush border membrane vesicles of the larvae. Heterologous competitive binding assays suggested a model of three receptors, a common receptor for Cry1Aa and Cry1Ab another one for Cry1Fa and Cry1Ab. Vip3Aa did not compete for binding with any of the Cry proteins tested. Among interactions bioassays, the combinations between Cry1Ab:Cry1Ca and Cry1Fa:Cry1Ca showed synergistic effect, whereas the other combinations showed antagonistic effects.

Keywords: biotin, microbiol control, union assays, competition assays, interactions bioassays

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

No anos 40, a indústria química produziu produtos para controlar as “pestes” agrícolas (insetos, plantas daninhas e fungos) de forma exacerbada e o uso indiscriminado desses produtos mudou a história do mundo. Tragédias ambientais e intoxicações humanas ocorriam constantemente. Ecologistas se reuniam para tentar acabar com a quietude que havia na primavera. Reuniões definiam os produtos químicos como elixires da morte e relatavam em muitos artigos que os passos em falso da humanidade poderiam levar à destruição da produtividade do solo e que os artrópodes poderiam tomar conta do mundo (revisado por CARSON, 1962).

Desde então, normas e maneiras para o uso de produtos químicos na agricultura foram estipuladas e diversas áreas de pesquisa e desenvolvimento foram implementadas em diferentes países. Na década de 1970 nos Estados Unidos da América, foi fundada a Agência de Proteção Ambiental e disciplinas como ecologia e biologia da conservação ficaram em alta. Questões sobre cuidados com o meio ambiente foram e são abordadas até os dias atuais.

Como alternativa ao controle químico de insetos, temos à nossa disposição algumas tecnologias que ganharam peso e forma após os ocorridos em meados do século passado e seguem sendo estudadas por diversos grupos de geneticistas, microbiologistas, entomologistas, patologistas, bioquímicos, fisiologistas, ecologistas, entre outros; cada um em sua área fornecendo conhecimentos que levam a conservação e preservação do meio ambiente.

Novas descobertas científicas ocorreram e o controle de pragas deixou de ser realizado por aplicações sistemáticas de produtos químicos. O conceito de Manejo Integrado de Pragas (MIP) surge a partir desse momento e visa a manutenção das pragas abaixo do nível econômico de dano com integração harmoniosa entre aplicações de inseticidas e uso de sistemas biológicos, levando em consideração os aspectos ecológicos (Gallo et al., 2006). Esse novo conceito proporciona reduções diretas no uso de produtos químicos em lavouras com reduções nos investimentos financeiros dos agricultores.

Diversos grupos no mundo visam a produção de alimentos com métodos de controle a partir de princípios ecológicos, econômicos e sociais, visando interferir o mínimo possível nos agroecossistemas. Nesse contexto, o uso de plantas geneticamente modificadas, plantas que expressam proteínas de *B. thuringiensis* e/ou inibidores enzimáticos para o controle de insetos-praga, compõe um dos métodos de controle do MIP. Desde a liberação de plantio comercial dessas plantas transgênicas, em 1996 nos EUA e em 2005 no Brasil, os genes da bactéria *Bacillus thuringiensis* passaram a ser usados em larga escala.

A partir desse momento, empresas multinacionais iniciaram a busca incessante por genes efetivos, com o intuito de desenvolver variedades mais resistentes e/ou tolerantes ao ataque de insetos-praga. E em outro cenário pesquisadores de instituições governamentais e de empresas privadas iniciaram questionamentos, como: Por que essa bactéria controla larvas de inseto? Quais são os produtos de *Bt* que controlam esses insetos? Como é o mecanismo de funcionamento desses genes e proteínas? Como usá-los em larga escala? Inserí-los em plantas? De qual maneira devemos manejar essas culturas modificadas no campo? Qual a durabilidade dessa tecnologia?

E assim continua até os dias atuais. Grandes avanços foram alcançados, novas maneiras de selecionar os genes e manejar as culturas *Bt* foram encontradas e estão em constantes adaptações.

Dessa maneira, o presente trabalho tem por objetivo gerar informações básicas sobre o uso de proteínas Cry1 e Vip3Aa em *Diatraea saccharalis*, uma praga de grande importância econômica em nosso país.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bacillus thuringiensis*

A bactéria *B. thuringiensis* foi descrita em 1911 na província de Thuringia, Alemanha, por Berliner. Anteriormente, foi isolada no Japão por Ishiwata (1901)

como uma bactéria esporulante tóxica a larvas de bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Pertence à família *Bacillaceae*, é gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, naturalmente encontrada no solo e outros ambientes naturais. Com células vegetativas em forma de bastonete e com temperatura ideal de crescimento em torno de 30°C, quando expostas a restrições do meio como, ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, entra em estado de latência, sofrendo esporulação, o que lhe confere uma elevada resistência ao calor e à seca (RASKO et al., 2005; POLANCZYK et al., 2008).

A espécie *B. thuringiensis* possui características bioquímicas e fenotípicas muito semelhantes às bactérias *B. cereus* e *B. anthracis*. No entanto se difere pela presença de cristais protéicos, visíveis em microscopia de fase (YAMAMOTO; DEAM, 2000). Com capacidade de produzir e secretar uma série de proteínas entomopatogênicas, tais como δ -endotoxinas (proteínas Cry), β e α -exotoxinas, quitinases, fosfolipases, exoenzimas e proteínas inseticidas vegetativas (proteínas Vip), essa espécie merece atenção especial de diferentes grupos de pesquisa que buscam determinar as contribuições específicas de cada uma delas no fator virulência (HANSEN; SALAMITOU, 2000). As proteínas mais estudadas até o momento são Cry, Cyt e Vip, as quais apresentam ação tóxica para diferentes espécies de insetos-praga das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (GARCIA-ROBLES et al., 2001; QUESADA-MORAGA et al., 2004).

Responsável por cerca de 95% do mercado mundial de bioinseticidas, *B. thuringiensis* é utilizada há mais de 70 anos por possuir vantagens como ação eficaz e alta especificidade, não apresentando toxicidade conhecida para os seres humanos e meio ambiente (BRAVO et al., 2011). Suas formulações são baseadas na utilização de suspensões esporos/cristal e são utilizadas como alternativa ao uso de inseticidas químicos. A primeira formulação foi comercializada em 1937, na França, com o nome comercial de Sporine e, desde então, muitas formulações foram criadas e utilizadas em larga escala na produção agrícola de diversos países (SOBERON et al., 2009).

Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* são facilmente produzidos e de maneira muito menos onerosa que os inseticidas químicos, porém apresentam

limitações como a baixa estabilidade no campo e espectro de ação restrito. Consequentemente, o uso das proteínas inseticidas é realizada em grande parte por meio de plantas geneticamente modificadas.

2.1.1. Proteínas Cry

Essa classe protéica é assim denominada pois acumula sua produção na periferia do esporo, formando uma inclusão cristalina (YAMAMOTO; DEAM, 2000) e são classificadas de acordo com a homologia de suas sequências de aminoácidos da cadeia primária. Atualmente, mais de 680 sequências de genes *cry*, codificadores das proteínas Cry, são classificadas em 72 grupos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

No primeiro estágio de classificação as sequências recebem um número, e quando essas apresentam menos de 45% de similaridade genética esse número se difere (*cry1*, *cry2*, *cry3*.... *cry72*), classificando as sequências em 72 diferentes grupos de proteínas Cry. Esse número é seguido por uma letra maiúscula que separa as sequências com até 78% de homologia (*cry1A*, *cry1B*, *cry1C*....). Nesta etapa as sequências são divididas em classes, e quando a homologia entre as sequências passa a ser maior que 95% elas são divididas em um terceiro estágio no qual recebem letras minúsculas (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*...) sendo, então, classificadas em subclasses. No quarto estágio de classificação as sequências voltam a receber números que representam a ordem de depósito (publicação) das mesmas no banco de dados (*cry1Aa1*, *cry1Aa2*...*cry1Aa22*).

O grupo *cry1* possui maior número de sequências, totalizando 255 sequências divididas em 14 classes, publicadas desde 1985. A classe *cry1A* é composta por 108 sequências gênicas com nove subclasses, de *cry1Aa* a *cry1Ai*. Dentre essas, as subclasses com maior número de sequências depositadas são *cry1Ab* e *cry1Ac*, ambas com 37 sequências.

Outra classe, denominada *cry1C*, começou a ser estudada por Honee et al. (1988) e apresenta um total de 17 sequências divididas em apenas duas subclasses. No início da década de 90, após a descoberta de uma sequência por um grupo de pesquisadores liderados por Visser, ficou estabelecida a classe *cry1E*: *cry1Ea*

com 12 sequências e *cry1Eb* com apenas uma sequência registrada até o momento. Com um número mais restrito de sequências, temos também as subclasses *cry1Fa* com quatro e a *cry1Fb* com sete, que compõem a classe *cry1F* (CHAMBERS et al., 1991).

Basicamente, os genes *cry* são divididos em três grandes grupos, em função das diferenças registradas no modo de ação específico dos mesmos. O primeiro e maior grupo é conhecido como o grupo das proteínas com estrutura tridimensional (3D-Cry). Outros dois grupos são conhecidos como efetivos aos mosquitos (revisado por BRAVO et al., 2005) e o grupo dos que trabalham de forma binária (SCHNEPF et al., 1998).

Os três domínios protéicos das proteínas 3D-Cry apresentam conformações e funções diferentes (LI et al., 1991). A parte N-terminal, ou seja, domínio I, é responsável pela inserção da toxina na membrana alvo e consequentemente pela formação de poros. Os domínios II e III (C-terminal) são responsáveis pela especificidade pois estão relacionados com o reconhecimento dos receptores do intestino médio dos insetos alvo (de MAAGD et al., 1996; HERRERO et al., 2004; SCHNEPF et al., 1998).

O modo específico de ação das proteínas Cry1 é estudado por diferentes grupos em insetos da ordem Lepidoptera, e é um processo considerado complexo por ser composto por muitos passos. Em suma, as proteínas atuam após serem ingeridas pelas lagartas. Primeiramente ocorre a solubilização do cristal na forma de pro-toxina (130 kDa), seguida de ativação por meio de proteases do mesentero em um fragmento tóxico de aproximadamente 60 kDa. A proteína ativada passa pela membrana peritrófica e se liga aos receptores da membrana presentes no mesentero da lagarta, formando poros e ocasionando lise osmótica celular, o que leva a lagarta à morte (FERRE; VAN RIE, 2002; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2005).

As proteínas Cry1 podem reconhecer diferentes receptores presentes nas microvilosidades apicais das larvas de Lepidoptera, sendo esses: aminopeptidase-N (APN), fosfatase alcalina (ALP), caderina (CADR) e glicoconjugado (GCR) (revisado por BRAVO et al., 2011). A união das proteínas a estes sítios específicos é uma etapa determinante na especificidade e toxicidade das proteínas Cry aos insetos-praga (PIGOTT; ELLAR, 2007).

2.1.2. Proteínas Vip

As proteínas Vip (vegetative insecticidal proteins), descritas por Estruch et al. (1996), são produzidas durante a fase vegetativa de desenvolvimento e secretadas no meio líquido. A sequência de aminoácido não possui homologia com as proteínas Cry e são utilizadas no controle de diferentes pragas com baixa toxicidade as proteínas Cry.

São descritas como a segunda geração de proteínas de *B. thuringiensis* e possuem modo de ação similar aos das proteínas Cry, pois se unem especificamente aos receptores presente no mesentero do inseto, mas não dividem os mesmos receptores. São utilizadas em plantas transgênicas, em combinação as proteínas Cry ou não, com o intuito de ampliar o número de pragas controladas e também para prolongar o uso da tecnologia Bt (LEE et al., 2006; SENA et al., 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013).

Atualmente são divididas em quatro grupos; sendo os grupos Vip1 e Vip2 proteínas binárias utilizadas no controle de larvas da ordem Coleoptera (SHI et al., 2004) e Vip3 proteínas ativas contra larvas da ordem Lepidoptera. As proteínas Vip3 são divididas em três classes (Vip3A, Vip3B e Vip3C) e as 71 sequências descritas possuem homologia variando de 45 a 78% (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/; PALMA et al., 2012). A subclasse classe Vip3Aa (51 sequências) já foi testada por diferentes grupos contra importantes pragas agrícolas e foram eficientes no controle de diferentes pragas das famílias Noctuidae e Plutellidae (<http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>).

Novas subclasses de Vip3 estão sendo testadas em diferentes pragas para aumentar o espectro de ação dessa classe protéica. As proteínas Vip3Ae (1 sequência) e Vip3Af (3 sequências) foram testadas por diferentes grupos e apresentaram eficiência no controle de *Agrotis ipsilon* e *Spodoptera frugiperda*. Essas subclasses apresentam, respectivamente, identidade de 81 e 88% na sequência de aminoácidos da proteína Vip3Aa (CHAKROUN et al., 2012; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013)

A classe Vip3C foi recentemente descrita por Palma et al. (2012) e apresentou potencial de controle para as pragas *Chrysodeixis chalcites*, *Helicoverpa armigera*, *Manestra brassicae*, *Trichoplusia ni* e *S. frugiperda*.

