

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1Ia10 E Cry8 DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DO BICUDO-DO-
ALGODOEIRO**

Paula Castanho Borges

Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1Ia10 E Cry8 DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DO BICUDO-DO-
ALGODOEIRO**

Paula Castanho Borges

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

JABOTICABAL- SÃO PAULO- BRASIL

2018

Borges, Paula Castanho
B732i Interação das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 de *Bacillus thuringiensis* no
controle do Bicudo-do-algodoeiro / Paula Castanho Borges. – –
Jaboticabal, 2018
iv, 46 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientadora: Maria Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Vivian Boter Bergamasco, Jackson Antonio
Marcondes de Souza
Bibliografia

1. *Anthonomus grandis*. 2. Coleoptera. 3. Clonagem gênica. 4.
Expressão de genes. 5. Controle biológico. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.9

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

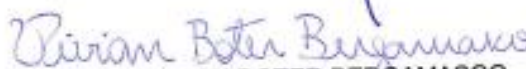
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY11A10 E CRY8 DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO

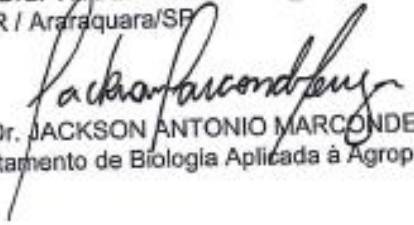
AUTORA: PAULA CASTANHO BORGES

ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. VIVIAN BOTER BERGAMASCO
FCFAR / Araraquara/SP


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 06 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Paula Castanho Borges - nascida em 29 de outubro de 1992, na cidade de Sorocaba - SP, é Engenheira Agrônoma, graduada pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais (IFSULDEMINAS) – *Câmpus* Muzambinho, em fevereiro/2016. Foi bolsista do CNPq pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBIT) durante três anos da graduação. Em março/2016, ingressou no programa de pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) onde desenvolveu o projeto de mestrado no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária sendo bolsista CAPES. Participou da comissão organizadora do “Curso de Inverno de Genética” (FCAV/UNESP), nas edições de 2016 e 2017, sendo que em sua última participação foi coordenadora do evento.

“As pessoas se convencem de que a sorte me ajudou, mas plantei cada semente que meu coração desejou.”

Nando e Aldir Blanc

Aos meus pais Marcelo de Moraes Borges e Vera Lucia
Castanho Borges por acreditarem e lutarem por meus sonhos.

À minha irmã Marcela Castanho Borges Murari pela
cumplicidade, dedicação e carinho de sempre.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde para que eu possa buscar caminhos que me levam a realizar sonhos;

Aos meus pais Marcelo de Moraes Borges e Vera Lucia Castanho Borges que não mediram esforços pela minha educação e me apoiaram em todas as decisões que tomei para chegar até aqui;

À minha irmã Marcela Castanho Borges Murari que me conforta todos os dias com suas doces palavras e jamais se negou buscar o desconhecido para me ajudar nas horas de dificuldade;

Ao meu noivo Marco Antonio Pereira de Ávila por todo amor e incentivo diário para conquistar novos obstáculos e buscar sempre o melhor de mim;

Ao Alfredo por preencher os dias solitários que passei a fim de conquistar objetivos maiores;

Ao meu cunhado, Leandro Augusto Pereira Murari pelos dias de alegria e otimismo;

À família Ávila pelo carinho e atenção de sempre;

Aos meus queridos amigos Maria Laura Viola Augusto e Nestor Dario Franco que me transmitiram grande parte de seus conhecimentos e me auxiliaram em todas as etapas deste trabalho, além de preencherem a saudade de casa;

À técnica de laboratório e grande amiga Eliane Cristina da Cunha Alves que me confortou e se dedicou em me auxiliar na realização deste projeto;

Aos colegas de laboratório pelo convívio agradável que tivemos;

À professora Dra. Janete Aparecida Desiderio pela orientação deste trabalho e todos os ensinamentos transmitidos na sala de aula e no decorrer deste projeto;

Ao professor Dr. José Roberto Postali Parra e toda a equipe do Laboratório de Biologia dos Insetos da ESALQ-USP, em especial Neide Graciano Zério por auxiliar nos bioensaios e ceder os insetos e dietas utilizados neste trabalho;

À professora Dra. Eliana Gertrudes Macedo Lemos e seus orientados por ceder equipamentos de seu laboratório;

Aos professores Dr. Manoel Victor Franco Lemos e Dr. Ricardo Antônio Polanczyk pela participação nas bancas examinadoras de qualificação e valiosas sugestões científicas que muito contribuíram para esta dissertação;

Ao professor Dr. Jesus Aparecido Ferro por compartilhar suas experiências e sugestões durante a execução deste trabalho;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária pelo convívio agradável e assistência;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP) e aos professores da Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) pela estrutura e aulas ministradas;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo;

A todos meus amigos de minha cidade natal e de Muzambinho/MG que contribuíram para que momentos felizes tornassem os caminhos percorridos mais saudáveis;

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A cultura do Algodoeiro (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	3
2.2. Bicudo-do-Algodoeiro (<i>Anthonomus grandis</i>)	4
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
2.4. Características e modo de ação das proteínas δ -endotoxinas (Cry)	8
2.5. Resistência de insetos-praga às proteínas de <i>B. thuringiensis</i>	10
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1. Amplificação do gene <i>cry8</i>	14
4.2. Clonagem do gene <i>cry8</i> no vetor de expressão pET SUMO	15
4.3. Indução da expressão dos genes <i>cry11a10</i> e <i>cry8</i> e obtenção dos lisados proteicos	17
4.4. Análise da expressão e quantificação das proteínas Cry11a10 e Cry8	18
4.5. Confirmação das proteínas por “Western blotting”	19
4.6. Análises filogenéticas da proteína Cry8	20
4.7. Bioensaio com <i>A. grandis</i>	21
4.7.1. Bioensaio para estimar a concentração letal de 50 % e 90 % das proteínas Cry11a10 e Cry8	23

4.7.2. Interação entre as proteínas Cry1la10 e Cry8 frente a <i>A. grandis</i>	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Amplificação do gene <i>cry8</i> por PCR	25
5.2. Indução da expressão dos genes <i>cry1la10</i> e <i>cry8</i> e obtenção dos lisados proteicos	26
5.3. Confirmação das proteínas por “Western blotting”	28
5.4. Análises filogenéticas da proteína Cry8	29
5.5. Concentração letal das proteínas Cry1la10 e Cry8 frente a larvas de <i>A.</i> <i>grandis</i>	33
5.6. Interação entre as proteínas Cry1la10 e Cry8	35
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	39

INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1Ia10 E Cry8 DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito inseticida das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 contra larvas de *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), buscando por potencial sinérgico. Para tanto, o gene *cry8* foi amplificado por PCR a partir de um clone previamente construído, obtendo-se um fragmento de aproximadamente 3531 pb e subclonado no vetor de expressão pET-SUMO. Para a expressão dos genes *cry1Ia10* e *cry8*, os DNAs recombinantes foram inseridos em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) e induzidos por isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), resultando em proteínas de 94 kDa e 143 kDa, respectivamente, visualizadas em SDS-PAGE. As proteínas foram quantificadas através do software ImageQuant TL 8.1" (GE Healthcare), para que fosse possível a realização dos cálculos de diluição nas respectivas concentrações incorporadas à dieta artificial, a fim de estimar a CL₅₀ e CL₉₀ das duas proteínas testadas sozinhas e em conjunto. Com base na sequência de aminoácidos de proteínas da classe Cry8, análises filogenéticas foram realizadas para investigar proximidade evolutiva da proteína Cry8 utilizada neste trabalho com as demais proteínas na mesma classe. Através dessas análises, sugerimos que a proteína em questão pertence à subclasse Cry8Pa devido a elevada proximidade filogenética e similaridade com a proteína Cry8Pa2. Observou-se que as proteínas Cry1Ia10 e Cry8 apresentaram ação inseticida contra larvas neonatas de *A. grandis*, obtendo-se as CL₅₀ de 7,232 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e 4,422 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para Cry1Ia10 e Cry8 respectivamente. Quando combinadas as proteínas a CL₅₀ é reduzida para 2,664 $\mu\text{g ml}^{-1}$ e CL₉₀ para 13,535 $\mu\text{g ml}^{-1}$ apresentaram sinergismo, potencializando a ação inseticida das mesmas. Este estudo conclui que larvas de *A. grandis* são suscetíveis as proteínas Cry1Ia10 e Cry8 e que a combinação entre elas aumenta a eficiência de controle, sugerindo que plantas piramidadas com estes genes são de interesse agrônomo para o controle de *A. grandis* possibilitando o retardo do desenvolvimento de insetos resistentes.

Palavras-chave: *Anthonomus grandis*, Coleoptera, clonagem gênica, expressão de genes, controle biológico.

SYNERGIC EFFECT BETWEEN Cry1Ia10 AND Cry8 PROTEINS OF *Bacillus thuringiensis* ON COTTON BOLL WEEVIL

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the insecticidal effect of Cry1Ia10 and Cry8 proteins against *Anthonomus grandis* Boheman larvae (Coleoptera: Curculionidae), searching for synergistic potential. To do so, the cry8 gene was amplified by PCR from a previously constructed clone, obtaining a fragment of approximately 3531 bp and subcloned into the pET-SUMO expression vector. For the expression of the cry1Ia10 and cry8 genes, the recombinant DNAs were inserted into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) cells, resulting in 94 kDa and 143 kDa proteins, respectively, visualized on SDS-PAGE. The proteins were quantified using ImageQuant TL 8.1 software (GE Healthcare) to allow the calculation of dilution in the respective concentrations incorporated into the artificial diet in order to estimate the LC₅₀ and CL₉₀ of the two proteins tested alone and together. Based on the amino acid sequence of Cry8 class proteins, phylogenetic analyzes were performed to investigate evolutionary proximity of the Cry8 protein used in this work with the other proteins in the same class. Through these analyzes, we suggest that the protein in question belongs to the subclass Cry8Pa due to its high phylogenetic proximity and similarity to the Cry8Pa2 protein. It was observed that the proteins Cry1Ia10 and Cry8 showed insecticidal action against neonatal larvae of *A. grandis*, obtaining the LC₅₀ of 7.232 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 4.422 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for Cry1Ia10 and Cry8 respectively. When combined the proteins at LC₅₀ is reduced to 2,664 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and CL₉₀ to 13,535 $\mu\text{g ml}^{-1}$ showed synergism, potentiating the insecticidal action of the same. This study concludes that *A. grandis* larvae are susceptible to Cry1Ia10 and Cry8 proteins and that the combination between them increases control efficiency, suggesting that pyramidal plants with these genes are of agronomic interest for the control of *A. grandis*, allowing the development of resistant insects.

Keywords: *Anthonomus grandis*, Coleoptera, gene cloning, gene expression, biological control.

1. INTRODUÇÃO

A cultura do algodão está entre as mais importantes do país, uma vez que a fibra da pluma é o principal produto da indústria têxtil e o caroço muito utilizado na alimentação animal, em consequência do elevado teor energético do óleo. De acordo com a CONAB (2017), o Brasil possui cerca de 900 mil hectares de área cultivada por algodão, predominantemente na região Centro-Oeste. No entanto, a produtividade da cultura é afetada pelo ataque de diversas pragas que surgiram a partir da década de 80 (SANTOS, 2003). Neste contexto, destaca-se o *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), que ataca principalmente o botão floral, afetando diretamente o principal produto comercial da cultura.

Na fase adulta, as fêmeas são atraídas pela floração e ovipositam nos botões florais causando senescência, ou nas maçãs, as quais terão as fibras e sementes destruídas pelas larvas em desenvolvimento (GALLO et al., 2002; PRAÇA et al., 2003). Atualmente, no Brasil, é adotado o manejo integrado de pragas (MIP), porém o controle químico é um dos métodos mais utilizados, ainda que ao custo de baixos índices de eficiência, uma vez que as larvas ficam alojadas no interior das maçãs, dificultando o contato da molécula inseticida com o alvo biológico. O uso excessivo, ou mesmo indiscriminado, de agrotóxicos na agricultura traz ao meio ambiente e aos organismos vivos consequências danosas e muitas vezes irreversíveis. Além disso, a utilização exagerada também contribui para aumento nos custos da produção, podendo representar até 25 % (EMBRAPA, 2017), o que reduz, portanto, a margem de lucro das unidades de produção agrícola.

Neste cenário, investimentos em pesquisa, desenvolvimento de novas estratégias e métodos alternativos para o controle de pragas são fundamentais para que se consiga a redução da quantidade de agrotóxicos lançados ao meio ambiente. Desta forma, o uso do controle biológico e plantas geneticamente modificadas estão avançando no mercado global e ganhando cada vez mais espaço nas lavouras.

Atualmente, a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner é considerada a espécie de maior interesse, pois apresenta amplo espectro de ação ao controle de diversas ordens de pragas. Durante o processo de esporulação, a bactéria gram-positiva

sintetiza inclusões proteicas cristalinas denominadas proteínas Cry ou δ -endotoxinas (BRAVO et al., 2017). Já no período de crescimento vegetativo, alguns isolados de *B. thuringiensis* sintetizam proteínas denominadas proteínas inseticidas vegetativas (“vegetative insecticidal protein” – Vip) (ESTRUCH et al., 1996). Ao ingerir tais proteínas, o elevado pH intestinal da larva suscetível ativa a prótoxina que se liga a receptores específicos, induzindo lesões que destroem as células intestinais e levam o inseto à morte por inanição alimentar (FIUZA, 2010). Além disso, pesquisa publicada por Tabashnik et al. (2015), também revelam que em alguns casos a prótoxina é mais eficiente no controle de pragas do que a toxina ativada correspondente.

