

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

**TOXICIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Cry1 DE  
*Bacillus thuringiensis* EM *Helicoverpa armigera*  
(Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Isis Sebastião**

Engenheira Agrônoma

**2015**

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

**TOXICIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Cry1 DE  
*Bacillus thuringiensis* EM *Helicoverpa armigera*  
(Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**Isis Sebastião**

**Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos**

**Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk**

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

**2015**

Sebastião, Isis  
S443t Toxicidade e Interação de Proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis*  
em *Helicoverpa Armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) / Isis  
Sebastião. -- Jaboticabal, 2015  
x, 35 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015  
Orientador: Manoel Victor Franco Lemos  
Co-orientador: Ricardo Antônio Polanczyk  
Banca examinadora: Janete Aparecida Desidério, Camila  
Chiaradia Davolos  
Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Manejo da resistência. 3. Proteínas inseticidas.  
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461:631.52

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** TOXICIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Cry1 DE *Bacillus thuringiensis* EM *Helicoverpa armigera* (Hübner)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

**AUTORA:** ISIS SEBASTIÃO

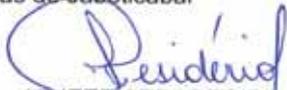
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK

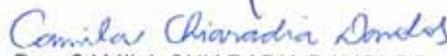
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS  
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. JANETE APPARECIDA DESIDERIO  
Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. CAMILA CHIARADIA DAVOLOS  
DuPont do Brasil / Paulínia/SP

Data da realização: 26 de fevereiro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**ISIS SEBASTIÃO** – nascida em Piedade - SP, em 19 de abril de 1989. Ingressou no curso de Agronomia em agosto de 2007 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Câmpus de Registro. Foi bolsista de Iniciação Científica (FAPESP), onde desenvolveu pesquisa na área de Genética de Conservação. Recebeu o título de Engenheira Agrônoma em julho de 2012. Em março de 2013 ingressou no curso de mestrado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal. Desenvolveu sua dissertação com enfoque em biotecnologia, sendo bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Foi aprovada no curso de doutorado em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas pela mesma instituição, com previsão de início para março de 2015.



## **DEDICO**

À minha família, em especial aos meus pais Wilma Domingues Sebastião e Renato José Sebastião e ao meu avô Jaime José Sebastião, pelo apoio, carinho e por não medirem esforços para me ajudar nesse período. Foram todos imprescindíveis para que eu completasse esse objetivo

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos pelos, ensinamentos, paciência e amizade que construímos nestes anos de trabalho.

Ao professor Ricardo Antonio Polanczyk pela co-orientação e colaboração no desenvolvimento desta dissertação.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pelos ensinamentos, contribuições neste trabalho, pela sua atenção e preocupação com o desenvolvimento de todos os trabalhos realizados no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA).

Aos docentes da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal (FCAV), pelos conhecimentos transmitidos através das disciplinas.

Aos professores Odair Aparecido Fernandes e Jackson Antonio Marcondes de Souza pelas correções e contribuição feitas na qualificação.

À professora Janete Aparecida Desidério e a Doutora Camila Chiaradia Davolos pela participação e sugestões propostas durante a banca de defesa.

A todos os funcionários da instituição pela dedicação na prestação de serviços, facilitando o trabalho dos pós-graduandos. Em especial a técnica do LGBBA, Eliane Cristina da Cunha Alves, pelos ensinamentos, ajuda e dedicação em todas as suas atividades no laboratório.

Aos pós-graduandos Oderlei Bernardi e Rogério Machado do Laboratório de Resistência de Artrópodes e Táticas de Controle do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/Piracicaba pelo fornecimento das lagartas de *H. armigera* utilizadas neste trabalho.

Ao Lucas Agostini, orientado do professor Ricardo Antonio Polanczyk, pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA): Ana Rita N. Lemes, Bruna Marques, Camila Figueiredo, Camila Chiaradia Davolos, Cláudio D. Pavani, Fernanda Mendes de Oliveira, Juliana R. Rossi, Maria Laura Viola, Mariane Camara, Marina Cabral, Paula C. B. Crialesi-Legori e Suzana Marucci, pela convivência, aprendizados e auxílio ao longo do trabalho.

A todos os amigos que me acompanharam em Jaboticabal no período de desenvolvimento dessa dissertação, em especial a Ana Rita, Camilinha e Fernanda Dias pelo companheirismo e amizade.

À Mariana Pelegrini por me acompanhar em todas as etapas do trabalho e da minha vida pessoal. Nossas conversas e seu companheirismo foram imprescindíveis na execução dessa etapa.

Às minhas ex-companheiras de casa Gisele (Fome) e Renata (Ixpulsa) pelo convívio, paciência e amizade.

A todos os amigos que mesmo longe estiveram sempre tão presentes. Luma, Samara, Carol, Fabiana, Andrea, Jussara, Jaqueline, Lilian e Bianca. Obrigada por tornar meu caminho mais leve.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim a todos que de forma indireta ou direta contribuíram para execução deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA**

## Sumário

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	3
2.2. Proteínas Cry.....	5
2.3. <i>Helicoverpa armigera</i> .....	7
2.4. <i>Helicoverpa armigera</i> e <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Expressão das proteínas.....	11
3.2. Bioensaios.....	12
3.2.1. Bioensaios de toxicidade.....	12
3.2.2. Bioensaios de dose resposta.....	14
3.3. Coleta de intestinos e preparo das vesículas.....	14
3.4. Ativação e purificação das proteínas .....	15
3.5. Marcação das proteínas com biotina.....	16
3.6. Ensaio de união e competição entre as toxinas marcadas e as BBMVs de <i>H. armigera</i> .....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

**TOXICIDADE E INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS Cry1 DE *Bacillus thuringiensis* EM *Helicoverpa armigera* (Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**RESUMO** – Estudos que visam a interação das proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, a fim de encontrar combinações adequadas para o desenvolvimento de plantas Bt são ferramentais fundamentais no controle de lepidópteros-praga. A lagarta *H. armigera* causa danos severos nas culturas agrícolas e sua introdução no Brasil levou a busca de formas de controle eficientes e nesse contexto *B. thuringiensis* pode ser um bom agente de controle. Diante do exposto o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Ca de *B. thuringiensis* à *H. armigera*, assim como interação dessas proteínas aos receptores do mesêntero do inseto. A toxicidade foi estimada com bioensaios de dose resposta com as proteínas testadas e a interação das proteínas com os receptores foram verificadas em análise de união entre a proteína ativada e marcada com a vesícula da “borda em escova” da membrana apical das células do intestino (“brush border membrane vesicle”– BBMV) do mesêntero larval de *H. armigera*, e ensaios de competição heteróloga. Dentre as proteínas testadas, a Cry1Ac destacou-se como a mais efetiva, seguida das proteínas Cry1Ab e Cry1Aa. A proteína Cry1Ca não apresentou toxicidade. As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac se ligaram aos receptores da membrana do intestino médio das lagartas de *H. armigera* de forma específica. Os ensaios de competição heteróloga revelaram que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ab competem entre si pelo mesmo receptor.

**Palavras-chave:** biotecnologia, manejo da resistência, manejo integrado de pragas, proteínas inseticidas

**TOXICITY AND INTERACTION OF CRY1 PROTEINS FROM *Bacillus thuringiensis* IN *Helicoverpa armigera* (Hübner) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

**ABSTRACT** – Studies attempting interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins in order to find combinations for developing Bt plants are fundamental in controlling lepidopteran pests. *H. armigera* causes severe damage to agricultural crops and their introduction in Brazil has led the search for efficient control and *B. thuringiensis* may be a good control agent. The aim of this research was to evaluate the toxicity of Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Ca proteins from *B. thuringiensis* to *H. armigera*, as well as interaction of these proteins with the receptors present in insect midgut. Toxicity was estimated from the lethal concentration LC<sub>50</sub> of the tested proteins and protein interactions with the receptors were found in a binding analysis between activated and biotinylated protein with the midgut brush border vesicle membrane (BBMV) of *H. armigera*, and heterologous competitive binding assays. Among the tested proteins, Cry1Ac protein was the most toxic, followed by the Cry1Ab and Cry1Aa proteins. The Cry1Ca protein showed no toxicity. The Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac proteins showed specific binding to the midgut membrane receptors of *H. armigera* caterpillars. Heterologous competitive binding assays revealed that Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac compete for a common receptor in the midgut larvae.

**Keywords:** biotechnology, resistance management, integrated pest management, insecticidal proteins

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é reconhecido mundialmente pelo seu potencial produtivo no setor agropecuário. A safra de grãos de 2013/14, por exemplo, teve um aumento de 6,3% em área plantada, e a produção total um incremento de 6,81 milhões de toneladas, 3,6% maior quando comparada com a safra de 2012/13 (CONAB, 2014).

