

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

POTENCIAL SINÉRGICO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS DE
***Bacillus thuringiensis* E DE *Pseudomonas* spp. NO**
MANEJO DA RESISTÊNCIA DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO

Jardel Diego Barbosa Rodrigues

Engenheiro Agrônomo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**POTENCIAL SINÉRGICO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS DE
Bacillus thuringiensis E DE *Pseudomonas* spp. NO
MANEJO DA RESISTÊNCIA DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO**

Jardel Diego Barbosa Rodrigues

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

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

2022

R696p Rodrigues, Jardel Diego Barbosa
Potencial sinérgico de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* e de *Pseudomonas* spp. no manejo da resistência do Bicudo-do-algodoeiro / Jardel Diego Barbosa Rodrigues. -- Jaboticabal, 2022
89 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Janete Aparecida Desidério

1. Bicudo-do-algodoeiro. 2. Toxinas bacterianas. 3. Proteínas recombinantes. 4. Biotecnologia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

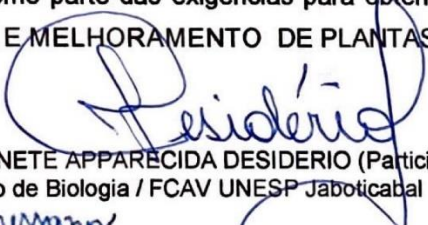
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: POTENCIAL SINÉRGICO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* E DE *Pseudomonas* spp. NO MANEJO DA RESISTÊNCIA DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO

AUTOR: JARDEL DIEGO BARBOSA RODRIGUES

ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

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




Prof.ª Dr.ª JANETE APPARECIDA DESIDERIO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV UNESP Jaboticabal



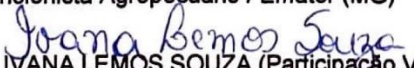
Dra. KEINI DRESSANO (Participação Virtual)
Controle Biológico / Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) - Piracicaba/SP



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dr. RENATO FARINACIO (Participação Virtual)
Extensionista Agropecuário / Emater (MG)



Dra. IVANA LEMOS SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 20 de junho de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jardel Diego Barbosa Rodrigues, nascido em 07 de agosto de 1989, em Belém, PA. Filho de José Joaquim Rodrigues e Anny Shirley Monteiro Barbosa Rodrigues. Iniciou seus estudos em Agronomia pela Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Campus de Belém-PA, onde se graduou em Engenharia Agrônômica, no mês de janeiro de 2016. Foi bolsista de iniciação científica (IC) de 2013 a 2016 na própria instituição de ensino e na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental), localizada em Belém-PA. Desenvolveu pesquisas relacionadas a Agrometeorologia, a Ciência do Solo e ao Melhoramento Genético da cultura do cupuaçuzeiro. Em 2016, ingressou como aluno regular no curso de Mestrado do programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) Campus de Jaboticabal, na qual foi inicialmente contemplado com bolsa do programa – CAPES e posteriormente com bolsa FAPESP. Sua dissertação e trabalhos de pesquisa contaram com o apoio da Estação Experimental de Citricultura de Bebedouro (EECB). Posteriormente, em 2018 iniciou o doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) Campus de Jaboticabal, onde desenvolveu a presente tese, com o apoio Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologias Aplicada (LGBBA).

A meus queridos pais, José Rodrigues e Anny Rodrigues, e avós (*in memoriam*), a quem tenho certeza que jamais poderei retribuir todo o apoio, incentivo e ensinamentos que me foram transmitidos durante minha formação pessoal e acadêmica.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida e amparo nos momentos difíceis.

Aos meus familiares que contribuíram na construção dos meus valores e por todo apoio que sempre deram às minhas decisões.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, pela orientação, incentivo, amizade e confiança em mim depositada, além de toda contribuição valiosa em minha formação durante a transmissão de seus conhecimentos em aulas, as quais tive a oportunidade de participar e colaborar.

Ao professor Dr. José Roberto Postalí 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;

Ao Prof. Jackson Antônio Marcondes de Souza, Prof. Dr. Arlindo Leal Boiça Junior, Dra. Keini Dressano, Dr. Renato Farinacio e Dra. Ivana Lemos Souza, pelas correções, contribuições e sugestões no trabalho;

Aos meus grandes e queridos amigos Bruno Barbosa, Raquel Oliveira Moreira, Maria Helena Zanetti, Maria Carolina Macario Cordeiro, Thais Nayara Ferreira dos Santos e Higor de Oliveira Alves, pela cumplicidade, pelo convívio no dia-a-dia, deixando a rotina do laboratório bem mais leve, além de preencherem a saudade de casa, sendo minha segunda família;

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

Aos técnicos do laboratório LGBBA Rodrigo Takeshi Uchiyama e Gustavo Henrique de Campos que se dedicaram em me auxiliar na realização deste projeto;

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da FCAV/UNESP 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;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de

Financiamento 001. Gostaria de agradecer à essa instituição pela bolsa de estudo concedida no primeiro semestre do programa.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho e àqueles que, por qualquer razão, não foram mencionados.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Cotonicultura	4
2.2. <i>Anthonomus grandis</i> Boheman, 1843	5
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	8
2.5. Plantas geneticamente modificadas com genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> e <i>Pseudomonas</i> spp. para controle de insetos-praga	17
2.6. Resistência de insetos-praga às proteínas de <i>B. thuringiensis</i>	19
2.7. <i>Pseudomonas</i> spp.	20
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Geral.....	23
3.2. Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. População de inseto	24
4.5. Confirmação dos clones obtidos a partir das transformações bacterianas.....	27
4.6. Fonte de proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
4.7. Indução da expressão dos genes de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus thuringiensis</i>	31
4.8. Análise das proteínas por SDS-PAGE	32
4.9. Purificação das proteínas	33
4.10. Filtração em Amicon Ultra 30 kDa.....	33
4.11. Análise <i>in silico</i> de alinhamento das sequências das proteínas de <i>Pseudomonas</i> spp.....	34
4.12. Bioensaio seletivo contra <i>A. grandis</i>	34
4.13. Bioensaios com <i>A. grandis</i> para estimar as CL ₅₀ e CL ₉₀	34
4.14. Ensaio de interações entre as proteínas frente a <i>A. grandis</i>	36
5. RESULTADOS	38
5.1. Amplificação dos genes <i>IPD072Aa</i> , <i>PIP-47Aa</i> e <i>Cry3Aa</i> por PCR.....	38

5.2. Confirmação das clonagens dos genes <i>IPD072Aa</i> , <i>PIP-47Aa</i> e <i>Cry3Aa</i> por PCR.....	39
5.3. Expressão das proteínas.....	40
5.4. Concentração das proteínas em filtro Amicon.....	40
5.5. Quantificação das proteínas.....	41
5.6. Alinhamento <i>in silico</i> das sequências nucleotídicas e de aminoácidos das proteínas de <i>Pseudomonas</i> spp.....	43
5.7. Mortalidade de <i>A. grandis</i> a uma concentração padrão das proteínas.....	44
5.8. Atividade inseticida contra <i>A. grandis</i>	45
5.9. Efeito de combinações entre as toxinas na taxa de mortalidade.....	46
5.10. Análise de sinergismos em <i>A. grandis</i> em ensaios de concentração-resposta.....	48
5.11. Avaliação das parcelas dos bioensaios.....	50
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

POTENCIAL SINÉRGICO DE PROTEÍNAS INSETICIDAS DE *Bacillus thuringiensis* E DE *Pseudomonas* spp. NO MANEJO DA RESISTÊNCIA DO BICUDO-DO-ALGODOEIRO

RESUMO – A produtividade da cultura do algodoeiro é afetada, em grande parte, pelo ataque de sua principal praga o *Anthonomus grandis*. Embora proteínas produzidas por *Bacillus thuringiensis* (Bt) possam limitar a infestação de insetos, algumas populações vêm desenvolvendo resistência a estas proteínas. Um dos métodos alternativos para esta finalidade tem sido a utilização de certas espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas* que apresentam eficiência no controle de insetos da ordem Coleoptera por apresentarem proteínas inseticidas altamente tóxicas. Assim, objetivou-se avaliar a toxicidade das proteínas, IPD072Aa e PIP-47Aa, isoladas de *Pseudomonas* spp. em interação com as proteínas Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 de *B. thuringiensis*, visando o controle de *A. grandis* na cultura do algodoeiro. Os genes IPD072Aa, PIP-47Aa, foram sintetizados e clonados no vetor de expressão pET-SUMO, e as proteínas Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 foram obtidas a partir da indução de clones de *E. coli* recombinantes, obtidos previamente por nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA). As proteínas produzidas foram visualizadas em SDS-PAGE, quantificadas e incorporadas à dieta artificial, para estimar, por meio de bioensaios, as Concentrações Letais (CL) das cinco proteínas testadas individualmente e em conjunto. Os resultados das avaliações de toxicidade individuais revelaram que as proteínas IPD072Aa, PIP-47Aa, Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 apresentaram eficiência no controle de *Anthonomus grandis*, sendo as proteínas Cry3Aa e Cry8 a mais tóxicas. Com relação aos ensaios de interações, uma alta interação sinérgica foi observada na combinação entre Cry1Ia10 com Cry3Aa. Todas as interações envolvendo as proteínas Cry3Aa e PIP-47Aa, quando combinadas com as demais proteínas, apresentaram um claro efeito sinérgico. Os resultados mostraram que as combinações das proteínas testadas, em sua maioria, aumentam a toxicidade contra larvas neonatas de *A. grandis*, sugerindo novas construções para a piramidação de plantas do algodoeiro visando o controle do bicudo e o manejo de possível surgimento de resistência por este inseto.

Palavras-chave: *Anthonomus grandis*, Bactérias esporulantes e não-esporulantes, Controle biológico, Sinergismo, Toxinas inseticidas

SYNERGIC POTENTIAL OF INSECTICIDAL PROTEINS FROM *Bacillus thuringiensis* AND *Pseudomonas* spp. IN RESISTANCE MANAGEMENT OF THE COTTON BOLL WEEVIL

ABSTRACT – The productivity of cotton is largely affected by the attack of its main pest, *Anthonomus grandis*. Although proteins produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt) can limit insect infestation, some populations have developed resistance to these proteins. One of the alternative methods for this purpose has been the use of certain species of bacteria of the genus *Pseudomonas* that are efficient in controlling insects of the order Coleoptera because they present highly toxic insecticidal proteins. Thus, the objective was to evaluate the toxicity of proteins, IPD072Aa and PIP-47Aa, isolated from *Pseudomonas* spp. in interaction with proteins Cry1Ia10, Cry3Aa and Cry8 of *B. thuringiensis*, aiming the control of *A. grandis* in the cotton crop. The IPD072Aa, PIP-47Aa genes were synthesized and cloned into the pET-SUMO expression vector, and the Cry1Ia10, Cry3Aa and Cry8 proteins were obtained from the induction of recombinant *E. coli* clones, previously obtained by our research group at Laboratory of Bacterial Genetics and Applied Biotechnology (LGBBA). The proteins produced were visualized on SDS-PAGE, quantified and incorporated into the artificial diet, to estimate, by means bioassays, the Lethal Concentrations (LC) of the five proteins tested individually and together. The results of individual toxicity evaluations revealed that the proteins IPD072Aa, PIP-47Aa, Cry1Ia10, Cry3Aa and Cry8 were efficient in controlling *Anthonomus grandis*, with the proteins Cry3Aa and Cry8 being the most toxic. Regarding the interaction assays, a high synergistic interaction was observed in the combination between Cry1Ia10 and Cry3Aa. All interactions involving the proteins Cry3Aa and PIP-47Aa, when combined with the other proteins, showed a clear synergistic effect. The results showed that the combinations of the proteins tested, for the most part, increase the toxicity against neonate larvae of *A. grandis*, suggesting new constructions for the pyramiding of cotton plants aiming at the control of the boll weevil and the management of possible emergence of resistance by this insect.

Keywords: *Anthonomus grandis*, Sporulating and non-sporulating bacteria, Biological control, Synergism, Insecticidal toxins

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Anthonomus grandis* em seu estágio adulto na coloração castanho-ferruginosa.....6
- Figura 2.** Ciclo de vida do Bicudo do Algodoeiro. Os ovos são individualmente depositados no interior de botões florais ou de maçãs. Após a eclosão, as larvas desenvolvem-se no interior da planta, até o estágio de pupa. Os adultos podem acasalar e ovipositar em apenas 4 dias após a emergência.....7
- Figura 3.** Esporos e inclusões proteicas cristalinas de *B. thuringiensis*. (A) microscopia de contraste de fase, (B) microscopia eletrônica de varredura.....9
- Figura 4.** Representação esquemática das estruturas das toxinas Cry.....11
- Figura 5.** Estrutura primária e terciária das toxinas Cry. (a) Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. As regiões coloridas correspondem às sequências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à porção da toxina ativa. (b) Estrutura tridimensional de uma toxina ativada, Cry1Aa. O domínio I (azul) está envolvido na inserção da membrana e na formação de poros. O domínio II (verde) e o domínio III (amarelo-vermelho) estão envolvidos no reconhecimento e ligação do receptor. O bloco conservado 1 está na hélice central do domínio I, o bloco 2 está na interface do domínio I-II, o bloco 3 está na fronteira entre os domínios II e III, o bloco 4 está na fita central do domínio III e o bloco 5 é no final do domínio III.....13
- Figura 6.** Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen®).....25
- Figura 7.** Materiais usados nos bioensaios. (A) Larvas neonatas de *A. grandis* para a execução e avaliação dos bioensaios. (B) Bandeja de poliestireno de 128 poços. (C) Bandeja contendo dieta artificial incorporada com proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* contendo filme de vedação onde as larvas permaneceram em ambiente controlado durante 7 dias.....35
- Figura 8.** Eletroferograma da amplificação por PCR dos genes de *Pseudomonas* spp. e *B. thuringiensis*. (A) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = IPD072Aa (261 pb); 2 = PIP-47Aa (888 pb); 3 = Controle negativo da reação. (B) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = Cry3Aa (1935 pb); 2 = Controle negativo da reação.....38

Figura 9. Eletroferograma para a confirmação da clonagem dos genes dos genes de *Pseudomonas* spp. e *B. thuringiensis* na orientação correta em relação ao promotor de expressão do vetor pET SUMO, Amplificação com os oligonucleotídeos antisenso específicos de cada gene e o oligonucleotídeo SUMO F. (A) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = IPD072Aa; 2 = PIP-47Aa; 3 = Controle negativo da reação. (B) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 a 10 = clones com o gene *Cry3Aa*; 11 = Controle negativo da reação.....**39**

Figura 10. Detecção das proteínas purificadas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* em gel de SDS-PAGE 12%. MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = IPD072Aa; 2 = PIP-47Aa; 3 = Cry1Ia10; 4 = Cry3Aa; 5 = Cry8.....**40**

Figura 11. Perfil proteico das proteínas purificadas e concentradas após filtragem em Amicon Ultra 30kDa (Millipore). MM = Marcador Molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = Cry3Aa; 2 = Cry8; 3 = Cry1Ia10; 4 = IPD072Aa; 5 = PIP-47Aa.....**41**

Figura 12. Detecção e quantificação das proteínas purificadas em gel de SDS-PAGE 12% por meio da curva de soroalbumina bovina (BSA). MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = BSA (0,88 mg mL⁻¹); 2 = BSA (0,44 mg mL⁻¹); 3 = BSA (0,22 mg mL⁻¹); 4 = BSA (0,11 mg mL⁻¹); 5 = BSA (0,05 mg mL⁻¹); 6 = Proteína IPD072Aa (1,95 mg mL⁻¹); 7 = Proteína PIP-47Aa (2,25 mg mL⁻¹).....**42**

Figura 13. Detecção e quantificação das proteínas purificadas em gel de SDS-PAGE 12% por meio da curva de soroalbumina bovina (BSA). MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = BSA (0,88 mg mL⁻¹); 2 = BSA (0,44 mg mL⁻¹); 3 = BSA (0,22 mg mL⁻¹); 4 = BSA (0,11 mg mL⁻¹); 5 = BSA (0,05 mg mL⁻¹); 6 = Proteína Cry1Ia10 (0,38 mg mL⁻¹); 7 = Proteína Cry3Aa (0,33 mg mL⁻¹); 8 = Cry8 (0,35 mg mL⁻¹).....**42**

Figura 14. Análise de similaridade entre a sequência de nucleotídeo das proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa através da ferramenta Geneious Prime® 2022.1.1. Os nucleotídeos destacados em cinza são os que se conservam entre as sequências avaliadas.....**43**

Figura 15. Análise de alinhamento entre a sequência de aminoácidos das proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa através da ferramenta Geneious Prime® 2022.1.1. Os aminoácidos destacados em cinza são os que se conservam entre as sequências avaliadas.....**44**

Figura 16. Avaliação das parcelas dos bioensaios com *A. grandis*. (A) Parcela controle após 7 dias. (B) Parcela que recebeu a concentração de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína IPD072Aa. (C) Parcela que recebeu a concentração de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína PIP-47Aa. (D) Parcela que recebeu a concentração de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína Cry1Ia10. (E) Parcela que recebeu a concentração de 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína Cry3Aa. (F) Parcela que recebeu a concentração de 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína Cry8.....**50**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes utilizados no preparo da dieta artificial para manutenção das larvas de <i>A. grandis</i>	24
Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>IPD072Aa</i> e <i>PIP-47Aa</i> de isolados de <i>Pseudomonas</i> spp.....	28
Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>Cry3Aa</i> isolado de <i>Bacillus thuringiensis</i>	29
Tabela 4. Combinações testadas nos bioensaios com proteínas de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
Tabela 5. Ensaios de seleção das proteínas de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus thuringiensis</i> normalizadas a uma concentração padrão de 500 µg mL ⁻¹ sobre larvas neonatas de <i>Anthonomus grandis</i>	44
Tabela 6. Estimativa das concentrações letais (CL ₅₀ e CL ₉₀) das proteínas de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus thuringiensis</i> larvas neonatas de <i>Anthonomus grandis</i>	45
Tabela 7. Mortalidade de larvas neonatas de <i>Anthonomus grandis</i> a toxinas de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus thuringiensis</i> analisadas de forma isoladas e combinadas.....	47
Tabela 8. Interações entre as proteínas de <i>Pseudomonas</i> spp. e <i>Bacillus thuringiensis</i> no controle de larvas neonatas de <i>A. grandis</i>	49

1. INTRODUÇÃO

A cultura do algodoeiro tornou-se nos últimos anos uma das principais “commodities” brasileiras, resgatando o país da condição de importador para a de exportador de seu principal produto utilizado na indústria têxtil, a pluma. Diante do bom desempenho das cotações da pluma, tanto no mercado interno quanto no externo, os produtores nacionais decidiram intensificar os investimentos no cultivo de algodão. De acordo com o IBGE (2022), o Brasil na safra de 2021/2022 deverá alcançar cerca de 1,53 milhões de hectares de área cultivada de algodão, um crescimento de 10,9% em relação aos 1,38 milhões de hectares efetivados na safra passada. No entanto, a produtividade da cultura é afetada pelo ataque do *Anthonomus grandis*, que é atualmente a praga de maior importância da cotonicultura brasileira.

No Brasil, é adotado o manejo integrado de pragas (MIP), porém o controle químico ainda é um dos métodos mais utilizados. O uso exagerado destes compostos contribui para o aumento nos custos de produção, podendo representar até 25% (EMBRAPA, 2022), além de contribuir para danos ao meio ambiente. Por estes motivos, tem-se intensificado o desenvolvimento de novas estratégias e métodos alternativos para o controle biológico de pragas agrícolas para que se consiga promover a redução da quantidade de agrotóxicos lançados ao meio ambiente. Desta forma, o uso de inseticidas biológico e plantas geneticamente modificadas (GM) estão avançando no mercado global e ganhando cada vez mais espaço nas lavouras.

A bactéria mais utilizada no controle de numerosos insetos-praga é a espécie *Bacillus thuringiensis* (BERLINER, 1915). A principal característica desta bactéria é a produção de inclusões cristalinas de natureza proteica durante a fase de esporulação denominada de proteínas Cry ou δ -endotoxinas (BRAVO et al., 2017). Essas proteínas são altamente específicas aos insetos alvos e constituem a base de diferentes produtos utilizados como inseticida biológico (TABASHINIK et al., 2015). Ao ingerir tais proteínas, o elevado pH intestinal da larva suscetível ativa a protoxina que se liga a receptores específicos, induzindo lesões que destroem as células intestinais e levam o inseto à morte por inanição alimentar (BRAVO et al., 2017).

Grande parte das plantas geneticamente modificadas possuem genes de *B. thuringiensis* que codificam proteínas com ação inseticida, sendo o algodão Bt o terceiro Organismo Geneticamente Modificado (OGM) resistente a insetos mais

cultivado no mundo (ISAAA, 2022a). 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), Bollgard™ III (cry1Ac + cry2Ab2 + vip3Aa), WideStrike™ (Cry1Ac + Cry1Fa), TwinLink™ (Cry1Ab + Cry2Ae) e VIPCOT™ (cry1Ab + vip3Aa) (ISAAA, 2022b).

A utilização em larga escala e quase que exclusivamente de *B. thuringiensis*, seja na sua utilização como biopesticida e principalmente pela expressão de suas proteínas inseticidas em plantas transgênicas, fez surgir, como consequência, sucessivos casos de evolução de resistência (LIU et al., 2010; STORER et al., 2010; GASSMANN et al., 2011; FARIAS et al., 2014; GASSMANN et al., 2014; JAKKA et al., 2016). Há ainda o agravante da ocorrência de resistência cruzada (BERNARDI et al., 2015). Todos estes relatos de surgimento de resistência nos colocam diante da necessidade de identificar novas moléculas que sejam amplamente eficazes, e que apresentem modo de ação diferente daquelas de *B. thuringiensis*, no sentido de interagirem com diferentes receptores no intestino das larvas, e que possam ser utilizadas com segurança contra as conhecidas e emergentes pragas agrícolas (LABREUCHE et al., 2017).