2.2. *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)

Popularmente conhecida como broca da cana-de-açúcar, é importante praga das gramíneas em geral, com importância econômica nas culturas do milho, sorgo, cana-de-açúcar, arroz, trigo e pastagens. Com desenvolvimento holometábolo, seu ciclo de vida dura, em média, 70 dias. A fase larval, de 40 dias, é a fase que provoca danos às culturas. É classificada como uma larva brocadora e é uma espécie muito importante no Brasil, Estados Unidos, América Central e Argentina (BALDWIN et al. 2006; CRUZ et al., 2007; MOREÉ et al., 2003).

No Brasil, *D. saccharalis* é a principal praga da cultura de cana-de-açúcar e os prejuízos causados são classificados como diretos e indiretos. Os danos diretos ocorrem devido à abertura de galerias no colmo das plantas pelas larvas de segundo instar, ocasionando perda de peso, morte de gemas, falhas na germinação, tombamento e secamento dos ponteiros ("coração morto") de plantas mais novas. Os prejuízos indiretos ocorrem com a entrada de fungos causadores de doenças pelo orifício aberto pelas lagartas (GALLO et al., 2006).

Na cultura da cana-de-açúcar, recomenda-se o controle biológico com o uso dos parasitóides *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae), que é um parasita larval, *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), que é parasitóide de ovos, e também com o uso de produtos à base de *B. thuringiensis*. Dentre estes, a espécie *C. flavipes* recebe destaque por ser o método mais eficiente de controle da broca-da-cana no país. Nos últimos anos, a liberação inundativa de *C. flavipes* reduziu o índice de infestação da broca na em 8% e as perdas antes estimadas em 100 milhões de dólares ao ano caíram para 20 milhões de dólares (BOTELHO et al. 1995; BROGLIO-MICHELETTI et al. 2007).

O controle químico pode ser realizado com inseticidas de amplo espectro de ação aplicados em pulverização. Atualmente estão registrados 22 produtos químicos para o controle de *D. saccharalis* na cultura da cana, sendo esses pertencentes aos

grupos químicos: antralinamida, benzoiluréia, diacilhidrazina, metilcarbamato de benzofuralina, neonicotinóides, pirazol e piretróide (<http://agrofit.agricultura.gov.br>).

2.3. Plantas *Bt*

Com o intuito de contornar os problemas do uso da bactéria *B. thuringiensis* aos fatores ambientais, como a incidência solar, a chuva e as altas temperaturas, os genes que codificam as proteínas Cry e Vip foram introduzidos no genoma de plantas. O objetivo é controlar de forma eficiente as pragas, diminuir a utilização dos inseticidas químicos e manter as populações de inimigos naturais, praticando uma agricultura sustentável (KLETER et al., 2007).

O uso das plantas *Bt* em escala comercial foi iniciado nos EUA em meados da década de 90. No Brasil, passou a ser utilizado no ano de 2005, quando a Comissão Técnica Nacional de Segurança (CTNBio) liberou o plantio em escala comercial de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) que expressava a proteína Cry1Ac. A partir de então, diferentes culturas como o milho, em 2007 e a soja, em 2010, também foram liberadas. Dessa maneira, o uso das plantas *Bt* passou a fazer parte dos programas de Manejo Integrado de Pragas em diversos agroecossistemas (JAMES et al., 2010; BERNARDI et al., 2012).

Apesar de ser uma alternativa para o controle de pragas, as “plantas *Bt*” podem levar a novos desafios, como o surgimento de populações de insetos resistentes às proteínas Cry1 (TABASHNIK et al., 1994). Os insetos adquirem resistência por meio de um processo evolutivo, em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Para resolver este problema, vários podem ser os caminhos, incluindo o manejo da resistência de insetos (MRI) por meio da utilização de diferentes genes para o controle da mesma praga; ou seja, com a construção de plantas baseadas na inserção de múltiplos genes, que são comumente conhecidas como plantas “piramidadas” (TABASHNIK et al., 1998). A utilização de diferentes genes na mesma planta é considerada como a segunda geração de plantas *Bt* e visa a redução na taxa de evolução da resistência (FERRÉ; VAN RIE, 2002).

2.4. *Diatraea saccharalis* e *Bacillus thuringiensis*

A espécie *D. saccharalis* passou a ser controlada por plantas *Bt* nos Estados Unidos em 2005, devido a sua expansão geográfica e estabelecimento como praga primária nas áreas de cultivo de milho. Desde então, diversos grupos de pesquisa estudam o comportamento da espécie em relação às proteínas Cry1 e às plantas *Bt*. Rang et al. (2004) estudaram o modo de união das proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ba, Cry1Ca e Cry1Ea nos receptores da membrana epitelial de larvas de *D. saccharalis* e concluíram que, dentre as proteínas estudadas, Cry1Ac e Cry1Ba são as melhores para serem usadas em plantas geneticamente modificadas, por não apresentarem competição pelo mesmo sítio de ligação e por proporcionarem um controle da praga com eficiência.

Em estudos envolvendo plantios comerciais de milho os pesquisadores notaram a grande capacidade de tolerar a proteína Cry1Ab que a espécie *D. saccharalis* apresentava. O primeiro relato de uma população de insetos broqueadores capaz de completar seu desenvolvimento larval em um cultivo de milho *Bt* comercial foi detectado nesta espécie (HUANG et al., 2006; HUANG et al., 2007 a, b).

O milho comercializado nos EUA durante os anos de 2004 a 2008 expressava a proteína Cry1Ab e foi implementado como estratégia de controle para a espécie *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). A partir deste momento foram planejados estudos com o intuito de determinar o tipo de resistência que a espécie possuía. Huang et al. (2006) testaram a suscetibilidade de larvas de *D. saccharalis* e *O. nubilalis* à proteína Cry1Ab e verificaram que a primeira apresentava suscetibilidade inferior à espécie *O. nubilalis*. Consequentemente, levantaram a questão que a expressão de proteína Cry1 necessária para controlar *O. nubilalis* não era suficiente para controlar *D. saccharalis*.

Estes autores levaram em consideração a questão do uso de alta dose: a expressão da proteína deve ser suficiente para controlar a maioria dos heterozigotos resistentes da população. Analisando 213 isolinhas da população de campo da Louisiana durante cinco anos, eles verificaram que a resistência era determinada por um alelo recessivo, de apenas um *locus*, com frequência de 0,0025. Foi concluído

que a alta dose utilizada nas plantas comerciais de milho era suficiente para controlar a frequência dos alelos de resistência na população de *D. saccharalis* durante os anos de 2004 a 2008 (HUANG et al., 2008).

No entanto, Huang et al. (2011) amostraram 200 indivíduos de plantas de “milho não Bt” em 2009, na Louisiana, e identificaram seis indivíduos com alelos de resistência, estimando uma frequência de alelos de resistência da ordem de 0,0176, a qual foi significativamente maior do que os estimados para as populações coletadas no anos de 2004 a 2008.

A eficiência das proteínas Cry1Aa, Cry1A.105, Cry1Ac e Cry2Ab foi testada por Wu et al. (2009 a) em duas populações de *D. saccharalis*, sendo uma população Cry1Ab-resistente e uma suscetível. Os autores verificaram que a proteína Cry1Aa foi a mais eficiente no controle larval, seguida de Cry1A.105, Cry1Ac e Cry2Ab. Também determinaram a razão de resistência entre as duas populações e encontraram valores da ordem de 80x, 45x, 4x e 0,5x, respectivamente. Em sequência, os mesmos autores verificaram que o nível de dominância da resistência depende da dose utilizada no controle (WU et al., 2009 b). Na maioria das doses testadas, a resistência foi incompleta e recessiva, mas quando doses muito pequenas foram aplicadas a resistência foi dominante.

Esses dados foram importantes na implantação do uso de plantas de milho com a expressão de mais de um gene *cry* de *B. thuringiensis*, conhecidas como plantas piramidadas. Desde 2010, a tecnologia de plantas piramidadas é utilizada na região do centro-sul dos EUA, evitando o aumento da frequência dos alelos de resistência a proteína Cry1Ab nas populações locais e proporcionado o sucesso contínuo do milho *Bt* na região.

Estudos baseados em expressão gênica foram realizados no início desta década com o intuito de identificar as fontes gênicas responsáveis pela resistência em *D. saccharalis*. Yang et al. (2010) sequenciaram três APN (aminopeptidases 1, 2 e 3) do intestino de populações resistentes e suscetíveis da espécie. Verificaram que as três sequências do receptor das proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* eram idênticas, porém que a atividade proteolítica e a expressão das APN estava reduzida na população resistente. O silenciamento das APNs decresceu a suscetibilidade larval às proteínas Cry1Ab e, baseados nestes resultados, concluíram que a redução

da expressão das APNs está associada a resistência da espécie *D. saccharalis* à proteína Cry1Ab.

Buscando entender melhores mecanismos de resistência de *D. saccharalis* à proteína Cry1Ab, Guo et al. (2012) analisaram mais de 7.000 genes pela técnica de Microarray em populações resistentes e suscetíveis e detectaram diferenças no nível de expressão de muitos genes envolvidos em funções metabólicas e catabólicas. Os autores sugerem que os mesmos podem ser caracterizados como genes associados a resistência, inferindo que a resistência está relacionada ao declínio destas atividades. Alterações na expressão do receptor caderina no intestino médio de larvas de *D. saccharalis* foram constatadas por Yang et al (2011): embora as sequências de cDNA fossem idênticas, a população resistente apresentou menor expressão quando comparadas a população suscetível. Em relação à fosfatase alcalina (ALP), a atividade enzimática e o níveis de expressão não apresentaram nenhuma diferença entre as populações resistentes e suscetíveis. Diferenças nesse padrões foram detectados e associados à resistência de outras importantes pragas agrícolas as proteínas Cry1 (JURAT-FUENTE et al., 2004; JURAT-FUENTE et al., 2011).

No mesmo ano, Tan et al. (2011) voltaram a comparar a suscetibilidade dos gêneros *Ostrinia* e *Diatraea* e relataram que *D. saccharalis* era mais suscetível à proteína Cry1Ba e mais tolerante a proteína Cry1F quando comparada à duas espécies de *Ostrinia*. Em 2013, o mesmo grupo publicou resultados que elucidaram as diferenças de suscetibilidade entre os gêneros e concluíram que estava diretamente ligada ao padrão de união das proteínas Cry1Ab e Cry1F. Os níveis de expressão dos receptores caderina e APN também influenciaram a diferença na suscetibilidade entre as espécies.

Zhang et al. (2013) testaram a suscetibilidade de 7 populações de *D. saccharalis* resistentes à Cry1Ab e uma população suscetível. Verificaram que todas as populações possuem elevada resistência cruzada com Cry1Aa e Cry1Ac e baixa resistência cruzada com Cry1F. Em relação a população suscetível, a proteína Cry1Aa foi a mais eficiente no controle larval, seguida de Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1F. Baseados nestes dados, os autores sugerem a piramidação dos genes da família *cry1A* com a família *cry1F* para o controle da espécie alvo.

3. REFERÊNCIAS

BALDWIN, J.; HUANG, F.; LEONARD, B. R. **Corn borer pests in Louisiana corn**. Baton Rouge: Louisiana State University AgCenter, 2006. 4 p. (Ag Center Research and Extension Publication 2947).

BERNADI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012. 116 f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; MAGRINI, E. A.; HADDAD, M. L.; RESENDE L. C. L. Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 1 p. 65-69, 1995.

BOTELHO, P. S. M.; PARRA, J. R. P.; CHAGAS NETO, J. F.; OLIVEIRA, C. P. B. Associação do Parasitóide de Ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do Parasitóide Larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no Controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em Cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 491-496, 1999.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. p. 175-206, 2005. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K; GILL, S. S. **Comprehensive Molecular Insect Science**. 1. Ed. Elsevier, New York, 2005, cap. 6, p. 175-205.

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

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

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; PEREIRA-BARROS, J. L.; SANTOS, A. J. N.; CARVALHO, L. W. T.; CARVALHO, L. H. T.; OLIVEIRA, C. J. T. Efeito do número de adultos de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) liberados em semanas sucessivas, para o controle de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2007.

CHAKROUN M.; BEL Y.; CACCIA S.; ABDELKEFI-MESRATI L.; ESCRICHE B; FERRÉ, J. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 334-339, 2012.

CHAMBERS, J. A.; JELEN, A.; GILBERT, M. P.; JANY, C. S.; JOHNSON, T. B.; GAWRON-BURKE, C. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 13, p. 3966-3976, 1991.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html. acessado dia 20 de novembro de 2013.

CRUZ, I. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. Sete Lagoas: Embrapa (Circular Técnica), n. 90, 2007. 12p.

DE MAAGD, R. A.; KLEI, H. V. D.; BAKKER, P. L.; WILLEM J. STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Different Domains of *Bacillus thuringiensis* α -Endotoxins Can Bind to Insect Midgut Membrane Proteins on Ligand Blots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2753–2757, 1996.

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

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

GALLO, D.; NAKANO, O. SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 450-453.

GARCIA-ROBLES, I.; SANCHEZ, J.; GRUPPE, A.; MARTINEZ-RAMIREZ, A. C.; RAUSELL, C.; REAL, M. D.; BRAVO, A. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* PS86Q3 strain in hymenopteran forest pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 9, p. 849-856, 2001.

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

GUO, Z.; ZHU, Y. C.; HUANG, F.; LUTTRELLA, R.; LEONARD, R. Microarray analysis of global gene regulation in the Cry1Ab-resistant and Cry1Ab-susceptible strains of *Diatraea saccharalis*. **Pest Management Science**, DOI 10.1002/ps.2318, 2012.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, ARMELLE; NIELSEN-LE ROUX, C. **Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-64.