Grande parte das plantas geneticamente modificadas possuem genes de *B. thuringiensis* que codificam proteínas com ação inseticida, sendo o algodão Bt o segundo Organismo Geneticamente Modificado (OGM) resistente a insetos mais cultivado no mundo (JAMES, 2009). No entanto, as cultivares de algodão Bt aprovadas para o cultivo sintetizam proteínas capazes de controlar somente insetos da ordem Lepidoptera, como as cultivares Bollgard I (Cry1Ac), Bollgard II (Cry1Ac + Cry2Ab2), Widestrike (Cry1Ac + Cry1Fa) e Twinlink (Cry1Ab +Cry2Ac) (THOMAZONI et al., 2013).

Recentemente, Ribeiro et al. (2017), relataram pela primeira vez uma planta de algodão geneticamente modificada com ação inseticida contra *A. grandis* conferido pela toxina Cry10Aa. Em estudos anteriores, Oliveira et al. (2016) modificaram o algodão com o gene *cry11a*, apesar do controle significativo a lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), o mesmo não foi observado em larvas de *A. grandis*, sendo de suma importância aumentar a eficiência desta proteína através do potencial sinérgico com outra proteína específica para Coleoptera, como proposto neste trabalho.

Segundo Praça et al. (2007), proteínas pertencentes às classes Cry1, Cry3, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry14, Cry18, Cry22, Cry34, Cry35 e Cry36 apresentaram atividade inseticida contra insetos da ordem Coleoptera, além da classe Cry10 supramencionada. Já dentre as proteínas Vip, as toxinas binárias Vip1 e Vip2, atuam em conjunto no controle de algumas espécies desta ordem (WARREN, 1997).

Ensaios realizados com proteínas Cry1Ia e Cry8 frente a larvas neonatas de *A. grandis* demonstram que tais proteínas também são alternativas viáveis para o controle da principal praga do algodão (GROSSI-DE-SÁ et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; MARTINS et al., 2009; BERGAMASCO et al., 2011). Assim como proteínas das classes Cry10 e Cry1B também apresentam potencial inseticida para o bicudo-do-algodoeiro (MARTINS, 2009).

Tendo em vista os prejuízos significativos causados por *A. grandis* na cultura do algodão, bem como o potencial inseticida das proteínas de *B. thuringiensis* contra insetos coleópteros, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de proteínas Cry1Ia10 e Cry8, provenientes de isolados brasileiros pertencentes à coleção de *B. thuringiensis* do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA). Além disso, visou-se investigar a interação das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 em busca de potencial sinérgico, a fim de prover uma favorável combinação para a construção de plantas piramidadas, podendo aumentar a eficiência inseticida das proteínas e também retardar de maneira eficaz a possível evolução de resistência desta praga contra proteínas desta classe.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A cultura do Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)

Pertencente à família Malvaceae, a planta de algodão possui estrutura ereta e caule herbáceo. É cultivado anualmente e seus frutos recebem a denominação de maçãs quando verdes, e capulho após a abertura e exposição das plumas (FERRAZ, 2012). O algodoeiro é constituído de ramos vegetativos e ramos frutíferos, são nos ramos frutíferos que as maçãs se desenvolvem e amadurecem de forma desuniforme.

Por ser a principal matéria prima na indústria têxtil, a cultura ocupa um importante espaço no mercado agrícola. Até os anos 80, o Brasil possuía uma

produção de algodão superior ao consumo interno, fazendo do país um dos maiores produtores do seguimento e os preços superavam os valores de culturas como milho, soja e trigo (MARTINS et al., 2005; SANTOS, 2003). Apesar da perda de espaço da fibra natural para fibras sintéticas na indústria têxtil os subprodutos da planta cresceram no mercado na última década. O caroço do algodão *in natura* para a alimentação animal ou esmagado para a produção de torta ou óleo são de grande importância por possuir elevado valor energético.

De acordo com a Associação Brasileira de Produtores de Algodão - ABPA (2015), o Brasil está entre os cinco maiores produtores mundiais de algodão, juntamente com China, Índia, EUA e Paquistão. Estima-se que em 2017 o Brasil produziu 4.030.273,57 t de algodão em caroço que corresponde todo o algodão, desde o capulho, pluma e o caroço; 1.632.472,38 t de algodão em pluma e 2.195.464,64 t de caroço de algodão sendo o estado de destaque o Mato Grosso (MT). O comparativo de dados do setor com relação ao ano de 2016, mostra que houve uma redução na área plantada, no entanto a produção foi maior. Este aumento de produtividade é o reflexo de cultivos mais tecnificados e plantas melhoradas geneticamente.

A partir do ano de 1986 a produção brasileira começou a cair gradativamente devido a problemas de mercado e de natureza agrônômica decorrente da vasta diversidade de pragas adaptadas ao clima tropical. Considerado uma das principais pragas da cultura, o bicudo-do-algodoeiro contribuiu para a queda da produção nacional já que o inseto ataca e danifica os frutos da planta (GALLO et al., 2002).

2.2. Bicudo-do-Algodoeiro (*Anthonomus grandis*)

Da ordem Coleoptera e pertencente à família Curculionidae, o bicudo-do-algodoeiro (*A. grandis*) é uma das principais pragas do algodão, pois ataca o órgão reprodutivo da planta afetando diretamente o principal produto comercial. O inseto possui em média 7 mm de comprimento com rosto alongado correspondendo metade do seu comprimento, de coloração castanho-ferrugínea quando jovem e

cinza na fase adulta (GALLO et al., 2002; PRAÇA et al., 2003). A infestação da praga em campos de algodão se deve ao clima tropical que favorecem o período de reprodução do inseto. Na fase adulta as fêmeas são atraídas pela floração onde ovipositam cerca de 150 ovos nos botões florais do algodoeiro, provocando queda das flores. A destruição de fibras e semente é ocasionada pelas larvas que se alimentam no interior da maçã, afetando diretamente a produção. A planta fica em estado vegetativo, enfolhada, mas sem produção.

O bicudo-do-algodoeiro ataca a planta a partir do 30º dia após a emergência, perdurando até o final do ciclo. O inseto completa um ciclo de vida em aproximadamente 19 dias, fato que torna possível o desenvolvimento de 4 a 6 gerações da praga na cultura (Figura 1). Dessa forma, o controle desse inseto preferencialmente é feito através do manejo integrado de pragas (MIP), pois utiliza mais de um método para o controle da praga, podendo ser o manejo cultural com uso de ferormônios, controle biológico e controle químico. Observa-se nas fazendas produtoras de algodão que o uso do controle químico se destaca entre esses métodos mesmo apresentando baixa eficiência, uma vez que a molécula química encontra dificuldades de entrar em contato com as larvas, já que estas se abrigam no interior das maçãs.

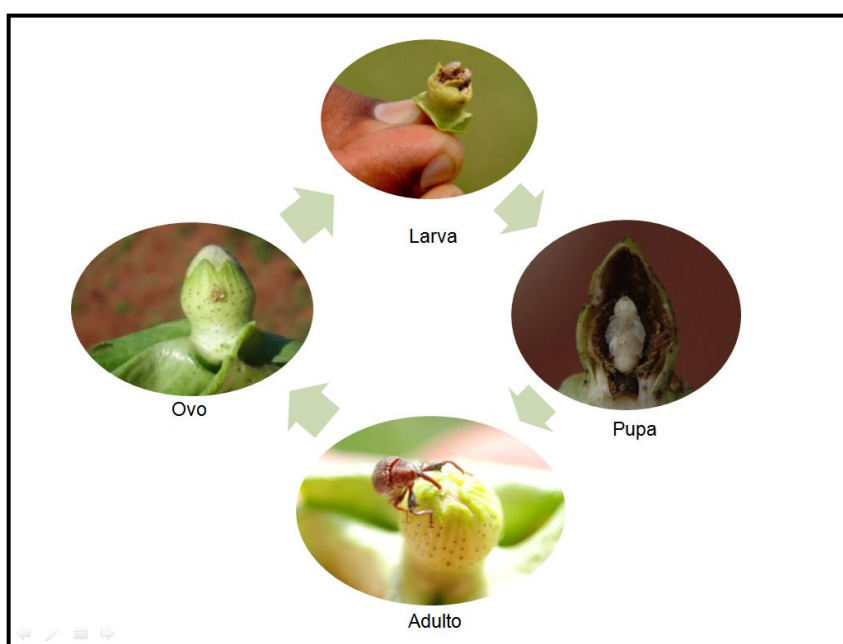


Figura 1. Ciclo de desenvolvimento do inseto *Anthomonus grandis*.

Apesar de ser o método de controle mais utilizado, o uso excessivo de químicos na agricultura agride imensuravelmente o meio ambiente e é prejudicial à saúde humana. Devido a isso, diversos programas de melhoramento genético buscam cultivares resistentes, porém com resultados não significativos. Outra vertente a ser estudada é a obtenção de plantas transgênicas com genes capazes de produzir proteínas com capacidade de controlar o inseto. Esta tecnologia gera redução do uso de defensivos químicos, atribuindo menor custo de produção já que os inseticidas correspondem em média 20 % do custo de produção da lavoura (IMEA, 2016).

2.3. *Bacillus thuringiensis*

Da família Bacillaceae a bactéria *B. thuringiensis* é pertencente ao grupo *Bacillus cereus* que contém *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* e *Bacillus weihenstephanensis* como parte desse grupo (ARANTES, 1989). Em forma de bastonete de dimensões cerca de 1,0 a 2,0 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento, a bactéria *B. thuringiensis* se movimenta através de flagelos peritríquios (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000). São naturalmente encontradas no solo, insetos mortos, plantas e em produtos armazenados, possuindo característica gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica, esporulante, que produzem cristais proteicos utilizados como inseticida biológico (COSTA et al., 2009).

No mercado de bioinseticidas a *B. thuringiensis* destaca-se pela atividade tóxica contra insetos de diversas ordens, como Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Himenoptera, Mallophaga, incluindo vetores de importância mundial da ordem Diptera como *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* e *Anopheles ssp* (LERECLUS et al., 1993), além de nematoides e platelmintos (FEITELSON et al., 1992).

A célula bacteriana em condições desfavoráveis interrompe a divisão celular dando origem ao processo de esporulação como defesa de sobrevivência da espécie. Este processo de esporulação resulta na produção de proteínas

denominadas Cry ou δ -endotoxinas na forma de cristais que são liberados durante a lise celular (LERECLUS et al., 1989).

O mecanismo de ação ao controle de inseto praga realizado por *B. thuringiensis* ocorre quando a larva do inseto suscetível ingere a proteína inativa, denominada protoxina. Ao entrar em contato com o pH intestinal capaz de solubilizar os cristais proteicos, as protoxinas se tornam ativas e aptas a se ligarem à receptores localizados na parede intestinal da lagarta, afetando o equilíbrio osmótico da célula que se intumescce e rompe. Consequentemente a lagarta é levada a morte por inanição ou septicemia, pois para se alimentar (BRAVO, 2017) (Figura 2).

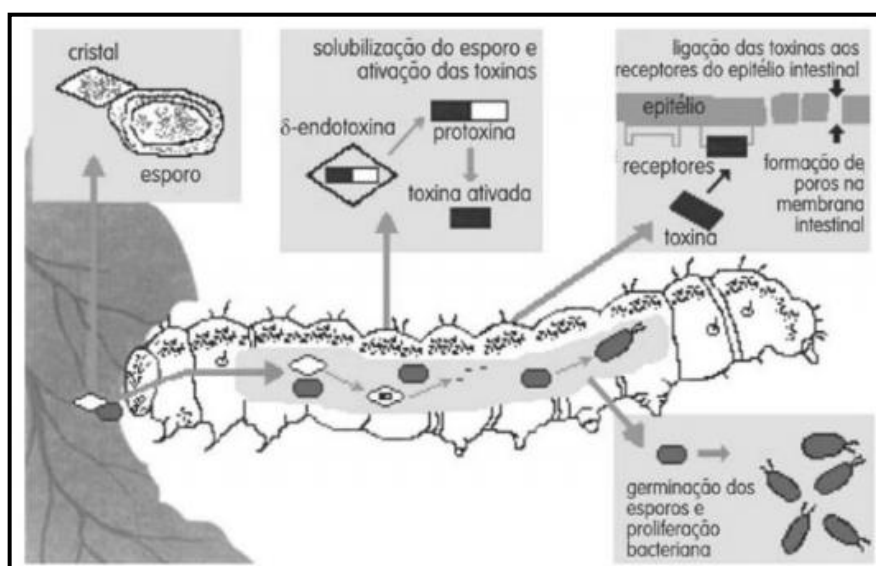


Figura 2. Mecanismo de ação de proteínas de *B. thuringiensis* em larvas suscetíveis proposto pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999).

Algumas cepas de *B. thuringiensis* produzem toxinas denominadas Proteínas Inseticidas Vegetativas (Vip) que diferentemente das proteínas Cry, são produzidas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria. Dentre as proteínas Vip a toxina binária Vip1 e Vip2 possui ação inseticida para Coleoptera e a Vip3 para Lepidoptera (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009).