Nesse sentido, com o intuito de diversificar a utilização de método de controle a base de Bt e diminuir o surgimento da resistência prolongando o uso da tecnologia, muitos outros métodos de biocontrole estão sendo avaliados por pesquisadores. Bactérias como *Bacillus popilliae*, *Brevibacillus laterosporus*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas chlororaphis*, *P. mosselii* e *Paenibacillus lentimorbus* foram relatadas como capazes de expressar proteínas inseticidas que são tóxicas para insetos-praga da ordem Coleoptera (ZHANG et al., 1997; YOKOYAMA et al., 2004; RUIU, 2013; SCHELLENBERGER et al., 2016; WEI et al., 2018; YALPANI et al., 2017; BOECKMAN et al., 2019).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* vem ganhando destaque no cenário atual de controle biológico, pois além de já apresentarem um histórico de uso seguro na agricultura, por sua atuação na produção de ácido indolacético (AIA), um tipo de hormônio de crescimento, como biorremediadoras e na proteção contra certos patógenos fúngicos de plantas através da produção de antibióticos do tipo fenazina

(ZAGO et al., 2000; KUPFERSCHMIED et al., 2013; EFSA, 2015; GRAÇAS et al., 2015; LIU et al., 2022). Recentemente, certas espécies foram relatadas como entomopatogênicas e já estão sendo utilizadas como fonte promissora de genes inseticidas para a produção de plantas geneticamente modificadas expressando proteínas inseticidas contra insetos da ordem Coleoptera, que incluem IPD072Aa de *Pseudomonas chlororaphis* e PIP-47Aa de *Pseudomonas mosselii* (SCHELLENBERGER et al., 2016; WEI et al., 2018; BOECKMAN et al., 2019).

A descoberta de novas toxinas proteicas isoladas de *Pseudomonas* spp., as quais tem mostrado eficiência no controle biológico de insetos, nos coloca frente a possíveis novos mecanismos de ação e novas alternativas ao manejo da resistência dos insetos-praga, pois amplia a possibilidade de fazer a piramidação de genes em plantas geneticamente modificadas, aumentando a durabilidade da eficiência inseticida das proteínas (MARUCCI et al., 2015).

Tendo em vista os prejuízos significativos causados por *A. grandis* na cultura do algodoeiro, bem como o potencial inseticida das proteínas de *Pseudomonas* spp. contra insetos da ordem Coleoptera, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade das proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa no controle do bicudo-do-algodoeiro. Além disso, pretende-se investigar a interação dessas proteínas em busca de potencial sinérgico com proteínas Cry de *B. thuringiensis* a fim de prover uma favorável combinação para a construção de plantas do algodoeiro piramidadas, o que poderá aumentar a durabilidade da eficiência inseticida das proteínas e também retardar de maneira eficaz a possível evolução de resistência desta praga.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cotonicultura

O algodoeiro (*Gossypium* spp.) é uma das principais plantas utilizadas para a produção de fibras naturais no mundo, constituindo uma das cadeias produtivas mais importantes do Brasil. A cotonicultura está classificada entre as dez principais práticas agrícolas do País, sendo que a maior produção ocorre nos Estados de Mato Grosso e Bahia, que juntos representaram na safra de 2020/2021 89% da área plantada e 90% da produção nacional (CONAB, 2022). Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor mundial, e esse ranking poderá melhorar, pois segundo a estimativa da safra 2021/2022 teremos um aumento de 10,7% na produção de algodão, totalizando 2,61 milhões de toneladas (CONAB, 2022).

Pelo menos trinta espécies de insetos e três espécies de ácaros são citadas na literatura como pragas do algodoeiro. GONDIM et al. (2001) descrevem que, dentre as pragas da parte aérea do algodão, destacam-se os pulgões *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) e *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae), além de trips, como pragas da fase inicial devido aos danos diretos e como vetores da doença azul e de outras viroses. Durante a fase vegetativa e o início da fase reprodutiva, lepidópteros desfolhadores como o curuquerê do algodão *Alabama argillacea* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) são as principais pragas. Já durante a fase reprodutiva, o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), a lagarta da maçã *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta rosada *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) são as pragas dominantes, merecendo a maior atenção por parte dos produtores para o seu controle. Assim, há uma demanda por formas menos onerosas para controle de insetos-praga, mais eficientes e que causem menores danos ao meio ambiente.

Desde o início da década de 1990, a biotecnologia possibilitou a criação de culturas geneticamente modificadas que apresentam altos níveis de resistência específica às principais pragas em diferentes culturas (PERLAK et al., 1993). Até o momento, várias toxinas Bt expressas em plantas transgênicas foram selecionadas para controlar Lepidoptera e Coleoptera, com toxicidade limitada para outras espécies

de insetos (BERNALL et al., 2002). Uma das vantagens da adoção de culturas GM é a redução significativa do uso de defensivos químicos, o que é benéfico para a saúde humana e para o meio ambiente (SHELTON et al., 2002). Cataneo et al. (2006) relatam menor aplicação de inseticidas de amplo espectro em campos de algodão Bt expressando a toxina Cry1Ac, e maior produção de fibras nos EUA. Men et al. (2003) observaram menor diversidade de pragas e outros artrópodes em campos de algodão Bt (Delta & Pine NuCOTN 33B, expressando Cry1Ac) aliado ao uso de pesticidas em relação a plantios convencionais na China. Isso devido, principalmente, à forte pressão de seleção da toxina expressa na planta, aliado ao uso de agroquímicos de amplo espectro. Assim, uma menor diversidade de pragas contribuiu para um decréscimo em populações de inimigos naturais, devido a fatores como mortalidade e migração. Efeitos mínimos relatados usando a mesma variedade GM em biomas de inimigos naturais em comparação com danos causados por inseticidas de amplo espectro (NARANJO, 2005). De fato, a eficácia da variedade GM no controle das principais pragas do algodão nos Estados Unidos reduziu a necessidade de muitos defensivos agrícolas. Na China, o plantio de algodão expressando a toxina Cry1Ac para controle de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) diminuiu a ocorrência desta praga em outras plantações, como milho e amendoim (WU et al., 2008).

Em março de 2005, a CTNBio aprovou o cultivo e a comercialização do algodoeiro geneticamente modificado para resistência a insetos Bollgard™ I, contendo a proteína Cry1Ac (CTNBIO, 2022). O evento tem resistência a alguns dos principais insetos-praga da ordem Lepidoptera que afetam a cultura do algodão no Brasil, como o curuquerê-do-algodão (*Alabama argillacea*), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) e a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens*), embora não possua efeitos sobre outros insetos-praga, como *A. grandis*. Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar do ranking mundial em área cultivada com plantas transgênicas, sendo a cultura do algodoeiro GM a terceiro mais cultivada (ISAAA, 2022a).

2.2. *Anthonomus grandis* Boheman, 1843

O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é um inseto da ordem Coleoptera, família Curculionidae, mede normalmente de quatro a nove milímetros de comprimento e sete milímetros de envergadura, de coloração castanho-ferruginosa

quando jovem e cinza quando se torna mais velho (Figura 1) (SANTOS, 2003). Apresenta a cabeça alongada para frente, prolongando-se em um rostro que tem metade do seu comprimento fino e recurvado (GONDIM et al., 1999; SILVIE et al., 2001; GALLO et al., 2002). A variação do tamanho do bicudo é influenciada por uma série de fatores, destacando-se entre eles a quantidade de alimento ingerido durante o estágio larval (BUSOLI et al., 1994).

Figura 1. *Anthonomus grandis* em seu estágio adulto na coloração castanho-ferrugínea. Fonte: <https://bequisa.com.br/pragas/bicudo/>.

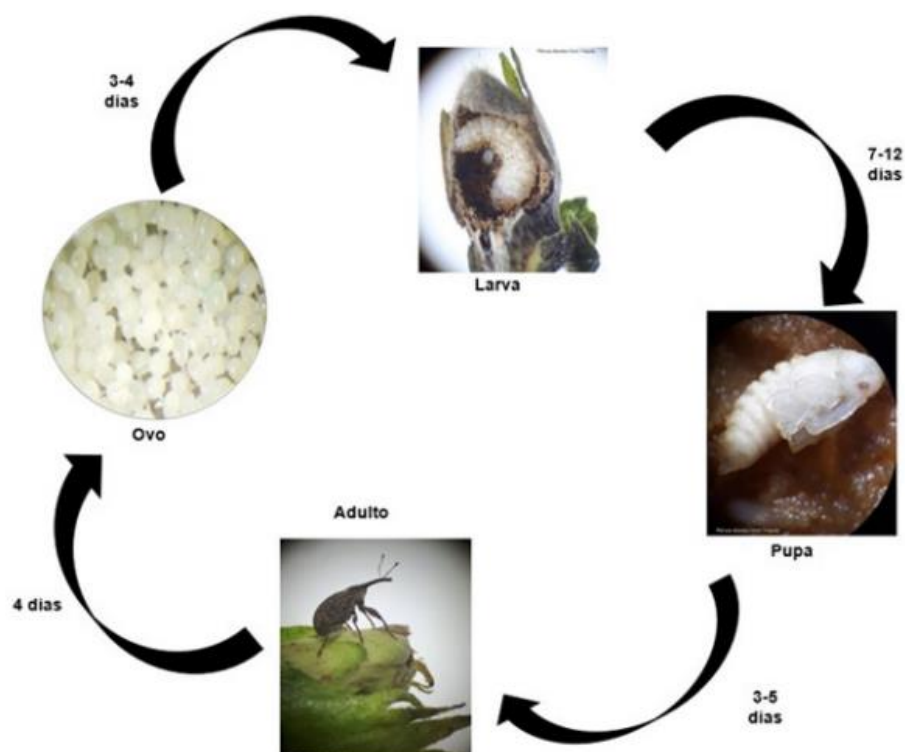


O *A. grandis* é considerado a maior praga da cotonicultura no continente americano, causando queda de botões florais e perda na qualidade das fibras. Nativo da América Central, esse inseto foi relatado pela primeira vez nos Estados Unidos da América no ano de 1892, infestando toda a área sudeste do país em menos de 30 anos. Posteriormente, o bicudo-do-algodoeiro disseminou-se para a Venezuela em 1949 e à Colômbia, em 1950. O Brasil foi o último país americano a registrar a presença desse inseto, em fevereiro de 1983, na região de Santa Bárbara do Oeste, São Paulo (MARENGO LOZADA et al., 1987). Em 1985, o bicudo-do-algodoeiro já havia se dispersado por cerca de 350 mil hectares de algodão, nos Estados de São Paulo, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte.

O ciclo de vida do bicudo-do-algodoeiro é relativamente curto (Figura 2). O processo de infestação começa quando os botões florais do algodoeiro atingem cerca de 6 mm de diâmetro. Os ovos são elípticos e opacos, com cerca de 1 mm de

tamanho, e são ovipositados individualmente no interior de botões florais e maçãs, atingindo um total de até 300 ovos por fêmea (LEONARD et al., 1999). As larvas são curculioniformes, eclodindo entre três a quatro dias após a oviposição, alimentando-se por sete a 12 dias no interior de botões florais e maçãs, até o estágio de pupa, as quais possuem vestígios dos futuros membros do adulto, podendo ser visualizados através da cutícula da pupa, estruturas como o rostro, pernas e asas (TOMQUELSKI; MARTINS, 2008). Após a emergência, os adultos alimentam-se por três a cinco dias, até copularem e produzirem mais ovos, reiniciando o ciclo (AZAMBUJA; DEGRANDE, 2015).

Figura 2. Ciclo de vida do Bicudo do Algodoeiro. Os ovos são individualmente depositados no interior de botões florais ou de maçãs. Após a eclosão, as larvas desenvolvem-se no interior da planta, até o estágio de pupa. Os adultos podem acasalar e ovipositar em apenas 4 dias após a emergência. Fonte: Spers, 2020.



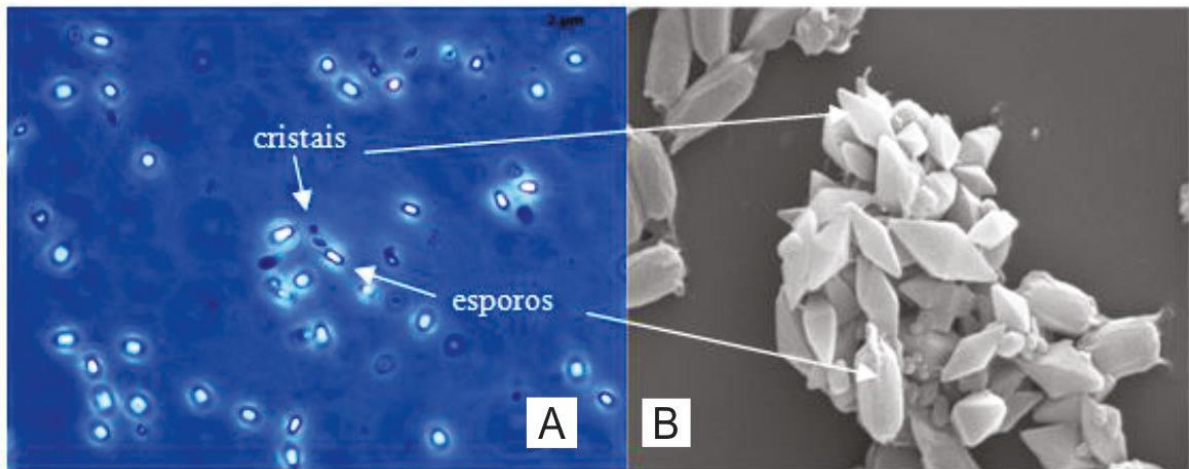
Considerando que os adultos alimentam-se inserindo seu aparelho bucal em partes abaixo da superfície da planta, e que todo o desenvolvimento do inseto é endofítico, o bicudo-do-algodoeiro é considerado um dos insetos-praga de mais difícil

controle (METCALF; METCALF, 1993). Dentre as estratégias adotadas, destaca-se o uso de inseticidas químicos, chegando a 17 aplicações no ciclo da cultura, o que causa danos ao meio ambiente e aumenta os custos de produção. A utilização de plantas de ciclo curto e agentes de controle biológico, como fungos entomopatogênicos (SILVA, 2001) e parasitóides (ARAÚJO; AZEVEDO, 1997) ainda é incipiente, embora possuam potencial como alternativa ao controle químico. Neste cenário, o uso de plantas transgênicas que expressam genes de resistência a insetos apresenta algumas vantagens, como a redução nas aplicações de agentes de controle químico e biológico, bem como o aumento da resistência a inseticidas em todo o ciclo produtivo.

2.3. *Bacillus thuringiensis* Berliner

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria de solo, anaeróbica facultativa, Gram-positiva e flagelada. As células têm entre 1 a 1,2 μm de largura e 3 a 5 μm de comprimento e são capazes de produzir esporos em condições desfavoráveis à sua multiplicação. Estes esporos são resistentes ao calor, dessecação e substâncias desinfetantes (RABINOVITCH et al., 2000), podendo permanecer no ambiente por longos períodos (SLEPECKY; LEADBETTER, 1983). Durante a etapa de esporulação, o Bt produz inclusões cristalinas proteicas contendo uma ou mais toxinas Cry (BENINTENDE; MARQUEZ, 1996), que possuem atividade inseticida. Estas inclusões se distinguem como cristais de formas definidas em microscópio de contraste de fases (Figura 3), e o diferenciam de outras espécies da família Bacillaceae. Além das δ -endotoxinas, que incluem as toxinas Cry e Cyt, o *B. thuringiensis* pode produzir outros fatores de entomotoxicidade, como α -exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases, parasporinas e proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (CRICKMORE et al., 2022), atuando ou não em sinergia com as toxinas Cry.

Figura 3. Esporos e inclusões proteicas cristalinas de *B. thuringiensis*. (A) microscopia de contraste de fase, (B) microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Monnerat et al. (2020).



As toxinas Cry contidas nesses cristais compreendem pelo menos 50 subgrupos, com mais de 200 membros (BRAVO et al., 2005). Uma ou mais toxinas Cry podem estar contidas em um cristal proteico, os quais possuem formas variadas, podendo ser bipiramidais, esféricos, cubóides, romboidais, retangulares ou irregulares (MAAGD et al., 2003). Classicamente, as cepas de Bt são caracterizadas conforme a sorologia flagelar e às toxinas Cry produzidas (LECADET et al. 1999).

Formulações microbianas contendo δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* têm sido usadas como uma alternativa aos métodos convencionais de controle químico por quase 60 anos (ROMEIS et al., 2006), devido ao amplo espectro de ação que as proteínas possuem, com possibilidade de atuação no controle de lepidópteros, dípteros, coleópteros, hemípteros e nematóides (VAN FRANKENHUYZEN, 2009). A relativa popularidade da utilização de *B. thuringiensis* como agente de biocontrole deriva de sua capacidade de não ter ação prejudicial a plantas e vertebrados, efeito não poluente o meio ambiente e ser altamente específico a insetos suscetíveis (WHITELEY; SCHNEPF, 1986). No entanto, as formulações à base de Bt têm certas limitações, como dificuldade de acesso a pragas que se alimentam no interior das plantas, baixa persistência no campo e letalidade lenta em comparação aos inseticidas químicos.

Uma maneira de contornar estes problemas é usar plantas transgênicas que expressam as toxinas Cry. Até o momento, as toxinas Bt expressas em culturas

transgênicas (Cry3A e vários tipos de Cry1) foram selecionadas para controle de lepidópteros e coleópteros, possuindo toxicidade limitada sobre outras ordens de insetos (BERNALL et al., 2002). Desde o final da última década, algodão, soja, milho, batata, arroz e outras importantes culturas estão sendo geneticamente modificadas para aumentar a resistência contra herbivoria de insetos (BELL et al., 1999; CTNBIO, 2022).

2.3.1. Proteínas Cry

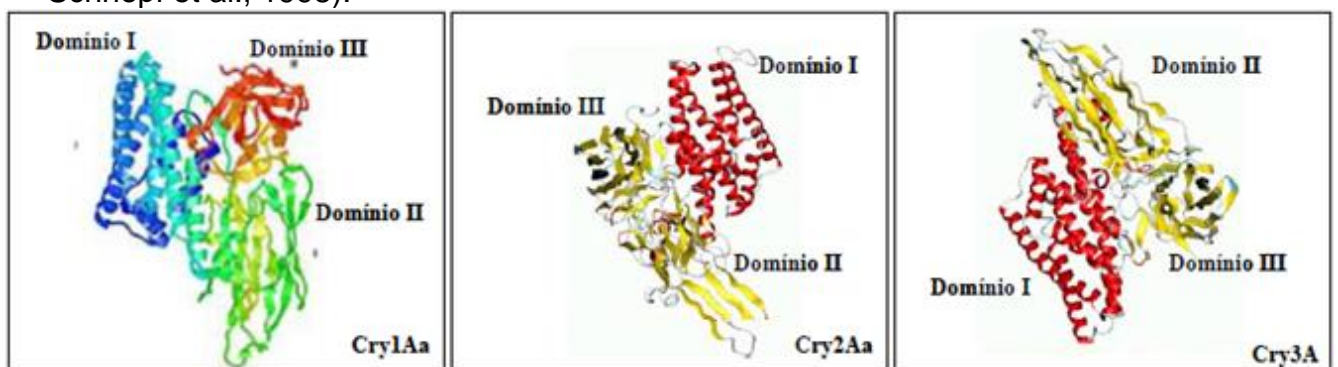
À medida que genes clonados que codificam proteínas cristalinas de *Bacillus thuringiensis* foram sendo relatados, foi proposta uma nomenclatura para as proteínas codificadas (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Nesta nomenclatura, as proteínas foram classificadas de acordo com suas atividades inseticidas, sendo as proteínas CryI tóxicas para insetos lepidópteros, CryII para Lepidoptera e Diptera, CryIII para Coleoptera e CryIVs para apenas Diptera. Essa classificação mostrou-se ser bem útil, porém apresentava limitações significativas. Uma dessas limitações foi que as proteínas que compartilhavam homologia de sequência muitas vezes tinham diferentes especificidades inseticidas, exigindo que fossem colocadas em diferentes grupos de classificação primária.

Para superar esses desafios, uma nomenclatura revisada foi introduzida em 1998, que classificou as proteínas apenas pela similaridade de aminoácidos (CRICKMORE et al., 1998). Neste sistema, as proteínas foram comparadas em um alinhamento de múltiplas sequências e um dendrograma produzidos para ilustrar sua relação. Os nomes foram derivados com base na localização do nó em que a proteína se juntou ao dendrograma. Um sistema de nomenclatura de quatro níveis foi adotado no qual as proteínas que compartilhavam pelo menos 45% de identidade de sequência foram colocadas no mesmo grupo de classificação primária (Cry1, Cry2 e etc.). Os grupos primários foram então divididos de modo que as proteínas que compartilhavam menos de 78% de identidade foram alocadas em diferentes classificações secundárias (Cry1A, Cry1B e etc.). Um terceiro nível foi usado para proteínas dentro da classificação secundária que compartilhavam menos de 95% de identidade de sequência (Cry1Aa, Cry1Ab e etc.). Finalmente, um quarto nível foi usado para proteínas dentro do mesmo nível terciário que compartilhavam mais de 95% de identidade (Cry1Aa1, Cry1Aa2 e etc.).