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal of Economy Entomology**, v. 91, n. 3, p. 565-571, 1998.

HERNÁNDEZ-MARTINÉZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 78-81, 2013.

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

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; GABLE, R. H. Comparative Susceptibility of European Corn Borer, and Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab Protein in a Commercial *Bacillus thuringiensis* Corn Hybrid. **Plant Resistance**, v. 99, n. 1, p. 194-202, 2006.

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; ANDOW, D. A. F2 screen for resistance to a *Bacillus thuringiensis*-maize hybrid in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, p. 437-444, 2007 a.

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; WU, X. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to Transgenic *Bacillus thuringiensis* Maize. **Insecticide Resistance and Resistance Management**, v. 100, n. 1, p. 164-171, 2007 b.

HUANG, F.; LEONARD, B. R.; MOORE, S. H.; COOK, D. R.; BALDWIN, J.; TINDALL, K. V.; LEE, D. R. Allele Frequency of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Corn in Louisiana Populations of Sugarcane Borer (Lepidoptera: Crambidae). **Insecticide Resistance and Resistance Management**, v. 101, n. 2, p. 492-498, 2008.

HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; WANG, J.; DAVES, C.; LEVY, R.; COOK, D. R.; HEAD, G. P.; YANG, Y.; TEMPLE, J.; FERGUSON, R. Fe screening for resistance to pyramided *Bacillus thuringiensis* maize in Louisiana and Mississippi populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pest Management Science**, v. 67, p. 1269-1276, 2011.

JAMES, C., 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief n. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 3127–3135, 2004.

JURAT-FUENTES, J. L.; KARUMBIAH, L.; JAKKA S. R. K.; NING, C.; LIU, C. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS ONE**, v.6, e17606, 2011.

KLETER, G. A.; BHULA, R.; BODNARUK, K.; CARAZO, E.; FELSOT, A. S.; HARRIS, C. A. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science**, v. 63, n. 11, p. 1107-1115, 2007.

LEE M. K.; MILES P.; CHEN J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midgut. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, 2006.

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5-Å resolution. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

MORÉ, M.; TRUMPER, E. V.; PROLA, M. J. Influence of corn, *Zea mays*, phenological stages in *Diatraea saccharalis* F. (Lep. Crambidae) oviposition. **Journal of Applied Entomology**, v. 127, n. 9-10, p. 512-515, 2003.

OSTLIE, K. R.; HUTCHISON, W. D.; HELLMICH, R. L. Bt corn and European corn borer: long term success through resistance management. **North Central Region Extension Publication**, 1997.

PALMA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; MAEZTU, M., HRENÉDEZ-MARTINEZ, P.; ESCUDERO, I. R.; ESCRICHE, B.; MUNOZ, D.; VAN RIE, J.; CABALLERO, P. Vip3C, a Novel Class of Vegetative Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 7163-7165, 2012.

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.

POLANCZYK, R. A.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (eds.) **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 111-136.

QUESADA-MORAGA, E.; GARCIA-TOVAR, E.; VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ALVAREZ, C. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain. **Microbiological Research**, v. 159, n. 1, p. 59-71, 2004.

RANG, C.; BERGVINGSON, D.; BOHOROVA, N.; HOISINGTON, D.; FRUTOS, R. competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiology**, v. 49, p. 22–27, 2004.

RASKO, D. A.; ALTHER, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

SCHNEPF, H. E.; CRICMORE, N.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZFIDER, D. R. and DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SENA, J. A. D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236–2237, 2009.

SHI, Y., XU, W., YUAN, M., TANG, M., CHEN, J., PANG, Y. Expression of vip1/vip2 genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 757-765, 2004.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, 2009.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIERE, Y. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 199-202, 2008.

TAN, S. Y.; CAYABYAB, B. F.; ALCANTARA, E. P.; IBRAHIM, Y. B.; HUANG, F.; BLANKENSHIP, E. E.; SIEGFRIED, B. Comparative susceptibility of *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. **Crop Protection**, v. 30, p. 1184-1189, 2011.

TAN, S. Y.; CAYABYAB, B. F.; ALCANTARA, E. P.; HUANG, F.; HE, K.; NICKERSON, K. W.; SIEGFRIED, B. Comparative binding of Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* toxins to brush border membrane proteins from *Ostrinia nubilalis*, *Ostrinia furnacalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) midgut tissue. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.114, p. 234-240, 2013.

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

WU, X.; LEONARD, R. B.; ZHU, Y. C.; ABEL, C. A.; HEAD, G. P.; HUANG, F. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 100, p. 29–34, 2009.

WU, X.; HUANG, F.; LEONARD, R. B.; OTTEA, J. Inheritance or resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in the sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 102, p. 44–49, 2009.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultures pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81-100.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; LEONARD, B. R.; ABEL, C.; HUANG, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidases N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and –resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p.52-603, 2010.

YANG, Y.; ZHU, Y.C.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; LEONARD, B. R.; ABEL, C.; LUTRELL, R.; HUANG, F. Down regulation of a gene for cadherin, but not Alkaline Phosphatase, Associated with Cry1Ab Resistance in the Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis*. **PlosONE**, v. 6, n. 10, e25783, 2011.

ZHANG, L.; HUANG, F.; LEONARD, R. B.; CHEN, M.; CLARK, T.; ZHU, Y. C.; WANGILA, D. S.; YANG, F.; NIU, Y. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and -susceptible strains of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 267-72, 2013.

CAPÍTULO 2 - Suscetibilidade de larvas da broca-da-cana a diferentes proteínas Cry1

RESUMO – As proteínas inseticidas Cry (proteínas cristal – Cry) são amplamente utilizadas no controle biológico de pragas. Podem ser utilizadas na forma de inseticidas biológicos e/ou expressas em plantas transgênicas. Assim sendo, o presente trabalho produziu as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa provenientes de clones de *Escherichia coli* e testou a suscetibilidade de larvas de *D. saccharalis* por meio de bioensaios de dose-reposta. A proteína Cry1Ab foi a mais efetiva no controle larval seguida das proteínas Cry1Ac, Cry1Fa, Cry1Ca. A proteína Cry1Aa foi a menos efetiva dentre as Cry1A testadas e a Cry1Ea não apresentou toxicidade a espécie alvo. Foi verificado forte inibição no crescimento larval. Os resultados obtidos indicam as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Fa como potencialmente tóxicas a *D. saccharalis* podendo ser utilizadas em programas de manejo integrado da praga no Brasil.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, bioinseticidas, controle microbiano, *Diatraea saccharalis*

Sugarcane borer larvae susceptibility to different Cry1 proteins

ABSTRACT – Cry proteins (protein crystal - Cry) are widely used in biological pest control. They are used as biological insecticides and/or expressed in transgenic plants. Therefore, for this work it were produced Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea and Cry1Fa proteins from *Escherichia coli* clones and tested the susceptibility of *D. saccharalis* larvae to the six proteins by dose-response bioassays. Cry1Ab protein was the most effective protein followed by Cry1Ac, Cry1Fa, Cry1Ca. Among Cry1A proteins, Cry1Aa was the least effective. Cry1Ea showed no toxicity to the target species. All Cry1 are proteins effective to this specie showed a strong growth inhibition. The findings

indicates the Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca and Cry1Fa proteins are potentially toxic and could be used in programs to control *D. saccharalis* in Brazil.

Key-word: *Bacillus thuringiensis*, bioinsecticides, microbiol control, *Diatraea saccharalis*

1. INTRODUÇÃO

A expansão das fronteiras da cana-de-açúcar por todo o território nacional favorece a distribuição da praga *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e seus prejuízos aumentam em dimensões proporcionais. Conhecida popularmente como broca-da-cana é responsável por causar prejuízos econômicos às culturas da cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo e sorgo (Botelho e Macedo, 2002).

O uso de inseticidas químicos recomendados para o controle desta praga na cultura da cana-de-açúcar traz consequências graves ao homem e ao meio ambiente devido à alta toxicidade, amplo espectro de ação e alto efeito residual. Assim, uma alternativa é o uso do controle biológico que consiste na utilização de parasitóides, predadores e patógenos; com a finalidade de promover o controle da população a níveis não prejudiciais aos cultivos agrícolas (Aranda et al., 1996).

Atualmente o principal método de controle desta praga na cultura da cana-de-açúcar é realizado com a liberação do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). A espécie é produzida em larga escala em laboratórios e suas liberações no campo mostram elevada eficiência de controle na população da praga (Botelho et al., 1995; Gallo et al., 2002).

Por ser a principal fonte de controle da praga a produção desse parasitóide não atende as necessidades de todos os produtores. Portanto, uma alternativa viável para o controle dessa praga é o uso da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1911). Esta bactéria apresenta capacidade de sintetizar proteínas inseticidas (cristal ou Cry), com alta especificidade, e sem efeito poluente ao ambiente e ao homem. Pode ser utilizada em formulações (sprays) e também com a incorporação dos genes *cry* em espécies de plantas cultivadas.

As plantas modificadas com a inserção de tais genes são chamadas plantas *Bt* e possuem grande aceitação no mercado agrícola. Desde 1996, primeira liberação de cultivo comercial nos EUA, a área global de plantio (ha) aumentou mais de 80 vezes (James, 2012). O cultivo das plantas *Bt* foi liberado no Brasil a partir de 2005 pela CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança) e atualmente países como EUA, Brasil, Argentina, Espanha e Canada plantam significantes áreas de plantas modificadas com os genes da bactéria *B. thuringiensis*.

As culturas de algodão, milho e soja geneticamente modificadas com os genes Cry1A.105, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry34Ab/Cry35Ab e Vip3Aa20 são atualmente comercializadas no Brasil. Portanto, diferentes insetos-praga estão expostos às referidas proteínas em função das culturas que atacam.

Com o intuito de analisar o potencial de controle das proteínas de *B. thuringiensis* em *D. saccharalis* o presente trabalho estudou a suscetibilidade larval da espécie às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Proteínas empregadas

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa foram produzidas a partir de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* XL-1 Blue expressando uma única proteína (clones). Todos os clones foram gentilmente cedidos pelo Dr. Ruud A. de Maagd (Plant Research International - Wageningen, Holanda).

A expressão foi realizada de acordo com protocolo descrito por Herrero et al. (2004). Para tanto os clones foram cultivados em meio TB (Terrific Broth) (12 g de triptona; 24 g de extrato de levedura; 2,31 g de KH₂PO₄; 12,54 g de K₂HPO₄; 4 mL de glicerol; q.p.s. 1000 mL), + ampicilina (100 µg.mL⁻¹) em três etapas de desenvolvimento. Primeiramente elas foram cultivadas em placa de Petri (90x15 mm) com meio TB e ágar (1,5% v/v) por 24 h a 37°C, seguido de transferência de uma colônia para 20 ml de meio líquido com incubação a 37°C, por 12 h sob agitação de 200 rpm. Por último, um volume de 2,5 ml desse cultivo foi transferido

para um erlenmeyer (capacidade de 1 L) contendo 250 ml de meio e incubados durante 60 h, a 28°C sob agitação de 200 rpm. Nas duas primeiras etapas do desenvolvimento celular foram utilizados no meio de cultivo glicose 2% para suprimir a expressão das proteínas. Como a montagem molecular favorece a produção das proteínas Cry1 a proteína produz em larga escala afetando o desenvolvimento celular, portanto essa expressão é suprimida nas etapas iniciais para que se possa ter quantidades suficientes de célula, permitindo o desenvolvimento nas etapas posteriores.

As células cultivadas foram coletadas por centrifugação por 8 min a 5.930 Xg, os sedimentos obtidos foram pesados e mantidos a -20°C por pelo menos 30 min. O processo de rompimento celular foi realizado em tampão 50mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5mM de EDTA e 100mM de NaCl com lisozima (800 µg/g de pellet). Em seguida tratou-se a suspensão com desoxicolato de sódio [ácido desoxicólico (sal sódico)] e solução de DNaseI (1 mg/ml), para completa remoção do DNA.

Concluída a etapa de rompimento celular foi iniciada a lavagem com 20mM Tris/HCl pH7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X 100, por três vezes. Seguida de três lavagem com solução salina tamponada contendo fosfato - 10mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl. Como etapa final foi realizada a solubilização das proteínas Cry em tampão 50 mM NaHCO₃ pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT (adicionado imediatamente antes do uso) e incubação por 3 h a temperatura ambiente sob agitação horizontal. Essa etapa foi seguida de centrifugação por 15 min a 39.200 xg a 4°C. O sobrenadante contendo a pro-toxina solubilizada foi filtrado em membrana de poliestireno de 0,44 µm.

Em seguida, realizou-se quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976), o material foi diluído a uma concentração de 1 mg.ml⁻¹, para evitar a precipitação o extrato proteico foi transferido para tubos estéreis. Uma alíquota foi coletada para verificar a qualidade da proteína em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970).

As proteínas visualizadas em gel de SDS-PAGE foram quantificadas pelo software Bionumerics (Applied-Maths), por uma curva de densitometria usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão de referência da concentração final.

2.2. Bioensaios

A população de *D. saccharalis* testada foi gentilmente cedida pela Usina São Martinho (Pradópolis-SP). Essa população encontra-se estabelecida há mais de dez anos e as posturas de diferentes gerações foram levadas ao LGBBA para eclosão e teste de suscetibilidade.