Como alternativa para reduzir o desenvolvimento de resistência de insetos-praga a piramidação de genes vem se destacando, pois ao utilizar diferentes proteínas é possível retardar o desenvolvimento de uma população de insetos resistente a tais toxinas (WATKINS et al., 2012).

2.4. Características e modo de ação das proteínas δ -endotoxinas (Cry)

A bactéria *B. thuringiensis* é capaz de produzir corpos parasporais (cristais) durante a fase esporulativa. Estes cristais são denominados proteínas Cry ou δ -endotoxinas e possuem atividade inseticida para alguns insetos. O cristal pode assumir diferentes formas, como bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico ou, ainda, sem forma definida (HABIB; ANDRADE, 1998), fica acumulado no interior da célula bacteriana e é liberado juntamente com o esporo (SCHNEPF et al., 1998).

As toxinas Cry apresentam um espectro de ação normalmente restrito a uma única ordem de inseto, no entanto mais de 800 genes cry foram sequenciados e classificados em 75 grupos e subgrupos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html). As toxinas são classificadas de acordo com os níveis de identidade de aminoácidos.

Grande parte das proteínas Cry possuem massa molecular entre 130–140 kDa, porém, para se tornarem ativas são processadas por proteases que se encontram no intestino do inseto e então, assumem massa molecular entre 55–65 kDa.

Ao estudar a estrutura tridimensional da toxina Cry3Bb, pode-se concluir que a proteína Cry consiste em três domínios diferentes. O domínio I (N-terminal) é o responsável pela inserção da membrana à toxina, e os domínios II e III (C-terminal) são os que caracterizam a especificidade da toxina, pois reconhecem os receptores no intestino do inseto suscetível e realizam a ligação da mesma. A estabilidade estrutural da proteína é assegurada pelo domínio III que também age em conjunto com o domínio I para a formação de poros (SCHNEPF et al., 1998; SOBERON et al., 2010).

As lagartas suscetíveis ao ingerir esporos de *B. thuringiensis*, submetem os cristais proteicos ao pH intestinal que solubilizam e liberam protoxinas, estas serão ativas por proteases que atuam na porção N-terminal da proteína. Dessa forma a protoxina passa a ser uma toxina ativa capaz de se ligar a receptores localizados nas microvilosidades do epitélio intestinal. Acredita-se que a protease digestiva de lepidópteros e dípteros é do tipo serino-protease, enquanto em coleópteros são proteases cisteíno e aspártico-proteases (MONNERAT; BRAVO, 2000).

Primeiramente a proteína se liga a um receptor do tipo caderina (CAD) que promove uma clivagem aciona da toxina, resultando na formação de um oligômero aumentando a afinidade da proteína ao segundo receptor, seja uma aminopeptidase-N (APN) ligada à membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI), por uma proteína gliconjugada de 270 kDa (GCR) ou pela fosfatase alcalina (ALP) ancorada por GPI à membrana lipídica (BRAVO et al., 2015). Dessa forma o oligômero é inserido na camada lipídica, promovendo poros que causam desequilíbrio osmótico na região, intra e extracelular levando o inseto a morte.

Diferente do mecanismo de ação citado acima, Zhang et al. (2006) propuseram um segundo modelo em que a toxina Cry se liga a uma CAD que desencadeia uma via intracelular resultando na ativação da proteína. Esta proteína ativa aciona a adenilato ciclase (AC) que eleva a produção de adenosina monofosfatocíclico (AMPC). Elevados níveis de AMPC ativam a proteína quinase A (PKA) levando a uma sequência de alterações citológicas, inclusive a formação de bolhas na membrana e inchaço celular, levando a célula a morte.

Nos dois modelos citados, as proteínas CAD são as primeiras receptoras que dão início ao mecanismo de ação das toxinas Cry nos insetos. Experiências *in vitro* com *Plutella gossypiella* indicam que tanto a protoxina quanto a toxina ativa se ligam a CAD (FABRICK; TABASHNIK, 2007). Portanto, estes resultados nos levam a crer que a ligação de protoxinas a receptores intestinais podem levar o inseto a morte por uma segunda via que também ocasiona a formação de poros através de um oligômero da protoxina (GOMEZ et al., 2014). Este modelo conhecido como “modelo dual” propõe que tanto a protoxina quanto a toxina ativa, são capazes de se ligar a CAD e promover oligômeros diferentes que darão origem a poros no epitélio intestinal de larvas suscetíveis.

Dentre as proteínas Cry específica para Coleoptera as mais estudadas são Cry3 e Cry8, no entanto há relatos na literatura de proteínas Cry1, Cry3, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10 Cry14, Cry18, Cry22, Cry34, Cry35 e Cry36 com ação inseticida a insetos da ordem (PRAÇA et al., 2007; SHU et al., 2009). No controle de *A. grandis* há relatos de que as proteínas Cry1la, Cry8, Cry1B e Cry10 são eficientes no controle de larvas deste inseto (MARTINS, 2009).

2.5. Resistência de insetos-praga às proteínas de *B. thuringiensis*

A evolução da resistência de insetos cada vez mais se torna preocupante no aspecto do controle de insetos-praga na agricultura, forçando o surgimento de novas tecnologias para o controle. Este fenômeno da evolução de resistência não se limita apenas a inseticidas sintéticos, mas também aos produtos naturais como reguladores de crescimento e agentes de controle biológico. As pragas resistentes selecionadas naturalmente a partir do método de controle dão origem a populações resistentes, reduzindo a vida útil da tecnologia aplicada (HAWTHORNE, 1998).

Até o ano de 2007, os casos de resistência a toxinas de *B. thuringiensis* se restringia apenas a inseticidas biológicos aplicados em pulverizações no campo ou devido à seleção de linhagens em laboratório. A partir de então, casos de populações resistentes a plantas Bt começaram a ser reportadas como *Helicoverpa zea* e *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) à proteína Cry1Ac expressa em algodão (TABASHNIK et al., 2008; DUHRUA; GUJAR, 2011), *S. frugiperda* à proteína Cry1F expressa em milho (STORER et al., 2010) e, também foi reportado o primeiro caso de evolução de resistência de um coleóptero, *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), à proteína Cry3Bb1 expressa em milho (GASSMANN et al., 2011).

Em média, as tecnologias de controle com proteínas Bt são eficientes por 10 anos até que populações resistentes evoluam. No entanto, a praga *S. frugiperda* tornou-se resistente ao milho Bt, apenas quatro anos após sua liberação comercial, sendo este evento o mais rápido de evolução de resistência no campo com uma cultura Bt (STORER et al., 2010).

A variabilidade genética da população ou até mesmo entre outras populações de uma espécie de inseto é o principal fator que determina a capacidade do inseto desenvolver resistência a qualquer método de controle (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Altos níveis de variação intraespecífica possibilitam a existência de insetos

resistentes que serão selecionados naturalmente ao serem submetidos a determinados métodos de controle.

Diversos fatores bioquímicos, isolados ou integrados, são responsáveis pela evolução de resistência a toxinas de *B. thuringiensis* expressas de plantas geneticamente modificadas. Qualquer alteração no modo de ação da toxina é o suficiente para reduzir ou até mesmo anular sua capacidade de controle a determinada praga. Tais alterações podem estar relacionadas à mudança no sítio de ligação da toxina à membrana, alteração na atividade proteolítica no intestino do inseto; ou até mesmo aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. Observa-se que a ocorrência de alteração no sítio de ligação da toxina à membrana do inseto é o fator mais ocorrente em populações resistentes de campo e de laboratório (FERRÉ; VAN RIE, 2002; WANG et al., 2007; TABASHNIK et al., 2011; LEMES, 2012).

Com o intuito de conter a evolução da resistência, o emprego de técnicas como área de refúgio tem sido adotada em cultivos transgênicos. O refúgio permite que a evolução da resistência não avance drasticamente, pois, a área de plantio sem plantas Bt não seleciona uma fração da população da praga. O acasalamento de insetos resistentes com insetos suscetíveis produz progênie heterozigota suscetível a plantas Bt. No entanto, a adoção de refúgio muitas vezes não é bem avaliada pelos produtores rurais, pois, dificulta o manejo de máquinas agrícolas, já que áreas tão próximas necessitam de diferentes aplicações, como por exemplo o uso de inseticida na área de refúgio.

Outra estratégia que vem sendo utilizada recentemente é a piramidação, ou seja, o empilhamento de múltiplos genes na mesma planta. Dessa forma, a chance de mais de uma mutação simultânea ocorrer em diferentes receptores para as diferentes toxinas no mesmo inseto são menores, reduzindo a probabilidade de ocasionar a evolução da resistência. Para que essa estratégia seja eficiente, é necessário que as proteínas sintetizadas na planta apresentem um mecanismo de ação diferente ou local de ligação diferente, evitando o surgimento de resistência cruzada que é a resistência a uma proteína sem mesmo o inseto ter sido exposto a mesma e sim a outra proteína com o mesmo sítio de ligação. Também é necessário

utilizar proteínas com toxicidade contra o mesmo organismo alvo (BRAVO; SOBERÓN, 2008; FERRÉ et al., 2008; TABASHNIK; CARRIÈRE, 2008).

Dessa forma, acredita-se que plantas piramidadas reduzem o desenvolvimento de populações resistentes a toxinas de *B. thuringiensis*. Por esse motivo, cultivares piramidadas de algodão e outras culturas já estão disponíveis no mercado com o intuito de desacelerar a evolução da resistência em insetos-praga e aumentar a vida útil da tecnologia.

3. OBJETIVOS

- O objetivo deste trabalho é identificar a proximidade evolutiva da nova proteína Cry8 com as demais proteínas da mesma classe sequenciadas até o momento.
- Averiguar a ação inseticida das proteínas Cry1Ia10 e Cry8, pertencentes ao Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) e investigar o potencial sinérgico da combinação destas duas proteínas frente a larvas de *A. grandis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As análises moleculares deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), *Câmpus* de Jaboticabal, SP. A elaboração do ensaio de patogenicidade com larvas do bicudo-do-algodoeiro, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), contou com a colaboração do Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, que forneceu dieta e as larvas neonatas do inseto em estudo que foram utilizados para determinação da concentração letal das proteínas e efeito em conjunto entre elas. Os bioensaios foram realizados e armazenados em sala climatizada no LGBBA-FCAV/UNESP.

4.1. Amplificação do gene *cry8*

Para expressar o gene *cry8* de *B. thuringiensis*, foi necessário subclonar o gene do DNA recombinante pGEM-T easy + *cry8*, previamente construído e clonado em células de *Escherichia coli* DH10B por Rossi (2011), no vetor de expressão pET SUMO “Champion pET SUMO Expression System” (Invitrogen) e introduzi-lo em células de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot (Invitrogen). Amplificou-se o fragmento de 3531 pb (número de acesso GenBank: JN591316.1) com oligonucleotídeos específicos *cry8*(F) 5'ATGAGTCCAAATAATCTAAA 3' e *cry8*(R) 5'TTACTCTACGTCTACAAT 3'. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em volume total de 25 µL, com: 150 ng de DNA; 1 U de enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP); 1 X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen); 1,5 mmol L⁻¹ de MgSO₄; 0,5

pmol de cada oligonucleotídeo; 0,16 mmol L⁻¹ de dNTP; e água destilada deionizada estéril (q.s.p. 25 µL).

Inicialmente, para a desnaturação do DNA, a reação foi mantida por 2 min a 94°C, seguida por 30 ciclos compostos de 1 min a 94°C; 1 min a 53°C; 2 min a 68°C; mais um passo adicional de 5 min a 68°C e, ao final do processo, o produto foi mantido a 4°C para a manutenção das amostras até a retirada dos tubos do aparelho.

Para a confirmação da amplificação, foram adicionado 3 µL de tampão de amostra (0,5 % de azul de bromofenol, 50 % de glicerol) ao produto da PCR, totalizando 10 µL de amostra, a qual foi aplicada em gel de agarose a 0,8 %, contendo brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e submetido à eletroforese em cuba horizontal, por 1 h e 30 min, a 70 V, conduzida em tampão TEB 1X [Tris 89 mM, EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM (pH 8,2)]. Também foi aplicado no gel de agarose uma amostra do marcador molecular “GeneRuler™ 1 kb DNA ladder” (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) que serviu de referência para a confirmação do tamanho molecular obtido na reação de amplificação. Posteriormente, os géis de agarose foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentados em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por meio do *software* Quantity-one.

4.2. Clonagem do gene *cry8* no vetor de expressão pET SUMO

Para a expressão do gene, utilizou-se o kit de clonagem “Champion™ pET SUMO Expression System” (Invitrogen) pois possibilita uma clonagem de um fragmento desejado por meio de um produto de PCR no vetor. Este vetor possibilita que a expressão da proteína esteja ligada a uma cauda de seis histidinas (6Xis), o que facilita a identificação da proteína em estudo através de um anticorpo anti-His, e a uma proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis.

A expressão do gene no vetor pET SUMO é iniciada pelo promotor bacteriófago T7 modificado para um “*lac operator*”. Para a expressão do gene, é necessária a liberação da enzima T7 RNA polimerase que é sintetizada pela célula *E. coli* BL21 (DE3) de maneira regulada e que, quando em quantidade suficiente, liga-se ao promotor T7 do vetor e transcreve o gene de interesse (STUDIER et al., 1990) (Figura 3).