Dentro desta nomenclatura, reconheceu-se que havia uma série de proteínas que mostravam muito pouca similaridade de sequência, mas ainda assim receberam nomes Cry (Cry6, Cry15 e Cry22). À medida que mais desses casos foram sendo caracterizados, foi ficando claro a existência de uma grande variedade de proteínas inseticidas derivadas de bactérias e que a nomenclatura existente restringe fortemente a apreciação de sua diversidade. Por essa razão, foi elaborado um novo sistema de classificação que melhor reflete as diferenças estruturais das proteínas, com base em suas estruturas distintas (3-domínios, Toxin_10/Bin-like, ETX/Mtx2-like e etc.) (CRICKMORE et al., 2021), esse sistema atual manteve o princípio original do sistema antigo de dar a cada nova sequência caracterizada um identificador único.

As toxinas Cry de *B. thuringiensis*, são classificadas por apresentarem estrutura de três domínios. O domínio I compreende sete alfa-hélices e está relacionado à formação do poro, o domínio II está relacionado com a ligação a receptores de membrana, sendo formado por três beta-antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula, já o domínio III corresponde à região C-terminal que consiste de duas folhas beta-antiparalelas, formando um beta-sanduíche e acredita-se que este domínio esteja fortemente envolvido com a estabilidade estrutural e à ligação ao receptor (Figura 4) (SCHNEPF et al., 1998; CRICKMORE et al., 2021). O incremento no número de genes de Bt depositados no banco de dados "*Bacillus thuringiensis*: Toxin Nomenclature" se dá devido a viabilidade de utilização das toxinas para fins agrônômicos e em saúde pública, visando encontrar alternativas para o manejo da resistência (LI et al., 2012; CRICKMORE et al., 2022), como resultado um grande número de estirpes foram isoladas e caracterizadas, produzindo mais de 140 sequências de toxinas Cry.

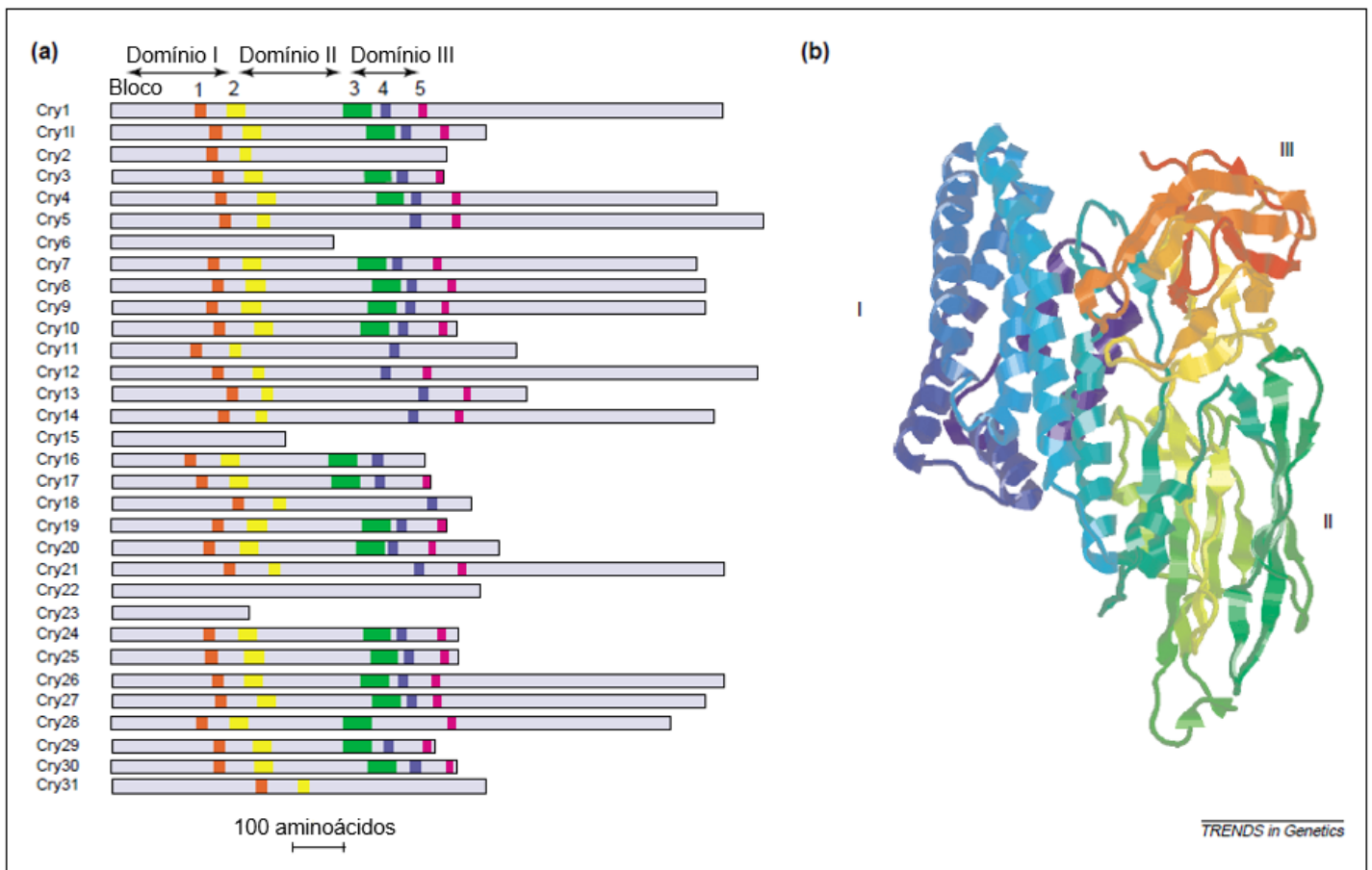
Figura 4. Representação esquemática das estruturas das toxinas Cry (Adaptado de Schnepf et al., 1998).



A maior parte das toxinas Cry possui cinco blocos de aminoácidos conservados na sua estrutura primária (MAAGD et al., 2001), sugerindo sua importância na estabilidade e função da proteína (Figura 5). De forma geral, as toxinas Cry podem ter apenas um dos dois tamanhos: entre 130 e 140 kDa, ou cerca de 70 kDa, sendo que os blocos conservados estão presentes na metade N-terminal das toxinas maiores, enquanto a parte C-terminal constitui um domínio de protoxina não presente nas toxinas menores (PIGGOT; ELLAR, 2007).

Na figura 5 é mostrado a estrutura primária e terciária das toxinas Cry, as posições dos três domínios da toxina ativada são indicadas para Cry1 e variam com as posições dos blocos 2 e 3 para as demais toxinas. O restante da protoxina, consiste de uma parte N-terminal curta (20-40 aminoácidos) precedendo o primeiro domínio e a parte C-terminal seguindo o terceiro domínio nas protoxinas mais longas, essas partes são digeridas pelas proteases intestinais durante o processo de ativação (MAAGD et al., 2001).

Figura 5. Estrutura primária e terciária das toxinas Cry. (a) Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. As regiões coloridas correspondem às sequências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à porção da toxina ativa. (b) Estrutura tridimensional de uma toxina ativada, Cry1Aa. O domínio I (azul) está envolvido na inserção da membrana e na formação de poros. O domínio II (verde) e o domínio III (amarelo-vermelho) estão envolvidos no reconhecimento e ligação do receptor. O bloco conservado 1 está na hélice central do domínio I, o bloco 2 está na interface do domínio I-II, o bloco 3 está na fronteira entre os domínios II e III, o bloco 4 está na fita central do domínio III e o bloco 5 é no final do domínio III. Fonte: Adaptado de Maagd et al. (2001).



Até o momento, estão descritos mais de 500 genes *Cry* e as suas sequências estão classificadas em 74 grupos (*Cry1* à *Cry74*) organizados em diferentes subgrupos. As proteínas do tipo *Cry1* estão divididas em quatorze classes de *Cry1A* até *Cry1N*. E estas proteínas *Cry1A* apresentam subclasses *Cry1Aa* à *Cry1Aj*. As proteínas *Cry2A* possuem subclasses de *Cry2Aa* à *Cry2Ai*. (CRICKMORE et al., 2022). A alta capacidade inseticida das proteínas *Cry1* e *Cry2* contra algumas espécies de insetos da ordem *Lepidoptera* tem conduzido ao uso dos genes destas classes em plantas transgênicas visando o controle de pragas (KNIGHT et al., 2013).

As proteínas Cry1 possuem 130 a 134 kDa e as Cry2 apresentam tamanho molecular de 65 a 70 kDa (CRICKMORE et al., 2022). Após a ativação, as proteínas têm uma redução no tamanho por perda de aminoácidos, então, as proteínas Cry1A ativadas possuem aproximadamente 60 kDa e as Cry2 50 kDa.

2.4. Expressão heteróloga em sistema bacteriano

Uma excelente estratégia que permite o estudo mais completo e detalhado de moléculas proteicas, cuja ocorrência no organismo de origem é baixa, limitando sua obtenção em quantidades satisfatórias, é a produção de proteínas heterólogas através da tecnologia do DNA recombinante. Atualmente, o uso de proteínas recombinantes é bastante difundido tanto em laboratórios de pesquisa quanto na indústria farmacêutica, pois esta tecnologia apresenta forte potencial para a produção de proteínas de interesse comercial e tecnológico.

O desafio de produzir proteínas em escala e qualidade necessárias para aplicações experimentais, terapêuticas e comerciais levou ao desenvolvimento de uma ampla gama de métodos para a produção de proteínas heterólogas. Dentre os mais diversos organismos hospedeiros estão bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algas unicelulares (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

O organismo procariótico *Escherichia coli* continua sendo o meio mais amplamente utilizado como um sistema de produção de proteínas recombinantes devido ao seu genoma ser bem caracterizado, maquinaria celular bem estabelecida e ao intenso aperfeiçoamento das inúmeras ferramentas e protocolos disponíveis para a sua manipulação genética (BROWN, 2010). O sistema de expressão utilizado nesta bactéria possui muitas características atrativas, como o controle da expressão gênica e estratégias que facilitam a purificação de proteínas (TERPE, 2006). Entretanto, para o sucesso da expressão da proteína, a escolha do sistema de expressão é de fundamental importância e deve levar em consideração a estrutura da proteína, sua funcionalidade e complexidade, e também o rendimento desejado (DEMAIN; VAISHNAV, 2009).

A partir da década de 1970, todos os componentes necessários para a manipulação do DNA recombinante já estavam disponíveis, incluindo a amplificação do gene de interesse pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A PCR destaca-se por apresentar de forma muito benéfica a predição da atividade inseticida

de *B. thuringiensis*, além de estabilidade e reprodutibilidade nas informações moleculares geradas (TASIOR et al., 2021). Essa técnica foi desenvolvida em 1983, por Kary Banks Mullis, e consiste em um método replicativo de DNA *in vitro* para a produção de grandes quantidades de um fragmento de DNA específico, a partir da utilização de oligonucleotídeos iniciadores (primers) direcionados para o alvo (WHITE et al., 1989).

Essa técnica é constituída por três etapas: Desnaturação, Anelamento e Extensão. A desnaturação consiste na abertura da dupla fita de DNA através do aumento de temperatura a 94^o, tornando-as fitas simples. O anelamento, ou hibridização, consiste na ligação do par de primers na sequência complementar nas fitas desnaturadas. Essa etapa varia de acordo com o primer utilizado, sendo utilizada uma margem de temperatura entre 50^o e 60^o. A extensão, ou polimerização de DNA, é a etapa na qual a enzima Taq DNA polimerase adiciona nucleotídeos produzindo fitas simples de DNA complementares ao molde. A extensão ocorre a uma temperatura de 72^o e é nela que as fitas simples se tornam novamente duplas (SANTIAGO et al., 2007). Essas etapas de amplificação são consideradas como um ciclo, o qual se repete, normalmente, por 30 a 40 vezes. Cada ciclo gerará produtos que servirão como molde para o ciclo seguinte, acarretando crescimento exponencial na ordem de bilhões no número de cópias de DNA produzido.

Uma vez que o gene de interesse tenha sido isolado, uma molécula de DNA autorreplicante, chamada de vetor, deve ser selecionada para incluir a sequência extraída. Essa inserção é realizada unindo as extremidades compatíveis do vetor às extremidades do gene de interesse pela enzima DNA-ligase. Dentre os vetores disponíveis, o mais utilizado é o plasmídeo (NELSON; COX, 2010).

Para otimização da produção de proteína heteróloga em sistema bacteriano, é necessário à utilização de um vetor de expressão. Essa escolha deve ser feita de acordo com as peculiaridades da proteína de interesse. Para isso, existe uma grande quantidade de catálogos de plasmídeos de expressão resultantes de múltiplas combinações de replicons, promotores, marcadores de seleção, múltiplos sítios de clonagem e estratégias para remoção e secreção da proteína (TERPE, 2006). O promotor é uma das regiões mais importantes para a transcrição, pois controla a velocidade que o gene de interesse é transcrito. Ou seja, um promotor forte aumenta

a taxa de produção de mRNA, e conseqüente a produção da proteína recombinante. Os principais promotores usados nos vetores de expressão são: lac, trp, T7 (BROWN, 2010)

Diversos vetores se encontram disponíveis no mercado para expressão de proteínas recombinantes com ou sem fragmentos de fusão em *E. coli*. Dentre esses, temos os vetores da família pET (plasmid for expression by T7 RNA polimerase), onde a principal vantagem desses vetores é ser transcrito pela T7 RNA polimerase, que é muito seletiva e ativa, possuindo a capacidade de alongar cadeias de RNA aproximadamente 5 vezes mais rápida que a RNA polimerase de *E. coli*. Outra característica, é que alguns vetores da família pET apresentam o promotor T7-Lac, colocando a expressão da proteína sob o controle do repressor lac, reduzindo assim o “background” de expressão da proteína alvo na ausência do agente indutor (NOVAGEN, 2006; BROWN, 2010).

Outra característica fundamental dos vetores da família pET, é a presença de uma sequência que codifica para seis resíduos de Histidina, formando uma sequência conhecida como cauda de Histidina. Esses seis resíduos são fusionados à sequência de aminoácidos de interesse formando complexos com íons de metais de transição, como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} . A formação desse complexo é essencial para a purificação de proteínas heterólogas em coluna contendo resina com íons metálicos bivalentes (Ni^{2+}), pois as proteínas com a cauda são imobilizadas na resina devido a sua afinidade pelos íons (NOVAGEN, 2006).

As expressões de proteínas recombinantes são necessárias em pesquisas biológicas para investigar a atividade de enzimas, de ligação ao ligante, as interações ou outras funções *in vitro*. Em 1981, o primeiro gene *Cry* de *B. thuringiensis* foi clonado e expresso em *E. coli* (SCHNEPF; WHITLEY, 1981), desde então, várias outras proteínas de Bt vêm sendo expressas neste sistema, Cry1Ia10 e Vip3Aa (BERGAMASCO et al., 2013), Cry1Ie e Cry1Ah (YANG et al., 2018), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ea, Cry1Ca, Cry2Aa, Cry2Ab e Vip3Aa (FIGUEIREDO et al., 2019), entre outras. Essas proteínas foram e estão sendo expressas, com o objetivo de utilizá-las nos ensaios de controle biológico de diversas ordens de insetos-praga das grandes culturas agrícolas.

2.5. Plantas geneticamente modificadas com genes de *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas* spp. para controle de insetos-praga

A ciência está evoluindo rapidamente no campo da biologia molecular, abrindo novas perspectivas para a próxima geração de plantas melhoradas. O uso de ferramentas biotecnológicas possibilitou a construção de plantas transgênicas portadoras de genes de *B. thuringiensis*, favorecendo o setor agrícola mundial, que já adota essa biotecnologia em diversas regiões do mundo.

Os países que adotaram a tecnologia apresentaram incremento na produtividade e redução no custo de produção. E isso pode ser observado, pela área global com plantas transgênicas cultiváveis, que cresce anualmente em uma velocidade intensa. Desde a liberação comercial nos Estados Unidos em 1996, foram cultivados 1,7 milhões de hectares com plantas transgênicas, e em 2003 os índices mostram um aumento da área, que atinge 59 milhões de hectares, somente com soja, algodão, milho e canola. Em 2018, esta área chegou a 191,7 milhões de hectares, representando um aumento de aproximadamente 113 vezes em relação aos 1,7 milhão de hectares em 1996 (ISAAA, 2022a). Atualmente, o Brasil ocupa a segunda posição em área cultivada com variedades transgênicas (51,3 milhões de hectares) com área inferior apenas à observada nos Estados Unidos (75,0 milhões de hectares) (ISAAA, 2022a).

A maior parte das plantas transgênicas com resistência a insetos disponíveis comercialmente possuem um ou mais genes que codificam proteínas inseticidas do microrganismo *B. thuringiensis* em plantas como fumo, tomate, batata, algodão, milho, soja e outras (ISAAA, 2022a). Uma nova, rigorosa e abrangente meta-análise abrangendo 147 estudos publicados sobre espécies agrícolas transgênicas e conduzidos ao longo dos últimos 20 anos, usando dados primários dos levantamentos agrícolas ou testes de campo mundiais, revelou os impactos nos rendimentos agrícolas da soja, milho e algodão geneticamente modificados, uso de defensivos agrícolas e lucros dos agricultores. A meta-análise concluiu que em média, a adoção da tecnologia transgênica reduziu o uso de defensivos agrícolas químicos em 37%, aumentou os rendimentos agrícolas em 22%, e aumentou os lucros agrícolas em 68% (KLÜMPER; QAIM, 2014). Além destes benefícios, a produtividade torna-se elevada em função do melhor controle de pragas.

No Brasil, a primeira cultura de algodão Bt contendo o gene *Cry1ac* foi lançada comercialmente para controle de lepidópteros-praga em 2005. Posteriormente, em 2007, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou liberações comerciais de vários eventos de milho Bt, como MON810 e *Bt11*, ambos contendo o gene *cry1ab*. Em 2010, a soja Bt com o gene *Cry1ac* foi aprovada para comercialização no Brasil (CTNBIO, 2022). Atualmente, no Brasil encontram-se disponíveis 69 eventos de plantas transgênicas que expressam genes e combinações de genes de *B. thuringiensis* para resistência a insetos-praga: 42 eventos de milho que contém um gene ou combinações de genes (*Cry1Ab*, *Cry1F*, *Cry2Ab2*, , *mcry3A*, *Vip3Aa*, *Vip3Aa20*, *Cry1A.105*, *Cry2Ab2*, *Cry3a*, *Cry3Bb1*, *Cry34Ab1*, *Cry35Ab1*, *ecry3.1Ab*, *Cry1Da_7*, *Cry1B.868*, *Cry1Be* e *Cry1Ca*) 15 eventos de algodão que contém um gene ou combinações de genes (*Cry1F*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Vip3A*, *Vip3Aa*, *Vip3Aa19*, *Cry2Ab2* e *Cry2Ae*), 6 eventos de soja que contém um gene ou combinações de genes (*Cry1F*, *Cry1Ac*, *Cry1A.105*, *Cry2Ab* e *Cry14Ab1*) e 6 eventos de cana-de-açúcar (*Cry1Ab* e *Cry1Ac*) (CTNBIO, 2022).

Recentemente, espécies do gênero *Pseudomonas* estão sendo utilizadas para controle de pragas agrícolas. Vários trabalhos têm demonstrado o potencial de utilização de genes isolados de espécies de *Pseudomonas* para o desenvolvimento de plantas transgênicas eficazes no controle de insetos da ordem Coleoptera. Pode-se citar as proteínas IPD072A identificada em *Pseudomonas chlororaphis*. Depois de constatada sua atividade inseticida, o gene que codifica a proteína foi utilizado na transformação genética de milho e as plantas obtidas foram resistentes a *Diabrotica virgifera virgifera* (SCHELLENBERGER et al., 2016).

Há também o trabalho de Wei et al. (2018), que descobriram a proteína PIP-47Aa isolada de *Pseudomonas mosselii*, esta apresentou atividade inseticida contra *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata Howardi*, *Diabrotica speciosa* e *Phyllotreta cruciferae*. A proteína demonstrou-se também efetiva quando expressa em plantas de milho. No Brasil, a CTNBio liberou comercialmente três eventos com soja transgênica contendo genes de *Pseudomonas fluorescens* para tolerância a herbicidas (*hppd* e *hppdPf4Pa*) (CTNBIO, 2022). Esses relatos indicam o potencial de uso de proteínas extraídas de diferentes espécies de *Pseudomonas*.

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

A evolução da resistência aos agrotóxicos é um dos graves problemas no controle de pragas agrícolas, entretanto, os casos de resistência não se limitam a inseticidas sintéticos, mas incluem muitos produtos naturais, tais como os reguladores de crescimento e agentes de controle biológico, entre eles a toxina produzida por *B. thuringiensis*. As pragas-alvo evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Inicialmente, os casos de evolução da resistência de insetos às proteínas de *B. thuringiensis* limitavam-se a pulverizações de biopesticidas à base de Bt ou à seleção de cepas resistentes às proteínas Bt. As formulações contendo a toxina de *B. thuringiensis* foram utilizadas há mais de quarenta anos como inseticidas sem nenhuma evidência de resistência em situações de campo. No entanto, o primeiro relato de falhas de formulações de *B. thuringiensis* no controle de pragas ocorreu nas Filipinas com *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) (VAN RIE; FERRÉ, 2000). Desde então, observa-se que populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros, têm desenvolvido resistência a proteínas isoladas *B. thuringiensis* e produzidas em por plantas transgênicas (NEPPL, 2001).

Um fator importante na determinação da capacidade de uma espécie de inseto desenvolver resistência é a variação genética, tanto dentro da mesma população quanto entre populações diferentes (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Geralmente, os altos níveis de variação intraespecífica entre as populações refletem uma maior capacidade de desenvolver resistência. Este tipo de variabilidade tem sido detectado em diferentes espécies de insetos-praga, *H. virescens*, *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *P. xylostella*, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (ALI et al. 2006; SAEGLITZ et al. 2006, ALI; LUTRELL, 2007).