Este panorama pode variar ao longo dos anos devido à influência de fatores intrínsecos à cadeia produtiva. Um desses fatores é decorrente dos problemas fitossanitários que assolam as safras brasileiras. Dentre as questões fitossanitárias destaca-se o ataque de insetos-praga que causam danos diretos e indiretos podendo comprometer totalmente a lavoura.

A introdução de uma praga exótica no Brasil, chamada *Helicoverpa armigera*, preocupou todos os envolvidos no cenário agrícola, levando a tomada de medidas emergenciais para o seu controle pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O primeiro relato de *H. armigera* no Brasil ocorreu no ano de 2012 em plantações de algodão na Bahia. Os danos advindos do ataque dessa lagarta causaram perdas na ordem de 80%. Além da cultura do algodão foram atingidas também as culturas da soja, milho, feijão e tomate em estados da região Nordeste e Centro-Oeste (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

*H. armigera* é considerada a praga de maior impacto na Austrália, Índia, China e Europa (LIAO; HECKEL; AKHURST, 2002). Sua severidade como inseto-praga envolve aspectos como hábito alimentar polífago, alta capacidade migratória e adaptação a diferentes ambientes e cultivos (TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014). Entre espécies silvestres e cultivadas ocorre em mais de 100 espécies hospedeiras (ALI; CHOUDHURY, 2009).

Por ser uma praga com elevada capacidade de desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos (WYCKHUYS et. al., 2013), além da busca de agentes de controle de menor impacto ao ambiente, produtos com princípios biológicos estão sendo adotados. Na China, Austrália e Índia foram adotados como medida de controle o algodão transgênico contendo genes que expressam proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (LIAO; HECKEL; AKHURST, 2002; ZHANG et al., 2013).

*B. thuringiensis* (Bt) é uma bactéria utilizada no controle de pragas há mais de 70 anos, inicialmente na forma de bioinseticida, e com o avanço da biotecnologia desenvolveram-se as plantas transgênicas Bt. Sua toxicidade está relacionada, sobretudo, com as suas inclusões cristalinas denominadas proteínas Cry. As proteínas Cry são encontradas com diferentes tamanhos, variando de 60 a 140 kDa, a depender das suas formas ativas e não ativas (PARDO-LÓPEZ; SOBÉRON; BRAVO, 2013).

Proteínas dos grupos Cry1 (Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac) e Cry2 (Cry2Aa) possuem bons níveis de toxicidade à *H. armigera* (LI; BOUWER, 2012, 2014). Dados com populações brasileiras de *H. armigera* são escassos e, portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Ca de *B. thuringiensis* à *Helicoverpa armigera*, assim como interação dessas proteínas aos receptores presentes nas “vesículas da membrana da borda escovada” (BBMVs) dessa espécie.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *Bacillus thuringiensis*

*B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, esporulante caracterizada por formar inclusões cristalinas em sua fase estacionária de crescimento. Sua importância está ligada a característica entomopatogênica, ou seja, com a sua exploração como agente microbiano no controle de pragas, atribuída entre outros fatores, às suas inclusões cristalinas (SCHNEPF et al., 1998).

*B. thuringiensis* pertence à família Bacillaceae que abriga outras bactérias como *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. pseudo - mycooides*, e *B. weihenstephanensis*. Os grupos *B. thuringiensis* e *B. cereus* são muito próximos geneticamente e morfológicamente, distinguindo-se um do outro pela produção de cristais em *B. thuringiensis* (PIGOTT; ELLAR, 2007).

O primeiro relato da bactéria *B. thuringiensis* foi registrado por Ishiwata em 1901, durante estudos realizados com o bicho-da-seda. Berliner a redescreveu em 1915, após encontrar atividade inseticida de *B. thuringiensis* contra larvas de traças. Assim nomeada devido à região onde ela foi descoberta, Thuringia na Alemanha, vários foram os eventos que marcaram a trajetória dessa bactéria no controle de pragas. Na década de 30 a descoberta da sua atividade inseticida em campo contra *Ostrinia nubilales*, deu origem ao primeiro produto formulado com o nome de “*Sporeine*” (FEDERICI, 2005). A partir de então, a frequência de estudos com o objetivo de estabelecer as propriedades inseticidas de suas cepas se intensificaram, e na década de 60 foram desenvolvidos dois produtos comerciais de notório reconhecimento, foram eles o Dipel e o Thuricide, ambos formulados a partir do isolado de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 (NARVA; STORERR; MEADE, 2014).

O desenvolvimento dos inseticidas Dipel e Thuricide culminou no registro de vários produtos à base *B. thuringiensis* no período de 1961 a 1995 nos Estados Unidos. Esses inseticidas obtiveram boa aceitação e foram adotados como forma de controle pelos produtores, por apresentar algumas vantagens quando comparados aos inseticidas químicos tradicionais. Os bioinseticidas a

base de *B. thuringiensis* têm a capacidade de não deixar resíduos poluentes no meio ambiente, alta especificidade contra os insetos-alvo, o que conseqüentemente o torna um produto seguro por não possuir atividade a organismos não alvos. Porém, como desvantagem é atribuída a sua baixa persistência.

O espectro de ação dos inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* aumentou consideravelmente com a caracterização de cepas para diferentes ordens de insetos. Dessa forma é sabido que os produtos a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* são voltados para o controle de lepidópteros, os à base de *B. thuringiensis* var. *israelensis* agem contra mosquitos e os de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* possuem ação contra coleópteros (FEDERICI, 2005). No Brasil existem registrados 10 produtos desenvolvidos a partir de *B. thuringiensis*, sendo estes desenvolvidos com *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, *B. thuringiensis* var. *israelenses* e *B. thuringiensis* var. *azawai* ([http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)).

Apesar da indústria de bioinseticidas de *B. thuringiensis* ter importância notória no controle de pragas agrícolas, a maior representatividade do uso de *B. thuringiensis* não é atribuída aos seus bioinseticidas, e sim às culturas transgênicas desenvolvidas com os seus genes. Estes genes codificam diferentes proteínas relacionadas com a atividade inseticida de *B. thuringiensis*, essa atividade está envolvida, sobretudo com ação das proteínas Cry, que se são inclusões cristalinas produzidas pela bactéria. Existe uma grande diversidade nesse grupo de proteínas, relacionada ao fato dos genes *cry* estarem associados a elementos de transposição e plasmídeos (De MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001). Atualmente encontram-se classificados cerca de 760 membros nesse extenso grupo de proteínas ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)).

Outras duas classes de proteínas muito estudadas em *B. thuringiensis* são as proteínas Cyt e as Proteínas Inseticidas Vegetativas – “*Vegetative Insecticidal Proteins*” Vip. O primeiro grupo também é formado por inclusões cristalinas e é caracterizado por sua atividade citolítica *in vitro*, embora tenha mostrado atividade *in vivo* contra dípteros (SOBERON et al., 2013). As proteínas inseticidas vegetativas (Vips) receberam esse nome por serem secretadas na fase de desenvolvimento vegetativo. Estas não possuem

homologia de sequência com as proteínas Cry (ESTRUCH et al., 1996). Existem também outras proteínas com atividade inseticida e potencial de exploração. Neste grupo estão inclusas as proteínas fosfolipases,  $\beta$ -exotoxinas, proteases e quitinases (SCHNEPF et al., 1998).

## 2.2. Proteínas Cry

As proteínas Cry podem adquirir formas bipiramidais, cuboidais, retangulares e irregulares. Cada uma dessas formas está relacionada com uma classe diferente de genes *cry* (SCHNEPF, et al., 1998). As proteínas são classificadas com base em dois aspectos distintos, assim elas podem ser classificadas a partir da similaridade das suas sequências, ou por apresentar atividade inseticida a algum organismo alvo (CRICKMORE et al., 1998). Assim podem existir proteínas Cry vindas de outros organismos como é o caso da Cry16Aa que foi clonada de *Clostridium bifermentans* (BARLOY et al., 1996), ou que não formam cristais, como a Cry1Ia produzida pela cepa T01-328 isolada do solo da região de Cubatão/SP. Essa proteína é solúvel e produzida na fase de desenvolvimento vegetativo da bactéria (VARANI et al., 2013).

O nome de cada proteína é dividido em quatro níveis, em que o primeiro número é o primeiro nível. Todas as toxinas que possuem o mesmo número no primeiro nível possuem 45% de similaridade genética. Dentro deste nível de classificação são encontrados, atualmente cerca de 73 grupos diferentes (Cry1, Cry2, Cry3) ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/)).

