

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÕES MOLECULARES DAS PROTEÍNAS CRY1 E
VIP3 NO CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Ana Rita Nunes Lemes

Engenheira Agrônoma

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**INTERAÇÕES MOLECULARES DAS PROTEÍNAS CRY1 E
VIP3 NO CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS EM CANA-DE-
AÇÚCAR**

Ana Rita Nunes Lemes

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Co-orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

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

L552i Lemes, Ana Rita Nunes
Interações moleculares das proteínas Cry1 e Vip3 no controle de
lepidópteros em cana-de-açúcar / Ana Rita Nunes Lemes. – –
Jaboticabal, 2016
xix, 60 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Alexandre de Sene Pinto, Aliandra Maura
Gibertoni Malaman, Sonia Marli Zingaretti, Vivian Boter Bergamasco
Bibliografia

1. Controle biológico. 2. *Diatraea flavipennella*. 3. *Elasmopalpus
lignosellus*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 632.937:633.61

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA RITA NUNES LEMES – Nascida em Ituiutaba, MG, no dia vinte e seis de abril de 1985. Filha de Sílvio Lemes Junior e Maria das Graças Franco Nunes Lemes. Iniciou o curso de Engenharia Agrônoma em 2005, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), que foi concluído em fevereiro de 2010. Foi bolsista de iniciação científica, PIBIC, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de 01/08/2008 a 31/07/2009. Em março de 2010, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal. Recebeu o título de Mestre em fevereiro de 2012. Em março de 2012, ingressou no curso de Doutorado em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos meus pais, Sílvia e Maria das Graças,
que tanto se esforçaram na criação de seus
filhos, por me apoiarem e proporcionarem o
que estava ao alcance deles para que tudo
desse certo.

Ofereço

Aos meus irmãos, Luciana e Lúcio, pela constante
torcida pelo meu sucesso.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pois sem Ele nada seria possível.

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério, por ser acima de tudo uma grande amiga e por incentivar-me desde a época da graduação acreditando no meu potencial. Obrigada pela paciência e pelos conselhos acadêmicos, pessoais e profissionais.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes, pela co-orientação desde a época da graduação, amizade, ensinamentos, disponibilidade, além das sugestões sempre valiosas.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo e pelo incentivo à pesquisa.

À FCAV/UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

À técnica do Laboratório Eliane por toda ajuda neste trabalho, pela convivência, aprendizado e carinho durante esta etapa da minha vida.

Aos Doutores Agda Paula Facincani, Alexandre de Sene Pinto, Aliandra Maura Gibertoni Malaman, Jackson Antônio Marcondes de Souza, Manoel Victor Franco Lemos, Ricardo Antônio Polanczyk, Sonia Marli Zingaretti, Vivian Boter Bergamasco, pela participação nas bancas examinadoras e valiosas sugestões científicas que muito contribuíram para esta tese.

Aos meus amigos pelos felizes anos de convivência, amizade e companheirismo.

Às amigas, Isis e Camila, pela amizade, companheirismo no trabalho, infinitas ajudas, risadas e viagens realizadas juntas. Obrigada por estarem comigo nesta caminhada.

À minha querida amiga Fernanda pela convivência durante todos estes anos, amizade, parceria e companheirismo em todos os momentos.

Aos companheiros do Laboratório pela colaboração e agradável convívio.

À minha família, que sempre me incentivou e esteve presente, independente da distância.

Às minhas queridas sobrinhas Elisa e Lara e ao meu querido sobrinho Pedro que com pequenos gestos me enchem de alegria.

Aos professores e funcionários da FCAV, em especial aos do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária.