Para a clonagem do gene *cry8* no vetor de expressão pET SUMO, primeiramente amplificou-se o fragmento por meio de uma PCR. Para aumentar a eficiência de ligação, adicionou-se 1U de Taq DNA Polymerase (recombinant) (Thermo Scientific) ao produto de PCR que foi submetido a 72°C por 8 min para adicionar adenina nas extremidades do fragmento, facilitando assim a ligação do fragmento ao vetor, o qual possui extremidades de timina.



Figura 3. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen).

A inserção do gene *cry8* completo no vetor de expressão pET SUMO foi realizada de acordo com as recomendações expressas pelo fabricante. A reação

contendo 2 μL do produto de PCR, 1 μL do vetor pET SUMO, 1 μL de tampão de ligação 10X, 1 μL de enzima T4 ligase e água estéril (q.s.p) 10 μL foi incubada a 15 °C durante 16 h. Uma vez efetuada a reação de ligação, 50 μL de células de *E. coli* BL21(DE3) One Shot (Invitrogen) foram transformadas com 2 μL do produto de ligação através do método de choque térmico e selecionadas em meio sólido LB (2x) suplementado com canamicina (50 mg mL⁻¹). Os clones foram confirmados por PCR com oligonucleotídeos específicos tanto do gene quanto do vetor.

4.3. Indução da expressão dos genes *cry1la10* e *cry8* e obtenção dos lisados proteicos

O DNA recombinante capaz de sintetizar a proteína Cry1la10, utilizado neste trabalho, foi construído e caracterizado por Marucci (2015) em vetor de expressão pET SUMO.

Para a indução a expressão dos genes *cry1la10* e *cry8*, células recombinantes foram cultivadas em meio sólido LB (2x) com canamicina (50mg mL⁻¹) por 16 h à temperatura de 37°C. O pré-inóculo foi preparado a partir da coleta de uma colônia isolada, a qual foi incubada em 10 mL de meio LB (2x) líquido suplementado com antibiótico canamicina (50mg mL⁻¹) e mantido sob agitação de 200 rpm na temperatura de 37°C por 16 h.

Após esse período, foi adicionado a 250 mL de meio líquido LB (2x), suplementado com antibiótico canamicina (50mg mL⁻¹) , 2,5 mL do pré-inóculo e reincubado a 37°C sob agitação de 200 rpm até que a densidade óptica de 600 nm estivesse entre 0,5 e 0,8. A indução da expressão dos genes foi efetuada com a adição de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,5 mM, durante 5 h a 22°C e agitação constante de 200 rpm.

No processo de extração das proteínas, os inóculos foram centrifugados por 30 min a 21.952 x g e o sobrenadante deste processo descartado. Os sedimentos ("pellet") foram ressuspensos com 12,5 mL de Tampão pET SUMO (50 mM fosfato de potássio, pH 7,8; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10 % glicerol; 0,5 % Triton x 100;

10 mM imidazol) sob agitação vigorosa no aparelho tipo “vórtex”. Para o rompimento das células, adicionou-se 375 μL de lisozima (100 mg mL^{-1}), 125 μL de DNase I (1 mg mL^{-1}) e 5 μL de PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto) a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, em seguida incubadas sob agitação suave, a 37°C por 30 min. Posteriormente, as amostras foram submetidas à sonicação a 60 W por 180 s, sendo divididas em 3 etapas de 60 s com intervalos de 15 s e finalmente centrifugadas a $21.952 \times g$ a 4°C por 30 min.

O sobrenadante da amostra de Cry1Ia10 foi armazenado a -20°C , enquanto a amostra de Cry8 sofreu o processo de solubilização, no qual o “pellet” foi ressuspenso em tampão de solubilização (50 mM NaHCO_3 (pH 10), 100 mM NaCl, 10 mM ditioneitol - DTT) e incubado por 3 h a 37°C , sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a amostra passou por nova centrifugação de 15 min a $21.952 \times g$ na temperatura de 4°C , recuperando-se assim a proteína solubilizada presente no sobrenadante, o qual também foi armazenado a -20°C .

No intuito de confirmar a expressão proteica, uma colônia de *E. coli* BL21(DE3) One Shot não transformada passou por todas as etapas de indução e extração proteica, juntamente aos clones contendo Cry1Ia10 e Cry8, para que fosse obtida uma amostra de controle negativo. Foi coletado o lisado proteico *E. coli* BL21(DE3) One Shot nos mesmos momentos das proteínas em estudo. Portanto, cada proteína possui seu respectivo controle negativo.

4.4. Análise da expressão e quantificação das proteínas Cry1Ia10 e Cry8

A expressão das proteínas foi confirmada através de gel de poliacrilamida SDS-PAGE na concentração de 12 % conforme Laemmli (1970), utilizando equipamento para eletroforese vertical Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA) e 1 % de SDS, enquanto o gel de empilhamento foi preparado na concentração de 5 % de poliacrilamida e 0,5 % de SDS. As amostras foram preparadas com 20 μL de cada lisado proteico e 10 μL de tampão de carregamento de proteína [0,187 M de Tris, pH 7,0; 2,0 % de SDS (m/v); 1,0 % de Azul de

Bromofenol (m/v); 27 % de Glicerol (v/v) e 5,0 % de β -mercaptoetanol (v/v)] e aquecidas a 100°C durante 5 min e aplicadas no gel que também continha uma amostra do marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Thermo Scientific) para monitorar a separação das proteínas durante a eletroforese e o peso molecular das mesmas. A quantificação das proteínas foi feita através de uma curva padrão, onde cinco amostras de diferentes concentrações de Soroalbumina Bovina (BSA), sendo elas de 0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05 mg mL⁻¹, foram adicionadas ao gel. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50 mM de Tris, pH 8,6; 1,92 M de Glicina e 1 % de SDS), a 30 mA e 200 V em temperatura ambiente por 90 min.

Após a eletroforese, os géis foram imersos em 30 mL de solução de coloração (0,1 % de Coomassie-Brilliant Blue R-250 (m/v); 50 % de Metanol e 10 % de Ácido Acético) por 5 min e posteriormente descorados sob agitação constante e solução descorante (10 % de Metanol e 10 % de Ácido Acético).

Para determinar a concentração das proteínas, utilizou-se o método de densitometria, utilizado o programa ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia).

4.5. Confirmação das proteínas por “Western blotting”

O “Western blotting” (TOWBIN et al., 1979) foi realizado a partir de um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 % contendo amostras das proteínas estudadas neste trabalho, amostra de controle negativo e o marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). O gel foi preparado nas condições descrita no item anterior descritas, no entanto, ao fim da eletroforese o mesmo não foi submetido à etapa de coloração. Para a detecção das proteínas Cry1la10 e Cry8 contendo cauda de histidina foi utilizado o anticorpo primário anti-histidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (GE Health Care Bio-Sciences, Piscataway, EUA). A proteína marcada foi revelada com o uso de “SIGMAFAST™ DAB With Metal Enhancer Tablet Set” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de “Amersham Hybond-P PVDF” (GE Healthcare) utilizando uma cuba de transferência úmida “Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell” (Bio-Rad) com tampão CAPS 1X (10 mM de CAPS, pH 11,0) a 100 V a 4°C por 1 h.

Após a transferência a ligação inespecífica na membrana foi bloqueada com 50 mL do tampão PBS-T (1 mM de KH_2PO_4 ; 10 mM de Na_2HPO_4 ; 137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl, pH 7,4 e 0,1 % de Tween-20) adicionado 2,5 g de leite em pó desnatado e mantida sob agitação constante por 1 h. Após este período a membrana foi lavada rapidamente por 2 vezes em tampão PBS-T e lavada em excesso do mesmo tampão por 5 min.

Em seguida a membrana foi incubada em solução contendo 4 μL do anticorpo primário anti-his e 20 μL do tampão PBS-T, mantida sob agitação constante por 1 h.

A membrana, novamente foi submetida a 2 lavagens de 10 min com tampão PBS-T e posteriormente incubada com o 4 μL do segundo anticorpo anti-IgG e 20 μL de tampão PBS-T, mantida por 1h sob agitação constante. Após a incubação a membrana foi novamente lavada com PBS-T.

Para revelar a proteína marcada, diluiu-se em 5 mL de água estéril e destilada ao substrato “SIGMAFAST TM DAB With Metal Enhancer Tablet Set” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e o adicionamos a membrana até que a proteína fosse revelada. Para a interrupção da reação, a membrana foi lavada com água deionizada. A membrana foi dessecada em temperatura ambiente e armazenada sob o abrigo de luz.

4.6. Análises filogenéticas da proteína Cry8

Foi feito um levantamento de sequências disponíveis da família Cry8 de acordo com a “Nomenclatura da toxina *Bacillus thuringiensis*” no endereço eletrônico (<http://www.btnomenclature.info/>) (CRICKMORE et al., 2016) e no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

As sequências obtidas foram editadas e gerada a matriz através do programa BioEdit v7.5.0.2 (HALL, 1999), e alinhadas com o aplicativo MAFFT v.7 (KATO et al., 2017), foram adicionadas máscaras (*missing data* = "?") onde as sequências não estavam disponíveis (WIENS, 2006).

Através do programa PhyML (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2011) foi selecionado o modelo evolutivo JTT + G + F (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992) através do Akaike Information Criterion (AIC) (AKAIKE, 1973) e através do site Cipres (MILLER et al., 2010) seguiu-se com uma Inferência Bayesiana (IB) MrBayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012), também foi realizada uma análise de Maximum Likelihood (ML) pelo aplicativo IQ-TREE (NGUYEN et al., 2014).

Nas interferências Bayesianas 3×10^7 gerações foram conduzidas, com as probabilidades posteriores estimadas por meio do algoritmo MCMC, utilizando-se quatro cadeias quentes. Foram amostradas árvores a cada 100 gerações (1 árvore /100 gerações), com descarte de 25 % das amostras iniciais (*burnin*) .

Na análise de Máxima Verossimilhança (ML) foram utilizadas 1000 réplicas e gerada uma árvore de consenso estrito e calculados os valores dos *bootstraps*.

As árvores obtidas foram editadas através dos programas TreeGraph 2 (STÖVER, 2010) e FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2009).

4.7. Bioensaio com *A. grandis*

O bioensaio com larvas neonatas de *A. grandis* foi realizado em parceria com o Laboratório de Biologia dos Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP, a dieta dos insetos e as larvas foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra.

Em todos os bioensaios foram utilizadas placas de poliestireno de 128 poços, onde uma única larva neonata com 1 mL de dieta tratada foi mantida por poço. As diferentes concentrações de proteínas foram incorporadas a uma dieta artificial (Tabela 1) a uma temperatura de 40°C permitindo a incorporação da proteína, sem

desnatura-la, em uma dieta líquida. A dieta, já sólida, foi perfurada com auxílio de uma ponteira estéril para abrigar uma larva neonata.

Com o auxílio de uma lupa, as larvas neonatas de *A. grandis* foram inseridas em um orifício (Figura 4) e mantidas em sala climatizada a 25°C ($\pm$ 2°C), contendo umidade relativa 70 % e fotoperíodo de 14:10 (luz:escuro).

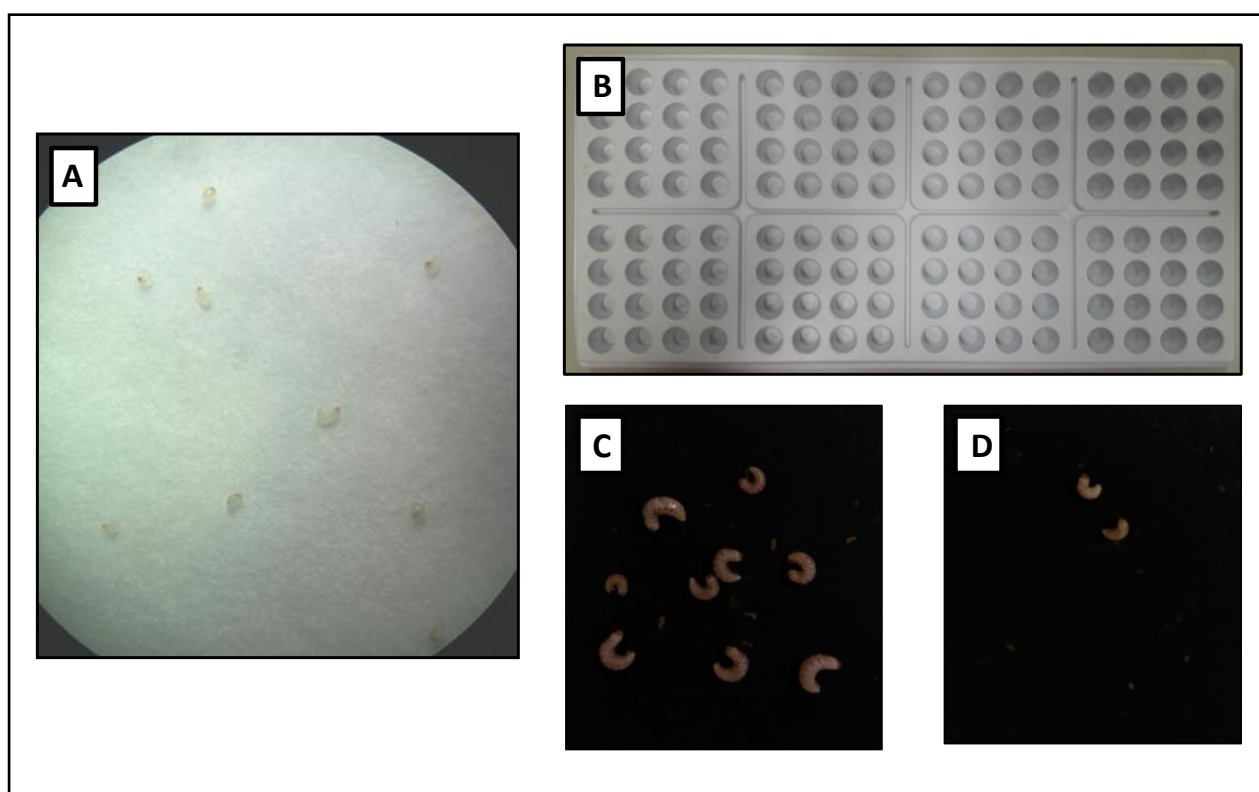


Figura 4. Larvas de *A. grandis* para a execução e avaliação dos bioensaios. A – Larvas neonatas de *A. grandis* visualizadas com auxílio de lupa para a montagem dos bioensaios. B – Bandeja de poliestireno de 128 poços onde as larvas permaneceram em ambiente controlado durante 7 dias com dieta artificial e proteína. C – Avaliação de uma das parcelas testemunha após 7 dias. D- Avaliação de uma das parcelas que recebeu 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ da proteína Cry8.