O nível de similaridade vai aumentando entre as proteínas, conforme aumentam os níveis descritores compartilhados pelas mesmas. Aquelas que compartilham do quarto nível descritor possuem 99% de homologia em suas sequências (Cry1Aa1, Cry1Aa2 etc).

Apesar de existir uma grande diversidade entre as proteínas Cry, Höfte e Whiteley (1989) descreveram a presença de cinco blocos de regiões conservadas na maioria de suas sequências. A maioria das toxinas possui pelo menos uma dessas cinco regiões conservadas, sugerindo que a presença dessas regiões está relacionada com sua estrutura e função. São encontradas proteínas com diferentes tamanhos variando de 60 a 140 kDa, nas proteínas de

maior tamanho é encontrada a fração C-terminal, que não é determinante no seu modo de ação (PARDO-LÓPEZ; SOBÉRON; BRAVO, 2013).

O mecanismo de ação das proteínas cristal segue uma série de eventos e começa a partir da solubilização e ativação da proteína Cry, no mesêntero da larva hospedeira (PIGOTT; ELLAR, 2007). Essa solubilização e ativação ocorrem por meio da clivagem de parte da proteína; essa quebra ocorre nas pontes de dissulfeto entre os aminoácidos das frações C-terminal e N-terminal, por enzimas proteolíticas presentes no mesêntero larval. As enzimas proteolíticas mais comumente encontradas são a tripsina e a quimiotripsina. Essa fase é influenciada, sobretudo, pela condição físico-química do mesêntero e da composição do cristal, ocorrendo em condições de pH alcalino (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

A seguir a proteína na sua forma ativada passa por uma sequência de eventos de união aos receptores presentes no mesêntero do inseto, o que leva a sua inserção e formação de poros na membrana epitelial. A formação de poros na região apical das membranas das células do intestino médio da larva é explicada pela formação de um canal iônico não seletivo que leva ao inchaço, e rompimento das células com conseqüente morte larval (PIGOTT; ELLAR, 2007). Com relação aos eventos de ligação é atribuída grande importância a algumas proteínas que funcionam como receptores das proteínas de *B. thuringiensis*. Neste grupo encontram-se as aminopeptidases (APN), as fosfatases alcalinas (ALP) e as caderinas (CAD).

As proteínas Cry têm três regiões de domínios. Esses domínios estão relacionados com o mecanismo de ação da proteína, e cada domínio tem uma participação dentro do mecanismo. O domínio I é composto por várias estruturas  $\alpha$ -hélices (7 a 8) em volta da  $\alpha$ -hélice 5, que possui característica hidrofóbica. Esse domínio interfere nos eventos de inserção na membrana e formação do poro. O domínio II possui uma estrutura em  $\beta$ -folha e está envolvido com a união das proteínas aos receptores da membrana e oligomerização. O domínio III atua na união com o receptor e possivelmente na inserção na membrana (ADANG; CRICKMORE; JURAT-FUENTES, 2014).

### **2.3. *Helicoverpa armigera***

*H. armigera* conhecida popularmente como a lagarta do algodoeiro, é uma das pragas de maior relevância e impacto na agricultura mundial. Com ocorrência em países da Ásia, Europa, África e Austrália, causam danos de produtividade na ordem de 2 bilhões de dólares anuais, além de custos socioeconômicos e ambientais associados ao seu controle (TAY et al., 2013).

No Brasil o registro do primeiro relato de lagartas de *H. armigera* ocorreu em plantações de algodão na Bahia, na safra 2011/2012. Foram registrados também ataques nas culturas da soja, milho convencional e transgênico. Na safra 2012/2013 os ataques se repetiram nessa região, alcançando também a cultura do feijão. Nessa mesma safra o ataque de *H. armigera* não ficou restrito apenas a região da Bahia, alcançou também os estados do Maranhão e Piauí nas lavouras de soja. No Mato Grosso foi encontrada em lavouras de algodão, soja e milho e em Goiás na cultura da soja e na cultura do tomateiro (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

Sua severidade como inseto-praga envolve aspectos como hábito alimentar polífago, boa capacidade de dispersão, e adaptação a diferentes ambientes e cultivos. Entre espécies silvestres e cultivadas é relatada a ocorrência de mais de 100 espécies hospedeiras. Quanto às partes atacadas nas plantas, as lagartas de *H. armigera* possuem preferência pelos órgãos reprodutivos, como brotos, inflorescências, frutos e vagens, porém também se alimentam de folhas e caules (CZEPAK et al., 2013)

O ciclo biológico holometábolo tem duração de 40 a 45 dias da postura ao adulto. Os ovos possuem coloração que varia de branco-amarelada, no início da postura, à marrom-escuro quando está próximo o momento da eclosão da larva. A deposição dos ovos ocorre de forma isolada ou em pequenos grupos, e seu período de incubação varia de 2 a 12 dias. O período larval de 13 a 22 dias é composto com o desenvolvimento de seis distintos ínstares. Nesta fase pode-se identificar características determinantes na determinação ou classificação da espécie, são elas, a presença de tubérculos abdominais escuros e bem visíveis na região dorsal do primeiro segmento abdominal e a textura coriácea do seu tegumento (ALI; CHOUDHURY, 2009; ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

O período de pupa dura de 10 a 15 dias, na natureza ocorre no solo e por alguma condição de estresse abiótico, as pupas podem entrar em diapausa (KARIM, 2000). A longevidade dos adultos é de aproximadamente oito dias e possuem preferência por flores que produzem néctar.

A implantação de estratégias de controle para o manejo de pragas é realizado a partir do monitoramento populacional do inseto no ecossistema atacado. Após verificação do nível populacional, realizado por monitoramento de ovos, lagartas, pupas e adultos é possível prever a necessidade e o tipo de controle a ser utilizado. O Manejo Integrado de Pragas (MIP) preconiza a utilização de formas de controle variadas, com o objetivo de se ter alta eficiência e minimizar o aparecimento de resistência. O monitoramento de adultos pode ser feito com armadilhas luminosas e feromônio, no primeiro tipo ocorre a captura de machos e fêmeas e no segundo ocorre apenas a captura de indivíduos machos (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013).

As formas de controle para *H. armigera* são: feromônio sexual para o confundimento de machos, controle químico, controle biológico e controle cultural. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou a liberação de alguns inseticidas químicos com a ressalva da importância da rotação dos seus princípios ativos. Não são reconhecidos inimigos naturais para *H. armigera* no Brasil, para tanto pesquisas focadas no monitoramento de inimigos naturais que podem atacar essa praga são valiosos. Parasitoides de ovos do gênero *Trichogramma* possuem ação contra pragas da mesma família e, portanto pode ser uma alternativa para ovos de *H. armigera*. Produtos biológicos a base de *B. thuringiensis* e *Baculovirus* são indicados com uma boa alternativa, por sua eficiência e segurança ambiental (ÁVILA; VIVAN; TOMQUELSKI, 2013; CZEPAK et al., 2013).

#### **2.4. *Helicoverpa armigera* e *Bacillus thuringiensis***

O uso de *B. thuringiensis* como agente de controle, contra *H. armigera* é preconizado nos países com histórico de danos causados por esta praga. Na Austrália o algodão Bt é utilizado desde 1996, sua primeira versão continha apenas a proteína Cry1Ac em níveis de alta dose. Após ocorrência de

populações resistentes à proteína Cry1Ac, em 2003 essa versão foi substituída pela segunda geração de algodão Bt que expressa a proteína Cry1Ac e Cry2Ab. Essa versão rapidamente foi adotada pela maioria dos agricultores australianos e ela trouxe como benefícios a diminuição de 15% no uso de inseticidas sintéticos em comparação com os cultivos convencionais (DOWNES; MAHON, 2012).

Relatos sobre o uso e proteínas Cry em *H. armigera* apresentam a proteína Cry1Ac como a mais tóxica para populações de lagartas oriundas da Austrália (LIAO; HECKEL; AKHURST, 2002), Espanha (AVILLA et al., 2005) e África do Sul (LI; BOUWER, 2012). As proteínas do grupo Cry2 (Cry2Aa e Cry2Ab) e outras proteínas do grupo Cry1 (Cry1Ab, Cry1Aa, Cry1Aa) também são tóxicas a essa praga.