A análise de toxicidade à *D. saccharalis* foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo seis proteínas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Cry1Fa) em oito diferentes concentrações, com 32 larvas neonatas cada. Para validação dos ensaios três testemunhas foram utilizadas: água destilada, bactéria hospedeira *E. coli* do tipo XL1-Blue e tampão de solubilização das proteínas Cry1. O experimento foi realizado em triplicata com a aplicação do lisado proteico em superfície da dieta artificial semi-sólida (Hensley e Hammond, 1968).

A dieta artificial foi colocada para solidificar em placas de poliestireno de 128 – poços (Cell Wells, Corning Glass Works). Um volume de 50 µl da solução proteica foi aplicado na superfície de cada poço da placa que contém 2 cm², portanto, os valores de quantificação obtidos por densitometria pelo programa Bionumerics foram multiplicados por 25, que representa o volume aplicado por cm² e transformados para µg.cm⁻². Em função desse valor as diluições preparadas foram realizadas pela fórmula: $C_1V_1=C_2V_2$. Após a aplicação dos tratamentos, as bandejas foram acondicionadas em fluxo laminar por 40 min para secagem e em seguida duas lagartas foram colocadas em cada poço da placa contendo a dieta artificial tratada. As bandejas foram acondicionadas em câmara climatizada com temperatura 26 ± 2°C e fotoperíodo 14 h de luz: 10 h de escuro.

A mortalidade foi verificada aos sete dias e os valores médios de larvas mortas para cada concentração testada foram submetidos à análise de Probit (Finney et al., 1971), pelo programa POLO-PC (LeOra Software, 2003). Nesta análise foi possível estimar a concentração letal necessária para controlar 50% e 90% das larvas (CL₅₀ e CL₉₀) e os ângulos das curvas de dose-reposta de cada proteína no controle larval. As larvas não controladas foram pesadas (mg) e uma análise de redução do peso larval foi realizada de acordo com Zhang et al. (2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas Cry1 apresentaram bandas de massa molecular ao redor de 130 kDa (dados não mostrados). Esses dados foram aferidos com base no marcador de massa molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein e são condizentes aos obtidos na literatura por diferentes grupos que estudam as mesmas classes proteicas (de Maagd et al., 1996; Bravo et al., 2007).

A suscetibilidade das larvas de *D. saccharalis* às diferentes proteínas de *B. thuringiensis* está descrita na Tabela 1. Os dados descritos são valores da análise de Probit estimados pelo programa POLO PC em $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Todas as proteínas se ajustaram ao teste por meio de confirmação do valor de chi-quadrado obtido ser inferior ao valor do chi-quadrado tabelado, em função do grau de liberdade a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Resposta das larvas de *D. saccharalis* às diferentes protoxinas de *B. thuringiensis*.

Proteínas	b $\pm$ (EP) ¹	CL ₅₀ (95% IC) ²	CL ₉₀ (95% IC) ²
Cry1Aa	1,35 $\pm$ 0,14	0,78 (0,44 – 1,38)	7,00 (3,4 – 24,8)
Cry1Ab	1,22 $\pm$ 0,09	0,015 (0,011 – 0,021)	0,17 (0,11 – 0,30)
Cry1Ac	1,74 $\pm$ 0,16	0,19 (0,13 – 0,30)	1,10 (0,6 – 2,5)
Cry1Ca	1,60 $\pm$ 0,16	0,283 (0,19 – 0,4)	1,78 (1,1 – 3,6)
Cry1Ea	-----	> 20	
Cry1Fa	1,70 $\pm$ 0,15	0,18 (0,13 – 0,31)	1,32 (0,9 – 1,8)

¹ Valor do ângulo da curva de regressão $\pm$ erro padrão; ² Concentração letal estimada (μg de proteína por cm^{-2}) e Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

De acordo com os valores pode-se observar que a proteína Cry1Ab apresentou maior atividade tóxica no controle da praga, os valores de CL₅₀ estimados foram de 12 a 19 vezes menores que os estimados para as proteínas Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Fa e 52 vezes menor que a CL₅₀ estimada para a proteína Cry1Aa. A proteína Cry1Ea não foi eficiente no controle da espécie alvo, não permitindo a estimativa da CL₅₀ e CL₉₀ para referida classe proteica.

Macedo et al. (2012) estudaram o efeito das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac em uma população brasileira de *D. saccharalis* e encontraram a mesma ordem de efetividade obtida no presente trabalho. No entanto, a CL₅₀ estimada para a população testada no presente trabalho foi 15 vezes menor para a proteína Cry1Ab, mostrando maior suscetibilidade.

Até o presente momento as informações sobre o uso das proteínas Cry1 no controle de *D. saccharalis* são escassas. Os valores encontrados na base de dados “Specificity Database” referem-se a populações de diferentes regiões dos Estados Unidos da América (<http://www.glfsc.forestry.ca/bacillus>) e diferem entre si. Tan et al. (2011), estudando uma população do estado da Califórnia encontraram maior efetividade da proteína Cry1Ac e os grupos liderados por Wu et al. (2009) e Zhang et al. (2013) verificaram maior toxicidade à proteína Cry1Aa no controle larval de uma população do estado da Louisiana. As diferenças encontradas em relação a suscetibilidade podem estar relacionadas a diversidade genética presente nas diferentes populações, bem como ao modo de montagem dos bioensaios. Monnerat et al. (2006) associaram as diferenças de suscetibilidade as proteínas Cry1 com a diversidade genética da espécie *Spodoptera frugiperda* de três populações da América Latina. Portanto vale ressaltar a importância de direcionar as estratégias de controle da broca-da-cana em função das regiões geográficas de controle.

A não efetividade da proteína Cry1Ea as larvas pode estar associada ao fato dessa proteína não se unir aos receptores presentes nas vesículas do mesentero de *D. saccharalis* (Rang et al., 2004). Os autores não avaliaram a suscetibilidade larval, mas fizeram uma análise mais elaborada mostrando que a população do inseto oriunda do México não possui receptores específicos a esta classe proteica.

Todas as proteínas Cry1 inibiram o desenvolvimento larval devido a reduções no peso (Figura 1). Este é um fator considerado efetivo dentro do contexto do controle biológico, pois muitas vezes os insetos-praga com peso reduzido não conseguem completar o ciclo de vida e se reproduzir.

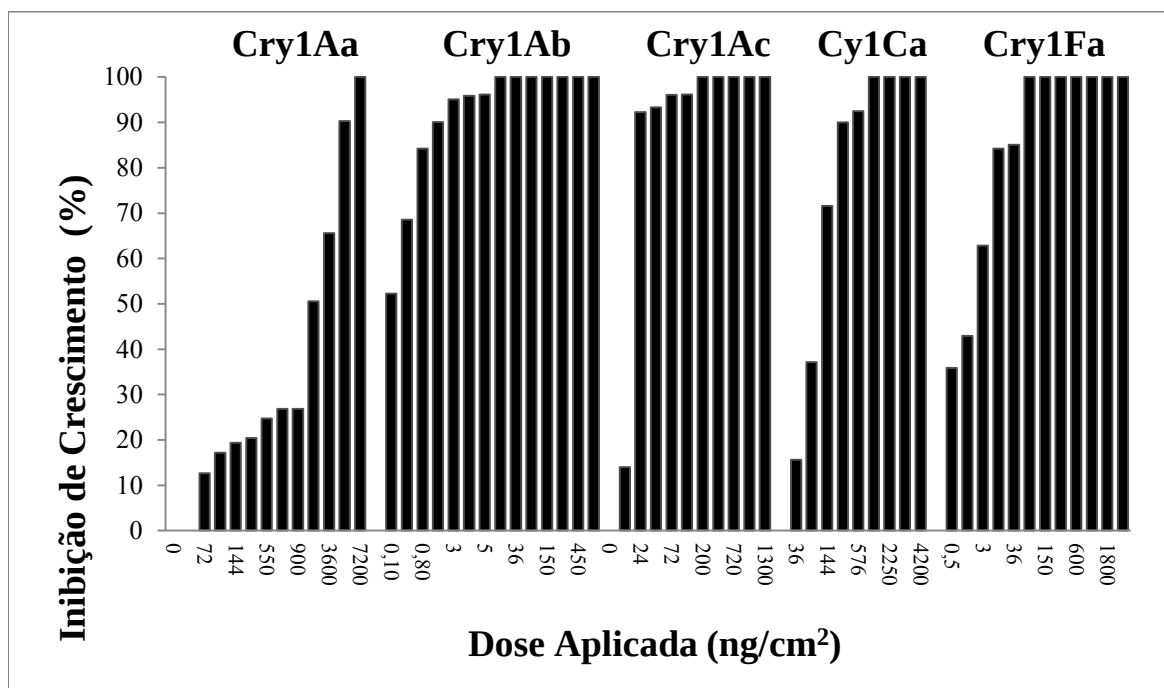


Figura 1. Inibição do Crescimento larval de *D. saccharalis* expostas a dieta artificial tratada com as proteínas Cry1. Valores médios calculados pela formula: Inibição de crescimento (%) = $100 * [(peso da testemunha - peso da larva exposta ao tratamento) / Peso da testemunha]$.

Associando os valores de CL_{50} a porcentagem de inibição de crescimento (Figura 1) podemos verificar que as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Fa foram mais tóxicas no controle larval, pois a dose de CL_{50} inibiu totalmente o crescimento. Para a proteína Cry1Ca esta inibição foi da ordem de 90% e para Cry1Aa de apenas 27%. A associação da CL_{50} aos valores de inibição de crescimento podem sugerir o que ocorrerá com a metade da população que sobreviveu. Por exemplo, as larvas sobreviventes nas doses de CL_{50} estimadas para as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa e Cry1Ca provavelmente não se desenvolverão e não conseguirão se estabelecer praga na cultura. No caso da proteína Cry1Aa, as lagartas terão maior probabilidade de desenvolvimento na cultura e dessa maneira a capacidade de levarem alelos de resistência as próximas gerações aumenta. Weng et al. (2011) observaram que plantas transgênicas de cana-de-açúcar expressando a proteína Cry1Ac provocaram grande inibição no desenvolvimento da broca-da-cana seguido de mortalidade.

4. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados revelam potencial de controle das proteínas de *B. thuringiensis* pertencentes as classes Cry1A, Cry1C e Cry1F à broca-da-cana. A proteína Cry1Ea não é recomendada para o controle da espécie alvo. Dentre as proteínas testadas, a Cry1Ab merece destaque por ser a mais efetiva no controle larval.

5. REFERÊNCIAS

ARANDA, E.; SÁNCHEZ, J.; PEFEROEN, N.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, P.S.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p.409-442.

BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; MAGRINI, E.A.; HADDAD, M.L.; RESENDE L.C.L. Efeito do número de liberações de *Trichogramma galloi* (Zucchi, 1988) no parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Scientia Agricola**, v.52, p.65-69, 1995.

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. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v.49, p.423-435, 2007.

DE MAAGD, R. A.; KLEI, H. V. D.; BAKKER, P. L.; WILLEM J. STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Different domains of *Bacillus thuringiensis* α -endotoxins can bind to insect midgut membrane proteins on ligand blots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2753–2757, 1996.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. London: Cambridge University Press, 1971. 272p.

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

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, v.6, p.1742-1743, 1968.

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

JAMES, C., 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief n. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

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

MACEDO, C.L.; MARTINS, E.S.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, A.C.; PRAÇA, L.B.; GÓIS, L.A.; MONNERAT, R.G. Seleção e Caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1759-1765, 2012.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M.D.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; RAUSSEL, C.; CERÓN, J.; IBARRA, J.E.; RINCON-CASTRO, M.C.DEL, ESPINOZA, A.M.; MEZA-BASSO, L.; CABRERA, L.; SÁNCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied of Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7029–7035, 2006.

RANG, C.; BERGVINGSON, D.; BOHOROVA, N.; HOISINGTON, D.; FRUTOS, R. competition of *bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiology**, v.49, p.22–27, 2004.

TAN, S.Y.; CAYABYAB, B.F.; ALCANTARA, E.P.; IBRAHIM, Y.B.; HUANG, F.; BLANKENSHIP, E.E.; SIEGFRIED, B. Comparative susceptibility of *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. **Crop Protection**, v.30, p.1184-1189, 2011

WENG, L. W.; DENG, H.; XU, J.L.; LI, Q.; ZHANG, Y. Q.; JIANG, Z. D.; LI, Q. X.; CHEN, J. W.; ZHANG, L. H. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified *cry1Ac* provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Research**, v.20, p.759-772, 2011.

WU, X.; LEONARD, R.B.; ZHU, Y.C.; ABEL, C.A.; HEAD, G.P.; HUANG, F. Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.100, p.29-34, 2009.