A evolução da resistência a toxinas de *B. thuringiensis* expressas em plantas transgênicas, em populações de insetos, é influenciada por um grande número de fatores que interagem entre si e envolvem às bases bioquímicas da resistência, qualquer alteração no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* podem influenciar

no desenvolvimento da resistência. Essas alterações podem ser: 1) alteração no sítio de ligação da toxina à membrana; 2) modificação na atividade proteolítica no intestino do inseto; 3) aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. A primeira alteração é a que gera os maiores níveis de resistência, ela tem sido descrita tanto em populações resistentes capturadas em campo como em populações selecionadas artificialmente em laboratório. Além disso, esta alteração tem sido detectada em cepas resistentes a uma ou várias toxinas da família Cry1A de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Hübner) (VAN RIE et al. 1990), *P. xylostella* (FERRÉ et al. 1991) e *H. virescens* (LEE et al. 1995).

Quanto ao mecanismo que implica na alteração da atividade proteolítica do intestino do inseto, Oppert et al. (1997) mostraram que há ligação genética entre a resistência a Cry1Ac e a ausência de uma protease intestinal em uma cepa de *P. interpunctella*. Em *H. virescens* tem-se observado que as lagartas resistentes mostram mais rápida recuperação do tecido epitelial após sua intoxicação com doses subleveis da toxina Cry1Ac (MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 1999).

Embora várias estratégias tenham sido implementadas com o intuito de reduzir a resistência, como por exemplo, a utilização de área de refúgio, outra metodologia vem sendo utilizada, que é o uso de culturas piramidadas, ou seja, com empilhamento de múltiplos genes na mesma planta. As chances de ocorrer duas mutações simultaneamente nos dois receptores para toxinas agindo independentemente seriam muito menores. Esta última estratégia exige que: 1) os genes que codificam proteínas inseticidas apresentem um mecanismo de ação diferente ou local de ligação diferente, para evitar o aparecimento de resistência cruzada; 2) utilizar proteínas com toxicidade contra o mesmo organismo alvo; 3) existir baixa frequência de alelos de resistência na população do campo e os locus de resistência de ambos os genes não estarem ligados (BRAVO; SOBERÓN 2008; FERRÉ et al., 2008; TABASHNIK; CARRIÈRE, 2008).

2.7. *Pseudomonas* spp.

As espécies do gênero *Pseudomonas*, são bacilos gram-negativos dispostos aos pares, não fermentadores, aeróbios, não esporulantes, que se caracterizam pelo fato de serem incapazes de utilizar carboidratos como fonte de energia através de

fermentação, degradando-os pela via oxidativa. São conhecidas por sua ampla distribuição em diferentes ambientes, como solo, água, superfícies de plantas e animais, sua capacidade de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia e produzir uma ampla gama de exoenzimas, toxinas e metabólitos secundários (RANGEL et al., 2016). Além destas características, foram relatadas recentemente que essas bactérias produzem moléculas com atividade inseticida podendo assim ser utilizadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Desde 2009 foram descritas mais de 70 novas espécies, sendo que nos últimos 3 anos houve em média a identificação de 10 novas espécies por ano (PEIX et al., 2018). Dentro dessa diversidade, encontramos espécies nocivas ao homem, *Pseudomonas aeruginosa*, às plantas, *Pseudomonas syringae*, enquanto outras são conhecidas por sua capacidade de tratar biologicamente poluentes, *Pseudomonas putida* e seus efeitos benéficos sobre as plantas, como melhoria da saúde das culturas e produção, *Pseudomonas fluorescences* (FLURY et al., 2016).

Vários trabalhos têm mostrado o potencial da utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* para o controle de insetos-praga. Esses estudos levaram à descoberta de uma variedade de moléculas que contribuíram ou foram eficazes no controle, como as proteínas Fit de *Pseudomonas fluorescens* CHA0 e *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391, contra *Spodoptera littoralis*, *Heliothis virescens* e *Plutella xylostella* (RUFFNER et al., 2013); do cianeto de hidrogênio e diferentes tipos de lipopeptídeos cíclicos de *Pseudomonas protegens* CHA0, *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 e *Pseudomonas* sp. CMR12a avaliados em *Galleria mellonella* e *Plutella xylostella* (FLURY et al., 2017); de lipopeptídeos xantholysins A e B de *Pseudomonas* sp. DJ15 em *Myzus persicae* (LIM et al., 2017); de análogos de rizoxina, orfamida A e quitinase de *Pseudomonas protegens* Pf-5 em *Drosophila melanogaster* (LOPER et al., 2016).

Além da descoberta dessas moléculas, já temos também o desenvolvimento de plantas transgênicas com genes de *Pseudomonas* eficazes no controle de praga da ordem Coleoptera. Schellenberger et al. (2016) constataram a eficiência de plantas transgênicas expressando a proteína IPD072Aa de *Pseudomonas chlororaphis* no controle da *Diabrotica virgifera virgifera* na cultura do milho. Wei et al. (2018) avaliando a eficiência da proteína PIP-47Aa isolada de *Pseudomonas mossellii* expressa em plantas transgênicas de milho, constataram eficácia em controlar a *D. virgifera*

virgifera, assim como das pragas secundárias *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Howardi*, *Diabrotica speciosa* e *Phyllotreta cruciferae*.

Boeckman et al. (2019), avaliaram a atividade inseticida da proteína IPD072Aa em um espectro de 15 espécies de insetos, sendo 11 espécies dentro da ordem Coleoptera, e outras quatro espécies representando a ordem de Lepidoptera. Não observaram efeito adverso nas espécies de lepidóptera, porém na ordem de Coleoptera foi observado uma gama de respostas que incluem crescimento reduzido, atraso no desenvolvimento e/ou sobrevivência reduzida, demonstrando a eficiência em controlar insetos pragas dessa ordem em plantas que expressem a proteína.

A descrição de novos genes eficazes controle biológico nos coloca frente a possíveis novos mecanismos de ação e novas alternativas ao manejo da resistência dos insetos-praga, pois amplia a possibilidade de produzir culturas com piramidação de genes, aumentando a durabilidade da eficiência inseticida das proteínas (MARUCCI et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade das proteínas, IPD072Aa e PIP-47Aa, isoladas de *Pseudomonas* spp., frente às proteínas Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 de *B. thuringiensis*, visando o controle e o manejo da resistência de *A. grandis* na cultura do algodoeiro.

3.2. Específicos

- Sintetizar os genes de *Pseudomonas* spp. e clonar em vetor de expressão pET-SUMO.

- Expressar e purificar as proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa de *Pseudomonas* spp.

- Expressar e purificar as proteínas Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 de *B. thuringiensis*.

- Verificar a toxicidade isolada de cada proteína frente as larvas neonatas de *A. grandis* por meio de bioensaios.

- Avaliar o potencial sinérgico das diferentes combinações destas proteínas frente às larvas de *A. grandis*, indicando a(s) melhor(es) combinação(ões) que poderia(m) compor a construção de uma planta de algodoeiro geneticamente modificada para o manejo da resistência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. População de inseto

A elaboração dos bioensaios 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, Piracicaba-SP, o qual passou a fornecer a dieta e os ovos do inseto.

Esse laboratório conta com criações de populações que estão estabelecidas e mantidas há mais de 10 anos, sendo renovada com população de campo a cada ano. Esses insetos são criados em dieta artificial conforme Tabela 1, a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $70\pm 10\%$ de umidade relativa (U.R.) e fotoperíodo de 14:10 h (luz:escuro). Os ovos de *A. grandis* são espalhados na dieta em placas de petri (60 x 15 mm) e ao eclodir, as larvas desenvolvem-se até a emergência do adulto. Os adultos são coletados e transferidos para gaiolas (20 x 15 x 10 cm) destinadas à copulação e oviposição. Os ovos são coletados, esterilizados (em 250 mL de solução de sulfato de cobre 20% + 250 mL de cloreto de benzalcônio 0,3%) e espalhados novamente na dieta artificial conforme Monnerat et al. (2000).

Tabela 1. Ingredientes utilizados no preparo da dieta artificial para manutenção das larvas de *A. grandis*.

Ingredientes	Quantidade	Proporção (%)
Pharmamedia	40g	2,10
Gérmen de trigo	60g	3,15
Levado de cerveja	60g	3,15
Proteína de soja	100g	5,25
Glicose	60g	3,15
Sais de Wesson ²	10g	0,53
Ácido ascórbico	20g	1,05
Ácido sórbico	2,4g	0,13
Nipagin	2g	0,11
Solução vitamínica ¹	40g	2,10
Ágar	28g	1,47
Água destilada	1500 mL	77,81

¹ 1 litro de solução vitamínica contém: 12g de ácido ascórbico; 0,3g de pantotenato de cálcio; 0,15g de niacina; 0,08g de riboflavina; 0,04g de tiamina HCl; 0,04g de piridoxina HCl; 0,08g de ácido fólico.

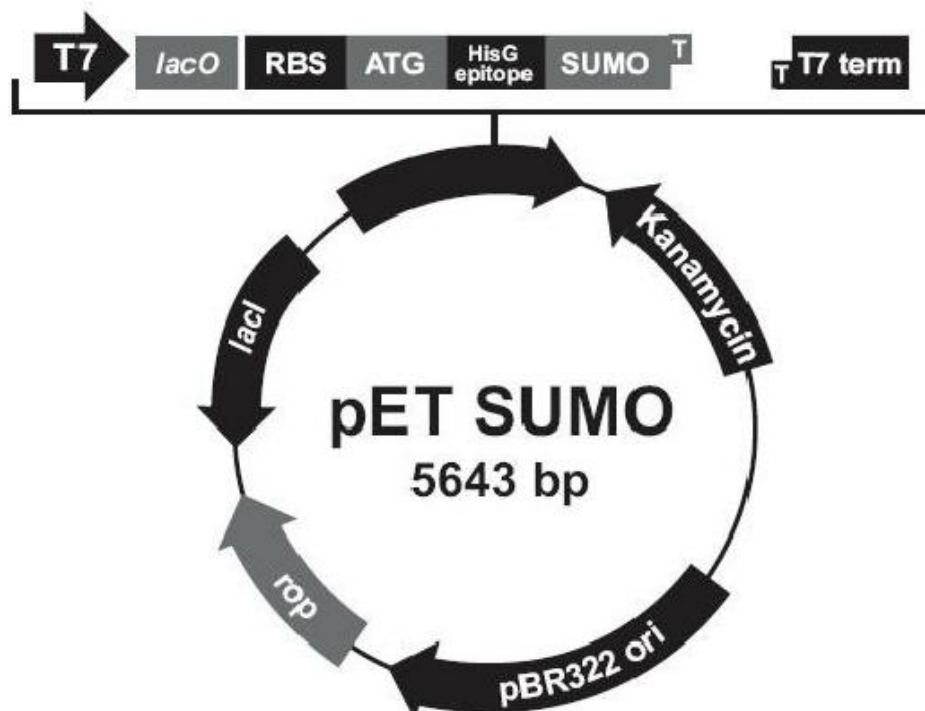
² Composição (vide Parra, 1999).

4.2. Síntese dos genes IPD072Aa e PIP-47Aa no vetor de expressão pET SUMO

Os genes de *Pseudomonas* spp. *IPD072Aa* e *PIP-47Aa* foram sintetizados junto à empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). O gene *IPD072Aa* isolado de *P. chlororaphis* codifica uma pequena proteína de 86 aminoácidos designada de IPD072Aa (número de acesso do GenBank KT795291) e o gene *PIP-47Aa* isolado de *P. mosselii* codifica uma proteína de 295 aminoácidos chamada de PIP-47Aa (número de acesso do GenBank KY982916).

Após essa síntese, foi realizada a clonagem em vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen®) (Figura 6). Este vetor possibilita a clonagem de um fragmento gerado como produto de PCR cuja expressão resultará na proteína unida à proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis, ligada a uma cauda de seis histidinas (6xHis), o que facilita a purificação da proteína por meio de um anticorpo anti-His (STUDIER et al., 1990).

Figura 6. Mapa do vetor de clonagem e expressão pET SUMO (Invitrogen®).



4.3. Transformação em células competentes de *Escherichia coli*

Os vetores recombinantes obtidos pET SUMO::IPD072Aa e pET SUMO::PIP-47Aa foram inseridos individualmente em células competentes de *E. coli* BL21(DE3) por choque térmico, segundo descrito por Hanahan et al. (1983), com as seguintes condições: 10 µl da ligação foi separada e adicionada no tubo que continha a célula competente, a qual foi incubada 30 minutos no gelo, posteriormente 90 segundos em “banho maria” a 42°C voltando rapidamente para o gelo durante 2 minutos, em seguida adicionado 800 µl de meio SOC (Meio LB; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM de glicose) e incubado a 37°C sob agitação de 150 rpm por 45 min, em seguida as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em 200 µl de meio SOC, e espalhadas na placa de petri com meio de cultura Luria-Bertani (LB 2x) sólido (20 g de triptona, 10 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl, 15 g de Ágar, água destilada q.s.p. 1L, pH 7,2) adicionado de 50 µg mL⁻¹ de canamicina, incubadas a 37°C por 12h. Uma alíquota dos clones transformantes foi assepticamente estocada com glicerol estéril (40%) e armazenada em ultra freezer a -80°C para a manutenção dos mesmos.

4.4. Minipreparação de DNA plasmidial das colônias de *E. coli* recombinantes

Os clones transformados foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo 3 mL de meio de cultura LB líquido suplementado com canamicina (50 µg mL⁻¹) e as células foram multiplicadas a 37°C por 12h sob agitação constante de 6.708 xg. Posteriormente, uma alíquota de 700 µL foi assepticamente estocada em glicerol (100%) estéril e armazenada em ultra freezer a -80°C.

O restante da suspensão de células de *E. coli* BL21 contendo pET SUMO::IPD072Aa e pET SUMO::PIP-47Aa (2,3 mL) foi centrifugado por 5 min a 17.949 Xg e os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados às amostras 200 µL da solução I (25 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA, 50 mM de D-glicose), previamente resfriados, agitados em aparelho tipo vórtex até a completa solubilização das células e mantidos a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, 200 µL da solução II (0,2 N de NaOH, 1% de SDS) foram adicionados às amostras. A suspensão foi levemente homogeneizada por meio da inversão dos tubos e mantida no gelo por 5 min. Decorrido este período, 150 µL da solução III (3 M de acetato de potássio, 2 M

de ácido acético, pH 5,2) foram adicionados às amostras. Os tubos foram levemente invertidos algumas vezes para completa homogeneização e mantidos por 5 min no gelo. Posteriormente, os tubos foram submetidos a 5 min de centrifugação a 17.949 Xg. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de centrifuga de 1,5 mL, o DNA foi precipitado por meio da adição de 400 µL de isopropanol para cada tudo com sobrenadante. As amostras foram homogenizadas invertendo os tubos levemente e em seguida foram mantidas em repouso por 2 minutos à temperatura ambiente. Feito isto, as amostras foram centrifugadas a 17.949 Xg por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de DNA foi lavado, por duas vezes, com 1 mL de etanol 70%, secado ao ar e ressuspensão em 30 µL de solução contendo 27 µL de TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 M pH 8,0) e 3 µL de RNase A (10 mg mL⁻¹). O DNA foi armazenado a -20°C até sua utilização. O DNA plasmidial dos clones transformantes foi quantificado em aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.5. Confirmação dos clones obtidos a partir das transformações bacterianas

Para confirmação das transformações, as amostras foram submetidas à técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os oligonucleotídeos iniciadores elaborados para amplificação dos genes *IPD072Aa* e *PIP-47Aa*. Estes oligonucleotídeos foram sintetizados de acordo com a sequência de cada gene de interesse (Tabela 2). Além de reação de PCR com os oligonucleotídeos específicos para os genes, reações de PCR com o oligonucleotídeo SUMO F (direto) (5' AGATTCTTGACGACGGTATTAG 3'), cuja sequência está presente no vetor pET SUMO, foram realizadas junto com os oligonucleotídeos antisenso (reverso) específicos de cada gene *IPD072Aa* e *PIP-47Aa* para verificar se o sentido dos genes clonados estava na orientação de leitura correta em relação ao promotor do vetor.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *IPD072Aa* e *PIP-47Aa* de isolados de *Pseudomonas* spp.

Genes	Composição	Iniciadores	Produto (pb ⁴)
IPD072Aa	Completo com CDS ¹	IPD072Aa (d ²) 5' ATG GGT ATT ACC GTT ACA 3' IPD072Aa (r ³) 5' TTA CGA GAG CGG CTC GAT 3'	261
PIP-47Aa	Completo com CDS	PIP-47Aa (d) 5' ATG CAC GCT CCA GGA GCA 3' PIP-47Aa (r) 5' TCA GCT GAC CAG GCA GAT 3'	888

¹ "CDS completo" significa a presença de um códon de iniciação "ATG" e um códon de paragem "TAA/TGA/TAG".

² (d) = direto

³ (r) = reverso

⁴ pb = pares de bases.

Cada 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 (desnaturação); 1 min a 53°C (anelamento); 2 min a 68°C (extensão); 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 adicionados 3 µL de tampão de amostra (0,5 % de azul de bromofenol, 50 % de glicerol) ao tudo contendo 7 µL do produto da PCR, totalizando 10 µL para cada amostra, as quais foram aplicadas 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 "GeneRulerTM 1 kb DNA ladder" (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canadá) que serviu de referência para a confirmação do tamanho molecular obtido na reação de amplificação. Posteriormente, o gel de agarose foi visualizado sob luz ultravioleta (UV) e fotodocumentado em equipamento fotodocumentador Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por meio do software Quantity-one.

4.6. Fonte de proteínas de *Bacillus thuringiensis*

Clones de *E. coli* BL21(DE3) expressando uma única proteína Cry1Ia10 e Cry8 de *B. thuringiensis*, foram clonados no vetor de expressão pET SUMO (Invitrogen®) (BERGAMASCO et al., 2013; BORGES, 2018). Estes clones fazem parte da coleção mantida pelo Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), junto ao Departamento de Biologia, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal. Os clones estão estocados com glicerol estéril (40%) e armazenados em ultra freezer a -80°C.

Já o gene *Cry3Aa* (ECE131) foi cedido pelo Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) (WU; DEAN, 1996), o qual está inserido em plasmídeo pOS4601 sob TAC promotor, induzido por IPTG, e em *E. coli* JM103. Para expressão do gene *Cry3Aa*, foi necessário subclonar o gene em vetor de expressão pET SUMO "Champion pET SUMO Expression System" (Invitrogen®) e introduzi-lo em células de *E. coli* BL21 (DE3). Amplificou-se o fragmento de 1935 pb (número de acesso GenBank: J02978.1) com oligonucleotídeos específicos (Tabela 3). Também foi feita reação de PCR com o oligonucleotídeo SUMO F (direto) e oligonucleotídeos antisenso (reverso) específicos do gene para confirmação do sentido correto da clonagem conforme descrito no item 3.5.

As condições da PCR, bem como a confirmação da amplificação do gene foi realizado conforme descrito no item 4.5 com modificação na temperatura de anelamento para 55°C. A confirmação da amplificação foi realizada conforme descrito no item 4.5.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para amplificação do gene *Cry3Aa* isolado de *Bacillus thuringiensis*.

Genes	Composição	Iniciadores	Produto (pb ⁴)
Cry3Aa	Completo com CDS ¹	Cry3Aa (d ²) 5' ATG AAT CCG AAC AAT CGA AG 3' Cry3Aa (r ³) 5' TTA ATT CAC TGG AAT AAA 3'	1935

¹ "CDS completo" significa a presença de um códon de iniciação "ATG" e um códon de paragem "TAA/TGA/TAG".

² (d) = direto

³ (r) = reverso

⁴ pb = pares de bases.

Para subclonagem foi utilizado O kit para clonagem “Champion™ pET SUMO Expression System” (Invitrogen®) que possibilita uma clonagem rápida por meio da inserção de um produto de PCR no vetor. Este vetor permite a clonagem e a expressão de uma proteína de interesse, fusionada a uma cauda com seis histidinas (6XHis), o que facilita a purificação da proteína por meio de colunas de purificação por afinidade, carregadas com níquel, e a uma proteína SUMO, que incrementa a expressão da proteína recombinante e aumenta a solubilidade de proteínas parcialmente insolúveis. A estrutura terciária da proteína SUMO é reconhecida de forma específica e clivada pela enzima SUMO protease, presente no kit. Quando essa proteína está fusionada à região N-terminal da proteína de interesse, na presença da SUMO protease, ocorre à clivagem dessa partícula, resultando na produção da proteína nativa.

A proteína SUMO é originária da *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen, 1883) (Saccharomycetales: Saccharomycetaceae), que faz parte da família da proteína “ubiquitina-like” responsável por regular vários processos celulares. No vetor pET SUMO, a expressão do gene de interesse é controlada por um promotor bacteriófago T7 forte que foi modificado para conter um “lac operator”. Para a expressão do gene, é necessária a liberação da T7 RNA polimerase para as células pela indução da expressão desta, cujo gene T7 RNA polimerase é fornecido pela célula hospedeira *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 5).

Para realizar a subclonagem do gene *Cry3Aa* no vetor pET SUMO inicialmente foi realizada reação de ligação utilizando-se de 150 ng de inserto, 50 ng de vetor pET SUMO, 1 µL de tampão de ligação 10X, 1 µL de enzima T4 ligase e água estéril (q.s.p) 10 µL. A reação foi incubada a 15°C durante 16 h.