Ao longo dos anos além do efeito individual das proteínas isoladas de *B. thuringiensis* foram realizados estudos de interação das mesmas *in vitro* ou *in vivo*, por meio de ensaios de união e bioensaios, respectivamente. Ibargutxi et al. (2008) estudaram o efeito de interação entre as proteínas Cry1Ac, Cry2Aa e Cry1Fa. Os testes foram realizados com uma população de origem egípcia e apesar de não ser encontrado efeito individual da proteína Cry1Fa, quando a mesma foi combinada a Cry1Ac houve um efeito aditivo. Para a combinação de Cry1Ac com Cry2Aa a interação foi de natureza sinérgica. Li e Bouwer (2014) avaliaram a relação sinérgica de proteínas Cry em *H. armigera*, e encontraram uma relação de sinergismo entre Cry1Ca e as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry9Aa.

Esses estudos de interação são realizados com o objetivo de impedir o desenvolvimento da resistência de *H. armigera* às proteínas de *B. thuringiensis*. Na China, por exemplo, foi registrada uma frequência de alelos mutantes relacionados com a resistência das larvas à proteína Cry1Ac, sendo que essa mutação tem origem no receptor do tipo caderina (ZHANG et al., 2013). Análises *in vitro* revelam que a resistência à proteína Cry1Ac pode ser explicada pela falta da ligação aos receptores do epitélio médio intestinal (AKHURST et al., 2003).

A identificação dos receptores das proteínas de *B. thuringiensis* presentes em *H. armigera* tem sido realizada por diversos autores. Ning et al. (2010) identificaram duas fosfatases alcalinas (APL) de *H. armigera* e as

caracterizaram como sítios de união da proteína Cry1Ac. Os autores ressaltam a importância desse receptor para toxicidade de Cry1Ac, cuja extensão das APLs encontradas foram de 68 kDa, o que indica uma possível existência de resíduos GalNAc que são presentes em proteínas ancoradas por glicosil fosfatidil inositol (GPI), caso das aminopeptidases e fosfatases alcalinas. Angelluci et al. (2008) identificaram cinco aminopeptidases, obtidas a partir das BBMV's de *H. armigera*, em que houve afinidade de união com a proteína Cry1Ac, dentro das cinco proteínas identificadas quatro delas foram classificadas e agrupadas no mesmo clado de APNs de lepidópteros.

Análises de união das proteínas com as células presentes no mesêntero larval são fundamentais para avaliar as combinações que podem ser realizadas na construção de plantas piramidadas. Proteínas do grupo Cry1 compartilham o mesmo sítio de união em *H. armigera* e em outros lepidópteros de importância agrônômica (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; FERRÉ, 2005; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; DAVOLOS et al., 2015).

A similaridade entre os aminoácidos presentes nessas regiões proteicas pode explicar a existência da competição por proteínas do grupo Cry1A a um mesmo receptor. O reconhecimento dos receptores pelas proteínas inseticidas está relacionado com os domínios II e III das proteínas (SCHNEPF et al., 1998; PARDO-LÓPEZ; SOBÉRON; BRAVO, 2013). As proteínas Cry1Ab e Cry1Ac possuem um alto nível de similaridade genética na região do domínio II, enquanto Cry1Aa e Cry1Ab são muito similares para a região do domínio III (BRAVO, 1997; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Expressão das proteínas

As proteínas testadas foram Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Ca e estão clonadas em linhagens recombinantes de *Escherichia coli* XL-1 Blue expressando uma única proteína. Estes clones foram gentilmente cedidos por Dr. Ruud A. de Maagd (Plant Research International - Wageningen, Holanda).

A expressão de cada proteína foi realizada de acordo com protocolo descrito por Herrero et al. (2004). Os clones foram cultivados em meio TB (Terrific Broth) (12 g de triptona; 24 g de extrato de levedura; 2,31 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 12,54 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 4 mL de glicerol; q.s.p. 1000 mL), + ampicilina ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) em todas as etapas de produção. A primeira etapa do cultivo foi composta pela inoculação do clone em placas de Petri contendo meio TB sólido, para tanto foi adicionado ao meio, ágar numa concentração de 1,5% v/v. As placas permaneceram em ambiente com temperatura de 37°C por 24 horas. Após o desenvolvimento em meio sólido foi transferida uma colônia bacteriana para 20 ml de meio líquido com incubação a 37°C, por 12 h sob agitação de 200 rpm. Por último, um volume de 2,5 ml desse cultivo foi transferido para um erlenmeyer (capacidade de 1 L) contendo 250 ml de meio e incubados durante 60 h, a 28°C sob agitação de 200 rpm. Nas fases iniciais da produção (cultivo em meio sólido e pré-inoculo) foi adicionada glicose 2% para suprimir a expressão das proteínas que nesta fase ocorre de maneira exponencial afetando o desenvolvimento celular e as etapas posteriores. As células cultivadas foram coletadas por centrifugação por 8 min a 7000 rpm, o conteúdo celular precipitado (pellet) obtido foi pesado e mantido a -20°C por pelo menos 30 min.

Para o rompimento celular foi utilizado tampão 50mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5mM de EDTA e 100mM de NaCl com lizozima (800  $\mu\text{g/g}$  de ppt. bacteriano). A suspensão foi tratada com desoxicolato de sódio [ácido desoxicólico (sal sódico)] e solução de DNaseI (1 mg/mL), para completa remoção do DNA. Foi iniciada então a etapa de lavagem com 20mM Tris/HCl pH 7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X 100, por três vezes. Seguida de três lavagens com solução salina tamponada contendo fosfato - 10mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl. Como etapa final foi realizada a solubilização das proteínas Cry em tampão 50 mM  $\text{NaHCO}_3$  pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT (adicionado imediatamente antes do uso) e incubação por 3 h à temperatura ambiente sob agitação horizontal. Essa etapa foi seguida de centrifugação por 15 min a 15000 rpm a 4°C. O sobrenadante contendo a proteína solubilizada foi coletado e filtrado em membrana de poliestireno de 0,44  $\mu\text{m}$ .

A expressão das proteínas foi verificada em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 12%, segundo Laemmli (1970). As proteínas visualizadas em gel de SDS-PAGE foram quantificadas por densitometria utilizando o software ImageQuant TL v. 8.1 (GE Healthcare), como padrão foi utilizado soroalbumina bovina (BSA).

### 3.2. Bioensaios

Os bioensaios foram realizados com lagartas neonatas de *H. armigera* oriundas de uma população de Luís Eduardo Magalhães (LEM) na Bahia. A população de *H. armigera* utilizada está instalada no Laboratório de Resistência de Artrópodes e Táticas de Controle do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/Piracicaba.

Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 128 – poços (Cell Wells, Corning Glass Works) com dieta artificial semi-sólida (Tabela 1). Uma alíquota de 50  $\mu\text{l}$  do lisado proteico foi aplicada na superfície de cada poço. As bandejas foram mantidas em ambiente com temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 14 h de luz: 10 h de escuro. A mortalidade foi verificada aos sete dias após a exposição à dieta tratada.

**Tabela 1:** Composição da dieta artificial de *H. armigera* utilizada nos ensaios. (Adaptada de LIAO; HECKEL; AKHURST, 2002).

Ingredientes	Quantidade
Feijão branco (g)	206
Germe de trigo (g)	164
Farelo de soja (g)	82
Leite em pó (g)	62
Levedura de cerveja (g)	103
Ácido ascórbico (g)	9,8
Ácido sórbico (g)	5
Nipagim (g)	11,6
Formaldeído (ml)	10
Tetraciclina (g)	0,2
Ágar (g)	35
Água (mL)	2400
Solução vitamínica* (mL)	16

\*Solução vitamínica (Ácido Fólico 0,125g, biotina 0,01mg, vitamina B12 0,001g, vitamina B6 0,125g, vitamina B2 0,25g, vitamina B1 0,125g, vitamina B5 0,5g, vitamina B3 0,5g)

### 3.2.1. Bioensaio de toxicidade

A suscetibilidade da praga em relação às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Ca foram testadas em delineamento inteiramente casualizado composto por 9 tratamentos: 4 proteínas em suas formas ativadas e não ativadas e 1 testemunha composta pelo tampão de solubilização. Foram utilizadas 100 lagartas por tratamento distribuídas em quatro repetições de 25 lagartas cada. A concentração utilizada foi de 1000 ng/cm<sup>2</sup> para cada proteína testada. Para comparação dos tratamentos foi realizada uma análise comparativa das médias de mortalidade, por meio do teste de médias de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software Assistat.

### 3.2.2. Bioensaio de dose resposta

As proteínas com mortalidade média superior a 80% foram submetidas aos bioensaios de dose resposta e estes foram realizados de maneira análoga à descrita acima. Foram testadas seis concentrações diferentes para cada proteína (Tabela 2) com 50 larvas neonatas, distribuídas em duas repetições de 25 lagartas acondicionadas nos poços contidos na bandeja de forma individual. A testemunha foi composta pelo tampão de solubilização das proteínas Cry.