Tabela 1. Ingredientes utilizados no preparo da dieta artificial utilizada nos bioensaios e manutenção das larvas de *A. grandis*.

Ingrediente	Quantidade
Pharmamedia	40g
Gérmen de trigo	60g
Levedo de cerveja	60g
Proteína de soja	100g
Glicose	60g
Ácido ascórbico	20g
Ácido sórbico	2,4g
Sais de wesson	10g
Nipagin	2g
Solução vitamínica	40g
Ágar	28g
Água destilada	1500 mL

4.7.1. Bioensaio para estimar a concentração letal de 50 % e 90 % das proteínas Cry1Ia10 e Cry8

A estimativa das concentrações letais de 50 % e 90 % (CL₅₀ e CL₉₀) foi efetuada através de sete concentrações (1; 2; 4; 8; 16; 32 e 40 µg mL⁻¹) do lisado proteico de Cry1Ia10 e Cry8, além de uma alíquota controle, a qual recebeu apenas o tampão diluente sobre a dieta artificial. As proteínas diluídas ou o tampão diluente foram incorporados à dieta supramencionada (Tabela 1). Cada quadrante da placa recebeu uma concentração diferente, possibilitando que em cada placa todas as concentrações estivessem presentes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, contendo 3 repetições de cada concentração e 16 larvas neonatas por parcela. As placas foram mantidas a 25°C (± 2°C), umidade relativa 70 % e fotoperíodo de 14:10

(luz:escuro). A mortalidade foi avaliada após sete dias e a estimativa de CL_{50} e CL_{90} foi calculada por meio da análise de Probit (FINNEY, 1971), com uso do programa de estatística Polo Plus (LeOra Software, Berkeley, CA).

4.7.2. Interação entre as proteínas Cry1a10 e Cry8 frente a *A. grandis*

A interação entre as proteínas Cry1a10 e Cry8 foi avaliada através do bioensaio composto por sete concentrações (1; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$), respeitando a proporção de 1:1 entre as proteínas, e o tratamento controle que recebeu apenas tampão diluente na dieta artificial. As larvas foram mantidas nas mesmas condições do experimento anterior.

O potencial sinérgico das mesmas foi estimado através da metodologia descrita por Tabashnik (1992) baseada na equação de Finney (1971):

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

Onde, a $CL_{50(m)}$ representa a estimativa de concentração letal média da mistura de proteínas; ra e rb a proporção de cada proteína na mistura e $CL_{50(a)}$ e $CL_{50(b)}$ as concentrações letais individuais de cada proteína, previamente calculadas no ensaio anterior. O fator de sinergismo (FS), razão entre o CL_{50} observada e a $CL_{50(m)}$ estimada, demonstra que valores acima de 1 corresponde ao efeito antagônico da mistura e valores abaixo de 1 efeito sinérgico entre as proteínas avaliadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Amplificação do gene *cry8* por PCR

A subclonagem do gene *cry8* para o vetor de expressão pET SUMO foi confirmada com amplificação do fragmento de aproximadamente 3,5 kb através dos oligonucleotídeos específicos do gene e do vetor (Figura 5). Ao amplificar o gene *cry8Na* na estirpe Bt Q52-7, Li et al. (2014) também obtiveram uma banda única de massa molecular aproximadamente 3,5 kb. Ao final do sequenciamento completo do gene *cry8*, Rossi (2011) com o auxílio de oligonucleotídios similares aos que foram utilizados neste trabalho pode observar a mesma massa molecular do produto de PCR.

A primeira sequência de um gene *cry8*, foi publicada em 1985 pelo grupo de pesquisadores do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Washinton ao sequenciar os 4.222 pares de base de um plasmídeo de *B. thuringiensis*. A proteína que tal gene sintetiza, possui 1.176 aminoácidos e atualmente recebe a nomenclatura Cry8Aa.

Para a expressão do gene, é necessário que o mesmo esteja inserido no vetor de forma que o códon inicial (ATG) esteja adjacente da região promotora T7, responsável por dar início à transcrição gênica. Portanto, a combinação de oligonucleotídeos na reação de PCR que confirmou a clonagem do gene na posição adequada possuía um iniciador correspondente ao gene (direta) e outro correspondente ao vetor (reversa), e a reação com combinação oposta de iniciadores reafirmou a clonagem correta do gene. É importante ressaltar que os oligonucleotídeos correspondentes ao vetor acompanham o Kit de clonagem Champion™ pET SUMO Protein Expression System e são nomeados como SUMO Forward Sequencing Prime e T7 Reverse Sequencing Primer.

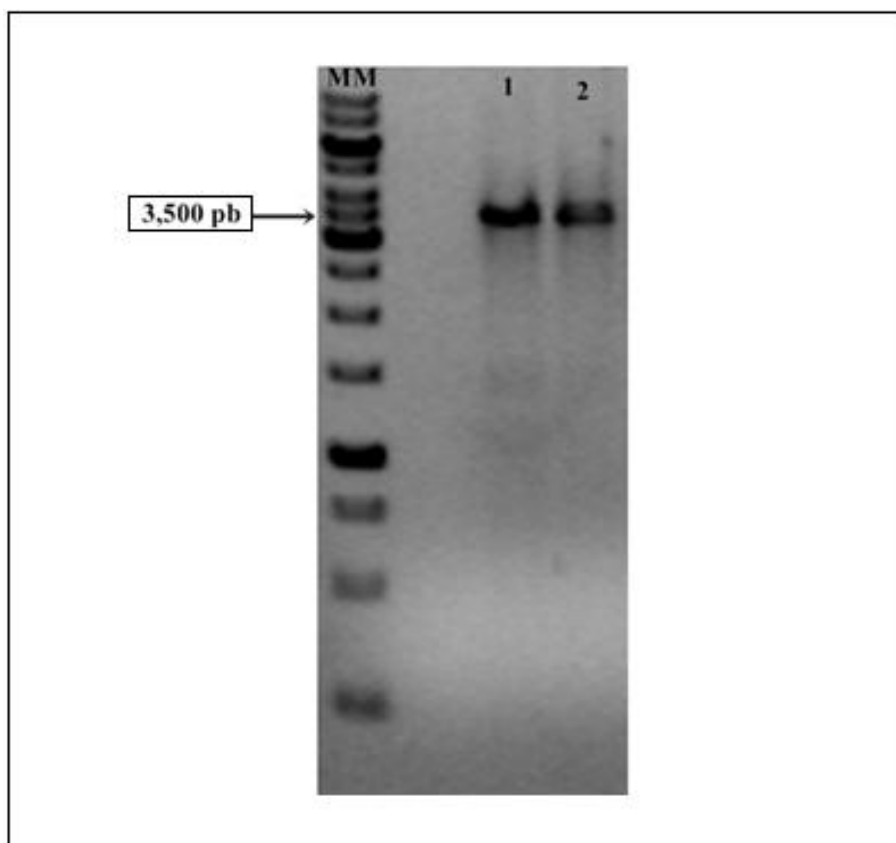


Figura 5. Confirmação de clonagem do gene *cry8* com 3.531 pb no vetor de expressão pET SUMO. MM: Marcador molecular 1kb DNA Ladder. 1. Amplificação do gene *cry8* através do oligonucleotídeos direta (correspondente ao vetor) e reversa (correspondente ao gene). 2. Amplificação do gene *cry8* através do oligonucleotídeos direta (correspondente ao gene) e reversa (correspondente ao vetor).

5.2. Indução da expressão dos genes *cry1la10* e *cry8* e obtenção dos lisados proteicos

Após a indução, a expressão das proteínas Cry1la10 e Cry8 foram confirmadas através de análise do gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %, no qual se puderam comparar os lisados proteicos de *E. coli* BL21 (DE3) recombinante e o controle negativo.

A proteína recombinante Cry1Ia10 foi detectada através da banda de massa molecular de 94 kDa no lisado proteico total de *E. coli* BL21 (DE3), sendo 81 kDa correspondentes à proteína e 13 kDa referentes à cauda de 6 histidinas (6XHis) e a proteína SUMO, ambas adicionadas pelo vetor de expressão pET SUMO na região N-terminal da proteína. Tais resultados corroboram os obtidos por Marucci (2015). Já a proteína Cry8 foi confirmada pela banda de massa molecular aproximada de 143 kDa, sendo que 130 kDa correspondem a proteína em questão e, novamente, 13 kDa referentes ao produto do vetor pET SUMO, corroborando dados já descritos na literatura que apresentam valores de massa molecular entre 128 a 137 kDa para proteínas Cry8 (SHU et al., 2009; LI et al., 2014; BI et al., 2015). Na imagem do gel de poliacrilamida SDS-PAGE pode-se, ainda, observar, na canaleta correspondente ao controle negativo, a ausência das bandas de massa molecular correspondentes às proteínas de interesse (Figura 6).

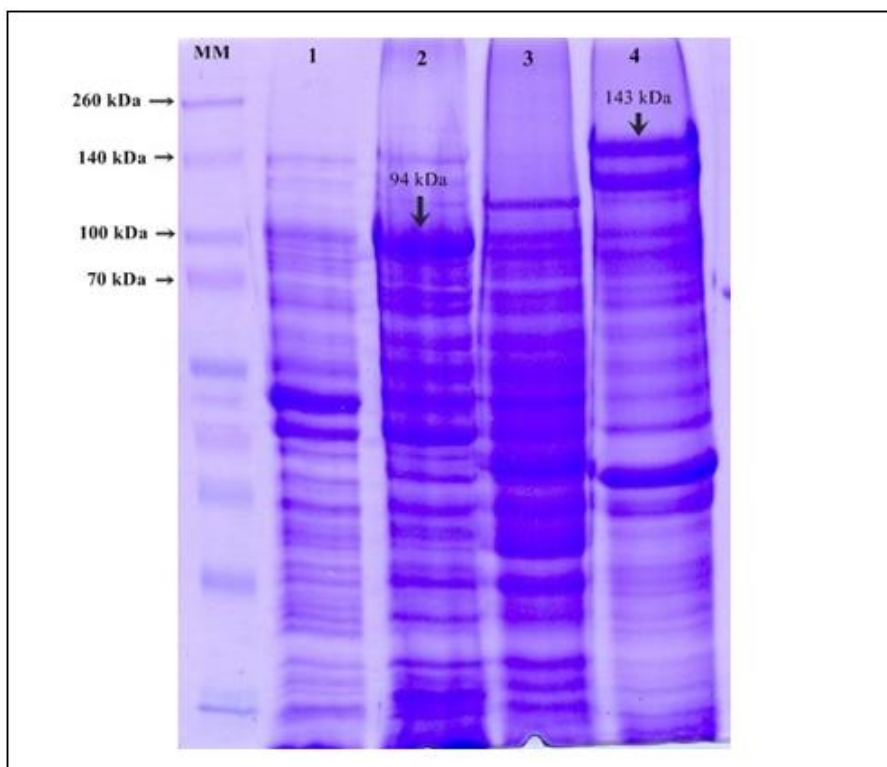


Figura 6. Análise da expressão das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 em lisado proteico de *E. coli* em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %. MM. marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” em kDa. 1. Controle negativo da proteína Cry1Ia10. 2. Expressão da proteína Cry1Ia10 de 94 kDa. 3. Controle negativo da proteína Cry8. 4. Expressão da proteína Cry8 de 143 kDa.

5.3. Confirmação das proteínas por “Western blotting”

De modo complementar, a expressão das proteínas também pode ser observada pelo reconhecimento da cauda de histidina anexada a cada uma delas, utilizando-se a técnica de “Western blotting”, onde a hexa-histidina ligada à região N-terminal de Cry1la10 e Cry8 reage ao anticorpo anti-poli-histidina. Desta forma, a expressão das proteínas foi evidenciada pela presença de bandas com as respectivas massas moleculares supramencionadas, nos lisados de *E. coli* BL21 (DE3) portadores dos respectivos genes (Figura 7). Bergamasco et al. (2011), utilizando a mesma técnica, também observaram a reação do anticorpo anti-poli-histidina à proteína recombinante Cry1la com mesma massa molecular. Já no gene Cry8, a técnica apenas foi utilizada em trabalhos em que a toxina se apresentava ativa com massa molecular de aproximadamente 70 kDa (OLIVEIRA, 2008; WEI, et al., 2016).