ZHANG, L.; HUANG, F.; LEONARD, R.B.; CHEN, M.; CLARK, T.; ZHU, Y.C.; WANGILA, D.S.; YANG, F.; NIU, Y. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and -susceptible strains of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.112, p.267-72, 2013

CAPÍTULO 3 – Cry1 and Vip3Aa toxins potential to control *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae), an important pest of different crops

ABSTRACT - Some tropical and sub-tropical plants were genetically engineered with the introduction of *cry1* and *vip3A* genes from *Bacillus thuringiensis* in order to protect them from several lepidopteran pests. However, it is well known that some of these Cry toxins share receptors in some insect species, which could boost the occurrence of cross-resistance. The knowledge of the effect of Cry1 and Vip3A proteins over one of the most important pests of transgenic crops in the tropics, *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer), has not been completely achieved yet. In the present study, a Brazilian population of *D. saccharalis* has been tested for the susceptibility to Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa and Vip3Aa by an artificial diet surface contamination. Cry1 proteins were biotinylated to homologous and heterologous competition assays with midgut brush border membrane vesicles (BBMV) to the target pest. Cry1Ab protein was shown the highest toxicity, followed by Vip3Aa, Cry1Ac, Cry1Fa and Cry1Aa. Cry1Aa protein did not control as well as the other ones. The four Cry1 proteins showed specific binding to the BBMV of the larvae. Based on the results of heterologous competitive binding assays a model of three receptors was suggested; a common receptor for Cry1A's protein, another receptor for Cry1Fa and Cry1Ab and a different receptor to Vip3Aa. These findings point out that transgenic maize field are currently protected against this insect pest. In addition, the high levels found of Vip3A toxicity and the lack of shared receptors with Cry proteins indicate that these proteins are an interesting alternative candidates for controlling *D. saccharalis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, sugarcane borer, biotinylated proteins.

1. INTRODUCTION

Maize and sugarcane are important industrial crops in South America. Indeed, they are becoming most relevant now because of their use not only for food supply, but also, for biofuels. Currently, several countries are implementing ambitious programs to increase production in order to achieve security supply in terms of food and energy (OECD-FAO, 2012). However, crop production are limited by pest infestations, which have been overlooked because their little impact on the developed countries crops.

One of the major sugarcane pests and potential corn pests is the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, which is responsible for significant economic damages, this pest is also important for sorghum and rice (Gallo et al., 2002). Chemical and biological control are difficult to be considered since the larvae bore galleries and develop inside the stalks. This biological activity is shared by other relevant corn pest in Holarctic region, the European corn borer (*Ostinia nubilalis*, Hübner), which has been successfully controlled engineering transgenic plants that express the entomopathogenic Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* (Bt corn) (Masson et al., 1996).

B. thuringiensis is a very commonly utilized bacterium in formulations for insect pest control because of their Cry insecticidal proteins are produced and accumulated in the sporulation phase. Moreover, it has been described other structurally unrelated insecticidal proteins secreted from the bacterium into the growth medium at the vegetative phase (Vip proteins), some of them (Vip3A family) effective to lepidopteran pests from the families Noctuidae and Plutellidae (<http://www.glf.cfs.nrcan.gc.ca/bacillus>).

The use of all these proteins as insecticides has increased since 1996, with transgenic corn and cotton commercialization (De Maagd et al., 1999). The *B. thuringiensis* genes codifying proteins for lepidopteran targets has been engineered into corn and approved for release include the following, singly and stacked: cry1Ab, cry1Ac, cry1Fa, cry2Ab and vip3Aa. Furthermore, some sugarcane varieties have already been engineered with *B. thuringiensis* genes cry1Ab and cry1Ac in order to control *D. saccharalis* (Koziel et al., 1993; Weng et al., 2011).

The mode of action of Cry proteins has been mostly studied for Cry1A proteins, however it is assumed no essential changes for other Cry and Vip proteins. Proteins are ingested and in the larvae midgut, the protoxins are cleaved by some proteases to an active form which binds to specific proteins on the brush border membrane. The protein binding triggers not completely understood biological mechanism that kills cells and finally drives to insect dead (Vachon et al., 2012, Ben Hamadou-Charfi et al., 2013).

The few studies carried out with *D. saccharalis* and *B. thuringiensis* proteins showed insect susceptibility to most of the those already present in transgenic varieties (Wu et al., 2009; Tan et al, 2011; Zhang et al., 2013). However, a serious potential problem associated with the transgenic plants is the possibility that the insect populations may become resistant to the single expressed protein, and, indirectly, cross-resistant to other proteins. Actually, different mechanisms could develop insect resistance but the binding is a key step, and sharing a receptor can provide cross-resistance after single protein selection (Ferré et al., 2008). Studies that determine *B. thuringiensis* proteins binding to the membranes of insect pests have shown parallelism and predicted cross resistance arising (Herrero et al., 2001; González-Cabrera et al., 2006; Hernández-Rodríguez et al., 2012). The reports about Cry1 shared receptors in different insect species (Hernández-Martínez et al., 2013) suggested a possible development of cross-resistance with a single Cry protein selection. Indeed, Cry1Ab and Cry1Ac sharing receptors in *D. saccharalis* has been reported (Rang et al., 2004), but no information is available about the other proteins expressed in transgenic crops.

In the present work, the toxicity of Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa and Vip3Aa *B. thuringiensis* proteins expressed in transgenic corn has been analyzed in *D. saccharalis* to compare their relative effectively. Moreover, the binding experiments performed to possible cross-resistance selection for Cry proteins, but not for the Vip3Aa protein.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Proteins

The recombinant *Escherichia coli* XL-1 Blue strains expressing just one type of Cry1 protein were kindly supplied by Ruud de Maagd (Plant Research International - Wageningen, Netherlands). Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins were expressed as protoxin inclusion bodies. Crystal dissolution was developed using a solubilization buffer (50 mM NaHCO₃ pH 10.0 - 100 mM NaCl with 10 mM DTT), as previously described (Herrero et al., 2004)

Gene encoding Vip3Aa protein was expressed in *E. coli* WK6. This clone was kindly provided by Bayer Crop Science (Ghent, Belgium). Protein expression was induced with 1 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and the cells were broken by lysozyme and sonication treatment as described before (Chakraborty et al., 2012). Protoxin was obtained directly from the supernatant after centrifugation and filtering of cell lysate (in phosphate buffer 20 mM pH 7.4 - 5M NaCl).

The four Cry1 and Vip3Aa protoxins were activated with 1% bovine pancreas trypsin (Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 h and 30 min and checked by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Both proteins class showed a band at a molecular weight around 60 kDa (data not show). Concentrations were estimated by densitometry with bovine serum albumin (BSA) as standard, using software Bionumerics (Applied-Maths).

2.2. Bioassays

D. saccharalis eggs were kindly supplied from a population established for more than 10 years at São Martinho mill (Pradópolis-SP, Brazil). The environmental conditions to maintain the insect culture was 27°C ± 2, relative humidity of 70% ± 10 and a photoperiod of 14:10 (L:D). The toxicity assays against neonatal larvae of *D. saccharalis* was evaluated by dose-mortality feeding bioassays. They were carried out using nine different concentrations of each supernatant toxin applied on the artificial diet surface (Hensley e Hammond, 1968). Thirty two individual larvae were

tested on each treatment, reared at the same maintain conditions. Entire sets of experiment were replicated three times. Solubilization buffer, *E. coli* XL-1 blue and *E. coli* WK6 were taken as negative control in insects bioassays. Levels of mortality were recorded seven days after the proteins treatment. Probit analyses were performed with the computer program POLO PC (Leora software, Berkeley, CA) to estimated LC₅₀ and LC₉₀ to each protein.

2.3. Midgut isolation and BBMV preparation

Midguts from final instar larval of *D. saccharalis* were dissected, washed on MET buffer (250 mM mannitol, 17 mM Tris-HCl, 5 mM EGTA, pH 7.5), frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until used. Brush border membrane vesicles (BBMV) were prepared by the MgCl₂ precipitation method as described by Wolfersberger et al. (1987). The protein concentration of BBMV was measured by Bradford's procedure (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.4. Binding assays with biotinylated Cry1 proteins

Trypsin-activated Cry1 proteins were purified by chromatography and labeled with biotin using the enhanced chemiluminescence protein biotinylation kit (Amersham Biosciences®) according to the manufacturer's instructions. Binding's assays were carried as (Escudero et al., 2007). The amount of BBMV used was 60 µg and the amounts of biotinylated protein were appropriated to each kind: 50 ng for Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa and 100 ng for Cry1Ab. The same conditions were used for homologous and heterologous competitions assays, using an excess of unlabeled protein.

The binding's samples were separated by a 12% SDS-PAGE. A Western blotting was performed using nitrocellulose membrane (GE Healthcare®, Amersham™ Hybond™ - ECL) with Streptavidin-AP biotinylate horseradish peroxidase (Roche Diagnosis) incubation and the revelation was done by chemiluminescence ECL™ Western Blotting Analysis System solution (GE

Healthcare®) using Image Quant LAS 400 with the software Image quant LAS 400 version 1.2 following manufacturer's instructions.

3. RESULTS

3.1. Susceptibility

Estimated LC₅₀ and LC₉₀ to the four Cry1 toxins and the Vip3Aa toxin with *D. saccharalis* showed that Cry1Ab toxin was significantly more toxic than Vip3Aa, Cry1Ac, Cry1Fa and Cry1Aa (from 6 to 125-fold) (Table 1). At both levels, Cry1Aa was the less effective to *D. saccharalis* control, with a LC₅₀ around 80-fold times higher than those of Cry1Ab; the LC₉₀, showed a 42-fold difference. Looking toward Vip3Aa toxin it was possible to observe that the target species was sensitive to this protein class. Vip3Aa and Cry1Ac toxin had showed no statistically difference. The LC₅₀ values were lower than Cry1Aa and Cry1F toxin (around 10 and 6-fold), but higher than Cry1Ab (12-fold). Negative controls did not cause mortality on the conditions of the assays.

Table 1. Susceptibility of *D. saccharalis* to neonate larvae to Cry1 and Vip3Aa proteins applied on diet surface feeding bioassays.

Toxins	Slope ± (SE) ^a	LC ₅₀ (ng/cm ²) FL ₉₅ ^b	LC ₉₀ (ng/cm ²) FL ₉₅ ^b
Cry1Aa	1.14 ± 0.13	43 (34 – 54)	322 (221 – 537)
Cry1Ab	0.96 ± 0.11	0.35 (0.15 – 0.64)	7.6 (3.5 – 30)
Cry1Ac	1.18 ± 0.09	5.1 (3.4 – 7.4)	60.7 (36 – 122)
Cry1Fa	1.76 ± 0.15	25.3 (20 – 32)	136 (95 – 229)
Vip3Aa	0.93 ± 0.08	3.44 (1.9 – 5.9)	82.5 (39 – 257)

^a Slope ± standard error; ^b FL₉₅: 95% fiducial limits.

3.2. Binding assays

The homologous binding's assays performed with Cry1 proteins present on transgenic crops showed that the four biotinylated Cry1 proteins tested, Cry1Aa,

Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa, bound specifically to the BBMV of *D. saccharalis* larvae (Fig. 1). Cry1Ab protein showed a complete displacement with 150 fold excess of the unlabeled protein, Cry1Aa and Cry1Ac had a displacement with 400 fold excess and Cry1Fa had a displacement with 10 fold excess. The all reciprocal experiments of heterologous competition showed that an excess of unlabeled Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac reduced the labeled protein bound to BBMV (data not show). On the other hand, Cry1Fa only provide partial competition to labeled Cry1Ab (Fig. 2.C), but no competition to Cry1Aa and Cry1Ac (Fig. 2.A and B).

Analyzing the competition between Cry1 proteins and Vip3Aa we found no competition between them, suggesting another receptor to Vip3Aa protein (Fig. 3 and Fig. 4).

4. DISCUSSION

Early reports show Vip3Aa proteins controlling different lepidopteran species as, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera albula*, *Spodoptera eridania* and *Agrotis ipsilon* (Estruch et al., 1996; Lee et al., 2003; Bergamasco et al., 2013; Hernández-Martínez et al., 2013). In the present study, it has been determined for first time the toxicity of Vip3Aa protein to *D. saccharalis*. The same Vip3Aa protein was tested against *S. frugiperda* and *S. exigua* in our laboratory in previous reports (Chakroun et al., 2012, Hernandez-Mártínez et al., 2013). The LC₅₀ estimated to *S. frugiperda* were 12 – 43 fold higher, and 10 folds to *S. exigua* than the estimated to *D. saccharalis*. Then, we can consider it an interesting protein to control *D. saccharalis* because of its high toxicity, which was similar to the Cry1Ac toxicity.

However, the most toxic protein assayed was Cry1Ab, whereas Cry1Aa and Cry1Fa the least effectives. There are little information reported regarding the control of *D. saccharalis* by *B. thuringiensis* proteins and it is difficult to compare results because of the methodologies applied. Then, studying the LC₅₀ values of same Cry1 proteins, Tan et al. (2011) and Zhang et al. (2013) found that Cry1Aa and Cry1Ac were most efficient on *D. saccharalis* larvae control, followed by Cry1Ab and Cry1Fa. On the other hand, the analysis of Cry1Aa and Cry1Ac by Wu et al. (2009) showed much more toxicity of the Cry1Aa protein. The absolute and relative values cannot be

directly compared, but taking all together and the ones from the present work suggests that Cry1A proteins are highly toxic to *D. saccharalis* and in the similar range than Vip3Aa protein, and Cry1Fa is less toxic, but not innocuous. In other corn pests, such as *O. nubilalis* and *S. frugiperda* the profile is different. *O. nubilalis* is highly susceptible to Cry1 proteins, but Vip3Aa have no effect and Cry1A proteins have little activity and Cry1Fa and Vip3Aa are highly effective to *S. frugiperda* larvae.