**Tabela 2:** Concentrações em ng/cm<sup>2</sup> utilizadas nos bioensaios de dose resposta para cada proteína testada.

Proteínas	Concentrações					
Cry1Aa	39,06	78,12	156,25	312,5	625	1250
Cry1Ab	6,25	12,50	25	50	100	200
Crr1Ac	1,5	3	6	12	24	48

Os valores de mortalidade para cada concentração testada foram submetidos à análise de Probit (Finney et al., 1971), pelo programa POLO-PC (LeOra Software, 2003). Nesta análise foram estimadas as concentrações letais necessárias para controlar 50% e 90% das larvas (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) e os ângulos das curvas de dose resposta de cada proteína no controle larval.

### 3.3. Coleta de intestinos e preparo das vesículas

Os intestinos de larvas de quarto ínstar de *H. armigera* foram dissecados com o auxílio de pinças e tesoura (ESCRICHE et al., 1995), lavados em tampão MET gelado (250 mM Manitol, 17 mM Tris-HCl e 5 mM EGTA; pH 7,5), congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C (HERNÁNDEZ et al., 2004).

As vesículas foram preparadas pelo método de precipitação diferencial de magnésio descrito por Wolfersberger et al. (1987). Para tanto, alíquotas de 1,5 g de intestino das lagartas foram transferidas para tubos contendo 10 ml de

tampão de homogeneização (300mM de manitol, 17mM de Tris-HCl, 10mM de Hepes, 5mM de EGTA, 2mM de DTT, 1mM de EDTA e 1mM de PMSF, pH 7,4.) gelado e foram submetidas à homogeneização em aparelho Turrax (Marconi) por 9 pulsos com duração de 1 min por vez e pausa de 1 min. Após a homogeneização, foram adicionados 10 mL de solução gelada de MgCl<sub>2</sub> a 24 mM e a mistura foi incubada em gelo por 15 min. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 10000 rpm por 1hr e 30min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 2,5 ml de tampão de homogenização e 5ml de MgCl<sub>2</sub> a 24mM, incubado em gelo por 15min e centrifugado a 4500rpm durante 15min a 4°C. O sobrenadante coletado foi novamente centrifugado a 15000 rpm por 40min e o sedimento ressuspendido em 500 µl de tampão de homogeneização.

A concentração das BBMV's de cada preparação foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e aliquotas foram armazenadas a -80 °C.

### **3.4. Ativação e purificação das proteínas**

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram ativadas por proteólise usando tripsina pancreática bovina (Sigma) a 10%. A reação, composta por proteína e tripsina foi mantida por 1h 30m a 37 °C e 140 rpm. A ativação foi verificada em SDS-PAGE 12% (ESCUDERO et al., 2006) e as proteínas foram então submetidas ao processo de purificação.

O processo de purificação das proteínas seguiu o princípio da troca catiônica, através de uma coluna HiTrap (GE). Foram coletadas frações de 0,5 mL em tubos de 1,5 mL contendo a proteína purificada em tampão de eluição (20 mM Tris HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,6). A verificação das proteínas purificadas foi realizada em gel de SDS-PAGE 12%. Assim como a concentração das BBMV's, a concentração das proteínas puras também foi mensurada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### 3.5. Marcação das proteínas com biotina

As proteínas ativadas foram marcadas com biotina usando “Kit ECL Protein Biotinylation Module” (RPN 2202; Amersham, Little Chalfont, United Kingdom), de acordo com as instruções do fabricante.

As proteínas foram eluídas a partir de colunas Sephadex G25 (P10 Desalting - Amersham) com 10 mL tampão PBS 1X (8x 10<sup>-4</sup>g/ml de NaCl, 1,44 x 10<sup>-4</sup>g/ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 x 10<sup>-4</sup>g/ml de KCl, 0,24 x 10<sup>-4</sup>g/ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,4. Frações com volume de 500 µL foram coletadas e quantificadas.

Para verificação da marcação foi realizada uma análise de *Dot blotting*, onde 1,5 µl de cada amostra foram adicionados a uma membrana previamente quadriculada e mantido em repouso por 5 minutos. Posteriormente foi adicionada uma solução bloqueadora contendo 10 mL de tampão PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v) + 0,3 g de reagente de bloqueio, mantidos sob agitação por 5 min a temperatura ambiente. A membrana foi lavada três vezes com solução PBS 1X, Tween 20 0,1% (v/v) sob agitação a temperatura ambiente. A membrana foi então incubada com anticorpo estreptavidina-fosfatase- AP-Conjugate (ROCHE) em TBS (0,05 mM Tris-HCl, 015 mM NaCl, pH 7.5) + Tween 20 0,1% (v/v) diluição 1:2000. E a revelação foi realizada com solução de NBT/BCIP Liquid Substrate System (Sigma Life Science).

As diferentes frações das proteínas biotiniladas foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE a 9%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham) para a análise por *Western blotting*. A eletrotransferência das proteínas foi realizada em tampão de transferência [Tris-base 25mM, glicina 192mM e metanol 20% (v/v)] a 100 V, 350 mA por 1 h. Após a transferência a membrana foi acondicionada por 5 min em solução TBS. As ligações foram bloqueadas com uma solução de TBS, Tween 20 0,1% (v/v) + 5% de reagente de bloqueio sob agitação horizontal por 1 hora. A etapa seguinte foi constituída por duas lavagens da membrana com a solução TBS por 10 segundos e uma por cinco minutos. A detecção das membranas foi realizada de forma análoga ao *Dot blotting* com a utilização do anticorpo estreptavidina-fosfatase - AP-Conjugate (ROCHE) em TBS (0,05 mM Tris-HCl, 015 mM NaCl, pH 7.5) +

Tween 20 0,1% (v/v) diluição 1:2000. A revelação foi feita com solução de NBT/BCIP Liquid Substrate System (Sigma Life Science).

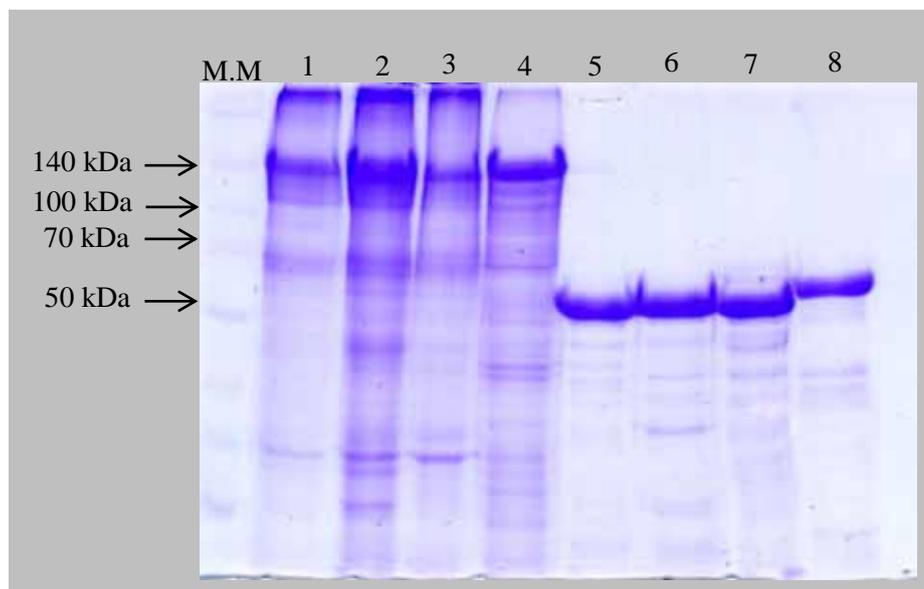
### **3.6. Ensaio de união e competição entre as toxinas marcadas e as BBMV de *H. armigera***

Para o ensaio de ligação, 100 ng de proteínas marcadas com biotina foram incubadas por 1h 30 min com 20µg BBMVs em 100 µL de tampão de união (tampão fosfato: 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl [pH 7,5] e 0,1% soro albumina bovina). Os ensaios de competição foram realizados segundo a metodologia descrita por Fernandez et al. (2006). Para tanto as incubações foram realizadas com um excesso de 40, 200 e 1000 vezes com as proteínas não marcadas em 100µl de tampão de união à temperatura ambiente durante uma hora e meia. As competições heterólogas foram realizadas entre as proteínas Cry1Aa marcada e Cry1Ab não marcada, Cry1Aa marcada e Cr1Ac não marcada e Cry1Ab marcada e Cry1Ac não marcada.