Após este período, 2 µL do produto de cada reação de ligação foram adicionados em tubos contendo 50 µL de células de *E. coli* BL21 (DE3), as quais foram utilizadas para a transformação por meio do método de choque térmico e selecionadas em placas com meio LB (2x) (20 g de triptona L⁻¹; 10 g de extrato de levedura L⁻¹ e 10 g de NaCl L⁻¹, adicionada de 15g de ágar L⁻¹), contendo canamicina (50 µg mL⁻¹) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

4.7. Indução da expressão dos genes de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis*

A indução da expressão dos genes de *Pseudomonas* spp. (*IPD072Aa* e *PIP-47Aa*) e de *B. thuringiensis* (*Cry1Ia10*, *Cry3Aa* e *Cry 8*) foi realizada seguindo o protocolo de Chakroun et al. (2012), com alterações na quantidade de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para uma concentração final de 1 mM e na temperatura de incubação de 22°C.

Os clones recombinantes foram cultivados em meio sólido LB (2x) com canamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 16 h à temperatura de 37°C. O pré-inóculo foi preparado a partir da coleta de uma colônia isolada, a qual foi incubada em 10 mL de meio LB (2x) líquido suplementado com o antibiótico canamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e mantido sob agitação de 200 rpm na temperatura de 37°C por 16 h.

Após esse período, 2,5 mL do pré-inóculo foi adicionado a 250 mL de meio líquido LB (2x), suplementado com o antibiótico canamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e novamente levado a 37°C sob agitação de 200 rpm até que a $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ atingiu um valor entre 0,5 e 0,8. A indução da expressão dos genes foi efetuada com a adição de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1 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 Xg e os sobrenadantes foram descartados. Os sedimentos (“pellets”) 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 foram adicionados 375 μL de lisozima (100 mg mL^{-1}), 125 μL de DNase I (1 mg mL^{-1}) e 5 μL de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) a 0,1 mol L^{-1} e, em seguida, foram 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 x g a 4°C por 30 min.

O sobrenadante das amostras de *IPD072Aa*, *PIP-47Aa*, *Cry1Ia10* e *Cry3Aa* foram armazenados a -20 °C enquanto a amostra contendo gene *Cry8* foi submetida ao processo de solubilização, no qual o “pellet” foi ressuspense 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 x 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) não transformada foi submetida a todas as etapas de indução e extração proteica, juntamente aos clones recombinantes, sendo considerada uma amostra de controle negativo.

4.8. Análise das proteínas por SDS-PAGE

A expressão das proteínas de cada clone foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida foi realizada utilizando-se mini-gel (60 x 80 x 1,0 mm) pelo sistema de corrida Mini PROTEAN II (Bio-Rad). O gel de separação foi preparado na concentração de 12% de poliacrilamida (acrilamida: bis-acrilamida 30:0,8%) e 1% de SDS e de 5% de poliacrilamida para o gel de empilhamento e 0,5% SDS. A eletroforese foi realizada em tampão Tris-Glicina (50 mM Tris, pH 8,6, 1,92 M glicina e 1% SDS), a 30 mA e 200V por 90 min em temperatura ambiente.

Para cada amostra de 10 µL, foram adicionados 10 µL de tampão de amostra Laemmli 4X [Tris-HCl 0,125 M (pH 6.8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Bromofenol 0,02% (m/v)]. A mistura foi aquecida por cinco minutos a 100°C e aplicada em gel juntamente com o marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). Após o período de corrida das amostras no gel, as bandas polipeptídicas foram, ao final, detectadas pela coloração do gel com solução de Coomassie-Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) dissolvido em solução fixadora [metanol 50% (v/v) e Ácido Acético 10% (v/v)], deixados sob baixa agitação por até 20 min. O gel foi descorado por solução descorante [metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v)] sob baixa agitação lenta por 1 h. O gel foi conservado em água destilada para ser analisado e fotodocumentado.

A massa molecular das proteínas foi aferida comparando-se os perfis àquele do marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas). A quantificação das proteínas recombinantes de IPD072Aa, PIP-47Aa, Cry1Ia10,

Cry3Aa e Cry8 nos lisados de *E. coli* foi feita pelo método de densitometria. Para isso, foram preparados géis de poliacrilamida contendo cinco diferentes concentrações de soroalbumina bovina (BSA) (0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg mL⁻¹) e as respectivas proteínas. Estas foram quantificadas com o auxílio do programa ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Suécia), sendo o padrão para quantificação da concentração final a soroalbumina bovina (BSA).

4.9. Purificação das proteínas

A coluna utilizada para a purificação das proteínas recombinantes foi a “HisTrap™ HP Columns” de 1 mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala Sweden). Estas colunas permitem a purificação por cromatografia de afinidade em resina de “Ni Sepharose” que possibilita uma alta purificação de proteínas marcadas com histidina como as proteínas em estudo que estão fusionadas a uma cauda com seis histidinas (6xHis).

Antes da aplicação na coluna de purificação, os lisados proteicos foram filtrados em filtros de 0,22 µm. A purificação das proteínas foi realizada em coluna pré-equilibrada com tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 20 mM pH 7,4). As eluições foram feitas com o tampão de equilíbrio acrescido de imidazol nas concentrações de 10, 25, 50, 75, e 250 mM. As frações foram coletadas para posterior quantificação, como descrito no item 4.8.

4.10. Filtração em Amicon Ultra 30 kDa

Um filtro Amicon® Ultra 15 mL com uma malha de 30 kDa (Millipore, Alemanha) foi utilizado para remoção do imidazol das proteínas obtidas após a purificação. Foram adicionados 15 mL das proteínas purificadas ao tubo concentrador e os tubos foram centrifugados (4000 Xg; 20 min; temperatura ambiente). Após a centrifugação, 15 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 foram adicionados ao tubo e uma nova centrifugação foi feita (4000 Xg; 20 min; temperatura ambiente). Para retirada da proteína do filtro, 7,5 mL do mesmo tampão foram adicionados. Após a filtração, alíquotas de 10 mL das amostras e do tampão fosfato 100 mM pH 7,0 foram liofilizadas durante 24 hr em um liofilizador “Savant Super Modulyo” e ressuspensas em 1 mL de água deionizada para posterior quantificação, como descrito no item 4.8.

4.11. Análise *in silico* de alinhamento das sequências das proteínas de *Pseudomonas* spp.

A análise *in silico* das sequências nucleotídicas e de aminoácidos das proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa foi realizada para identificação de similaridade entre as sequências. O programa MAFFT v.7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATO et al., 2017) foi utilizado para o alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dessas proteínas. A visualização do alinhamento foi feita através do Geneious Prime® 2022.1.1 (<https://www.geneious.com>).

4.12. Bioensaio seletivo contra *A. grandis*

Para os bioensaios de seleção, as proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* foram normalizadas a uma única concentração de 500 µg mL⁻¹ e incorporadas em dieta artificial para *A. grandis*, a qual foi preparada conforme Monnerat et al. (2000) (Tabela 1). Cerca de 400 µL foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 células. Uma única larva neonata de *A. grandis* foi infestada em cada poço e cada parcela foi constituída de 16 larvas neonatas do referido inseto, sendo utilizados 3 repetições por proteína. Uma condição com água deionizada utilizada para suspensão das proteínas também foi incorporada à dieta com a finalidade de ser utilizada como controle negativo. Ao final, os ensaios foram avaliados 7 dias após a implantação para verificação da mortalidade.

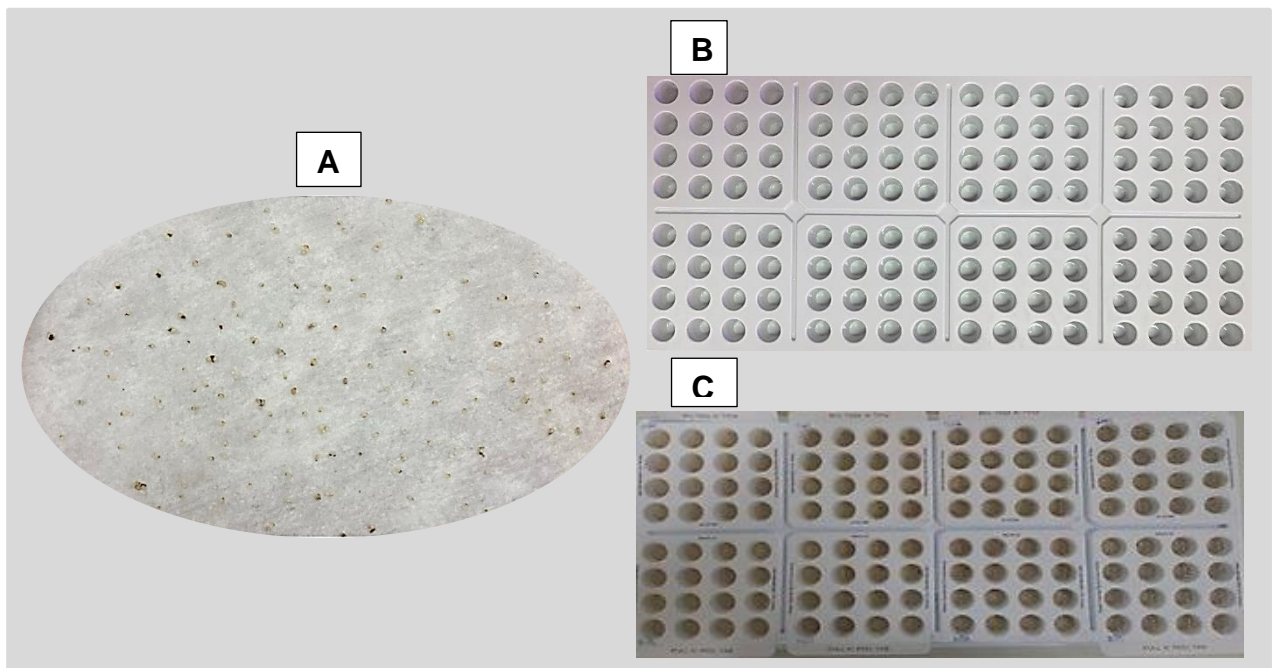
4.13. Bioensaios com *A. grandis* para estimar as CL₅₀ e CL₉₀

Para se estimar as concentrações letais de 50% e 90% (CL₅₀ e CL₉₀) foram utilizadas em todos os bioensaios placas de poliestireno de 128 poços ("Cell Wells, Corning Glass Works", Corning, Nova York) (Figura 7). Uma única larva neonata de *A. grandis* foi infestada em cada poço contendo 1 mL de dieta artificial (Tabela 1). Cada parcela foi constituída de 16 larvas neonatas, sendo utilizado três repetições por concentração, totalizando 48 larvas/concentração. O aumento gradual das diferentes concentrações das proteínas dos lisados proteicos de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* foi realizado de acordo com Shabbir et al. (2018), as quais foram diluídas para 7 concentrações, variando de 2 a 128 µg mL⁻¹. As diferentes concentrações de proteínas foram incorporadas na dieta artificial a uma temperatura de 40°C permitindo a incorporação das proteínas, sem desnatura-las, antes da solidificação da dieta.

Água deionizada foi utilizada como controle negativo para a mortalidade natural das larvas. 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 no orifício aberto na dieta já sólida e seladas com filme de vedação (Figura 7). Essas placas foram mantidas em sala climatizada a $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, contendo umidade relativa $70\pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10 (luz:escuro). A mortalidade foi registrada após sete dias de implantação dos bioensaios, sendo que as larvas que pesavam $<0,2$ mg e não estava além do segundo instar, foram consideradas mortas. O software Polo-Plus (LeOra Software, Berkeley, CA, USA) foi usado para estimar os valores de CL_{50} e CL_{90} em bioensaios de concentração-resposta por análise Probit (FINNEY, 1971) e para obter os valores de inclinação da reta e o qui-quadrado. As diferenças foram consideradas significativa se a estimativa de CL_{50} não estivesse dentro dos intervalos de confiança.

Figura 7. Materiais usados nos bioensaios. (A) Larvas neonatas de *A. grandis* para a execução e avaliação dos bioensaios. (B) Bandeja de poliestireno de 128 poços. (C) Bandeja contendo dieta artificial incorporada com proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* contendo filme de vedação onde as larvas permaneceram em ambiente controlado durante 7 dias.



4.14. Ensaio de interações entre as proteínas frente a *A. grandis*

Os testes para comparar os valores observados e esperados foram realizados simultaneamente com as combinações entre as proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* (Tabela 4). Um teste inicial para procurar interações entre as proteínas foi realizado em uma única concentração de cada proteína. A concentração de cada toxina na mistura foi selecionada de forma que fosse a de seu respectivo valor de CL₅₀. A mortalidade esperada na ausência de interações foi estimada assumindo a hipótese de ação independente simples (FINNEY, 1971). Sob esta hipótese, a proporção (P) de larvas morrendo por exposição a uma mistura de duas toxinas foi calculada como:

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

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

Tabela 4. Combinações testadas nos bioensaios com proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis*.

Isolados	Combinações
<i>P. chlororaphis</i> / <i>P. mosselii</i>	IPD072Aa/PIP-47Aa
<i>B. thuringiensis</i> / <i>B. thuringiensis</i>	Cry1Ia10/Cry3Aa
<i>B. thuringiensis</i> / <i>B. thuringiensis</i>	Cry1Ia10/Cry8
<i>B. thuringiensis</i> / <i>B. thuringiensis</i>	Cry3Aa/Cry8
<i>P. chlororaphis</i> / <i>B. thuringiensis</i>	IPD072Aa/Cry1Ia10
<i>P. chlororaphis</i> / <i>B. thuringiensis</i>	IPD072Aa/Cry3Aa
<i>P. chlororaphis</i> / <i>B. thuringiensis</i>	IPD072Aa/Cry8
<i>P. mosselii</i> / <i>B. thuringiensis</i>	PIP-47Aa/Cry1Ia10
<i>P. mosselii</i> / <i>B. thuringiensis</i>	PIP-47Aa/Cry3Aa
<i>P. mosselii</i> / <i>B. thuringiensis</i>	PIP-47Aa/Cry8

Um segundo teste para interações foi realizado usando ensaios de concentração-resposta em que as proporções das duas proteínas na mistura correspondiam à razão entre seus respectivos valores de CL_{50} . A mortalidade esperada na ausência de interações foi estimada assumindo a hipótese de ação similar simples Finney (1971) usando a fórmula de Tabashnik (1992), que deriva da equação 11.8 de Finney (1971):

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

onde $CL_{50}(m)$ é a concentração letal da mistura, $CL_{50}(a)$ e $CL_{50}(b)$ são as respectivas concentrações letais dos componentes individuais, e ra e rb são as proporções relativas dos componentes a e b na mistura.

Depois de estimada a $CL_{50}(m)$ calculou-se a razão entre a CL_{50} esperada sobre a CL_{50} observada ($CL_{50}(esp)/CL_{50}(obs)$), para desta forma, determinar qual a interação presente nas combinações de proteínas testas (Tabela 4). A razão entre as CL_{50} indica quando o fator de sinergismo (FS) está presente em uma interação sinérgica referente às toxinas em combinação. Sendo assim, um valor de $FS > 1$ indica a ocorrência de sinergismo entre as toxinas, $FS < 1$ indica uma interação antagônica e $FS = 1$ indica toxicidade aditiva (WU et al., 1994).

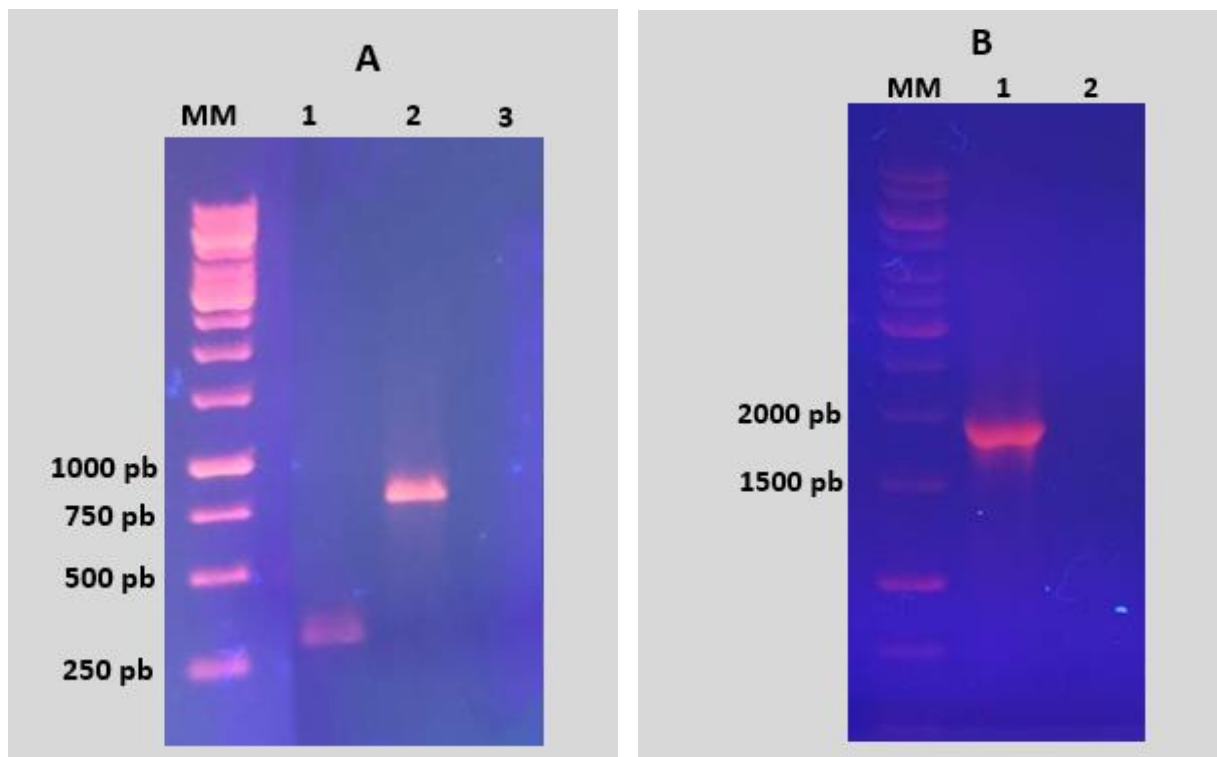
5. RESULTADOS

5.1. Amplificação dos genes *IPD072Aa*, *PIP-47Aa* e *Cry3Aa* por PCR

A comprovação da presença dos genes de *Pseudomonas* spp. e *B. thuringiensis* foi realizada por meio da amplificação do DNA de clones recombinantes pET SUMO::*IPD072Aa*, pET SUMO::*PIP-47Aa* e pET SUMO::*Cry3Aa*, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 2 e 3), os quais apresentaram diferentes tamanhos de produtos amplificados.

Na Figura 8A e 8B estão representados os perfis dos DNAs amplificados com os diferentes iniciadores, destacando que os clones recombinantes apresentaram um produto de amplificação com o tamanho esperado. Com relação aos genes *IPD072Aa* e *PIP-47Aa* os tamanhos foram de 261pb e 888pb, respectivamente. Para o gene *Cry3Aa*, o tamanho para o produto amplificado foi de 1935pb.

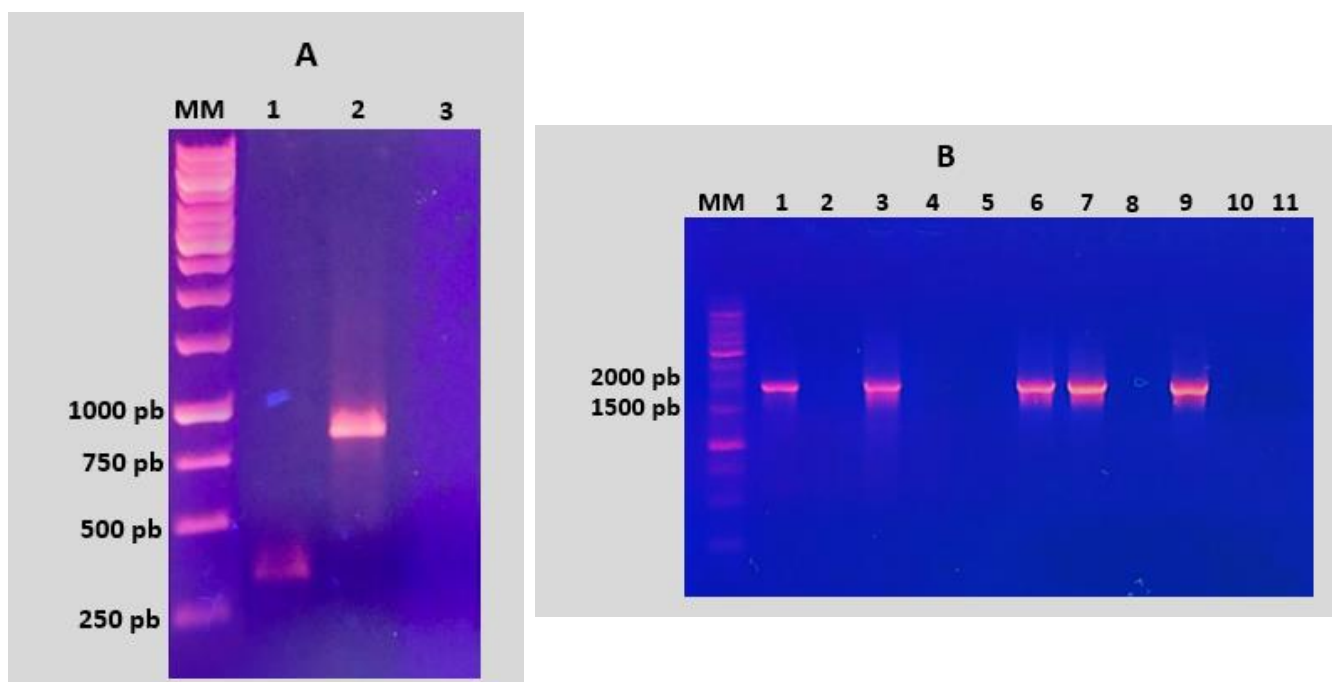
Figura 8. Eletroferograma da amplificação por PCR dos genes de *Pseudomonas* spp. e *B. thuringiensis*. (A) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = *IPD072Aa* (261 pb); 2 = *PIP-47Aa* (888 pb); 3 = Controle negativo da reação. (B) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = *Cry3Aa* (1935 pb); 2 = Controle negativo da reação.