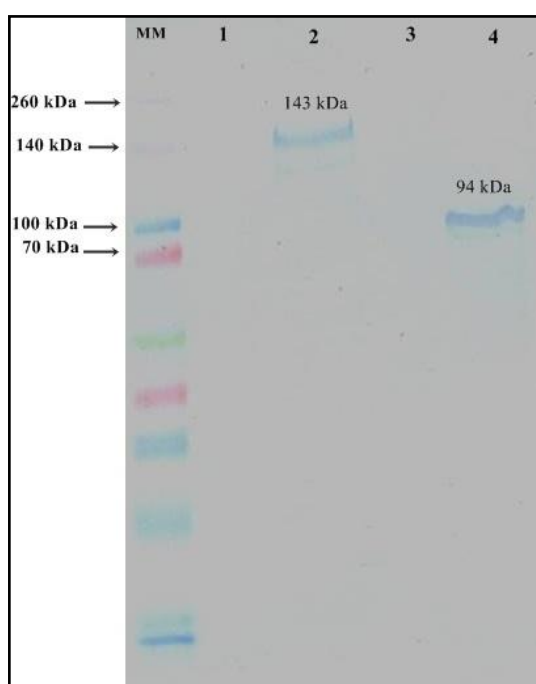


Figura 7. Detecção das proteínas Cry8 e Cry1la e seus respectivos controles negativos, através do “Western blotting”. MM: marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” em kDa. 1. Controle negativo correspondente à proteína Cry8. 2. Lisado de *E. coli* recombinante, observando a proteína Cry8. 3. Controle negativo correspondente à proteína Cry1a10. 4. Lisado de *E. coli* recombinante, observando a proteína Cry1la.

5.4. Análises filogenéticas da proteína Cry8

A sequência da proteína Cry8 utilizada neste trabalho foi compilada com outras 57 sequências de proteínas da mesma classe identificadas e nomeadas de acordo com Crikmore et al. (2016). As análises filogenéticas, Bayesiana e Máxima Verossimilhança, apresentaram resultados idênticos e, portanto, a árvore filogenética é o resultado da interferência Bayesiana com valores de probabilidade posterior (PP) e também possui valores de Bootstrap da análises de Máxima Verossimilhança.

O alinhamento das sequências revelou que a proteína Cry8 testada (identificada na árvore como Cry8 I622_59316.1) está agrupada no clado das demais proteínas Cry8, fortemente suportado pelos valores de PP e Bootstrap. Esta proteína se agrupa no subclado com as proteínas Cry8Pa1 e Cry8Pa2, sugerindo maior proximidade evolutiva com tais proteínas, que também se assemelham as proteínas da subclasse Cry8B. No entanto, a sequência em estudo está mais distante filogeneticamente da proteína Cry8La (Figura 8).

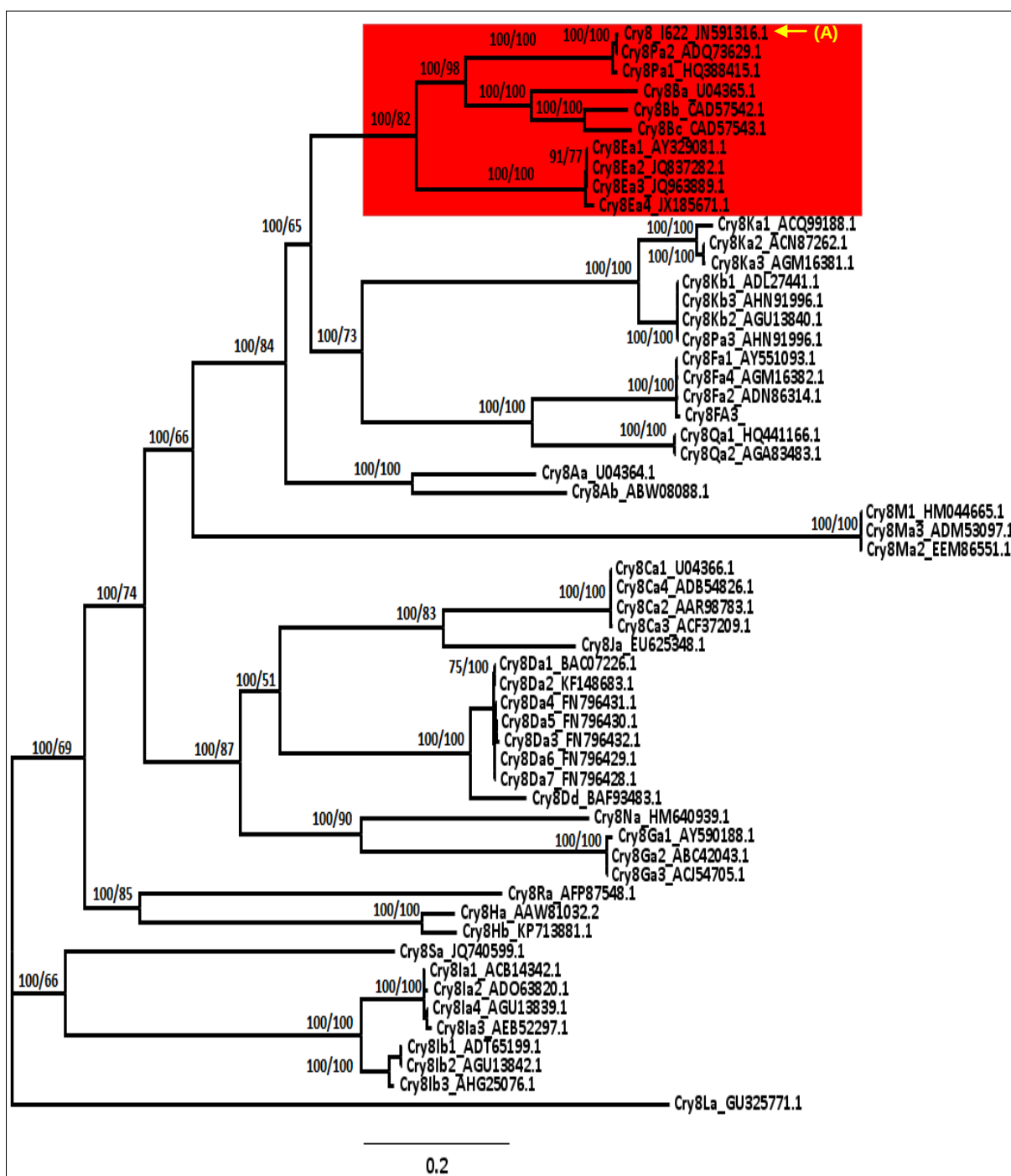


Figura 8. Filograma resultante das inferências Bayesianas. Os valores dos ramos mostram a probabilidade posterior (PP) da inferência Bayesiana seguido do valor de *bootstraps* das análises de Máxima verossimilhança. O comprimento dos ramos é proporcional ao número de substituições inferidas (barra de escala = substituições por site). As sequências de aminoácidos estão descritas de acordo com sua nomenclatura oficial seguida pelo número de acesso GeneBank. A sequência de aminoácidos da proteína Cry8 testada neste trabalho está destacada pela letra (A).

Após a comparação entre as sequências de aminoácidos através da ferramenta BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997) disponível no endereço eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) observou-se similaridade de 99% entre a proteína Cry8 utilizada neste trabalho e a proteína Cry8Pa2 indicada pelas análises filogenéticas com maior proximidade evolutiva. Dos 1176 aminoácidos comparados, 1172 aminoácidos se alinham, caracterizando uma elevada similaridade entre estas sequências (Figura 9).

A estirpe de *B. thuringiensis* ST8 estudada por Zhu et al. (2011), revela elevada atividade inseticida contra os insetos *Melolonthidae pesticial* e *Holotrichia oblita* da ordem Coleoptera. A concentração letal de 50 % (CL₅₀) do produto de fermentação desta estirpe foi de $3,06 \times 10^8$ ufc g⁻¹ para larvas neonatas de *M. pesticial* e $1,14 \times 10^8$ ufc g⁻¹ para larvas neonatas de *H. oblita*. A elevada atividade inseticida desta estirpe contra tais insetos é consequência da síntese das proteínas Cry8Kb1, Cry8Pa1 e Cry8Qa1 nestas células. Possivelmente, proteínas com elevada similaridade a estas são forte candidatas para o controle de larvas da ordem Coleoptera, como a proteína Cry8 sintetizada neste trabalho que apresenta elevada similaridade com a proteína Cry8Pa1.

Rossi (2011) avaliou a mesma sequência da proteína Cry8 utilizada neste trabalho através de análise de alinhamentos múltiplos (CLUSTALW) e concluiu maior proximidade evolutiva com as proteínas da subclasse Cry8Ba1 e Cry8Ea1. Desde então, novas sequências de proteínas Cry8 foram identificadas e sequenciadas, surgindo novas subclasses. Por este motivo, as análises filogenéticas deste trabalho são semelhantes, porém se diferem dos resultados anteriores devido ao maior número de sequências analisadas já que novas sequências foram depositadas a partir de 2011.

De acordo com Shu et al. (2009), ao analisar dois novos genes *cry8*, dentre eles a sequência que codifica a proteína Cry8Ea1, concluíram que a sequência de aminoácidos desta proteína se assemelha em 70 % com a proteína Cry8Ba1. No presente estudo, podemos observar a forte proximidade evolutiva entre as subclasses dessas proteínas.

cry8-like protein, partial [Bacillus thuringiensis]

Sequence ID: [ADQ73629.1](#) Length: 1176 Number of Matches: 1[▶ See 2 more title\(s\)](#)Range 1: 1 to 1176 [GenPept](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
2416 bits(6262)	0.0	Compositional matrix adjust.	1172/1176(99%)	1174/1176(99%)	0/1176(0%)
Query 1	MSPNNINEYEIIDATPSTSVSNDTTRYPFANEPTNALQNMNYKDYLRMSEGYDSEYAGSP	60			
Sbjct 1	MSPNNINEYEIIDATPSTSVSNDTTRYPFANEPTNALQNMNYKDYLRMSEGYDSEYAGSP	60			
Query 61	EAFSTSGQDAVKAAIGVVGQILGKLGVPFVGPIVSLYSALIDVLWPGGKSQWEIFMEQVEA	120			
Sbjct 61	EAFSTSGQDAVKAAIGVVGQILGKLGVPFVGPIVSLYSALIDVLWPGGKSQWEIFMEQVEA	120			
Query 121	LINKKIAEYARNKAI AELEGLGNNYKIYLTALEEWQKNPSSTRVLRDVQNRFEILDSLFT	180			
Sbjct 121	LINKKIAEYARNKAI AELEGLGNNYKIYLTALEEWQKNPSSTRVLRDVQNRFEILDSLFT	180			
Query 181	QYMPSFRVAGYEVPLLTVYAQAANLHLLLLKDASNFGEWGLTGSEVNTYYDRQMSLTAE	240			
Sbjct 181	QYMPSFRVAGYEVPLLTVYAQAANLHLLLLKDASNFGEWGLTGSEVNTYYDRQMSLTAE	240			
Query 241	YSDH SVKWYNTGLDQLKGSNAQWVAYNRFRREMTLTVLDVVALFSSYDTRTYPIETTAQ	300			
Sbjct 241	YSDH SVKWYNTGLDQLKGSNAQWVAYNRFRREMTLTVLDVVALFSSYDTRTYPIETTAQ	300			
Query 301	LTREVMYMDPLGAVDVSNI GSWYDKAPSFSAIESAAIRPPHLFDFITGLIVYTQLRNLTS	360			
Sbjct 301	LTREVMYMDPLGAVDVSNI GSWYDKAPSFSAIESAAIRPPHLFDFITGLIVYTQLRNLTS	360			
Query 361	RYIRFWAGHTIGYKKVNTPETNVQMYGTNQNQLQDTSTFDFKGYNIYKTL SKDAVLFDISQ	420			
Sbjct 361	RYIRFWAGHTIGYKKVNTPETNVQMYGTNQNQLQDTSTFDFKGYNIYKTL SKDAVLFDISQ	420			
Query 421	SGYTYTFFGMPEVEFFLVNQVNNTSKLVYKPVSKDIIQKTRDSELELPPATSDPIISNAY	480			
Sbjct 421	SGYTYTFFGMPEVEFFLVNQVNNTSKLVYKPVSKDIIQKTRDSELELPPATSDPIISNAY	480			
Query 481	SHRLNHITFIYSSSTNTYVPVFSWAHWSADLENTIYPEKITQIPAVKANYTGPSTTVINS	540			
Sbjct 481	SHRLNHITFIYSSSTNTYVPVFSWAHWSADLENTIYPEKITQIPAVKANYTGPSTTVINS	540			
Query 541	RGLYGGNIVHTSNANATEAILGINCRFNFTSNQKYIVRIRYAADRSGTLKLSAGTSSRTI	600			
Sbjct 541	RGLYGGNIVHTSNANATEAILGINCRFNFTSNQKYIVRIRYAADRSGTLKLSAGTSSRTI	600			
Query 601	DFNATMTPGTSLEYNSFKYAMSNTFFEVSNTQILNLLIFV ENFPGNLYIDKFEFIPVDE	660			
Sbjct 601	DFNATMTPGTSLEYNSFKYAMSNTFFEVSNTQILNLLIFV ENFPGNLYIDKFEFIPVDE	660			
Query 661	TYEAEQDLEN AKKAVNALFTNTKDGLRPGVTDYEVNQAANLVECLSDDLYPNEKRLLFDA	720			
Sbjct 661	TYEAEQDLEN AKKAVNALFTNTKDGLRPGVTDYEVNQAANLVECLSDDLYPNEKRLLFDA	720			
Query 721	VREAKRLSEARNLLQDPDFQEINGENGWTASTGIEVVEGDALFKGRYLRLPGARQIDTET	780			
Sbjct 721	VREAKRLSEARNLLQDPDFQEINGENGWTASTGIEVVEGDALFKGRYLRLPGARQIDTET	780			