As BBMVs foram lavadas duas vezes com 500 µL de tampão de união e ressuspendidas em 15 µL de tampão de união e 10 µL de tampão de amostra de eletroforese (LAEMMLI, 1970). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE 9% e em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL – Amersham). A metodologia para realização do *Western blotting* seguiu os mesmos passos descritos no item anterior.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas em sua forma não ativada apresentaram um tamanho de aproximadamente 135 kDa. Após a reação de ativação com tripsina, as proteínas passaram a ter um tamanho de aproximadamente 60 kDa (Figura 1).



**Figura 1:** Proteínas Cry1 ativadas e não ativada. **M.M:** marcador molecular Fermentas, **1:** Cry1Aa não ativada; **2:** Cry1Ab não ativada; **3:** Cry1Ac não ativada; **4:** Cry1Ca não ativada; **5:** Cry1Aa ativada; **6:** Cry1Ab ativada; **7:** Cry1Ac ativada; **8:** Cry1Ca ativada.

Os resultados do bioensaio de toxicidade revelaram alta mortalidade (valores maiores que 80%) para as proteínas Cry1Ac e Cry1Ab tanto em sua forma ativada e não ativada, pois não houve diferença estatística entre esses tratamentos. A proteína Cry1Aa também teve um alto índice de mortalidade para a sua forma não ativada, o mesmo não ocorreu com a Cry1Aa ativa que registrou uma mortalidade de 64%. Esses dados corroboram com os dados encontrados por Tabashnik et al. (2011) e Xu et al. (2005), que demonstraram uma redução da resistência de populações de *H. armigera* e *H. zea* às proteínas não ativadas. Taxas de mortalidade maiores para protoxinas podem estar relacionadas com a composição de proteases presentes no intestino da larva hospedeira. O conjunto de diferentes proteases afeta a taxa de conversão da protoxina em toxina (GÓMEZ et al., 2014). A proteína Cry1Ca mostrou baixa

taxa de mortalidade e, portanto ensaios de dose resposta não foram conduzidos com ela (Tabela 3).

**Tabela 3:** Taxas de mortalidade em porcentagem (%) de *H. armigera* a diferentes proteínas Cry1 em suas formas ativadas e não ativadas.

Tratamentos	Mortalidade (%)
Cry1Aa (não ativada)	100 a
Cry1Aa (ativada)	64 b
Cry1Ab (não ativada)	98 a
Cry1Ab (ativada)	90 a
Cry1Ac (não ativada)	96 a
Cry1Ac (ativada)	100 a
Cry1Ca (não ativada)	6 cd
Cry1Ca (ativada)	22 c
Testemunha	0 d

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si.

Nos ensaios de dose resposta dentre as proteínas avaliadas a proteína Cry1Ac apresentou maior toxicidade para lagartas neonatas de *H. armigera*, para os níveis de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>. Os valores do intervalo de confiança da CL<sub>50</sub> não se sobrepuseram, dessa forma, pode-se afirmar que as três proteínas apresentaram níveis de toxicidade diferentes estatisticamente. Para a CL<sub>50</sub> a proteína Cry1Ac foi dez vezes mais tóxica comparada com a proteína Cry1Ab e aproximadamente trinta vezes mais tóxica que a proteína Cry1Aa. O mesmo ocorreu em relação à CL<sub>90</sub>, exceto entre Cry1Ac e Cry1Aa, pois neste caso Cry1Ac foi vinte e três vezes mais tóxica que Cry1Aa. Entre as proteínas Cry1Ab e Cry1Aa houve sobreposição dos valores de intervalo de confiança para a CL<sub>90</sub> classificando-as com o mesmo nível de eficácia. (Tabela 4).

**Tabela 4:** Valores estimados das concentrações letais CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> em ng/cm<sup>2</sup> para lagartas neonatas de *H. armigera*.

Proteínas	b ± (EP) <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> (95% IC) <sup>2</sup>	CL <sub>90</sub> (95% IC) <sup>2</sup>
Cry1Aa	1,64 ± 0,15	277,3 (222,0 – 344, 9)	1675,75 (1197,6 – 2644, 5)
Cry1Ab	1,34 ± 0,17	87,5 (65,6 – 127,2)	787,27 (423,6 – 2138,0)
Cry1Ac	1,39 ± 0,18	8,8 (5,9 – 15,0)	72,87 (32,9 – 395,8)

<sup>1</sup>Valor do ângulo da curva de regressão ± erro padrão; <sup>2</sup>Concentração letal estimada (ng de proteína por cm<sup>-2</sup>); e Intervalo de confiança a 95% de probabilidade

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores em populações da África do Sul em que a proteína Cry1Ac aparece como a mais tóxica seguida das proteínas Cry2Aa, Cry1Ab e Cry1Aa (LI; BOUWER, 2012). Em populações do Sul da Espanha Avilla et al. (2005) relataram que a proteína Cry1Ac4 foi mais tóxica que a proteína Cry2Aa1.

*H. armigera* é considerada uma praga de grande impacto para regiões da África do Sul, Austrália, Índia e China (LIAO; HECKEL; AKHURST, 2002; GUJAR et al., 2007; LI; BOUWER, 2012; ZHANG et al., 2013). Nestes países a bactéria *B. thuringiensis* é utilizada como alternativa de controle, sobretudo na forma de cultura Bt, na China o algodão transgênico que expressa a proteína Cry1Ac é utilizado em seus programas de controle desde 1997 (ZHANG et al., 2013). Liao, Heckel e Akhurst, (2002) encontraram valores de CL<sub>50</sub> de 115 ng/cm<sup>2</sup> para a proteína Cry1Ac em uma população oriunda da Austrália, mantida em laboratório por 30 gerações livre da exposição de inseticidas, sendo treze vezes menos tóxica comparada com os valores encontrados neste trabalho. Essa diferença pode existir devido às características presentes nas populações e à pressão de seleção existente na Austrália onde casos de resistência já foram registrados.

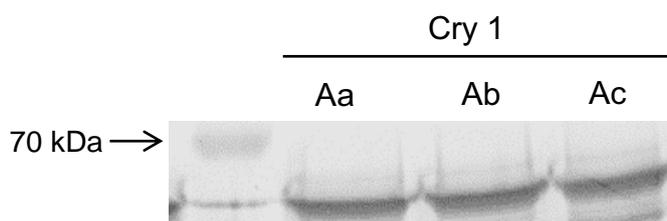
Bird & Akhurst (2007) verificaram que larvas neonatas de *H. armigera*, oriundas de diversos hospedeiros, como milho, algodão, tomate, sorgo, feijão-guandu apresentaram CL<sub>50</sub> para a proteína Cry1Ac variando entre 23,3 a 107,6 ng/cm<sup>2</sup>. Variações quanto à susceptibilidade da praga a uma proteína de *B. thuringiensis* ocorrem entre as populações estudadas, dessa forma, uma mesma proteína pode apresentar maior ou menor toxicidade a diferentes populações. Essas diferenças podem ser atribuídas em função da forma de

aplicação da proteína, da dieta utilizada, à maneira de ativação da toxina e aos métodos de quantificação.

Os valores absolutos de  $CL_{50}$  e  $CL_{90}$  são o primeiro passo na busca de proteínas inseticidas com potencial para implantação em programas de controle de pragas. Porém, é necessária a realização de estudos mais elaborados. Como exemplo podemos citar estudos que mostram a interação dessas proteínas, a elucidação do modo de ação das proteínas, identificação de receptores bem como mutações e expressões diferenciais.

Uma das alternativas que podem ser implantadas em programas de Monitoramento Integrado de Pragas (MIP) é a utilização de plantas transgênicas que expressam mais de uma proteína inseticida. A construção dessas plantas é baseada na combinação mais adequada entre as proteínas a serem utilizadas. Para tanto, a interação das proteínas pode ser avaliada *in vivo*, por meio de bioensaios ou avaliando a forma como essas proteínas se ligam aos receptores presentes nas células epiteliais do intestino médio do hospedeiro.

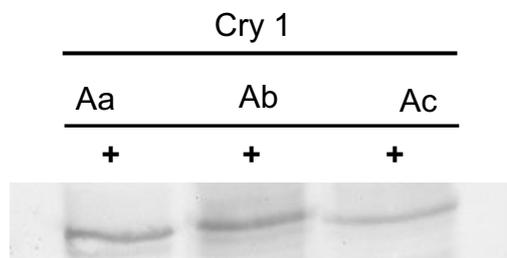
Esses ensaios de interação são compostos por proteínas marcadas e não marcadas. A verificação da marcação das proteínas com biotina através da técnica *Western blotting* revelou a presença de bandas bem marcadas com cerca de 62 KDa para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (Figura 2). Esses resultados demonstram que as proteínas se ligaram à biotina e apresentam-se íntegras após passarem pelo processo de marcação.