5.2. Confirmação das clonagens dos genes *IPD072Aa*, *PIP-47Aa* e *Cry3Aa* por PCR

Para verificação se o sentido dos genes clonados estava na orientação de leitura correta em relação ao promotor de expressão do vetor pET SUMO, também foi realizado reação de PCR com o oligonucleotídeo SUMO F (direto) com os oligonucleotídeos antisense (reverso) de cada gene. Os produtos de PCR obtidos por essa amplificação apresentaram um aumento de tamanho com cerca de 100 pb, referente à proteína SUMO que está fusionada à extremidade N-terminal do gene de interesse (Figura 9A e 9B). Somente os vetores com os genes que apresentaram produtos de amplificação com os tamanhos esperados quando utilizado o oligonucleotídeo SUMO F com os oligonucleotídeos antisense de cada gene foram selecionados para posterior expressão das proteínas.

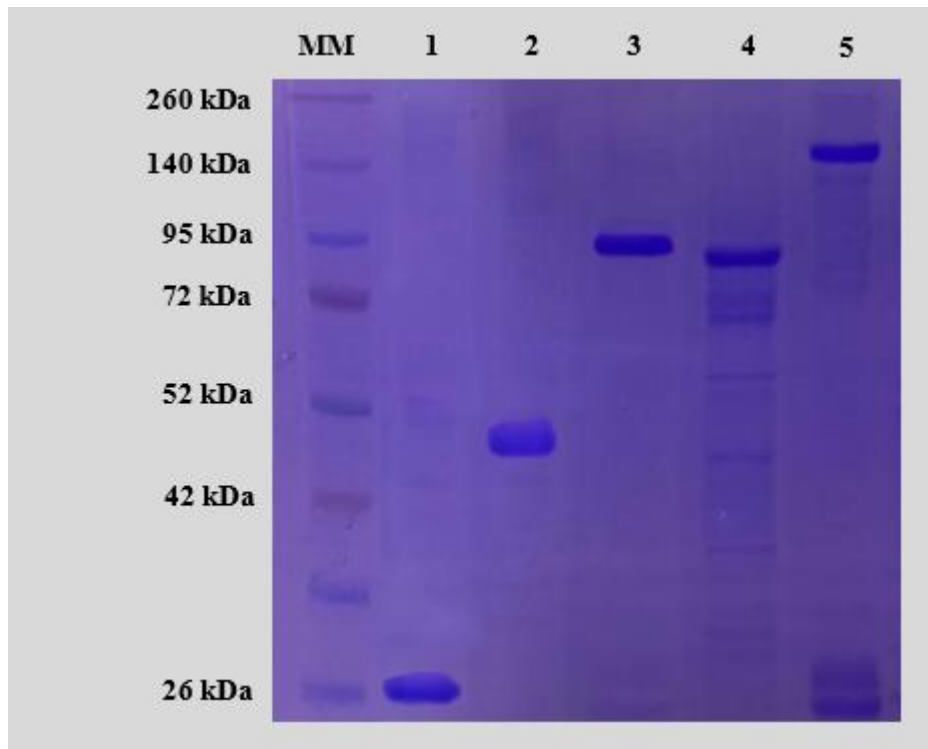
Figura 9. Eletroferograma para a confirmação da clonagem dos genes dos genes de *Pseudomonas* spp. e *B. thuringiensis* na orientação correta em relação ao promotor de expressão do vetor pET SUMO, Amplificação com os oligonucleotídeos antisense específicos de cada gene e o oligonucleotídeo SUMO F. (A) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 = IPD072Aa; 2 = PIP-47Aa; 3 = Controle negativo da reação. (B) MM = Marcador Molecular 1 kb DNA Ladder (GeneRuler™); 1 a 10 = clones com o gene *Cry3Aa*; 11 = Controle negativo da reação.



5.3. Expressão das proteínas

As proteínas recombinantes purificadas de *Pseudomonas* spp. IDP072Aa e PIP-47Aa foram detectadas através das bandas de massa molecular de 24 kDa e 46 kDa, respectivamente. Já as proteínas de *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 foram confirmadas pelas bandas de massa molecular aproximada de 94 kDa, 88 kDa e 143 kDa, respectivamente (Figura 10). Para cada proteína foi adicionado o peso de 13 kDa referente à cauda de 6 histidinas (6xHis) e a proteína SUMO, ambas adicionadas pelo vetor de expressão pET SUMO na região N-terminal da proteína.

Figura 10. Detecção das proteínas purificadas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* em gel de SDS-PAGE 12%. MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = IPD072Aa; 2 = PIP-47Aa; 3 = Cry1Ia10; 4 = Cry3Aa; 5 = Cry8.

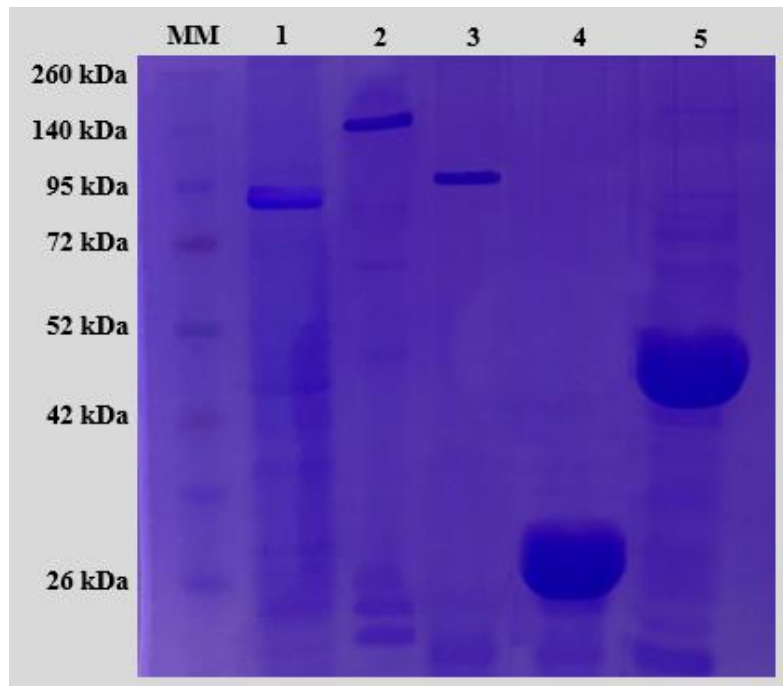


5.4. Concentração das proteínas em filtro Amicon

As frações das proteínas purificadas foram filtradas em Amicon Ultra 30 kDa (Millipore) para retirada do imidazol nas amostras. Após filtração, amostras mais limpas e em maior concentração foram obtidas (Figura 11). Devido à alta

concentração das proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa mostradas na Figura 9, foi necessário diluí-las para posterior quantificação.

Figura 11. Perfil proteico das proteínas purificadas e concentradas após filtragem em Amicon Ultra 30kDa (Millipore). MM = Marcador Molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = Cry3Aa; 2 = Cry8; 3 = Cry1Ia10; 4 = IPD072Aa; 5 = PIP-47Aa.



5.5. Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas foi realizada através do programa ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio Sciences AB, Uppsala, Suécia). O padrão para a quantificação da concentração final das proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* foi a proteína soroalbumina bovina (BSA) diluídas em cinco diferentes concentrações de 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg mL⁻¹ (Figura 12 e 13).

Para as proteínas de *Pseudomonas* spp. IPD072Aa e PIP-47Aa foram obtidas as seguintes concentrações: 1,95 mg mL⁻¹ e 2,25 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 12). Já para as proteínas de *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10, Cry3Aa e Cry8 as concentrações obtidas foram de 0,38 mg mL⁻¹, 0,33 mg mL⁻¹ e 0,35 mg mL⁻¹, respectivamente (Figura 13).

Figura 12. Detecção e quantificação das proteínas purificadas em gel de SDS-PAGE 12% por meio da curva de soroalbumina bovina (BSA). MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = BSA (0,88 mg mL⁻¹); 2 = BSA (0,44 mg mL⁻¹); 3 = BSA (0,22 mg mL⁻¹); 4 = BSA (0,11 mg mL⁻¹); 5 = BSA (0,05 mg mL⁻¹); 6 = Proteína IPD072Aa (1,95 mg mL⁻¹); 7 = Proteína PIP-47Aa (2,25 mg mL⁻¹).

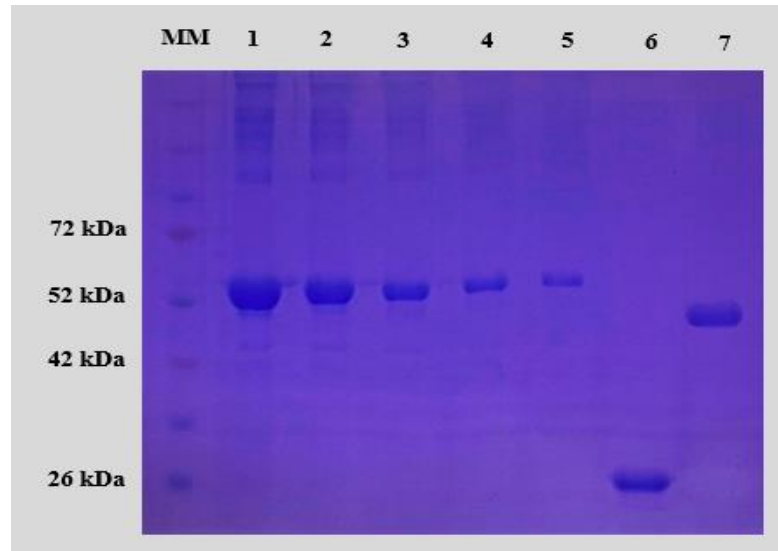
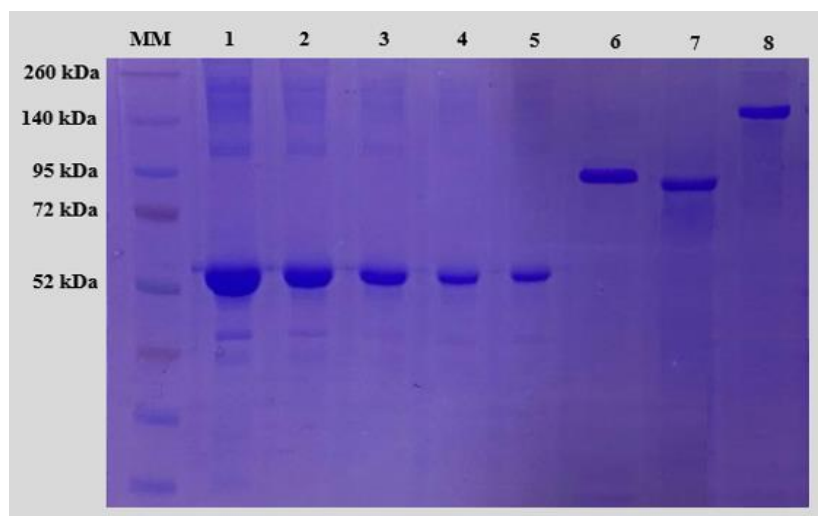


Figura 13. Detecção e quantificação das proteínas purificadas em gel de SDS-PAGE 12% por meio da curva de soroalbumina bovina (BSA). MM = Marcador molecular “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder”; 1 = BSA (0,88 mg mL⁻¹); 2 = BSA (0,44 mg mL⁻¹); 3 = BSA (0,22 mg mL⁻¹); 4 = BSA (0,11 mg mL⁻¹); 5 = BSA (0,05 mg mL⁻¹); 6 = Proteína Cry1Ia10 (0,38 mg mL⁻¹); 7 = Proteína Cry3Aa (0,33 mg mL⁻¹); 8 = Cry8 (0,35 mg mL⁻¹).



5.8. Atividade inseticida contra *A. grandis*

Pelas concentração-resposta que foram realizados nos bioensaios foi possível estimar os valores de CL₅₀ e CL₉₀ das cinco toxinas, e os resultados são mostrados na Tabela 6. As toxicidades de diferentes toxinas testadas contra larvas neonatas de *A. grandis* variaram consideravelmente, com valores de CL₅₀ variando de 6,35 a 17,71 µg mL⁻¹, já para CL₉₀ a variação foi 36,12 a 85,74 µg mL⁻¹. Entre as proteínas de *Pseudomonas* spp. a toxidade observada frente as larvas de *A. grandis* foi menor quando comparado com as proteínas de *B. thuringiensis* tanto para o nível CL₅₀ como para CL₉₀. Para ambos os níveis a toxicidade das proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa foi semelhante, não apresentado diferença significativa. As proteínas de *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa e Cry8 apresentaram similaridade quanto a toxidade a praga do algodoeiro com valores semelhantes ao nível de CL₅₀. A proteína Cry1Ia10 apresentou toxicidade moderada contra larvas do inseto-praga com valores intermediários de CL₅₀, embora não significativamente diferente de Cry3Aa. No entanto, ao nível de CL₉₀ a proteína Cry1Ia10 foi igualmente toxica quando comparada com as proteínas Cry3Aa e Cry8 frente a larva do inseto. Esta diferença na atividade relativa nos níveis de CL₅₀ e CL₉₀ é devido à diferença nas respectivas inclinações das linhas de regressão entre as proteínas. Os controles negativos não causaram mortalidade nas condições dos ensaios.

Tabela 6. Estimativa das concentrações letais (CL₅₀ e CL₉₀) das proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* sobre larvas neonatas de *Anthonomus grandis*.

Proteínas	CL ₅₀ (IC min.-max.) ^a	CL ₉₀ (IC min.-max.) ^a	(b±SE) ^b	(X ²) ^c
IPD072Aa	14,24 (8,38 - 21,53)bc	70,75 (43,13 - 171,13)ab	1,89±0.18c	10,2
PIP-47Aa	17,71 (13,94 - 22,01)c	85,74 (63,83 - 128,15)b	1,87±0.19c	2,39
Cry1Ia10	10,16 (6,37 - 14,51)b	52,80 (34,53 - 105,76)a	1,69±0.19b	7,08
Cry3Aa	7,82 (5,57 - 10,19)ab	46,93 (34,59 - 71,65)a	1,64±0.18b	4,57
Cry8	6,35 (4,40 - 8,36)a	36,12 (26,78 - 55,15)a	1,19±0.16a	0,76

^aValores expressos em µg mL⁻¹ com intervalo de confiança (IC 95%), valores seguidos pela mesma letra minúscula na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas em P>0,05.

^bCoefficiente angular da reta e Erro padrão.

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

5.9. Efeito de combinações entre as toxinas na taxa de mortalidade

Várias combinações entre proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* foram testadas em uma única concentração (a de seus respectivos valores de CL₅₀), e a mortalidade observada foi comparada com a mortalidade esperada, assumindo nenhuma interação (Tabela 7).

Interação significativa foi encontrada com a combinação de Cry1Ia10 com Cry8 ($P \leq 0,05$). Nesse caso, essa interação foi negativa (ou seja, antagônica), pois a mortalidade observada foi menor do que era esperada. Já para a combinação entre IPD072Aa com Cry8 foi observado uma toxicidade aditiva, sendo a mortalidade observada igual a mortalidade esperada, ou seja, a aditividade resultante da aplicação associada das proteínas produziu um efeito de toxicidade nas larvas neonatas de *A. grandis* semelhante quando comparado ao efeito dessas proteínas aplicadas de forma isolada.

Tabela 7. Mortalidade de larvas neonatas de *Anthonomus grandis* a toxinas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* analisadas de forma isoladas e combinadas.

Proteínas/Combinações	(Concentrações) ^a	Mortalidade (%)		Teste Exato de Fisher ^d	X ² (p) ^e
		(Observada) ^b	(Esperada) ^c		
IPD072Aa	14,24	52	50		
PIP-47Aa	17,71	48	50		
Cry1Ia10	10,16	46	50		
Cry3Aa	7,82	51	50		
Cry8	6,35	55	50		
IPD072Aa/PIP-47Aa	14,24+17,71	79	75	0,4781	0,0910 (0,7627)
Cry1Ia10/Cry3Aa	10,16+7,82	81	73	0,2334	0,9430 (0,3314)
Cry1Ia10/Cry8	10,16+6,35	41	75	0,0004**	12,303 (0,0005**)
Cry3Aa/Cry8	7,82+6,35	81	77	0,4011	0,2531 (0,6152)
IPD072Aa/Cry1Ia10	14,24+10,16	79	74	0,3166	0,5151 (0,4732)
IPD072Aa/Cry3Aa	14,24+7,82	80	76	0,4043	0,2361 (0,6272)
IPD072Aa/Cry8	14,24+6,35	78	78	0,5957	0,0000 (1,0000)
PIP-47Aa/Cry1Ia10	17,71+10,16	76	71	0,4093	0,2110 (0,6460)
PIP-47Aa/Cry3Aa	17,71+7,82	77	74	0,4070	0,2221 (0,6374)
PIP-47Aa/Cry8	17,71+6,35	78	76	0,5000	0,0570 (0,8110)

^aAs concentrações de proteínas foram escolhidas de modo a igualar seus respectivos valores de CL₅₀. Os valores são expressos em µg mL⁻¹.

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

^cMortalidade esperada considerando ação simples e independente.

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

^eQui-quadrado e valores de P.

5.10. Análise de sinergismos em *A. grandis* em ensaios de concentração-resposta

As combinações usadas na análise de mortalidade foram investigadas ainda mais por análises de concentração-resposta. Foi observado sinergismo na maioria das combinações testadas, com exceção das combinações entre Cry1Ia10 com Cry8 e IPD072Aa com Cry8. Sinergismo leve foi observado entre as combinações IPD072Aa com Cry1Ia10 e PIP-47Aa com Cry8 (FS = 1,09 e 1,02, respectivamente), sinergismo moderado foi observado entre cinco combinações de proteínas (FS = 1,12 a 1,41). A combinação entre Cry1Ia10 com Cry3Aa apresentou uma alta interação sinérgica (FS = 2,06) (Tabela 8).

A combinação entre IPD072Aa com Cry8 teve a CL_{50} esperada dentro da faixa para esta mistura, sendo assim considerada uma interação aditiva (FS = 1), ou seja, o efeito final das duas proteínas combinadas é igual à soma dos efeitos individuais. A CL_{50} observada da combinação Cry1Ia10 com Cry8 foi maior do que era esperada demonstrando um antagonismo para essa interação de proteínas.

Tabela 8. Interações entre as proteínas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* no controle de larvas neonatas de *A. grandis*.

Combinações de Proteínas	CL ₅₀ (IC min.-max.) ^a Observada	CL ₅₀ (Esperada) ^b	FS ^c	(b±SE) ^d	(X ²) ^e
IPD072Aa/PIP-47Aa (1:1)	6,82 (3,32 - 10,59)	7,89	1,16	1,74±0,20	8,70
Cry1Ia10/Cry3Aa (1:1)	2,15 (0,69 - 3,99)	4,42	2,06	1,06±0,18	1,26
Cry1Ia10/Cry8 (1:1)	6,41 (4,28 - 8,62)	3,91	0,61	1,60±0,20	4,19
Cry3Aa/Cry8 (1:1)	2,48 (1,03 - 3,98)	3,50	1,41	1,51±0,27	0,71
IPD072Aa/Cry1Ia10 (1:1)	5,45 (3,17 - 8,13)	5,93	1,09	2,15±0,27	3,92
IPD072Aa/Cry3Aa (1:1)	4,28 (3,12 - 5,49)	5,05	1,18	1,83±0,25	2,98
IPD072Aa/Cry8 (2:1)	3,36 (2,41 - 4,28)	3,36	1,00	2,01±0,28	2,20
PIP-47Aa/Cry1Ia10 (1:1)	5,19 (3,98 - 6,49)	6,46	1,24	2,02±0,26	1,19
PIP-47Aa/Cry3Aa (2:1)	3,72 (2,74 - 4,70)	4,15	1,12	1,93±0,26	1,29
PIP-47Aa/Cry8 (2:1)	3,64 (2,64 - 4,65)	3,70	1,02	1,85±0,25	2,84

^aValores expressos em µg mL⁻¹ com intervalo de confiança (IC 95%);

^bMortalidade esperada considerando simples ação similar.