Query	781	YPTYLYQKIDEGVLKPYTRYRLRGFVGRSQGLEIYTIRHQTNRIVKNVDPNLLPDASPGN	840
Sbjct	781	YPTYLYQKIDEGVLKPYTRYRLRGFVGRSQGLEIYTIRHQTNRIVKNVDPNLLPDASPGN	840
Query	841	AGDGINRCSEQKYVNSRLEGEKGLPNGSRSAEAHEFSLPIDIGEIDYNENAGVWVGFKIT	900
Sbjct	841	AGDGINRCSEQKYVNSRLEGEKGLPNGSRSAEAHEFSLPIDIGEIDYNENAGVWVGFKIT	900
Query	901	DPEGYATLGNLELVEEGPLLGDTLERVKREEQQWKIQMTKRREETDRKYMIAKQAVDRLY	960
Sbjct	901	DPEGYATLGNLELVEEGPLLGDTLERVKREEQQWKIQMTKRREETDRKYMIAKQAVDRLY	960
Query	961	ADYQDQQLNPNVEITDITAAQNVIQSIPYVYNDAFPGLPGMNYTKFTELTDRLQQAWSLY	1020
Sbjct	961	ADYQDQQLNPNVEITDITAAQNVIQSIPYVYNDAFPGLPGMNYTKFTELTDRLQQAWSLY	1020
Query	1021	DQRNAIPNGDFRNELSNWNNTAGVNVQQLNGTSVLVIPNWDAQVSQQFTVQPNQRYVLRV	1080
Sbjct	1021	DQRNAIPNGDFRNELSNWNNTAGVNVQQLNGTSVLVIPNWDAQVSQQFTVQPNQRYVLRV	1080
Query	1081	TARKEGVGNGYVSIRDGGNQTTETLTFSASDYDTNGVYNIQASNTNGYNTNGVYNDQTGYI	1140
Sbjct	1081	TARKEGVGNGYVSIRDGGNQTTETLTFSASDYDTNGVYNIQASNTNGYNTNGVYNDQTGYI	1140
Query	1141	TKTAEFIPHTNQVWIEMSETEGTFYIESVELIVDVE	1176
Sbcct	1141	TKTAEFIPHTNQVWIEMSETEGTFYIESVELIVDVE	1176

Figura 9. Análise de similaridade entre a sequência de aminoácidos da proteína Cry8 utilizada neste trabalho e a proteína Cry8Pa2 através da ferramenta BLASTp disponível no endereço eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A proteína Cry8 sintetizada neste trabalho corresponde a sequência denominada Query, enquanto a sequência da proteína Cry8Pa2 está representada por Sbjct. Os aminoácidos destacados em amarelo são os que se diferem entre as sequências avaliadas.

5.5. Concentração letal das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 frente a larvas de *A. grandis*

Na análise de mortalidade de larvas de *A. grandis*, observou-se que tanto a pró-toxina Cry1Ia10 quanto a Cry8 apresentaram atividade tóxica frente ao inseto. A proteína Cry1Ia10 atingiu CL_{50} igual a $7,232 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CL_{90} igual a $116,72 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já a proteína Cry8 obteve CL_{50} igual a $4,422 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CL_{90} igual a $101,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2). Diante destes resultados foi possível constatar que as larvas da espécie possuem suscetibilidade estatisticamente igual em relação à proteína Cry1Ia10 e Cry8, já que os intervalos de CL_{50} e CL_{90} se sobrepõem. Estes resultados

corroboram informações de toxicidade efetiva de tais proteínas em larvas da mesma espécie. A concentração letal de 50 % proporcionada pela proteína Cry1Ia10 se encontra dentro do intervalo de dados obtidos por Grossi-de-Sá et al. (2007) e Bergamasco et al. (2011), que relatam CL_{50} de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5,23 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, a larvas de *A. grandis*. Tais autores relatam que essa proteína também apresenta ação inseticida a lagartas de *Spodoptera frugiperda* e, por esse motivo, Oliveira et al. (2016) construíram uma planta de algodão geneticamente modificada capaz de expressar este gene, já que é capaz de controlar as principais pragas da cultura.

Tabela 2. Estimativa de concentrações letais (CL_{50} e CL_{90}) das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 sobre larvas neonatas de *A. grandis*.

Proteína	$CL_{50}^{(1)}$ -----($\mu\text{g mL}^{-1}$)-----	$CL_{90}^{(1)}$	$b \pm SE^{(2)}$	X^2
	7,232	116,72		
Cry1Ia	(3,216-17,693)	(39,677- 30694)	$1,56 \pm 0,364$	0,599
	4,422	101,500		
Cry8	(2,133-8,010)	(39,932-2635,283)	$1,49 \pm 0,259$	1,531

⁽¹⁾ Concentração letal de 50 % e 90 %, com intervalo de confiança 95 %.

⁽²⁾ Coeficiente angular da reta $\pm$ Erro Padrão.

A proteína inseticida Cry8 mostrou-se, no presente experimento, duas vezes mais tóxica do que em estudos anteriores realizados por Oliveira (2008) com Cry8Ha1 frente a larvas de *A. grandis* o qual a CL_{50} observada pela proteína original Cry8Ha1 foi de $8,93 \mu\text{g mL}^{-1}$. No entanto, o mesmo estudo revela redução da concentração letal de 50 % da proteína Cry8Ha1 mutada para $2,83 \mu\text{g mL}^{-1}$, ressaltando que mutações pontuais estão altamente relacionadas ao aumento de toxicidade desta proteína. Trabalhos como os de Yamaguchi et al. (2008); Shu et al. (2009); Guo et al. (2009); Li et al. (2014); Wei et al. (2016) mostram a elevada toxicidade de proteínas Cry8 a insetos da ordem Coleoptera, especificamente da família Scarabaeidae como *Holotrichia parallela* Motschulsky (Coleoptera:

Scarabaeidae) e *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae), podendo-se também observar a especificidade de subclasses proteicas a determinadas espécies.

Shu et al. (2009) relataram que larvas de *H. parallela* são suscetíveis a toxina Cry8Ea e não a proteína Cry8Fa, a qual também não foi efetiva no controle de *Anomala corpulenta* Motschulsky (Coleoptera: Rutelinae) e *H. oblita*, diferentemente da proteína Cry8Ga1, que demonstrou efeito inseticida tanto para *H. parallela* quando para *H. oblita*. Li et al. (2014) observaram a toxicidade da proteína Cry8Na1 apenas em larvas de *H. parallela*, quando comparadas com demais espécies da mesma família. Estes dados demonstram a elevada especificidade de subclasses ao inseto suscetível e a importância de se estudar e encontrar novos genes para ampliar o número de espécies controladas por diferentes proteínas de *B. thuringiensis*.

5.6. Interação entre as proteínas Cry1Ia10 e Cry8

A análise da combinação entre as duas proteínas revela que a concentração letal frente a larvas de *A. grandis* foi inferior a CL₅₀ e CL₉₀ esperada, caracterizando sinergismo na combinação Cry1Ia10 + Cry8. De acordo com a Equação de Finney (1971) a CL₅₀ e CL₉₀ esperada eram 2,744 µg mL⁻¹ e 54,289 µg mL⁻¹, respectivamente. Como os valores observados de CL₅₀ foi 2,664 µg mL⁻¹ e CL₉₀ 13,535 µg mL⁻¹ o fator de sinergismo (FS), que relaciona a concentração letal observada com a esperada, foi inferior a 1 tanto no cálculo de CL₅₀ quando de CL₉₀, comprovando que a combinação foi mais eficiente do que se esperava (Tabela 3).

Hipoteticamente, o efeito sinérgico entre proteínas ocorre por decorrência da falta de afinidade pelos mesmos receptores ou pela oligomerização entre as proteínas, melhorando sua capacidade de ligação e consequentemente, potencializando a atividade tóxica das proteínas (LEE et al., 1996; CHAKRABARTI et al., 1998).

Tabela 3. Suscetibilidade de larvas de *A. grandis* sobre a interação das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 de *B. thuringiensis*.

Combinação de proteína	Proporção	b±SE ⁽¹⁾	CL ₅₀ ⁽²⁾			CL ₉₀ ⁽²⁾		
			Observada	Esperada	FS	Observada	Esperada	FS
Cry1Ia+Cry8	1:1	2,61±0.222	2,664	2,744	0,971	13,535	54,289	0,249

⁽¹⁾ Coeficiente angular da reta ± Erro Padrão.

⁽²⁾ Concentração letal de 50 % e 90 % observada e esperada, com intervalo de confiança 95 %.

A mistura de toxinas de *B. thuringiensis*, normalmente é testada frente ao inseto praga para avaliar a contribuição no controle dos insetos suscetíveis, seja em pulverização ou expressos em plantas Bt. Porém, nem sempre a combinação entre duas ou mais proteínas atingem resultados positivos e favoráveis, podendo-se observar sinergismo ou efeito antagônico (LEMES et al., 2014). Sabendo disso, a escolha combinatória entre os genes que codificam a proteína é de suma importância para a construção de plantas piramidadas, uma vez que o objetivo é aumentar a eficiência da tecnologia no controle de pragas e retardar o desenvolvimento de insetos resistentes.

O sinergismo entre proteínas pode ocorrer por consequência dos diferentes modos de ação entre as proteínas ou também por possíveis interações entre as mesmas. Em trabalhos anteriores podemos observar sinergismo entre proteínas de *B. thuringiensis* contra o coleóptero *Plutella xylostella* entre toxinas Cry1 e Cry9. A combinação entre duas proteínas Cry1 (Cry1Ai + Cry1Ea) revelou efeito aditivo, já a combinação entre as subclasses (Cry1Ai + Cry9Aa e Cry1Ea + Cry9Aa) o efeito sinérgico foi expressivo no controle de *P. xylostella* (CAI et al., 2013).

Em insetos da ordem Lepidoptera, Bergamasco et al. (2013) avaliaram a interação entre toxinas de *B. thuringiensis* em *S. frugiperda*, *Spodoptera albula*, *Spodoptera cosmioides* e *Spodoptera eridania*. A combinação entre as proteínas inseticidas Cry1Ia10 e Vip3Aa foi sinérgica para lagartas de *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* enquanto que em larvas de *S. eridania* a combinação caracterizou-se por um efeito antagônico.

A eficiência de uma combinação de proteínas não pode ser estimada através da eficiência individual de cada toxina que compõe a mistura. Nem sempre a combinação de duas proteínas altamente tóxica é potencializada ao atuarem em conjunto, neste caso denomina-se antagonismo. No entanto, quando a mistura é mais tóxica que as proteínas individuais, denomina-se sinergismo.

O sinergismo normalmente está relacionado com a formação de mais e maiores poros na membrana do intestino do inseto se as proteínas possuírem diferentes receptores, este caso foi relatado por Lee et al. (1996) que ao demonstrarem o efeito sinérgico entre as proteínas Cry1Ac e Cry1Aa em lagartas de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) com a formação de poros maiores do que aqueles provocados pelas proteínas individuais. Outra explicação para o efeito sinérgico é hipótese de que proteínas Cry são capazes de formarem hetero-oligômeros que se inserem com maior eficiência na membrana do que homo-oligômeros correspondentes (PARDO-LÓPEZ; SOBERÓN; BRAVO, 2015). Com a melhor inserção de oligômeros na membrana epitelial, maior é a mortalidade do inseto.

Neste trabalho, pode-se observar que o sinergismo das proteínas Cry1a10 e Cry8 foi mais notável em CL₉₀ do que em CL₅₀. Como as doses para controlar o inseto no campo são mais próximas da CL₉₀ a combinação sugerida para o controle de *A. grandis* é uma alternativa viável para a composição de plantas geneticamente modificadas ou até mesmo na fabricação de inseticida para pulverização com esporos de *B. thuringiensis*.

6. CONCLUSÃO

1. As análises filogenéticas realizadas com sequências de proteínas Cry8 revelam que a proteína Cry8 clonada neste trabalho possui elevada proximidade evolutiva com a proteína Cry8Pa2, sugerindo que a nova sequência de aminoácidos receba a nomenclatura Cry8Pa3.
2. Larvas neonatas de *Anthonomus grandis* apresentam elevada suscetibilidade as proteínas Cry1Ia10 e Cry8.
3. A combinação de proteínas Cry1Ia10 + Cry8 potencializa o controle de larvas neonatas de *A. grandis*, uma vez que tais proteínas atuam em sinergismo frente ao inseto.
4. A piramidação das proteínas Cry1Ia10 e Cry8 em plantas de algodão geneticamente modificadas são de interesse agrônomo.