**Figura 2:** Marcação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac com biotina.

As três proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac se ligaram aos receptores presentes nas microvilosidades do mesêntero de *H. armigera* (Figura 3). Lu et al. (2013) relataram uma alta afinidade de ligação entre as BBMV's de *H. armigera* e as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac. Os autores observaram que o nível

de saturação no sítio de ligação ocorreu com o aumento da concentração de BBMV utilizada no experimento.



**Figura 3:** União das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac marcadas com biotina aos receptores presentes nas lagartas de *H. armigera*. O sinal positivo indica a união das proteínas aos receptores de BBMVs preparadas a partir do mesêntero larval.

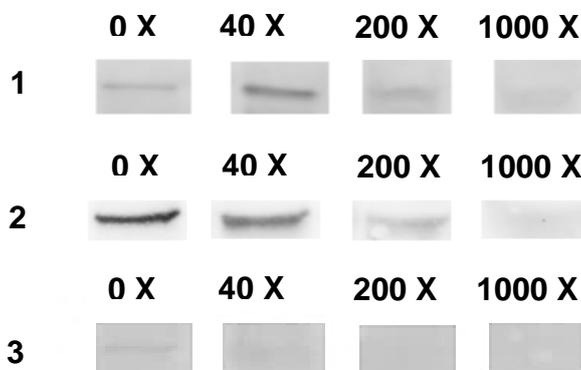
As proteínas que apresentaram união com as vesículas da espécie alvo podem ter se ligado aos três receptores APN, ALP e/ou CAD, pois estes foram descritos na literatura como sítios de ação de proteínas de *B. thuringiensis* à *H. armigera* (PIGGOT; ELLAR, 2007).

A ligação das proteínas aos receptores é um dos determinantes para a especificidade das proteínas Cry, diferentes proteínas podem competir pelo mesmo receptor ou ligar-se a receptores diferentes na membrana.

Nos ensaios de competição homóloga a adição das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac não marcadas em excesso, possibilitou a ligação das mesmas, indicando que essas ligações são específicas. A proteína Cry1Ac se comportou de forma diferente das demais, pois a adição da proteína não marcada em excesso de 40 X permitiu a sua ligação, enquanto para as proteínas Cry1Ab e Cry1Aa as proteínas não marcadas se ligaram quando presentes em excesso de 1000 X (Figura 4). Porém, esse resultado pode ser um falso positivo devido a problemas no processo de quantificação, em que a proteína Cry1Ac poderia estar em quantidades subestimadas em relação as demais.

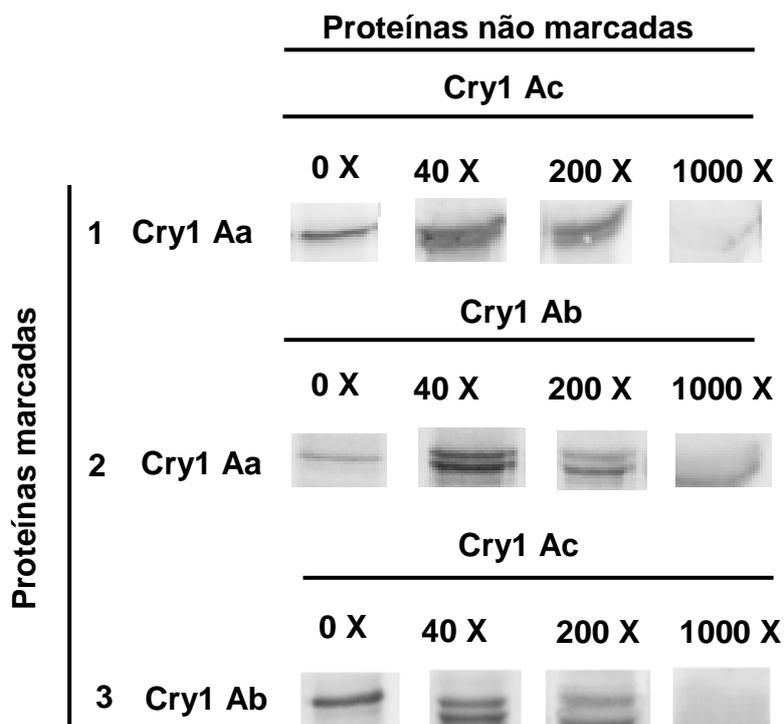
Herrero et al. (2001) e Alcantara et al. (2004) demonstraram que as proteínas, Cry1Ac e Cry1Ab possuem ligações específicas com os receptores de populações de *Plutella xylostella* e *Chilo suppressalis*. Jurat-Fuentes e Andang (2001) relataram através de análises de *Ligand blotting* há existência

de três possíveis receptores diferentes para as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac e um receptor para Cry1 Aa em populações de *Heliothis virescens*.



**Figura 4:** Competição homóloga. **Linha 1:** Cry1Aa marcada e Cry1Aa não marcada. **Linha 2:** Cry1Ab marcada e Cry1Ab não marcada. **Linha 3:** Cry1Ac marcada e Cry1Ab não marcada. Os valores 0X, 40X, 200X e 1000X representam a quantidade de vezes que a proteína não marcada foi colocada em excesso.

Os ensaios de competição heteróloga revelaram que há um compartilhamento pelo mesmo receptor de *H. armigera*. Em todas as combinações testadas (Cry1Aa marcada x Cry1Ac não marcada; Cry1Aa marcada x Cry1Ab não marcada; Cry1Ab marcada x Cry1Ac não marcada) a competição ocorreu com a adição de 1000 X da proteína não marcada (Figura 5).



**Figura 5:** Competição heteróloga. **Linha 1:** Cry1Aa marcada e Cry1Ac não marcada. **Linha 2:** Cry1Aa marcada e Cry1Ab não marcada. **Linha 3:** Cry1Ab marcada e Cry1Ac não marcada. Os valores 0X, 40X, 200X e 1000X representam a quantidade de vezes que a proteína não marcada foi colocada em excesso.

Hernández-Rodríguez & Ferré (2005) também verificaram o compartilhamento de mesmo receptor para proteínas do grupo Cry1 em *H. armigera*. Utilizando proteínas marcadas com biotina de Cry1Fa, os autores relataram a competição pelo mesmo sítio ativo entre Cry1Ac e Cry1Ja.

Estudos de competição heteróloga entre as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac aos receptores do mesêntero de outras espécies de lepidóptera foram realizados por diferentes grupos. O compartilhamento do mesmo receptor para as referidas proteínas foi constatado em: *Ostrinia nubilales*, *Spodoptera frugiperda*, *Cnaphalocrocis medinalis*, *Marasmia patnalis*, *Plutella xylostella*, *Diatraea saccharalis*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* e *Pectinophora gossypiella* (BALLESTER et al., 1999; KARIM; DEAN, 2000; KARIM et al., 2000; JURAT-FUENTES; ADANG, 2001; LI et al., 2004; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2013; DAVOLOS et al., 2015)

A similaridade na sequência de aminoácidos nas regiões II e III das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac pode ser a principal causa de compartilhamento de receptor em espécies de lepidópteros-praga, visto que

essas regiões são fundamentais e específicas no modo de união dessas proteínas aos receptores do mesêntero do inseto (SCHNEPF et al., 1998; PARDO-LÓPEZ; SOBÉRON; BRAVO, 2013).

Carrière, Crickmore e Tabashnik (2015) levantaram hipóteses de que a similaridade nas regiões dos domínios II e III entre diferentes classes de proteínas Cry1 podem resultar no desenvolvimento de resistência cruzada e em efeitos antagônicos. Li e Bouwer (2014) constataram interação antagônica entre as proteínas Cry1Aa:Cry1Ab e Cry1Aa:cry1Ac, quando testadas em bioensaio de interação para *H. armigera*. Ibargutxi et al. (2008) verificaram ação sinérgica entre as proteínas Cry1Ac e CryAa em uma população do Egito. Ambos os relatos corroboram ou elucidam as hipóteses levantadas por Carrière, Crickmore e Tabashnik (2015).