All assayed proteins in the present study had specific binding sites in *D. saccharalis*, Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac share a binding receptor, another is shared by Cry1Fa and Cry1Ab, and Vip3Aa showed an unshared receptor. A shared receptor for Cry1Ab and Cry1Ac in *D. saccharalis* has been previously reported by Rang et al. (2004), but the binding of the other proteins is a novelty. Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac sharing the same binding site in *D. saccharalis* was similarly found in other lepidopteran species as *Plutella xylostella* (Ferré et al., 2002), *O. nubilalis* (Hua et al., 2001). Moreover, it is noteworthy that a common receptor for Cry1A and Cry1Fa for some species have been reported in some publications (Banks et al., 2001, Hernández-Rodríguez et al., 2013), but in *D. saccharalis* showed shared binding sites only with Cry1Ab and suggesting low affinity as it was observed in *O. nubilalis* by Hua et al. (2001). Finally, the studied insect showed also similar no competition of Vip3Aa regarding the Cry1 labeled proteins as it was found by different research groups studying different insect pests as, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera* and *S. frugiperda* (Lee et al., 2006; Sena et al., 2009; Gouffon et al., 2011).

Present results could explain the cross resistant pattern observed in six *D. saccharalis* strains Cry1Ab-maize resistant to Cry1Aa, Cry1Ac and Cry1Fa, which most of them showed cross-resistance to Cry1A proteins, but only one the a weak cross resistance to Cry1Fa was observed (Zhang et al., 2013),. We can hypostatize that resistant strains will not be resistant to Vip3Aa. In addition, if a Cry1Fa resistant were selected, probably will not be cross-resistant to Cry1Aa, Cry1Ac and Vip3Aa, and may be have low levels of resistance to Cry1Ab.

The results of the present work suggests that all proteins studied can provide a good control for *D. saccharalis*, but we suggest to *D. saccharalis* combine proteins such as Cry1Ac, Cry1F and Vip3Aa for pyramiding strategy in resistance

management. However, it should be taking into account the geographical area and other possible pests for the specifically plant design. In fact, regarding the actual genes present in transgenic plants, a combination of *cry1Fa* and *vip3Aa* can be considered in South America region to be implemented in plants with problems with *D. saccharalis* and *S. frugiperda*.

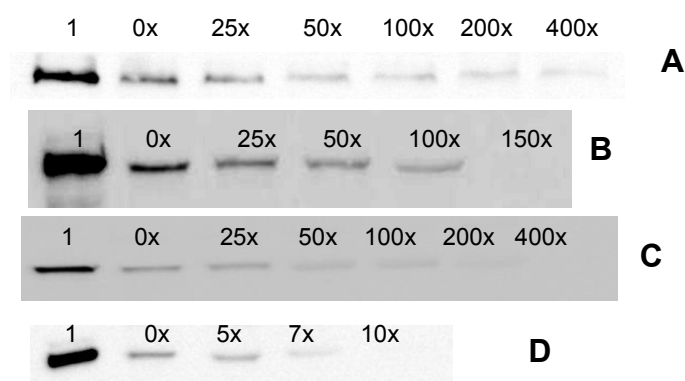


Fig. 1. Binding of biotinylated Cry1Aa (A), Cry1Ab (B), Cry1Ac (C) and Cry1Fa (D) toxins to *D. saccharalis*. Lane 1, Total amount of label protein. Lane 2 (0x), Total binding. Lane 3 – 6, presence of a fold excess of unlabelled protein.

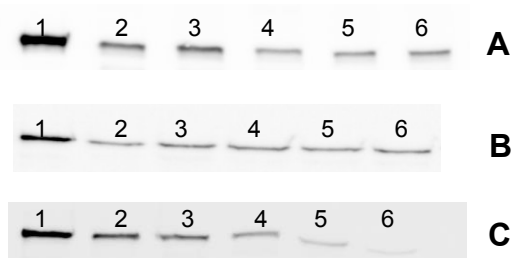


Fig. 2. Binding competition assays between biotinylated Cry1Aa (A), Cry1Ac (B) and Cry1Ab (C) toxins and unlabeled Cry1Fa toxin to BBMV from *D. saccharalis*. Lane 1, total amount of Cry1A's toxins. Lane 2, total binding of Cry1A's-biotylated toxins. Lanes 3 to 6, increasing concentrations of unlabeled Cry1F protein (50, 100, 200 and 400 times excess).

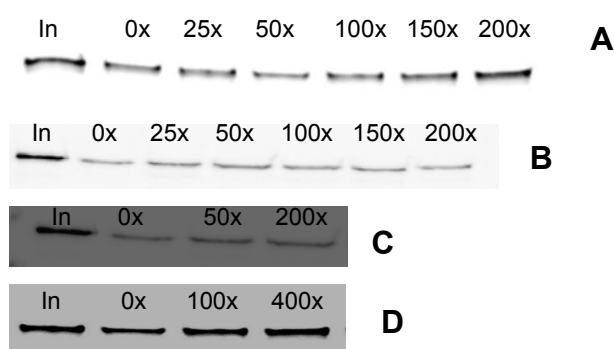


Fig. 3. Heterologous binding assays. Biotinylated toxins/unlabelled protein: Cry1Aa/Vip3Aa (A), Cry1Ab/Vip3Aa (B) Cry1Ac/Vip3Aa (C) and Cry1Fa/Vip3Aa (D) to *D. saccharalis* in the absence of competitor (in) or in the presence of a fold excess of unlabelled protein.

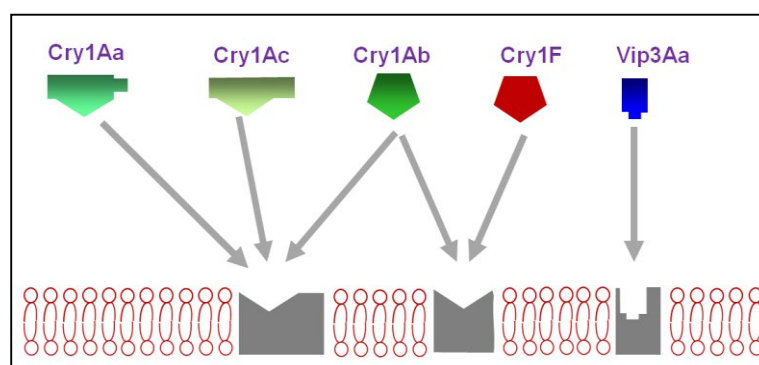


Fig. 4. Proposed model to Cry1 and Vip3Aa proteins binding to the brush border membrane of midgut cells of *D. saccharalis*.

5. REFERENCES

Banks, D.J., Jurat-Fuentes, J.L., Dean, D.H., Adang, M.J. (2001) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry1Fa delta-endotoxins share common binding proteins in *Heliothis virescens*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 31, 909-918.

Ben Hamadou-Charfi D, Boukedi H, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S, Jaoua S. (2013) *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **J. Invertebr. Pathol.** 114, 139-143.

Bergamasco, V.B., Mendes, D.R.P., Fernandes, A.O., Desidério, J.A., Lemos, M.V.F. (2013) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **J. Invertebr. Pathol.** 112, 152–158.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of dye-binding. **An. Biochem.** 72, 248-254.

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

De Maagd, R.A., Bosch D, Stiekema W. (1999) Toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends Plant Sci.** 4, 9–13.

Escudero, I.R., Estela, A., Escriche, B., Caballero, P. (2007) Potential of the *Bacillus thuringiensis* Toxin Reservoir for the Control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants. **Appl. Environm. Microbiol.** 73, 337–340.

Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Craig, J.A., Koizel, M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93, 5389-5394.

Ferré, J., Van Rie, J., Macintosh, S.C. (2008) Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In: Romeis, J.; Shelton, A. M.; Kennedy,

G. G. Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM programs. Springer, NY. p.41-85.

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

Gallo, D., Hakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti-Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. (2002). **Entomologia Agrícola**. FEALQ, p. 920.

González-Cabrera, J., Farinós, G.P., Caccia, S., Díaz-Mendoza, M., Castanera, P., Leonardi, M.G., Giordana, B., Ferré, J. (2006) Toxicity and Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesania nonagrioides* (Lefebvre). **Appl. Environm. Microbiol.** 72, 2594-2600.

Gouffon, C., Van Vliet, A., Van Rie, J., Jansens, S., Jurat-Fuentes, J.L. (2011) Binding sites for Cry2Ae toxin from *Bacillus thuringiensis* on Heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F or Vip3A toxins. **Appl. Environ. Microbiol.** 7, 3182–3188.

Hensley, S.D., Hammond, A.M. (1968) Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **J. Econom. Entomol.** 6, 1742-1743.

Hernández-Martínez, P., Hernández-Rodríguez, C.S., Van Rie, J., Escriche B., Ferré, J. (2013) Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **J. Invertebr. Pathol.** 113, 78-81.

Hernández-Rodríguez, C.S., Hernández-Martínez, P., Van Rie, J., Escriche, B., Ferré, J. (2012) Specific Binding of radiolabeled Cry1Fa insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* to midgut sites in lepidopteran species. **Appl. Environ. Microbiol.** 78, 4048-4050.

Hernández-Rodríguez, C.S., Hernández-Martínez, P., Van Rie, J., Escriche, B., Ferré, J. (2013) Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**. 8, 1-9.

Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Tabashnik, B., Ferré, J. (2001) Shared Binding Sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A Toxins. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, 5729–5734.

Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Ferré, J., Bakker, P.L., De Maagd, R.A. (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **Biochem J.** 384, 507-513.

Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J.L., Schwab, G., Adang, M.J. (2001) Binding Analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry δ -Endotoxins Using Brush Border Membrane Vesicles of *Ostrinia nubilalis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67, 872-879.

Kozziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., Mcpherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M., Evola, S.V. (1993) Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. **Nature Biotech.** 11, 194-200.

Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N., Chen, J.S. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 4648-4657.

Lee, M.K., Miles, P., Chen, J.S. (2006) Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Bioch Biophys Res. Commun.** 339, 1043-1047.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2012-2021, OECD publishing and FAO.

Mason, C.E., Rice, M.E., Calvin, D.D., Vanduyn, J.W., Showers, W.B., Hutchison, W.D., Witkowski, J.F., Higgins, R.A., Onstad, D.W., and Dively, G.R. (1996) European corn borer ecology and management. North Central Regional Publication No. 327. Iowa State University, Ames, Iowa.

Rang, C., Bergvingson, D., Bohorova, N., Hoisington, D., Frutos, R. (2004) Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiol.** 49, 22–27.

Sena, J.A.D., Hernández-Rodríguez, C.S., Ferré, J. (2009) Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Appl. Environ. Microbiol.** 75, 2236-2237.

Tan, S.Y., Cayabyab, B.F., Alcantara, E.P., Ibrahim, Y.B., Huang, F., Blankenship, E.E., Siegfried, B. (2011) Comparative susceptibility of *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. **Crop Protec.** 30, 1184-1189.

Vachon V, Laprade R, Schwartz J. (2012) Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. L. **J Invertebr Pathol.** 15, 1-12.

Weng, L.W., Deng, H., Xu, J.L., Li, Q., Zhang, Y.Q., Jiang, Z.D., Li, Q.X., Chen, J.W., Zhang, L.H. (2011) Transgenic sugarcane plants expressing high levels of modified *cry1Ac* provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Res.** 20, 759-772.

Wolfersberger, M., Luethy, P., Maurrer, A., Parenti, P., Sacchi, F.V., Giordana, B., Hanozet, G.M. (1987) Preparation and partial characterization of amino-acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comp. Biochem. Physiol.** 76, 131-139.

Wu, X., Leonard, R.B., Zhu, Y.C., Abel, C.A., Head, G.P., Huang, F. (2009) Susceptibility of Cry1Ab-resistant and -susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **J. Invertebr. Pathol.** 100, 29–34.

Zhang, L., Huang, F., Leonard, R.B., Chen, M., Clark, T., Zhu, Y.C., Wangila, D.S., Yang, F., Niu, Y. (2013) Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and -susceptible strains of sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. **J. Invertebr. Pathol.** 112, 267-72.

Capítulo 4 – Interações das proteínas Cry1 e Vip3Aa na toxicidade à *Diatraea saccharalis*

RESUMO – O uso de plantas *Bt* piramidadas, ou seja, plantas que expressam mais de um gene *cry* e/ou *vip*, está cada vez mais difundido, pois estas plantas oferecem melhor controle à pragas agrícolas. Portanto é muito importante estudar as interações dessas proteínas no controle de lepidópteros-praga. Essas interações podem ser estudadas por bioensaios e os resultados são basicamente classificados como combinações sinérgicas ou antagônicas, sendo este último indesejável. O presente trabalho avaliou em laboratório a interação de proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa com as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa em *Diatraea saccharalis*, para verificar as possíveis interações na toxicidade larval quando ingeridas em combinação. As proteínas Cry1Ab e Cry1Ca, quando utilizadas com as proteínas Cry1Ca apresentaram efeito sinérgico, as demais combinações revelaram efeitos antagônicos.

Palavras chave: antagonismo, bioensaios de interação, sinergismo

ABSTRACT – *Bt* pyramided plants, expressing more than one *cry* or *vip* genes, are becoming more widespread, in order to provide a better control of important agricultural pests. So, it is very important to study the interactions among *Bt* proteins on larvae control. These interactions can be studied by bioassays and the results can be classified as synergistic or antagonistic combinations, this one undesirable to be used. The aim of this research was to evaluate the interaction of Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa proteins with Cry1Ca and Vip3Aa in *D. saccharalis*, by bioassays to check larval toxicity when ingested in combination. The Cry1Ab protein and Cry1Ca, when used with Cry1Ca proteins showed synergistic effect. The other combinations showed antagonistic effects.