7. REFERÊNCIAS

AKAIKE H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. **Petrov BN**, Csaki F. eds. Second. 1973.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. L. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARANTES, O.M.N. **Caracterização molecular do Gene Delta-Endotoxina, sua clonagem e transformação em *Bacillus thuringiensis* Berliner**. 124p Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piraciaba, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO – ABPA. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva do Algodão e Seus Derivados. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/algodao/2017/48/abrpa_safr-16-17-e-estimativa-17-18.pdf>. Acesso em 15 de Abr. de 2018.

BERGAMASCO, V. B.; GONÇALVES, J. F.; POLANCZYK, R. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. Expression of a new *Bacillus thuringiensis cry1Ia* gene in *Escherichia coli* Strong Activity Against Cotton Pests. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5(12), p.526-533, 2011.

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.

BI, Y.; ZHANG, Y.; SHU, C.; CRICKMORE, N.; WANG, Q.; DU, L.; SONG, F.; ZHANG, J. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to *Scarabaeoidea* larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 99, p.753–760, 2015. DOI: 10.1007/s00253-014-5966-2

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. Different Models of the Mode of Action of Bt 3d-Cry Toxins. In: SOBERÓN M.; GAO Y.; BRAVO A. (Eds.). **Bt Resistance-Characterization and Strategies for GM Crops producing *Bacillus thuringiensis* Toxins**, Boston: CABI Biotechnology, p. 138-149, 2015.

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

BRAVO, A.; PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; GARCIA-GÓMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERÓN, M. Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action. In FIUZA, L. M.; POLANCZYK, R. A.; CRICKMORE, N. ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***. Characterization and use in the field of biocontrol (Ed.). Cap.4, p. 53-66, 2017.

CAI, J.; SHU, C.; SONG, F.; HUANG, B.; ZHANG, J. Screening of synergistic combination between Cry1 and Cry9 toxins against *Plutella xylostella*. **Plant Protection**, Polônia, 2013.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Séries históricas**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>>. Brasília, DF, 2017. Acesso em: 02 de dez. de 2017

COSTA, E. L. N.; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; FIUZA, L. M. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 38, 2009.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature". Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>>, 2016.

DUHRUA, S.; GUJAR, G. T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the Pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera; Gelechiidae), from India. **Pest Manag Sci**, Sussex, v. 67, n.8, p. 898-903, 2011.

EMBRAPA - Meio Ambiente. **Algodão Bt**. Jaguariúna. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=bioss:::23>>. Acesso em: 1 dez. 2017.

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**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37 (2), p. 97-106, 2007.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1992.

FERRAZ, R. L. S. **CRESCIMENTO, FISIOLOGIA E PRODUÇÃO DO ALGODOEIRO SOB EFEITO DO SILÍCIO VIA FOLIAR**. 130 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Agrárias, Agrobioenergia e Agricultura Familiar, Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, Campina Grande, 2012.

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

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM): **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs**, p.41-85, 2008.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971

FIUZA, L.M. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.38, p.32-35, 2010.

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

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-evolved resistance to *Bt* maize by Western Corn Rootworm. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 7, e22629, 2011.

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

GÓMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; MATUS, V.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, v. 459, p. 383-396, 2014.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; QUEZADO DE MAGALHAES, M.; SILVA, M. S.; SILVA, S. M.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y.; BRUNETTA, P. S.; OLIVEIRA, G. R.; NETO, O. B.; SAMPAIO DE OLIVEIRA, R.; SOARES, L. H.; AYUB, M. A.; SIQUEIRA, H. A.; FIQUEIRA, E. L. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cry1ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Wilmington, v. 5, p. 773-782, 2007.

GUO, S.; YE, S.; LIU, Y.; WEI, L.; XUE, J.; WU, H.; SONG, F.; ZHANG, J.; WU, X.; HUANG, D.; RAO, Z. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 168, p. 259-266, 2009. DOI: 10.1016/j.jsb.2009.07.004

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Fealq, p. 383-446, 1998.

HALL, T. A. Bioedit: a user-frindly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. (ver.7.0.9.0.2007). **Nucleic Acids Symposium Series**. v 41, p. 95-98, 1999.

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

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.107, p.219–225, 2009.

INSTITUTO MATO-GROSSENSE DE ECONOMIA AGROPECUARIA - IMEA. **Custo de produção de Algodão safra 2015/16**, Cuiabá, 4p, 2016. 4 p. Boletim semanal.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009 the first fourteen years, 1996 to 2009. **ISAAA Brief**, 41p, 2009.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Bioinformatics**, v. 8, nº 3, p. 275-282, 1992.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of T4 bacteriophage. **Nature**, New York, v. 227, p. 680-681, 1970.

LEE, M. K., CURTISS, A., ALCANTARA, E. A., DEAN, D. H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 583–586, 1996.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J. E.; GASCUEL, O. SMS: Smart model selection in PhyML. **Molecular biology and evolution**, v. 34, nº 9, p. 2422-2424, 2017.

LEMES, A. R. M. **Proteínas Cry1 e Vip3 de *Bacillus thuringiensis*: Sinergismo e efeito sub-letal no controle de *Heliothis virescens***. 76p. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas, Unesp, Jaboticabal, 2012.

LEMES, A. R. N.; DAVOLOS, C. C.; LEGORI, P. C. B. C.; FERNANDES, O. A.; FERRÉ, J.; LEMOS, M. V. F.; DESIDERIO, J. A. Synergism and Antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, San Francisco v. 9. 2014. DOI:10.1371/journal.pone.0107196

LERECLUS, D.; BOURGOIN, C.; LECADET, M. M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. R. Structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal delta-

toxins of *Bacillus thuringiensis*. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R. A.; SETLOW, P. (Ed.). **Regulation of prokaryotic development**, Washington: American Society for Microbiology. p. 255-276, 1989.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J.; HIGGS, S. (Ed.). ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 37-70, 1993.

LI, H.; LIU, R.; SHU, C.; ZHANG, Q.; ZHAO, S.; SHAO, G.; ZHANG, X.; GAO, J.; Characterization of one novel cry8 gene from *Bacillus thuringiensis* strain Q52-7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.30, p.3075–3080, 2014. DOI: 10.1007/S11274-014-1734-9.

MARTINS, E. S.; MONENERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M. **Estudo da atividade de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas contra inseto –praga do algodoeiro**. 161p. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Molecular, UnB, Brasília, 2009.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; SONE, E. H.; WAGA, I. C.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, F.; MONNERAT, R. G. **Estudo da atividade e caracterização bioquímica e molecular de estirpes de bacillus thuringiensis tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis bohemian*, 1983)**, Brasília: Embrapa, 2005.

MARUCCI, S. C. **Interação de proteínas Vip3A e Cry1Ia10 de *Bacillus thuringiensis* com atividade inseticida a lepidópteros-praga**. 81p. (Tese) Doutorado – Curso de Agronomia, Genética e melhoramento de plantas, UNESP, Jaboticabal, 2015.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees". **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, New Orleans, p. 1 – 8, 2010.

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

NGUYEN, L. T.; SCHIMIDT, H.; HAESELER, A. V.; MINH, B. Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n° 1, p. 268-274, 2014.

OLIVEIRA, G. R. **Evolução *in vitro* de moléculas cry ativas contra *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda***. 106p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; MOURA, H. F. N.; MACEDO, L. L. P.; ARRAES, F. B. M.; LUCENA, W. A.; LORENÇO-TESSUTTI, I. T.; BARBOSA, A. A. de D.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transgenic Cotton Plants Expressing Cry1la12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00165

PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓ, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiology**. v. 37, p. 3–22. 2013.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 34p, 2003.

PRAÇA, L. B.; SOARES, E. M.; MELATTI, V. M.; MONNERAT, R. G. ***Bacillus thuringiensis* Berliner (Eubacteriales: Bacillaceae): Aspectos Gerais, modo de ação e utilização**. Documento 239. Embrapa. Brasília, DF. 2007.

RAMBAUT, A. FigTree (ver 1.3.1). Tree Figure Drawing Tool. **Institute of Evolutionary Biology**. University of Edinburgh, 2009.

RIBEIRO, T. P.; ARRAES, F. B. M.; LOURENÇO-TESSUTTI, I. T.; SILVA, M. S.; LISEI-DE-SÁ, M. E.; LUCENA, W. A.; MACEDO, L. L. P.; LIMA, J. N.; SANTOS AMORIM, R. M.; ARTICO, S.; ALVES-FERREIRA, M.; MATTAR SILVA, M. C.; GROSSI-DE-SA, M. F. Transgenic cotton expressing Cry10Aa toxin confers high resistance to the cotton boll weevil. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 15(8), p. 997-1009, 2017. DOI: 10.1111/pbi.12694

RONQUIST, F.; TESLENKI, M.; MARK, P. V. D.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HOHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A. HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n° 3, p. 539-542, 2012.

ROSSI, J. R. **Novo gene *cry8* de *Bacillus thuringiensis*: Caracterização e avaliação da patogenicidade ao bicudo da cana-de-açúcar, *Sphenophorus levis vaurie* (Coleoptera: curculionidae)**. 115p. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas, Unesp, Jaboticabal, 2011.

SANTOS, R. C. dos. Estudos biológicos e moleculares da colesterol oxidase visando o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). **Editora da Universidade de Brasília**, Brasília, 2003.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, D.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H.; *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62(3), p. 775-806, 1998.

SHU, C.; YU, H.; WANG, R.; FEN, S.; SU, X.; HUANG, D.; ZHANG, J.; SONG, F. Characterization of Two Novel *cry8* Genes from *Bacillus thuringiensis* Strain BT185. **Current Microbiology**, New York, v.58, p. 389–392, 2009. DOI: 10.1007/s00284-008-9338-y

SOBERON, M.; PARDO, L.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; GOMEZ, I.; PORTA, H.; BRAVO, A. Pore formation by Cry toxins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 677, p. 127-142, 2010.

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

STÖVER, B. C.; MÜLLER, K. F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. **BMC Bioinformatics**, v.11(7), 2010.

STUDIER, F. W.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; DUBENDORFF, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Method. Enzymol**, Amsterdam, v. 185, p. 60-89, 1990.

TABASHNIK, B. E.; ZHANG, M.; FABRICK, J. A.; WU, Y.; GAO, M.; HUANG, F.; WEI, J.; ZHANG, J.; YELICH, A.; UNNITHAN, G. C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; CARRIÈRE, Y.; LI, X. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, London, v.5, p. 15107, 2015. DOI: 10.1038/srep15107

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

TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Evolution of insect resistance to transgenic plants. In TILMON, K. J. (Ed.). **Specialization, speciation, and radiation**. The evolutionary biology of herbivorous insects. University of California Press, 2008.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J.; HECKEL, D. G.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nature Biotechnology**, London, n. 29, p. 1128-1131, 2011.

THOMAZONI, D.; SORIA, M. F.; PEREIRA, E. J. G.; DEGRANDE, P. E. *Helicoverpa armigera*: perigo iminente aos cultivos de algodão, soja e milho do estado de Mato Grosso. **IMAmt, Circular Técnica**, Primavera do Leste, Instituto Mato-grossense do Algodão, v.5, p.1-12, 2013.

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

WANG, P.; ZHAO, J. Z.; RODRIGO-SIMÓN, A.; KAIN. W.; JANMAAT, A. F; SHELTON, A. M.; FERRÉ, J.; MYERS, J. Mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a greenhouse population of cabbage looper, *Trichoplusia ni*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 4, p. 1199-1207, 2007.

WARREN, G.W. Vegetative insecticidal proteins: Novel proteins for control of corn pests. In: **Carozzi N, Koziel M (eds), Advances in insect control: The role of transgenic plants**. London, UK: Taylor and Francis Ltd. p. 109-121, 1997.

WATKINS, P. R.; HUESING, J. E.; MARGAM, V.; MURDOCK, L. L.; HIGGINS, T. J. V. Insects, nematodes, and other pests. **Plant Biotechnology and Agriculture**. p. 353-370, 2012.

WEI, W.; WEI, G.; DAN, Z.; XIAOPING, Y.; YAKUN, Z. Characterization of a novel Cry8Ea3-binding V-ATPase Subunit A in *Holotrichia parallela*. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2016. DOI: 10.4238/gmr.15038994

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). International programme on chemical safety. Environmental health criteria 217: **Microbial Pest Control Agent Bacillus thuringiensis**. Geneva. 1999.

WIENS J. J. Missing data and the design of phylogenetic analyses. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 39, p. 34–42, 2006.

YAMAGUCHI, T.; SAHARA, K.; BANDO, H.; ASANO, S. Discovery of a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8D protein and the unique toxicity of the Cry8D-class proteins against scarab beetles. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 99, p. 257-262, 2008. DOI: 10.1016/j.jip.2008.05.009

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

ZHU, J.; LI, P.; ZHENG, A.; YIN, C.; WANG, S.; DENG, Q.; LI, S.; WANG, L.; LIU, H. HN. **Bacillus thuringiensis ST8, insecticidal genes thereof and applications thereof**. CN. Pat. 102363760B. 2011. 16p, 2011