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho é a primeira linha básica de suscetibilidade de *H. armigera* às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Ca no Brasil. O relato de efetividade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac no controle larval da espécie pode servir como base na adoção dessas proteínas em programas de Manejo Integrado de Pragas. A competição pelo mesmo receptor alerta ao uso delas combinadas. O desenvolvimento de plantas transgênicas piramidadas contendo as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ab deve ser evitado pela probabilidade de existir efeitos antagônicos ou o desenvolvimento de resistência cruzada para populações de *H. armigera* no Brasil. Porém, isso não descaracteriza a toxicidade das proteínas de forma isolada às lagartas de *H. armigera* e estas podem ser utilizadas em combinação com outras proteínas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. In: DHADIALLA, T. S.; GILL, S. S. (Edit.). **Advances in Insect Physiology**: Insect Midgut and Insecticidal Proteins. v.47. Elsevier, 2014. cap. 2, p. 39-87.

AKHURST, R. J.; JAMES, W.; BIRD, L. J.; BEARD, C. Resistance to the Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, v. 96, n. 4, p. 1290-1299, 2003.

ALCANTARA, E. P.; AGUDA, R. M.; CURTISS, A.; DEAN, D. H.; COHEN, M. B. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxin Binding to Brush Border Membrane Vesicles of Rice Stem Borers. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 55, p. 169–177, 2004.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 4, p. 99-106, 2009.

ANGELUCCI, C.; BARRETT-WILT, G. A.; HUNT, D. F.; AKHURST, R. J.; EAST, P. D.; GORDON, K. H. J.; CAMPBELL, P. M. Diversity of aminopeptidases, derived from four lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: Identification of proteins binding the  $\delta$ -endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 7, p. 685– 696, 2008.

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 2013, 12p. (Circular Técnica/ Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1517-4557, n. 23).

AVILLA, C.; VARGAS-OSUNA, E.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; GONZÁLEZ-ZAMORA, J.E. Toxicity of Several  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* Against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 1, p. 51–54, 2005.

BARLOY, F.; DELECLUSE, A.; NICOLAS, L.; LECADET, M. M. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia*, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 3099–3105, 1996.

BALLESTER, V.; GRANERO, F.; TABASHNIK, B. E.; MALVAR, T.; FERRÉ, J. Integrative Model for Binding of *Bacillus thuringiensis* Toxins in Susceptible and Resistant Larvae of the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1413–1419, 1999.

BIRD, L. J.; AKHURST, R. J. Variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* (Wallengren) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia to two *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, p.84-94, 2007.

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

BRAVO, A. Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxin Family Proteins and Their Functional Domains. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 9 p. 2793–2801, 1997.

BRÉVAULT, T.; HEUBERGER, S.; ZHANG, M.; ELLERS-KIRK, C.; NI, X.; MASSON, L.; LI, X.; TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Potential shortfall of pyramided transgenic cotton for insect resistance management. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 15, p. 5806-5811, 2013.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 1-8, 2015.

CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, v.1, n.12. Brasília: CONAB, 2014. 127p.

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

CRICKMORE, N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. [http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html). Acessado dia 20 de setembro de 2014.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DAVOLOS, C. C.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DESIDÉRIO, J. A.; FERRÉ, J; ESCRICHE, B.; LEMOS, M. V. F. Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 127, p. 32–34, 2015.

De MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 4, p. 193-199, 2001.

ESCRICHE, B.; SILVA, F.J.; FERRÉ, J. Testing suitability of brush border membrane vesicles prepared from whole larvae from small insects for binding

studies with *Bacillus thuringiensis* Cry1A(b) crystal protein. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 318-320, 1995.

ESCUDERO, I.R.; ESTELA, A.; PORCAR, M.; MARTÍNEZ, C.; OGUIZA, J.A.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4796–4804, 2006.

ESTRUCH, J. .; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings National Academy Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5393, 1996.

FEDERICI, B. A. Insecticidal Bacteria: An Overwhelming Success for Invertebrate Pathology. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, n. 1, p. 30–38, 2005.

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

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

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

GUJAR, G. T.; KALIA, V.; KUMARI, A.; SINGH, B. P; MITTAL, A.; NAIR, R.; MOHAN, M. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 95, n. 2, p. 214–219, 2007.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; JUAN FERRÉ, J. Common Receptor for *Bacillus thuringiensis* Toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5627–5629, 2005.

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

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J. ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared Midgut Binding Sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa Proteins from *Bacillus thuringiensis* in Two Important Corn Pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, e68164, 2013.

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

HERRERO, S.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; TABASHNIK, B. E.; FERRÉ, J. Shared Binding Sites in Lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A Toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5729–5734, 2001.

HÖFTE, H. WHITLEY, H. R. Insecticidal cristal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, v. 53, p. 242-255, 1989.

IBARGUTXI, M. A.; MUNÓZ, D.; ESCUDERO, I. R.; CABALLERO, P. Interactions between Cry1Ac, Cry2Ab e Cry1Fa *Bacillus thuringiensis* toxins in the cotton pests *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval). **Biological Control**, v.27, p 89-96, 2008.

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

KARIM, S.; DEAN, D. H. Toxicity and Receptor Binding Properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins to the Midgut Brush Border Membrane Vesicles of the Rice Leaf Folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. **Current Microbiology**, v. 41, p. 276–283, 2000.

KARIM, S.; RIAZUDDIN, S.; GOULD, F.; DEAN, D. H. Determination of Receptor Binding Properties of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins to Cotton Bollworm (*Helicoverpa zea*) and Pink Bollworm (*Pectinophora gossypiella*) Midgut Brush Border Membrane Vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 67, p. 198–216, 2000.

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

LEITE, N. A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A. S.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, p. e113286, 2014.

LI, H.; BOUWER, G. Evaluation of Sinergistic Activities of *Bacillus thuringiensis* Cry Protein Against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 121, p.7-13, 2014.

LI, H.; BOUWER, G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry Proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p.110-116, 2012.

LI, H.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; OPPERT, B.; FERRÉ, J.; HIGGINS, R. A.; BUSCHMAN, L. L.; RADKE, G. A.; ZHU, K. Y.; HUANG, F. Binding analyses of Cry1Ab and Cry1Ac with membrane vesicles from *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 323, p. 52–57, 2004.

LIAO, C.; HECKEL, D. G.; AKHURST, R. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins for *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae), major pests of cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 80, n.1, p. 55–63, 2002.

LU, Q.; CAO, G. C.; ZHANG, L. L.; LIANG, G. M.; GAO, X.; ZHANG, Y. J.; GUO, Y. Y. The Binding Characterization of Cry Insecticidal Proteins to the Brush Border Membrane Vesicles of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura* and *Agrotis ipsilon*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 9, p. 1598-1605, 2013.

MAPA. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – AGROFIT. Disponível em:< [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) >. Acessado: 01/11/2014.

NARVA, K. E.; STORER, N. P.; MEADE, T. Discovery and Development of Insect-Resistant Crops Using Genes from *Bacillus thuringiensis*. In: DHADIALLA, T. S.; GILL, S. S. (Edit.). **Advances in Insect Physiology**: Insect Midgut and Insecticidal Proteins. v.47. Elsevier, 2014. cap. 4, p. 177-233.

NING, C.; WU, K.; LIU, C.; GAO, Y.; JURAT-FUENTES, J. L.; GAO, X. Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, n. 6, p. 666–672, 2010.

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

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.71, n.2, p.255-281, 2007.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; JFEITELSON, J.; D. R. ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.3, p.775-806, 1998.

SOBERÓN, M.; LOPEZ-DIAZ, J. A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, v. 41, p.87–93, 2013.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F., GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J.; HECKEL, D. G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different mechanisms of resistance. **Nature Biotechnology**, 29, 1128–113, 2011.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNE, S. A Brave New World for an Old World Pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v.8, n. 11, 2013.

VARANI, A. M.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, C. C.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, E. C. C.; DESIDÉRIO, J. A. Draft Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Strain T01-328, a Brazilian Isolate That

Produces a Soluble Pesticide Protein, Cry1Ia. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, 2013.

WOLFERSBERGER, M.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, F.V.; GIORDANA, B.; HANOZET, M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the Cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. A86, p. 301-308, 1987.

WYCKHUYS, K.A.G.; LU, Y.; MORALES, H.; VAZQUEZ, L.L.; JESUSA, C.L.; LEGASPI, J.C.; ELIOPOULOS, P.A.; HERNANDEZ, L.M. Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. **Biological Control**, v. 65, p.152-167, 2013.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied Environmental Microbiology**, 71, 948–954, 2005.

ZHANG, H.; TANG, M.; YANG, F.; YANG, Y.; WU, Y. DNA-based screening for an intracellular cadherin mutation conferring non-recessive Cry1 Ac resistance in field populations of *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.107, p. 148-152, 2013.

ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, Y.; WU, Y. Diverse cadherin mutations conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 2, p. 113-118, 2010.