Key-words: antagonism, interaction bioassays, synergistic

1. INTRODUÇÃO

Os bioinseticidas a base da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* são responsáveis por quase 95% do mercado mundial de inseticidas biológicos. São utilizados na agricultura há mais de 70 anos no controle de importantes pragas agrícolas das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (revisado por BRAVO et al., 2007). No final da década de 80 as primeiras plantas geneticamente modificadas com os genes *cry1* de *B. thuringiensis* foram obtidas e desde então, diversas culturas foram modificadas e possuem em seu genoma genes dessa bactéria (FISCHHOFF et al., 1987).

Assim, o uso desta bactéria tornou-se comum e plantado em milhões de hectares após a liberação comercial de seu plantio (JAMES et al., 2012). Os genes inseridos nas plantas pertencem a duas diferentes categorias, sendo eles codificadores de importantes proteínas Cry e Vip.

As proteínas Cry são produzidas durante a fase de esporulação e assim denominadas pois acumulam sua produção na periferia do esporo, formando uma inclusão cristalina (YAMAMOTO; DEAM, 2000). São classificadas de acordo com a homologia de suas sequências de aminoácidos da cadeia primária. Atualmente mais de 680 sequências de genes *cry* são classificadas em 72 grupos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

As proteínas Vip (vegetative insecticidal proteins) foram descritas por Estruch et al. (1996) são produzidas durante a fase vegetativa de desenvolvimento e secretadas no meio líquido. A sequência de aminoácido não possui homologia com as proteínas Cry e são utilizadas no controle de diferentes pragas com baixa toxicidade as proteínas Cry. Essas são conhecidas como a segunda geração de proteínas de *B. thuringiensis* e possuem modo de ação similar às proteínas Cry.

Ambas classes atuam sobre larvas de insetos-praga pois possuem capacidade de união especificamente aos receptores presentes no mesentero das larvas. O importante diferencial está no fato de que não dividem os mesmos receptores, portanto são utilizadas em plantas transgênicas em combinação às proteínas Cry para ampliar o espectro de ação e prolongar o uso da tecnologia *Bt*,

pois retardam a capacidade dos insetos em tornarem-se resistentes (LEE et al., 2006; SENA et al., 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013).

Normalmente a escolha das combinações gênicas para construção de uma planta *Bt* são baseadas em proteínas com capacidade de união à diferentes receptores. No entanto, outro aspecto importante a ser avaliado é o modo de interação entre essas proteínas quando ingeridas conjuntamente. Segundo Tabashnik (1992), as proteínas podem ser combinadas de forma sinérgica ou antagônica e avaliadas por meio de bioensaios que comparam a toxicidade de proteínas individuais com a toxicidade da mistura de diferentes proteínas, denominados como bioensaios de interação.

Dessa forma o presente capítulo objetivou analisar possíveis interações entre algumas proteínas Cry1 e Vip3Aa em *D. saccharalis* por bioensaios de interação. As combinações proteicas foram propostas com base nos resultados apresentados anteriormente. No capítulo 3, foi verificado que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Fa possuem união específica aos receptores presentes no mesentero da broca-da-cana e que a proteína Vip3Aa não competem pelo mesmo receptor de nenhuma das proteínas Cry1 estudadas. Portanto, propusemos avaliar as possíveis interações entre as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa estudadas anteriormente com as proteínas Cry1Ca (alvo de estudo deste capítulo) e Vip3Aa nos níveis de CL₅₀ e CL₉₀.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Proteínas empregadas

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Fa e Vip3Aa foram produzidas a partir de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* expressando as proteína isoladamente (clones) conforme descrito nos capítulos 2 e 3 desta tese.

Após a produção as amostras foram submetidas a quantificação total de proteínas pelo método de Bradford (1976), utilizando reagente Comassie Plus™ Protein Assay Reagent. As proteínas foram diluídas a 1 mg.ml⁻¹ para evitar que ocorresse precipitação e ativadas com tripsina bovina comercial (Trypsin, from

pancreas bovine - Sigma®). Para as proteínas Cry1 a tripsina foi utilizada a 10% (p/p) durante 2 h e para ativação da proteína Vip3Aa utilizou-se apenas 1% (p/p) por 1 h e 30min, todas as ativações foram incubadas a 37°C sob agitação de 200 rpm.

Após a ativação as proteínas foram centrifugadas a 17.000 Xg por 15 min a 4°C, filtradas à 0,45 e 0,22 µm, verificadas em gel de SDS-PAGE 12% e quantificadas pelo software Bionumerics (Applied-Maths), por uma curva de densitometria usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão de referência da concentração final.

2.2. Bioensaios

A população de *D. saccharalis* testada foi gentilmente cedida pela Usina São Martinho (Pradópolis-SP). Essa população encontra-se estabelecida há mais de dez anos e as posturas de diferentes gerações foram levadas ao LGBBA para eclosão e teste de suscetibilidade.

2.2.1. Bioensaios individuais

A análise de toxicidade à *D. saccharalis* foi realizada em delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo a proteína Cry1Ca em oito diferentes concentrações, com 32 larvas neonatas cada e três testemunhas. Para validação dos experimentos foram utilizados como testemunha: água destilada, bactéria hospedeira *E. coli* do tipo XL1-Blue e tampão de solubilização da proteína Cry1. O experimento foi realizado em triplicata com a aplicação do lisado proteico em superfície da dieta artificial semi-sólida (HENSLEY e HAMMOND, 1968) em placas de poliestireno de 128 – poços (Cell Wells, Corning Glass Works).

Após a aplicação dos tratamentos nos poços, as bandejas foram acondicionadas em fluxo laminar por 40 min para secagem e duas lagartas foram colocadas em cada poço da placa contendo a dieta artificial tratada. As bandejas foram acondicionadas em câmara B.O.D. com temperatura $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e foto período 14 h de luz: 10 h de escuro.

A mortalidade foi verificada aos sete dias e os valores médios de larvas mortas para cada concentração testada foram submetidos à análise de Probit (FINNEY et al., 1971), pelo programa POLO-PC (LeOra Software, 2003). Nesta análise foi possível estimar a concentração letal necessária para controlar 50% e 90% das larvas (CL₅₀ e CL₉₀) e os ângulos das curvas de dose-reposta da proteína Cry1Ca. As CL₅₀ e CL₉₀ proteínas, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Fa e Vip3Aa foram estimadas no capítulo 3 desta tese e os valores apresentados na tabela 1 do referido capítulo foram utilizados para os bioensaios de interação.

2.2.2. Bioensaios de interação

As misturas proteicas foram avaliadas por bioensaios nos mesmo padrões de delineamento e acondicionamento descrito no item 2.2.1. Para o preparo da mistura foram definidas proporções de acordo com a CL₅₀ individual estimada para cada proteína. Os valores de mortalidade obtidos nas diferentes concentrações (proteína a + proteína b) foram submetidos à análise de Probit e os valores de CL₅₀ e CL₉₀ estimados pela análise foram denominados como valores de mortalidade observada.

As interações foram avaliadas de acordo com Tabashnik (1992) que utiliza a CL₅₀ estimada de cada proteína para determinar uma CL₅₀ da mistura proteica; estipulando assim uma mortalidade esperada.

Para o cálculo da mortalidade esperada, assume-se que as duas proteínas possuem ação semelhante e é calculada com uma fórmula derivada da equação de Finney (1971):

$$CL_{50}(m) = 1 / \left[\left(\frac{ra}{CL_{50}(a)} \right) + \left(\frac{rb}{CL_{50}(b)} \right) \right]$$

onde: CL₅₀ (m) é a concentração letal média da mistura;

ra e rb são as proporções relativas dos componentes a e b;

CL₅₀ (a) é a concentração letal média do componente a

CL₅₀ (b) é a concentração letal média do componente b.

A mesma fórmula foi utilizada para determinar a interação ao nível CL₉₀.

A análise da interação foi avaliada com base no fator de antagonismo (FA). O mesmo foi determinado pela razão entre as CL_{50} observada e esperada, que foi derivado do fator sinergismo (FS), onde $FA = 1/FS$. Valores de $FA > 1$ indicam interações antagônicas, $FA = 1$ indica toxicidade aditiva e $FA < 1$ indica interação sinérgica. As interações foram consideradas significativas quando o valor esperado não estivesse dentro dos limites do intervalo de confiança do valores observados.

3. Resultados e Discussão

As proteínas Cry1 e Vip3Aa apresentaram bandas de peso molecular ao redor de 65 kDa (Figura 1). Esses dados foram aferidos com base no marcador de massa molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein e são condizentes aos obtidos na literatura por diferentes grupos que estudam as mesmas classes proteicas (LEE et al., 2006; SAUKA e BENINTENDE, 2008).

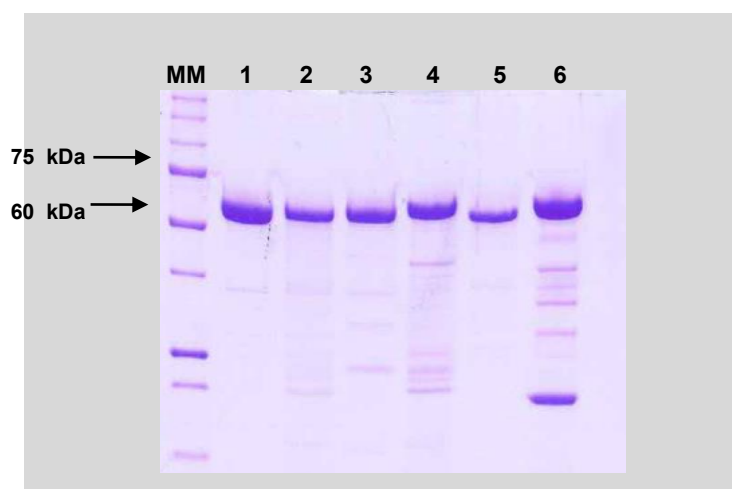


Figura 1. Gel de SDS-PAGE das proteínas Cry1 e Vip3Aa usadas nos bioensaios de interação. MM – Marcador Molecular, 1- Cry1Aa, 2- Cry1Ab, 3- Cry1Ac, 4- Cry1Ca, 5- Cry1Fa e 6- Vip3Aa.

A suscetibilidade das larvas de *D. saccharalis* as diferentes proteínas de *B. thuringiensis* está descrita na Tabela 1. Os dados descritos são valores da análise de Probit estimados pelo programa POLO PC em ng/cm^2 , todas a proteínas se ajustaram ao teste por meio de confirmação do valor de chi-quadrado obtido ser

inferior ao valor do chi-quadrado tabelado, em função do grau de liberdade a 5% de probabilidade.

Tabela 1. Atividade biológica da proteína Cry1Ca contra larvas neonatas de *D. saccharalis*.

Proteínas	b ± (EP) ¹	CL ₅₀ (95% IC) ²	CL ₉₀ (95% IC) ²
Cry1Ca	2,37 ± 0,22	5,80 (4,7 – 7,3)	20,3 (15,5 – 28,7)

¹ Coeficiente angular da curva de regressão ± erro padrão; ² Concentração letal estimada (ng de proteína por cm⁻²) e Intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

De acordo com os dados apresentados foi verificado potencial de controle da proteína Cry1Ca para *D. saccharalis*. A CL₅₀ estimada não diferiu estatisticamente da CL₅₀ estimada para as proteínas Cry1Ac e Vip3Aa no capítulo 3 desta tese. Quando comparamos esse resultado aos obtidos anteriormente verificamos que a proteína Cry1Ab continua sendo a mais tóxica a população de *D. saccharalis*, pois apresenta valores de CL₅₀ de 10 a 16 vezes menores que os estimados para as proteínas Vip3Aa, Cry1Ac e Cry1Ca, 72 vezes mais efetiva que a proteína Cry1Fa e 122 vezes quando comparada a proteína Cry1Aa.

Macedo et al. (2012) estudaram o efeito das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac em uma população brasileira de *D. saccharalis* e encontraram a mesma ordem de efetividade, sendo que Cry1Ab foi a mais efetiva, seguida de Cry1Ac e Cry1Aa. No entanto a CL₅₀ estimada pelos autores foi maior que a estimada no presente trabalho; mostrando que a população proveniente da Usina São Martinho é mais suscetível as proteínas Cry1 que a população testada pelo grupo de Brasília.

As diferenças encontradas em relação a suscetibilidade podem estar relacionadas a diversidade genética presente nas diferentes populações. Monnerat et al. (2006) associaram as diferenças de suscetibilidade às proteínas Cry1 com a diversidade genética da espécie *Spodoptera frugiperda* de três populações da América Latina. Portanto vale ressaltar a importância de direcionar as estratégias de controle da broca-da-cana em função das regiões geográficas de controle.

Até o momento não há relatos da utilização de Vip3A no controle do gênero *Diatraea*. Outras espécies de lepidópteros como, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera albula*, *Spodoptera eridania* e *Agrotis ipsilon* foram descritas

como suscetíveis a essas classe proteica (Estruch et al, 1996; Lee et al, 2003; Bergamasco et al, 2013; Hernández-Martinez et al., 2013).