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

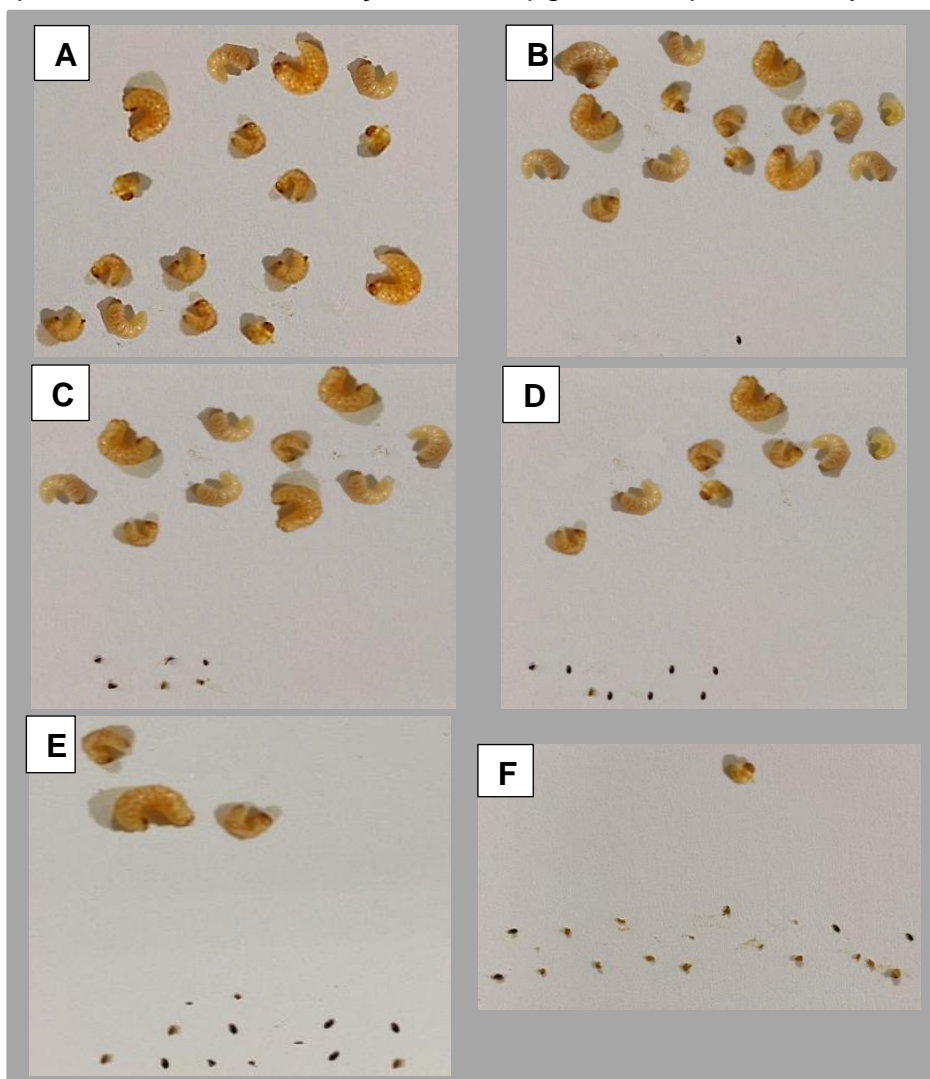
^dCoefficiente angular da reta e Erro padrão.

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

5.11. Avaliação das parcelas dos bioensaios

A avaliação de cada parcela das diferentes concentrações testadas nos bioensaios foram feitas após 7 dias de implantação. O tratamento controle, com água deionizada, mostrou-se ser satisfatório, sendo que todas as larvas de *A. grandis* sobreviveram (Figura 16). Para as proteínas testadas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis*, o comportamento foi similar, à medida que aumentava a concentração das proteínas incorporadas na dieta a mortalidade das larvas também aumentava.

Figura 16. Avaliação das parcelas dos bioensaios com *A. grandis*. (A) Parcela controle após 7 dias. (B) Parcela que recebeu a concentração de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína IPD072Aa. (C) Parcela que recebeu a concentração de $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína PIP-47Aa. (D) Parcela que recebeu a concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína Cry1Ia10. (E) Parcela que recebeu a concentração de $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína Cry3Aa. (F) Parcela que recebeu a concentração de $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ da proteína Cry8.



6. DISCUSSÃO

A expressão da proteína Cry1Ia10 obtida nesse trabalho (Figura 9) corrobora com os resultados obtidos por Bergamasco et al. (2013) e Marucci (2015). Para a proteína Cry3Aa foi obtida banda de massa molecular aproximadamente de 88 kDa, corroborando com os dados já descrito na literatura com valores de massa molecular entre 73 a 75 kDa (LAMBERT et al., 1992). Já a proteína Cry8 foi confirmada apresentando banda de aproximada de 143 kDa (Figura 10), indo de acordo com os valores de massa molecular entre 128 a 137 kDa já descritos para essa proteína (SHU et al., 2009; LI et al., 2014; BI et al., 2015; BORGES, 2018). Schellenberger et al. (2016), Wei et al. (2018) e Boeckman et al. (2019) relataram, para as proteínas de *Pseudomonas* spp., banda de tamanho 11 kDa para a proteína IPD072Aa e banda aproximadamente 32 kDa para a proteína PIP-47Aa, estando de acordo com os nossos resultados. Tanto as proteínas de *Pseudomonas* spp. quanto as de *Bacillus thuringiensis* apresentaram tamanhos compatíveis com os já relatados acrescido de 13 kDa relativo à cauda de 6 histidinas (6xHis) e a proteína SUMO ambas referente ao vetor de expressão pET SUMO.

Embora as espécies de *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas mosselii* pertencerem ao mesmo gênero, a análise de similaridade mostrou baixa identidade entre as sequências analisadas (Figura 14 e 15). O que pode implicar na ausência de domínios compartilhados e conseqüentemente diferenças em relação a sua função biológica. O que difere das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, onde análise de alinhamento da estrutura primária dessas toxinas mostrou possuir 3 domínios conservados que estão envolvidos com as funções das proteínas (MAAGD et al., 2001). Os domínios são essenciais para determinar o modo de ação das proteínas sobre os insetos-praga, portanto faz-se necessário a obtenção de maiores informações sobre as estruturas proteicas isoladas de *Pseudomonas* spp. e como elas interagem no intestino da praga alvo.

Os bioensaios para determinar a eficácia de proteínas com potencial inseticidas, tais como as de *Bacillus thuringiensis* e *Pseudomonas* spp., são tipicamente realizados com proteínas individuais, o que é útil para estimar sua contribuição teórica para o controle de pragas quando utilizadas em inseticida biológico ou expressas em culturas geneticamente modificadas. No entanto, sabe-se

que algumas combinações de proteínas inseticidas podem ter efeitos sinérgicos ou antagônicos (DONG et al., 2012; YU et al., 2012; BERGAMASCO et al., 2013; LEMES et al., 2014; FIGUEIREDO et al. 2019). Portanto, ao selecionar combinações de genes que codificam proteínas inseticidas a serem expressas em plantas, é importante considerar não apenas diferenças em seu modo de ação, mas também potenciais interações entre proteínas inseticidas.

Sabe-se que os insetos apresentam graus variados de suscetibilidade a diferentes toxinas inseticidas, sejam elas de *B. thuringiensis* ou de *Pseudomonas* spp., e a avaliação é necessária para definir a suscetibilidade antes da implantação do cultivo comercial de culturas geneticamente modificadas. Estudos publicados por Praça et al. (2007) mostraram que proteínas pertencentes às classes Cry1, Cry3, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry14, Cry18, Cry22, Cry34, Cry35 e Cry36 apresentaram atividade inseticida contra insetos da ordem Coleoptera. No nosso estudo, a toxicidade das proteínas de *B. thuringiensis* e *Pseudomonas* spp. foi avaliada contra *A. grandis*, e os valores de CL₅₀ e CL₉₀ obtidos variaram de 6,35 a 17,71 µg mL⁻¹ e 36,12 a 85,74 µg mL⁻¹, respectivamente (Tabela 6). Dentre as proteínas testadas, a Cry8 e Cry3Aa foram as proteínas mais ativas contra o inseto-praga. Ao nível de CL₅₀ elas não apresentaram diferença significativa e foram 2 vezes mais ativas que as proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa. Já ao nível de CL₉₀ as proteínas Cry11a10, Cry3Aa e Cry8 foram igualmente mais ativas que as toxinas IPD072Aa e PIP-47Aa, as quais apresentaram valores de CL₉₀ mais elevados.

As diferenças observadas ao comparar os resultados no nível CL₅₀ versus o nível CL₉₀ são consequência das diferenças nas inclinações das linhas de regressão dose-mortalidade entre as proteínas Cry8 (1,19); as proteínas Cry3Aa e Cry11a10 (1,64 e 1,69); IPD072Aa e PIP-47Aa (1,87 e 1,89) (Tabela 6). De acordo com os valores de CL₅₀ e CL₉₀, as proteínas de *Pseudomonas* spp. requerem doses mais altas para serem eficazes contra os insetos, mas uma vez atingido um limiar crítico, a resposta aumenta rapidamente com a dose. Uma interpretação a esses altos valores de inclinação das retas referente as proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa pode estar associada que esse tipo de proteína requer uma concentração limite no intestino médio do inseto. Em contraste, as proteínas de Bt mostram uma resposta de dose-mortalidade mais comum, representada por uma inclinação mais rasa.

A proteína inseticida Cry8 mostrou-se, no presente estudo, ser eficiente no controle de larvas de *A. grandis*, apresentando baixa estimativa de CL_{50} , com valor de $6,35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essa estimativa foi mais tóxica quando comparada com estudos anteriores realizados por Oliveira (2008) com a proteína Cry8Ha1 frente a larvas de *A. grandis*, o qual encontrou uma CL_{50} $8,93 \mu\text{g mL}^{-1}$. Trabalhos como os de 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. Larvas de *Holotrichia parallela* e *H. parallela* mostraram ser suscetíveis a toxina Cry8Ea e Cry8Na1 (SHU et al., 2009; LI et al., 2014). Esses resultados confirmam a eficácia e a especificidade do gene *Cry8* em controlar pragas agrícolas da ordem Coleoptera.

Em estudos anteriores, avaliando a toxicidade da proteína Cry11a para *A. grandis* e *Spodoptera frugiperda* foram encontrados que a proteína Cry11a12 recombinante purificada foi tóxica para as larvas desses insetos-praga, sendo $230 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ as maiores concentrações testadas para atingir as toxicidades máximas, respectivamente (GROSSI-DE-SA et al., 2007). Essa concentração é 10 vezes menos tóxica que a encontrada por Martins et al. (2008). Em ambos os casos, as concentrações estimadas para a proteína Cry11 foram menos eficientes que as encontradas no nosso trabalho. Souza Aguiar et al. (2012) estimaram uma CL_{50} para a toxina Cry10Aa contra *A. grandis* de $7,12 \mu\text{g mL}^{-1}$, estando de acordo e mais próximos do valor encontrado no presente estudo.

Ensaio realizados com proteínas Cry11a 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-SA et al., 2007; OLIVEIRA, 2008; MARTINS, 2009; BERGAMASCO et al., 2011; BORGES, 2018), assim como proteínas das classes Cry10 e Cry1B também apresentaram potencial inseticida para o bicudo-do-algodoeiro (MARTINS et al., 2009). Oliveira et al. (2016) construíram uma planta de algodão geneticamente modificada capaz de expressar o gene de Bt *Cry11a10*, o qual possui dupla ação ao controlar de forma eficiente insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera, controlando assim as principais pragas da cultura. Embora haja genes de *Bacillus thuringiensis*, que produz toxinas letais contra alguns tipos de insetos, ainda não existe comercialmente um algodão geneticamente modificado que seja resistente ao *A. grandis*.

A busca por biopesticidas e abordagens alternativas, como o desenvolvimento de estratégias eficientes para atrair e matar insetos-praga, são de extrema importância. Aliado a esses esforços novas toxinas proteicas estão sendo descobertas de diferentes espécies de *Pseudomonas*. As toxinas derivadas de *Pseudomonas* spp. como IPD072a e PiP-47a não correspondem a nenhuma outra sequência de aminoácidos de proteínas atualmente depositadas em bancos de dados e são especificamente tóxicas a insetos da ordem Coleoptera em sua forma monomérica (PANEVSKA et al., 2019). Wei et al. (2018) relataram uma CL_{50} para larvas de WCR (Western Corn Rootworm - lagarta-da-raiz do milho [*Diabrotica virgifera virgifera*]) de $52,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ após quatro dias de exposição à proteína inseticida PIP-47Aa de *P. mosselii*. Já Schellenberger et al. (2016) estimaram uma CL_{50} de aproximadamente $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a proteína IPD072Aa de *P. chlororaphis* após oito dias de exposição. Em nosso estudo relatamos uma menor CL_{50} para sete dias de exposição contra larvas neonatas de *A. grandis*: PIP-47Aa $17,71 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo aproximadamente 3 vezes mais tóxica e IPD72Aa $14,24 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo 8 vezes mais tóxica (Tabela 6). Esses resultados apontam a importância de se encontrar novos genes para ampliar o número de insetos-praga controlados pela ação de diferentes proteínas com potencial inseticida.

O efeito da interação entre proteínas é uma questão importante na seleção de toxinas para uso no controle de pragas e no manejo da resistência de insetos. A eficiência de uma mistura não deve ser estimada apenas com base na eficácia dos ingredientes individuais, mas no sinergismo entre seus componentes. Quando uma mistura é mais tóxica do que o esperado, a interação entre os componentes é considerada sinérgica, quando a mistura é menos tóxica do que o esperado, indica uma interação antagônica (FINNEY, 1971). Várias investigações confirmaram que pode ocorrer sinergismo e antagonismo entre as proteínas de Bt em várias espécies de insetos. Bergamasco et al. (2013) investigaram a interação entre proteínas Vip3Aa e Cry1Ia, revelando sinergismo dessas duas proteínas contra lepidópteros-praga, tais como *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*, e um antagonismo leve em *S. eridania*. Em outro estudo, a combinação de Vip3Aa e Cry9Ca foi ligeiramente sinérgica em *Plutella xylostella* (DONG et al., 2012). Interações entre Vip3Aa e outra classe de proteína (Cyt2Aa) foram estudadas em *Chilo suppressalis*, *Spodoptera exigua*,

Chironomus tepperi, *Helicoverpa armigera* e *Culex quinquefasciatus* (YU et al., 2012). Lemes et al. (2014) testando combinações de proteínas Cry com Vip de *B. thuringiensis* relataram antagonismos para todas as combinações testadas contra *S. frugiperda* e um sinergismo em *Diatraea saccharalis* com combinação Vip3Aa e Cry1Ca. Já Figueiredo et al. (2019) investigaram interações entre outras proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 contra larvas de *Spodoptera frugiperda* e encontraram interações sinérgicas em todas as combinações testadas. Esses indicativos demonstram a importância de se investigar as interações existentes entre diferentes proteínas para controle e manejo da resistência de insetos-praga.

No presente estudo foram testadas diferentes combinações (Tabela 4) para investigação das possíveis interações existentes entre as proteínas. O maior efeito sinérgico foi observado na combinação de Cry1Ia10 e Cry3Aa (FS = 2,06) (Tabela 8). Foi comprovado que Cry1Ia é altamente tóxico para *A. grandis* (GROSSI-DE-SA et al., 2007; MARTINS et al., 2008) e que cepas de *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* contendo o gene *Cry3A* são referência para toxicidade de insetos da ordem Coleoptera, podendo ser eficaz no manejo do controle dessa praga do algodoeiro (MARTINS et al., 2007). Isso sugere o uso potencial da combinação de Cry1Ia10 e Cry3Aa em algodão para um controle mais amplo dessa espécie-alvo e favorece o manejo da resistência da praga, já que as proteínas possivelmente não competem pelo mesmo sítio de ligação.

As interações envolvendo as proteínas Cry3Aa e PIP-47Aa, quando combinadas com as demais proteínas, apresentaram um claro efeito sinérgico, evidenciado pelas maiores diferenças entre os valores de CL₅₀ esperada e os de CL₅₀ observada (Tabela 8). Em relação aos mecanismos para explicar o sinergismo, várias hipóteses têm sido propostas. Uma hipótese é que as proteínas podem formar hetero-oligômeros que têm uma melhor capacidade de inserção na membrana do que os homo-oligômeros correspondentes, resultando em maior toxicidade contra suas pragas-alvo (PARDO-LÓPEZ et al., 2013). Uma outra hipótese seria que as combinações entre duas proteínas possam induzir poros maiores na membrana do intestino médio larval do que quando cada proteína o faz individualmente. A este respeito, Lee et al. (1996) demonstraram que combinação entre toxinas Cry1 mostraram atividade sinérgica contra lagartas *Lymantria dispar*, e também

descobriram que a combinação levou à formação de poros maiores do que quando as toxinas foram usadas isoladamente.

As interações sinérgicas observadas no presente estudo (Tabela 8) indicam que uma planta de algodão piramidal expressando tais combinações seria uma nova estratégia em um programa geral de manejo de pragas para *A. grandis*. Ribeiro et al. (2017) relataram experimentalmente uma planta de algodão geneticamente modificada com ação inseticida contra *A. grandis* conferido pela toxina Cry10Aa. Os bioensaios de suscetibilidade, realizados pela alimentação do *A. grandis* em folhas e botões florais de algodão GM, demonstraram um significativo efeito entomotóxico e um alto nível de mortalidade do inseto, chegando a alcançar até 100% de eficiência.

Além da descoberta destas moléculas isoladas de *B. thuringiensis* para controlar de forma eficaz as pragas agrícolas, já temos também o desenvolvimento de plantas transgênicas com genes de *Pseudomonas* spp. eficientes no controle de Coleopteros pragas. Como no caso do gene *IPD072Aa* de *Pseudomonas chlororaphis*, que codifica a proteína IPD072Aa. Depois de constatada sua atividade inseticida, o gene que codifica a proteína foi utilizado na transformação genética de milho e as plantas obtidas foram resistentes a *Diabrotica virgifera virgifera* (SCHELLENBERGER et al., 2016). Wei et al. (2018), descobriram a proteína PIP-47Aa isolada de *Pseudomonas mosselii*, esta apresentou atividade inseticida contra *Diabrotica virgifera virgifera*, *Diabrotica barberi*, *Diabrotica undecimpunctata*, *Howardi*, *Diabrotica speciosa* e *Phyllotreta cruciferae* demonstrando-se também efetiva quando expressa em plantas de milho.

Boeckman et al. (2019), avaliaram a atividade inseticida da proteína IPD072Aa em um espectro de 15 espécies de insetos, sendo 11 espécies dentro da ordem Coleoptera, e outras quatro espécies representando a ordem de Lepidoptera. Não observaram efeito adverso nas espécies de Lepidoptera, porém na ordem de Coleoptero foi observado uma gama de respostas que incluem crescimento reduzido, atraso no desenvolvimento e/ou sobrevivência reduzida, demonstrado a eficiência em controlar insetos pragas dessa ordem em plantas que expressem a proteína.

Destaca-se, ainda, que em ambos os trabalhos estas novas proteínas mantiveram-se eficazes contra larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* resistentes às proteínas de *Bacillus thuringiensis* mCry3Aa e Cry34Ab1/Cry35Ab1, ambas utilizadas

em eventos comercial de milho transgênico, o que nos coloca frente a possíveis novos mecanismos de ação e novas alternativas ao manejo da resistência dos insetos, pois a piramidação de múltiplas novas proteínas inseticidas com sítios-alvo distintos no intestino médio dos insetos também é essencial para aumentar a durabilidade da tecnologia.

No presente trabalho a maioria das interações envolvendo as proteínas isoladas de *Pseudomonas* spp. demonstraram um efeito sinérgico quando comparado a CL_{50} esperada com a CL_{50} observada, com exceção da combinação entre IPD072Aa com Cry8 (Tabela 8). Esses resultados demonstram a importância de se diversificar a utilização de um único método de controle, com o intuito de aumentar a eficiência do controle das pragas agrícolas, bem como o manejo da resistência dos insetos, favorecendo o prolongamento de uso da tecnologia a nível de campo.

Foi observado um efeito antagônico entre as toxinas Cry11a10 e Cry8 em *A. grandis* (FS = 0,61). O mecanismo relacionado ao antagonismo observado não é conhecido. É possível que as proteínas interajam fisicamente de uma maneira que se sequestram, formando um complexo que produz ambas as proteínas inativas. Alternativamente, a formação do complexo poderia apenas mascarar um epítopo na proteína mais tóxica, impedindo-a de interagir com o receptor de membrana. O antagonismo também pode resultar de interações estéricas, onde ambas as toxinas se ligam a diferentes epítopos na mesma molécula de membrana (LEE et al., 1996; RINCO'N-CASTRO et al., 1999). Sendo necessário novos estudos para determinar o motivo do efeito antagônico entre Cry11a10 e Cry8 observado em *A. grandis*. Também foi observado um efeito aditivo entre as proteínas IPD072Aa e Cry8 (FS = 1,00), indicando que o efeito dessa combinação é igual à soma dos efeitos isolados de cada proteína.

O fato de as combinações das proteínas isoladas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* poderem resultar em interações sinérgicas, antagônicas ou de efeito aditivo pode indicar diferentes modos de ação a nível bioquímico para a espécie de inseto estudada. Os resultados apresentados nesse estudo foram obtidos sob condições de laboratório (na ausência de predadores e parasitoides) e usando dieta artificial (na ausência de fitoquímicos). Portanto, as combinações de proteínas testadas que exibiram interações em condições de laboratório devem ser testadas em

condições de campo onde ambas serão expressas na mesma planta geneticamente modificada, afim de confirmar se as interações encontradas neste estudo iriam persistir ou até mesmo aumentar nessas condições.

Os resultados aqui apresentados, juntamente com os obtidos por outros autores sobre as interações entre proteínas inseticidas em diferentes insetos-praga, demonstram claramente para a importância deste tipo de pesquisa e devem ser considerados complementares aos estudos que tratam do modo de ação de diferentes toxinas, ao selecionar apropriadamente as combinações de genes inseticidas para cultivo piramidal de plantas geneticamente modificadas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados relatam que as proteínas IPD072Aa, PIP-47Aa, Cry11a10, Cry3Aa e Cry8 demonstraram eficiência no controle de *Anthonomus grandis*;

Isoladamente as proteínas Cry3Aa e Cry8 foram mais tóxicas para *A. grandis* que as demais proteínas testadas.

Uma alta interação sinérgica foi evidenciada entre as combinações Cry11a10 com Cry3Aa.

As interações envolvendo as proteínas Cry3Aa e PIP-47Aa, quando combinadas com as demais proteínas, apresentaram um claro efeito sinérgico.

A combinação entre Cry11a10 com Cry8 demonstrou um antagonismo, não sendo recomendado para compor uma planta Bt piramidada.

Os resultados mostraram que a maioria das combinações de proteínas testadas aumentam a toxicidade contra larvas neonatas de *A. grandis*, podendo ser utilizadas no desenho de novas combinações de genes piramidais em culturas geneticamente modificadas, para o controle do referido inseto praga, bem como para manejo da resistência.