A interação entre as proteínas Cry1 avaliadas anteriormente e as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa nos níveis de CL₅₀ e CL₉₀ estão descritas na Tabela 2.

Analizando as interação entre as proteínas Cry1, observamos sinergismo entre Cry1Fa:Cry1Ca e Cry1Ab:Cry1Ca, nos níveis de CL₅₀ e CL₉₀ respectivamente. Essa interação foi positiva, ou seja, sinérgica, pois a mortalidade observada foi maior que a esperada, resultando assim em valores de FA inferiores a 1. A interação sinérgica não foi mantida nos dois níveis estudados, porém os valores de FA não excederam 1,2 e a análise foi considerada não significativa devido aos valores de mortalidade esperada pertencerem ao intervalo de confiança dos valores observado.

Para as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac combinadas a proteína Cry1Ca verificamos antagonismo, os valores de FA calculados nos dois níveis foram superiores a 1,0, a análise foi significativa e a combinação Cry1Ac:Cry1Ca apresentou antagonismo bastante acentuado, com valor não estimado para o nível de CL₉₀, devido a mortalidade observada ser inferior a 90% com a aplicação da máxima concentração testada (≥ 3600 ng/cm²).

O mecanismo de sinergia não está ainda claramente compreendido e varia muito de espécie pra espécie, devido à especificidade das proteínas de *B. thuringiensis*. Estudando a interação entre proteínas Cry1Aa:Cry1C nas espécies *Helicoverpa armigera* e *S. exigua* foi verificado efeito sinérgico (XUE et al., 2005).

De acordo com Rang et al. (2004) as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac não dividem receptor com a proteína Cry1Ca em *D. saccharalis*. Davolos et al. (2012) verificaram que a proteína Cry1Ab se une a pelo menos dois receptores diferentes na espécie alvo, pois essa divide receptor com as proteínas Cry1Aa e Cry1Fa, as quais não dividem receptores entre si. Esses resultados foram associados à interação sinérgica aqui constatada para as combinações proteicas Cry1Ab:Cry1Ca e Cry1Fa:Cry1Ca e sugerem que a proteína Cry1Ca não compete pelo mesmo receptor da proteína Cry1Fa presente no mesentero da espécie estudada.

Tabela 2. Análise de interação entre as proteínas Cry1 com Cry1Ca e Vip3Aa para *Diatraea saccharalis*.

Mistura	Proporção	b ± EP ¹	CL ₅₀		FA ⁴		CL ₉₀		FA ⁴	
			observada (IC ₉₅) ²	Esperada ³	obs/esp		observada (IC ₉₅) ²	Esperada ³	obs/esp	
Cry1Aa:Cry1Ca	07:01	1,82 ± 0,30	110	(61 – 357)	24,0	4,6*	564	(222 – 22884)	11,3	50*
Cry1Ab:Cry1Ca	01:17	2,44 ± 0,34	3,8	(2,9 – 4,7)	3,0	1,2 ^{NS}	12,7	(9,8 – 18)	18,6	0,7*
Cry1Ac:Cry1Ca	01:01	0,541 ± 0,15	339	(92 – 1654)	5,4	62,5*	≥ 3600	-----	30,4	≥ 660*
Cry1Fa:Cry1Ca	04:01	1,24 ± 0,14	11	(8 – 13,7)	15,1	0,7*	68	(56 – 136)	63,5	1,1 ^{NS}
Cry1Aa:Vip3Aa	13:01	1,64 ± 0,17	48	(37 – 64)	22,7	2,1*	352	(193 – 525)	266,7	1,3 ^{NS}
Cry1Ab:Vip3Aa	01:10	0,74 ± 0,13	11	(6 – 26)	1,9	5,8*	610	(152 – 9530)	43,5	14
Cry1Ac:Vip3Aa	02:01	1,40 ± 0,16	14,5	(11 – 20,4)	4,7	3,1*	119	(69 – 273)	66,6	1,8*
Cry1Ca:Vip3Aa	02:01	1,52 ± 0,20	25	(18 – 36)	4,7	5,3*	173	(98 – 439)	27,1	6,4
Cry1Fa:Vip3Aa	07:01	1,62 ± 0,19	110	(61 – 357)	14,1	2,3*	230	(124 – 410)	125,8	1,8 ^{NS}

¹ Coeficiente angular da curva de regressão ± erro padrão; ² Concentração letal estimada (ng de proteína por cm⁻²) e Intervalo de confiança a 95% de probabilidade; ³ Concentração letal esperada para a mistura aplicada; ⁴ Fator de antagonismo; *análise de interação significativa; ^{NS} não significativa.

Em relação a interação entre as proteínas Cry1 e Vip3Aa, as combinações resultaram em interações antagônicas. Os valores de FA variaram de 2,1 a 5,8 ao nível de CL₅₀. Para o nível de CL₉₀ essa variação aumentou, sendo de 1,3 a 14. As combinações Cry1Aa:Vip3Aa e Cry1Fa:Vip3Aa ao nível de CL₉₀ apresentaram interação não significativa; essas duas proteínas Cry1 foram as menos tóxicas quando analisadas isoladamente e esta não significância pode estar atribuída a elevada diferença na proporção de doses utilizadas.

Analisando a interação entre as proteínas Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea com a proteína Vip3Aa na espécie *S. frugiperda* pelo método descrito por Fernández-Luna et al. (2010), Pavani (2013) verificou ação de sinergismo para a combinação Cry1Ab:Vip3Aa quando avaliadas em baixas doses e ação antagônicas em dose elevadas. Para a combinação Cry1Ca:Vip3Aa foi detectado antagonismo em todas as concentrações testadas e para a combinação Cry1Ea:Vip3Aa encontrou valores não significativos quando aplicadas baixas concentrações e antagonismo quando as doses aumentaram.

A interação entre as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ca com as proteínas Vip3Aa, Vip3Ae e Vip3Af para *Heliothis virescens* foi estudada por Lemes (2013) – comunicação pessoal. Antagonismo entre as proteínas Cry1Ca e Vip3Aa foi verificado e os autores analisaram a mesma combinação em *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, onde constatarem sinergismo e antagonismo, respectivamente. No presente trabalho, detectamos antagonismo para a mesma combinação. Os valores de FA estimados nos níveis de CL₅₀ e CL₉₀ foram superiores a 5,0 e essa diferença pode estar associada a utilização de proteínas na forma ativada neste trabalho e na forma de protoxinas no estudo realizado por Lemes (2013).

Adamczyk e Mahaffey (2008) demonstraram que o algodão transgênico expressando a proteína Vip3A foi mais eficaz contra *S. exigua* e *S. frugiperda* do que o algodão transgênico expressando Cry1Ab. Entretanto, o inverso foi verificado para *H. virescens*. Os autores verificaram também a não ocorrência de sinergismo para o algodão transgênico expressando as proteínas Cry1Ab e Vip3Aa conjuntamente.

Bergamasco et al. (2013), avaliaram a interação das proteínas Cry1Ia e Vip3Aa para quatro gêneros de *Spodoptera* e associaram o feito sinérgico das toxinas a não competição pelo receptor presente na membrana de três espécies: *S.*

frugiperda, *S. albula* e *S. cosmioides*. Contudo para a espécie *S. eridania* verificaram efeito de interação antagônico e competição da proteína pelo mesmo receptor.

As informações sobre bioensaios de interação são em alguns casos associadas aos resultados de ensaios de união das proteínas de *B. thuringiensis* aos receptores presentes no mesentero de diferentes pragas. No entanto, a proteína Vip3Aa não compete por nenhum dos receptores ocupados pelas proteínas Cry1 em *D. saccharalis*, mas apresentaram antagonismo quando ingeridas conjuntamente pelas larvas.

Eventos comerciais foram liberados com o uso de proteínas Cry1Ab e Vip3Aa na cultura do milho pela Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio). A combinação proteica foi declarada como eficiente no controle de *S. frugiperda*, no entanto dados da literatura não revelam o mesmo efeito quando analisados por bioensaios de interação. Além disso, vale ressaltar que *D. saccharalis* também é uma praga importante na cultura do milho e pode ser submetida a uma pressão de seleção em cultivos como estes.

4. CONCLUSÃO

Análises de interações baseadas na ingestão de duas ou mais proteínas devem ser analisadas contra diferentes pragas, a fim de gerar dados mais seguros e detalhados para a construção e/ou liberação de plantas piramidadas com as proteínas de *B. thuringiensis*.

5. REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, J. J. J.; MAHAFFEY, J. S. Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests. **Florida Entomological Society**, Lanhan, v. 91, n. 4, p. 570-575, 2008.

BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 152–158, 2013.

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. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v.49, p.423-435, 2007.

DAVOLOS, C. C.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; CRAVA, M. C.; FERRÉ, J.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F.; ESCRICHE, B. Toxicity of Cry1 and Vip3A proteins to *Diatraea saccharalis* (F, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) and binding to brush border membrane vesicles. **An..** 2012 International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 45TH Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 2012.

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 of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 5389-5394, 1996

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. **BioTecnology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FERNÁNDEZ- LUNA, M. T.; TABASHNIK, B. E.; LANZ- MENDONZA, H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; MIRANDA-RÍOS, JUAN. Single concentration tests show synergism among *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelenses* toxins against the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 104, n. 3, p. 231-233, 2010.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. London: Cambridge University Press, 1971. 272p.

HENSLEY, S. D.; HAMMOND, A. M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, v.6, p.1742-1743, 1968.

HERNÁNDEZ-MARTINÉZ, P.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; VAN RIE, J.; ESCRICHEM B.; FERRÉ, J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, p. 78-81, 2013

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

JAMES, C., 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Brief n. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

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 delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4648-4657, 2003.

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

MACEDO, C. L.; MARTINS, E. S.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, A. C.; PRAÇA, L. B.; GÓIS, L. A.; MONNERAT, R. G. Seleção e Caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficientes contra a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1759-1765, 2012.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M. D.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; RAUSSEL, C.; CERÓN, J.; IBARRA, J. E.; RINCON-CASTRO, M.C.DEL, ESPINOZA, A. M.; MEZA-BASSO, L.; CABRERA, L.; SÁNCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Genetic Variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7029–7035, 2006.

PAVANI, C. D. **Efeitos da Interação e Toxicidade das Proteínas Cry1 e Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis*, Berliner em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (LepidOptera: Noctuidae).** 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista ‘Julio de Mesquita Filho’, Jaboticabal, 2013.

RANG, C.; BERGVINGSON, D.; BOHOROVA, N.; HOISINGTON, D.; FRUTOS, R. competition of *bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiology**, v.49, p.22–27, 2004.

SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 40, n. 2, p. 124-140, 2008.

SENA, J. A. D., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S., FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, 2009

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

XUE, J. L.; CAI, Q. X.; ZHENG, D. S.; YUAN, Z. M. The synergistic activity between Cry1Aa and Cry1C from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v. 40, n. 6, p. 460–465, 2005.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultures pests. In: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX, C. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81-100.

CAPÍTULO 5 – Considerações Finais

Os resultados apresentados nesta tese demonstram que a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*, é suscetível às proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* pertencentes às classes Cry1A, Cry1C, Cry1F e Vip3Aa. Algumas cultivares de milho geneticamente modificadas expressam as referidas proteínas e poderão ser utilizadas no controle da praga em lavouras. Portanto, a avaliação de como essas proteínas interagem nos receptores da membrana do mesentero da espécie, bem como as consequências sobre a ingestão de combinações proteicas foram analisadas a fim de gerar dados para o Manejo desta praga no Brasil.

No contexto agrícola, o uso da tecnologia de plantas *Bt* está ameaçado devido ao surgimento de alelos de resistência nas populações de insetos e diversos grupos buscam retardar esse aparecimento usando estratégias mais detalhadas para a elaboração das plantas transgênicas. Assim, no presente trabalho, competições heterólogas foram realizadas com algumas proteínas Cry1 presentes em cultivos transgênicos e bioensaios de interação foram realizados com o intuito de gerar informações de base a serem utilizadas no manejo de *D. saccharalis* em nosso país.

O primeiro conjunto de dados revelou que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Fa possuem sítios de união específicos no mesentero de *D. saccharalis*. Os ensaios de competição heteróloga revelaram que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac dividem o mesmo receptor de membrana do mesentero da praga e que a proteína Cry1Fa divide receptor apenas com a proteína Cry1Ab, ou seja, esta última possui capacidade de união a pelo menos dois diferentes receptores. Foi verificado também que a proteína Vip3Aa não divide receptor de união com nenhuma das proteínas Cry1 estudadas.

A respeito das interações proteicas, constatou-se efeito antagônico em todas as combinações de proteínas Cry1 e Vip3Aa, sugerindo que a ingestão dessas proteínas em combinação pode não ser efetiva no controle larval de *D. saccharalis*. Já combinações entre as proteínas Cry1Ab:Cry1Ca e Cry1Fa:Cry1Ca resultaram em combinações satisfatórias pois apresentaram efeito sinérgico. Sugerimos a realização de estudos como este, que envolvem bioensaios de interação, em

diferentes espécies pois o desenvolvimento de plantas Bt é realizado com objetivo de controlar um complexo de pragas e, muitas vezes, o resultado pode ser contraditório quando analisado espécie a espécie. Assim, reunimos aqui alguns dados sobre o uso de proteínas da espécie *B. thuringiensis* para o controle de *D. saccharalis* com o propósito de estabelecer estratégias de controle mais seguras e duradouras.