As combinações entre as toxinas de *Pseudomonas* spp. e *Bacillus thuringiensis* contra *A. grandis* apresentaram interações sinérgicas, antagônicas e aditivas, sugerindo que há diferentes tipos de interações dentro do hospedeiro, e consequentemente diferentes modos de ação das proteínas testadas.

A toxicidade estimada contra larvas neonatas do bicudo-do-algodoeiro das toxinas derivadas de *Pseudomonas* spp. apontam para a necessidade de se explorar a biodiversidade microbiana na busca de novas proteínas e mecanismo de ação, para ampliar o número de insetos-praga controlados.

REFERÊNCIAS

- ALI, M.I., LUTTRELL, R.G., YOUNG, S. Susceptibilities of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.99, p.164–175, 2006.
- ALI, M.I., LUTTRELL, R.G. Susceptibility of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.100, p.921–931, 2007.
- ARAUJO, L.H.A.; AZEVEDO, F.R. Aspectos Biológicos de *Catolaccus grandis* (Burks) (Hymenoptera:Pteromalidae), Parasitóide do Bicudo do Algodoeiro Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 26(3): 503-506, 1997.
- AZAMBUJA, R.; DEGRANDE. P.E. Biologia e ecologia do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. In: BELOT, J.L. (Ed.). O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle.
- BELL, H.A.; FITCHES, E.C.; DOWN, R.E.; MARRIS, G.C.; EDWARDS, J.P.; GATEHOUSE, J.A. & GATEHOUSE, A.M.R. The effect of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae), a parasitoid of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, 45:983-991, 1999.
- BENINTENDE, G.; MÁRQUEZ, A. M. Bactérias entomopatógenas. In: LECUANA, R. Microorganismos patógenos empleados em el Control Microbiano de Insectos Plaga. Capítulo 4: Bacterias Entomopatógenas, p.61-65, 1996.
- BERGAMASCO, V. B.; GONÇALVES, J. F.; POLANCZYK, R. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. Expression of a new *Bacillus thuringiensis cry11a* 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, A.O.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus thuringiensis* Cry11a10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **J Invertebr Pathol** 112: 152–158.24. 2013.
- BERNALL, C.C.; AGUDA, R.M.; COHEN, M.B. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipinnis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 102:21-28, 2002.

- BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephesia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v.2, p.29-56, 1915.
- BERNALL, C.C.; AGUDA, R.M.; COHEN, M.B. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cyrtorhinus lividipinnis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 102:21-28, 2002.
- BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G.P.; OMOTO, C. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided bt maize hybrids in Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–15, 2015.
- 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
- BOECKMAN, C.J.; STURTZ, E.H.K.; WALKER, C.; WOODS, R.; ZHANG, J. Characterization of the Spectrum of Insecticidal Activity for IPD072Aa: A Protein Derived from *Pseudomonas chlororaphis* with Activity Against *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology**, v. xx (xx), p. 1-7. 2019.
- BORGES, P. C. Interação das proteínas Cry11a10 e Cry8 de *Bacillus thuringiensis* no controle do Bicudo-do-algodoeiro. 2018. 46p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Mechanisms and Use In: Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier BV, Amsterdam, p. 175–206, 2005.
- BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? Trends in Biotechnology, 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.
- BROWN, T. A. Gene Cloning & DNA Analysis an introduction, 6ª edição, Editora Wiley Blackwell, 338p. 2010.

BUSOLI, A. C.; SOARES, J. J.; LARA, F. M. **O bicudo do algodoeiro e seu manejo. Jaboticabal:** FUNEP. 32p. (Boletim, 5), 1994.

CATTANEO, M.G.; YAFUSO, C.; SCHMIDT, C.; HUANG, C.Y.; RAHMAN, M.; OLSON, C.; ELLERS-KIRK, C.; ORR, B.J.; MARSH, S.E.; ANTILLA, L.; DUTILLEUL, P.; CARRIÈRE, Y. Farm-scale evaluation of the impacts of transgenic cotton on biodiversity, pesticide use, and yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(20):7571- 7576, 2006.

CHAKROUN, M.; BEL, Y.; CACCIA, S.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; ESCRICHE, B.; et al. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **J Invertebr Pathol** 110: 334–339. 2012.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos - v.9 - Safra 2021/2022, n.5 - Quinto levantamento, p. 1-101, fevereiro 2022; Brasília: Conab, 2022. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>> Acesso em: 6 mar. 2022.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v. 62, p. 807-813. 1998.

CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T.R.; BONNING, B.C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 186, 107438. 2021.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: <http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html>. Acesso em: 29 mar. 2022.

CTNBIO, COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Tabela de plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização. BRASÍLIA - DF. 2022. Disponível em: < <http://ctnbio.mctic.gov.br>> Acesso em: 16 mai. 2022.

DEMAIN, A.L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v.27, p.297–306, 2009.

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

EFSA Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 3: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2015. *EFSA J.* v. 13:4331, 2015.

EMBRAPA - Meio Ambiente. **Algodão Bt**. Jaguariúna. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=bioss:::23>>. Acesso em: 26 mar. 2022.

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

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

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews of Entomology**, 47: 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.

FIGUEIREDO, C.S.; LEMES, A.R.N.; SEBASTIÃO, I.; DESIDÉRIO, J.A. Synergism of the *Bacillus thuringiensis* Cry1, Cry2 and Vip3 proteins in *Spodoptera frugiperda* control. **Applied Biochemistry and Biotechnology**; 188: p. 798-809. 2019.

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

FLURY, P.; AELLEN, N.; RUFFNER, B.; PÉCHY-TARR, M.; FATAAR, S.; METLA, Z.; DOMINGUEZ-FERRERAS, A.; BLOEMBERG, G.; FREY, J.; GOESMANN, A.; RAAIJMAKERS, J.M.; DUFFY, B.; HÖFTE, M.; BLOM, J.; SMITS, T.H.M.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: Phylogenetic distribution and comparative genomics. **ISME Journal**, v. 10, n. 10, p. 2527–2542, 2016.

FLURY, P.; VESGA, P.; PÉCHY-TARR, M.; AELLEN, N.; DENNERT, F.; HOFER, N.; KUPFERSCHMIED, K.P.; METLA, Z.; MA, Z.; SIEGFRIED, S.; DE WEERT, S.; BLOEMBERG, G.; HÖFTE, M.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Antimicrobial and insecticidal: Cyclic lipopeptides and hydrogen cyanide produced by plant-beneficial *Pseudomonas* strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 contribute to insect killing. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 100, p. 1–15, 2017.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; DE BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.;

VENDRAMIN, 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**, v. 6, n. 7, p. 1–7, 29 jul. 2011.

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

GONDIM, D. M. C.; JEAN-LOUIS, B.; SILVIE, P.; PEITI, N. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. 3ª ed. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 120p. (B.T. Nº 33), 1999.

GONDIM, D.M.C.; BELOT, J-L.; SILVIE, P.; PETIT, N. **Manual de identificação das pragas, doenças, deficiências minerais e injúrias do algodoeiro no Brasil**. COODETEC. 3ª ed. Cascavel, PR. 120p. 2001.

GRAÇAS, J. P.; RIBEIRO, C.; COELHO, F.A.A.; CARVALHO, M.E.A.; CASTRO, P.R.C. **Microrganismo estimulantes na agricultura**. Piracicaba: ESALQ – Divisão de Biblioteca, 2015.

GROSSI-DE-SA, M.F.; QUEZADO DE MAGALHAES, M.; SILVA, M.S.; SILVA, S.M.B.; DIAS, S.C.; NAKASU, E.Y.T.; BRUNETTA, P.S.F.; OLIVEIRA, G.R.; OLIVEIRA NETO, O.B.; OLIVEIRA, R.S.; SOARES, L.H.B.; AYUB, M.A.Z.; SIQUEIRA, H.A.A.; FIGUEIRA, E.L.Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a cry1ia-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **J Biochem Mol Biol**; 40(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.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, p.557-580, 1983. DOI: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8.

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

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

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. SIDRA-IBGE, 2022. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>> Acesso em: 16 mar. 2022.

ISAAA. INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. Where are Biotecch Crops Grown in the World? 2022a. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/resources/infographics/wherearebiotechcropsgrown/default.asp>> acesso em: 20 mai. 2022.

ISAAA. INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. GM Approval Database - GM Events with Lepidopteran insect resistance. 2022b. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gmtrait/default.asp?TraitID=6&GMTrait=Lepidopteran%20insect%20resistance>> acesso em: 20 mai. 2022.

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

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

KLÜMPER, W. QAIM, M. A Meta-Analysis of the Impacts of Genetically Modified Crops. **PLoS One**, v. 9(11): e111629. 2014.

KNIGHT, K.; HEAD, G.; ROGERS, J. Season-long expression of Cry1Ac and Cry2Ab proteins in Bollgard II cotton in Australia. **Crop Protection**, v. 44, p. 50-58, 2013.

KUPFERSCHMIED, P.; MAURHOFER, M.; KEEL, C. Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities. **Front Plant Sci.** v. 4:287. 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00287.

LABREUCHE, Y.; CHENIVESSE, S.; JEUDY, A.; LE PENSE, S.; BOULO, V.; ANSQUER, D.; PAGÈS, S.; GIVAUDAN, A.; CZJZEK, M.; LE ROUX, F. Nigritoxin is a bacterial toxin for crustaceans and insects. **Nature Communications**, v. 8, n. 1248, p. 1–9, 2017.

LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSSENS, S.; SOETAERT, P.; PEFEROEN, M. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2536-2542. 1992.

LECADET, M. M.; FRACHON, E.; DUMANOIR, V. C.; RIPOUTEAU, H.; HAMON, S.; LAURENT, P.; TIÉRY, I. Updating the H- antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**, 86: 660-672, 1999.

- LEE, M. K.; RAJAMOHAN, F.; GOULD, F.; DEAN, D.H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA delta-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3836–3842, 1995.
- LEE, M.K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.; DEAN, D.H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. **Appl Environ Microbiol**, 62: 583–586. 1996.
- 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**, v. 9:e107196, 2014.
- LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B; ELLSWORTH, P.C. Insect and mite pests of cotton. In: SMITH, C.W. & COTHREN, J.T. Cotton: Origin, History, Technology, and Production, p.489-551, 1999.
- LI, H.; SHU, C.; HE, X.; GAO, J.; LIU, R.; HUANG, D. Detection and identification of vegetative insecticidal proteins vip3 genes of *Bacillus thuringiensis* strains using polymerase chain reaction-high resolution melt analysis. **Current Microbiology**, v. 64, p. 463–468, 2012.
- 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.
- LIM, D. J.; YANG, S. Y.; NOH, M. Y.; LEE, C. W.; KIM, J. C.; KIM, I. S. Identification of lipopeptide xantholysins from *Pseudomonas* sp.DJ15 and their insecticidal activity against *Myzus persicae*. **Entomological Research**, v. 47, p. 337–343, 2017.
- LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y. C.; HUANG, F.; WANG, Y.; LI, H.; LI, H.; GAO, C.; ZHOU, W.; SHEN, J. Evidence of field-evolved resistance to Cry1Ac-expressing Bt cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in northern China. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 155–161, 2010.
- LIU, F.; YANG, S.; XU, F.; ZHANG, Z.; LU, Y.; ZHANG, J.; WANG, G. Characteristics of biological control and mechanisms of *Pseudomonas chlororaphis* zm-1 against peanut stem rot. **BMC Microbiol** 22, n. 9 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02420-x>
- LOPER, J. E.; HENKELS, M.D.; RANGEL, L.I.; OLCOTT, M.H.; WALKER, F.L.; BOND, K.L.; KIDARSA, T.A.; HESSE, C.N.; SNEH, B.; STOCKWELL, V.O.; TAYLOR, B.J. Rhizoxin analogs, orfamide A and chitinase production contribute to the toxicity of *Pseudomonas protegens* strain Pf-5 to *Drosophila melanogaster*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 3509–3521, 2016.

MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17(4): 193-199, 2001.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, Diversity, and Evolution of Protein Toxins from Spore-Forming Entomopathogenic Bacteria. *Annual Reviews in Genetics*, 37: 409-33, 2003.

MARENGO LOZADA, R.M.; ALVAREZ, L.A.; WHITCOMB, W.H. El picudo mejicano del algodonoero, *Anthonomus grandis* Boh: **el desafio para la producción algodonoera en el Paraguay**. Ministerio de Agricultura y Ganadeiro, Paraguay. Serie Publicacion miscelanea, nº 118, 91p. 1987.

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

MARTINS, É.S.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; SILVA-WERNECK, J.O.; SONE, E.H.; WAGA, I.C.; BERRY, C.; MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biological Control**. V. 40, I. 1, p. 65-68. 2007.

MARTINS, É.S.; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**. p. 1363–1371, 2008.

MARTINS, E. S. **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.

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.

MARUCCI, S. C.; FIGUEIREDO, C. S.; TEZZA, R. I. D.; ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Relação entre toxicidade de proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a receptores intestinais de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 637-648, 2015.

MEN, X.; GE, F.; LIU, X.; YARDIM, E.N. Diversity of arthropod communities in transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton agroecosystems. **Environmental Entomology**, 32(2):270-275, 2003.

METCALF, R.L.; METCALF, R.A. Destructive and useful insects: their habits and control. McGraw-Hill, New York. 1993.

MONNERAT, R.G.; DIAS, S.C.; OLIVEIRA NETO, O.B.; NOBRE, S.D.; SILVA-WERNECK, J.O. & GROSSI DE SÁ, M.F. Criação massa do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. Comunicado Técnico/Embrapa, 46: 1-4, 2000.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S.C.L.; MARTINS, E.S.; QUEIROZ, P.R.M.; SILVA, E.Y.Y.; GARCIA, A.R.M.; CASTRO, M.T.; ROCHA, G.T.; FERREIRA, A.D.C.L.; GOMESS, A.C.M.M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF, 2020.

NARANJO, S.E. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. **Environmental Entomology**, 34(5):1193-1210, 2005.

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

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

NOVAGEM. **Pet System Manual**, TB055 11th Edition, 80p. 2006.

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 Cry1Ia12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, 2016.

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

PANEVSKA, A.; HODNIK, V.; SKOČAJ, M.; NOVAK, M.; MODIC, Š.; PAVLIC, I.; PODRŽAJ, S.; ZARIĆ, M.; RESNIK, N.; MAČEK, P.; VERANIČ, P.; RAZINGER, J.; SEPČIĆ, K. Pore-forming protein complexes from *Pleurotus* mushrooms kill western corn rootworm and Colorado potato beetle through targeting membrane ceramide phosphoethanolamine. **Sci Rep**. v. 9(1):5073. 2019. doi: 10.1038/s41598-019-41450-4. PMID: 30911026.

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

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. ESALQ/FEALQ, 1999.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.-H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 57, p. 106–116, 1 jan. 2018.

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

PIGOTT, C.R.; ELLAR, D.J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and molecular biology reviews**, 71(2):255-281, 2007.

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.

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

RANGEL, L. I.; HENKELS, M.D.; SHAFFER, B.T.; WALKER, F.L.; DAVIS II, E.W.; STOCKWELL, V.O.; BRUCK, D.; TAYLOR, B.J.; LOPER, J.E. Characterization of toxin complex gene clusters and insect toxicity of bacteria representing four subgroups of *Pseudomonas fluorescens*. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1–22, 2016.

RINCO'N-CASTRO, M.C.D.; BARAJAS-HUERTA, J.; IBARRA, J.E. Antagonism between Cry1Ac1 and Cyt1A1 Toxins of *Bacillus thuringiensis*. **Appl Environ Microbiol** 65: 2049–2053. 1999.

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.

ROMEIS, J.; MEISSLE, M.; BIGLER, F. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. **Nature Biotechnology**, 24(1):63-71, 2006.

ROSANO, G.L.; CECCARELLI, E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in microbiology**; 5: 1-17. 2014.

RUFFNER, B.; PÉCHY-TARR, M.; RYFFEL, F.; HOEGGER, P.; OBRIST, C.; RINDLISBACHER, A.; KEEL, C.; MAURHOFER, M. Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 751–763, 2013.

RUIU, L. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 476-492, 2013. DOI: 10.3390/insects4030476.

SAEGLITZ, C.; BARTSCH, D.; EBER, S.; GATHMANN, A.; PRIESNITZ, K. U.; SCHUPHAN, I. Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer in Germany. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 1768-1773, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual 3 ed, New York: Cold Spring Harbor, 250p. 2001.

SANTIAGO, A.C.; VENERONI, G.B.; REGITANO, L.C. de A. Reação em cadeia da polimerase (pcr). Embrapa Pecuária Sudeste - Capítulo em livro científico (ALICE), 2007.

SANTOS, R.C. Estudos biológicos da colesterol oxidase visando o controle do bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2003. 152 p. Tese de Doutorado.

SCHELLENBERGER, U.; ORAL, J.; ROSEN, B.A.; WEI, J.Z.; ZHU, G.; XIE, W.; McDONALD, M.J.; CERF, D.C.; DIEHN, S.H.; CRANE, V.C.; SANDAHI, G.A.; ZHAO, J.Z.; NOWATZKI, T.M.; SETHI, A.; LIU, L.; PAN, Z.; WANG, Y.; LU, A.L.; WU, G.; LIU, L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 634–637, 4 nov. 2016.

SCHNEPF, H.E.; WHITLEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **PNAS**: v. 78, n. 5, p. 2893-2897. 1981.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 775-806. 1998.

SHABBIR, M.Z.; QUAN, Y.; WANG, Z. Characterization of the Cry1Ah resistance in Asian corn Borer and its cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* toxins. **Sci. Rep.** 8, 234. 2018.

SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Reviews in Entomology**, 47:845-881, 2002.

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.

SILVA, C.A.D. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* patogênicos ao bicudo-do-algodoeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(2): 243-247, 2001.

SILVIE, P.; LEROY, T.; BELOT, J-L.; MICHEL, B. **Manual de identificação das pragas, e seus danos no algodoeiro**. 1ª ed. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 2001.100p. (B.T. Nº 34), 2001.

SLEPECKY, R.A.; LEADBETTER, E.R. on the prevalence and roles of sporeforming bacteria and their spores in nature. In: Hurst, A. & Gould, G.W. *The bacterial spore*. Vol. 2, Londres: Academic Press. p. 79-99, 1983.

SOUZA AGUIAR, R.W.; MARTINS, E.S.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Cry10Aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields. *Bt Research*; 3 (1). 2012.

SPERS, E.E. **Agrárias: pesquisa e inovação nas ciências que alimentam o mundo IV**. In: Inseticidas para controle do bicudo do algodoeiro – eficiência, período residual e perdas por escorrimento. Curitiba, PR: Artemis, p.55-65. 2020.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHIENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031–8, ago. 2010.

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

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.; 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.

TASIOR, D.; MICHELI, A.; RUTHES, E. Metodologia molecular de identificação de proteínas Cry em bioinseticidas através de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, v. 4, n. 2, p.1.708-1.714, 2021.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 72, ed. 2, p.211-222. 2006.

TOMQUELSKI, G. V.; MARTINS, G. M. Bicudo em algodão. Cultivar Grandes Culturas, n.111, p.42-45, 2008.

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

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

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

WATSON, J. D. DNA: O segredo da vida. 1º edição. Companhia das letras, São-Paulo. 480 p. 2005.

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

WEI, J.Z.; O'REAR, J.; SCHELLENBERGER, U.; ROSEN B.A.; PARK, Y.J.; McDONALD, M.J.; ZHU, G.; XIE, W.; KASSA, A.; PROCYK, L.; PEREZ ORTEGA, C.; ZHAO, J.Z.; YALPANI, N.; CRANE, V.C.; DIEHN, S.H.; SANDAHI, G.A.; NELSON, M.E.; LU, A.L.; WU, G.; LIU, L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas mosselii* for corn rootworm control. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 2, p. 649–659, 2018.

WHITE, T. J.; ARNHEIM, N.; ERLICH, H. A. The polymerase chain reaction. **Trends in genetics**, v. 5, p. 185-189, 1989.

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

WU, D.; JOHNSON, J.J.; FEDERECI, B.A. Synergism of mosquitocidal toxicity between CytA and CryIVD proteins using inclusions produced from cloned genes of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, v.13, p.965-972, 1994. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00488.x

- WU, S.J.; DEAN, D.H. Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa delta-endotoxin. **J. Mol. Biol.** 255, 628–640. 1996.
- WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z. Suppression of Cotton Bollworm in Multiple Crops in China in Areas with Bt Toxin-Containing Cotton. **Science**, 321(5896): 1676-1678, 2008.
- YALPANI, N.; DAN, A.; BARRY, J. An *Alcaligenes* strain emulates *Bacillus thuringiensis* producing a binary protein that kills corn rootworm through a mechanism similar to Cry34Ab1/Cry35Ab1. **Scientific Reports**, v.7(1), 3063. 2017.
- YANG, J.; QUAN, Y.; SIVAPRASATH, P.; SHABBIR, M.Z.; WANG, Z.; FERRÉ, J.; HE, K. Insecticidal activity and synergistic combinations of ten different Bt toxins against *Mythimna separata* (Walker). **Toxins**; 10, 454. 2018.
- YOKOYAMA, T.; TANAKA, M.; HASEGAWA, M. Novel *cry* gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain Semadara inhibits ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 85(1), 25– 32. 2004.
- YU, X.; LIU, T.; SUN, Z.; GUAN, P.; ZHU, J.; WANG, S.; LI, S.; DENG, Q.; WANG, L.; ZHENG, A.; LI, P. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Curr Microbiol** 64: 326–331, 2012.
- ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícolas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 32p. 2000. (Embrapa-CNPAB. Documento, 127).
- ZHANG, J.; HODGMAN, T. C.; KRIEGER, L.; SCHNETTER, W.; SCHAIRER, H. U. Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 13, p. 4336- 4341. 1997.