À todos aqueles que de uma maneira ou outra, prestaram o seu apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTAS DE FIGURAS E TABELAS.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Cana-de-açúcar.....	4
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
2.2.1 Proteínas Cry e Vip	6
2.2.2 Modo de ação das proteínas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
2.2.3 Resistência dos insetos às proteínas Bt.....	10
2.3. <i>Diatraea flavipennella</i>	13
2.4. <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivos específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Obtenção das proteínas Cry1 e Vip3	16
4.2. Expressão das proteínas Cry1	18
4.3. Expressão das proteínas Vip3.....	19
4.4. Eletroforese SDS-PAGE e quantificação das proteínas.....	20
4.5. Bioensaios e estimativa da concentração letal média (CL ₅₀) com as proteínas Cry1 e Vip3 para <i>Diatraea flavipennella</i> e <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	20
4.6. Purificação das proteínas	23
4.7. Ativação e marcação das proteínas	23
4.8. Coleta de intestino e preparo de BBMV	24
4.9. Ligand-Blotting	26
4.10. Testes de competição homóloga e heteróloga das proteínas Cry1 e Vip3.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1. Expressão e análise das proteínas Cry1 e Vip3.....	27
5.2. Bioensaios com proteínas Cry1 e Vip3 para <i>Diatraea flavipennella</i> e <i>Elasmopalpus lignosellus</i>	28
5.3. Purificação, ativação e marcação das proteínas com biotina.....	32
5.4. Detecção dos receptores por Ligand-Blotting.....	35
5.5. Análises das competições homóloga e heteróloga entre Cry1 e Vip3.....	38
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS	45

INTERAÇÕES MOLECULARES DAS PROTEÍNAS CRY1 E VIP3 NO CONTROLE DE LEPIDÓPTEROS EM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO - O potencial biotecnológico das proteínas Cry e Vip provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis* é amplamente conhecido. Porém, a evolução da resistência de pragas é a principal ameaça a longo prazo do controle de insetos-praga por plantas transgênicas com toxinas desta bactéria. Estudos relatam a necessidade de se retardar a evolução da resistência e dentre as possibilidades, a utilização de mais de um gene na construção de plantas transgênicas mostra-se eficiente. Dessa forma, é importante buscar novos genes, com diferentes modos de ação, e selecionar os que apresentam atividade entomotóxica diferenciada para *Diatraea flavipennella* e *Elasmopalpus lignosellus*, que são pragas secundárias e potenciais da cana-de-açúcar. Para tanto, proteínas Cry1 e Vip3 foram expressas em *Escherichia coli* e a toxicidade verificada por meio de bioensaios com lagartas neonatas de ambas as espécies de insetos-praga. As proteínas foram purificadas, solubilizadas, ativadas com tripsina e biotiniladas. As BBMV (Brush Border Membrane Vesicles) foram preparadas a partir dos intestinos de lagartas das duas espécies para realização de ensaios de competição homóloga e heteróloga. Considerando a CL50, as proteínas Cry1Ac e Vip3Aa foram as mais efetivas no controle dos insetos-praga em estudo. O ensaio de ligação mostrou que ocorreu interação entre todas as proteínas e os receptores das duas espécies de lagartas. Os ensaios de competição heteróloga demonstraram não haver competição entre as proteínas Cry1 e Vip3 pelos mesmos sítios de ligação para ambas espécies de insetos estudadas. Os resultados obtidos sugerem a combinação de Cry1Aa ou Cry1Ac com Vip3Aa para futuros eventos de geração de cana-de-açúcar geneticamente modificada o que poderia contribuir para o manejo da resistência por estes insetos.

Palavras-chaves: controle biológico, *Diatraea flavipennella*, *Elasmopalpus lignosellus*, proteínas inseticidas

MOLECULAR INTERACTIONS OF CRY1 AND VIP3 PROTEINS IN THE CONTROL OF LEPIDOPTERANS IN SUGARCANE

ABSTRACT – The biotechnological potential of Cry and Vip proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis* is widely known. However, the evolution of pest resistance is a major threat to long-term control of insect pests by transgenic plants with toxins of this bacterium. Studies have reported the need to slow down the evolution of resistance and, among the possibilities, the use of more than one gene in the construction of transgenic plants is shown to be efficient. Thus, it is important to look for new genes with different modes of action, and select those with different entomotoxic activity to *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus*, which are secondary and potential sugarcane pests. Therefore, Cry1 and Vip3 proteins were expressed in *Escherichia coli* and the toxicity was verified by bioassays using neonate larvae of both species of the insect pests. The proteins were purified, solubilized, and activated with trypsin and biotinylated. The BBMs (Brush Border Membrane Vesicles) were prepared using the intestines of the two species to perform the homologous and heterologous competition assays. Considering the LC₅₀, the Cry1Ac and Vip3Aa proteins were the most effective in controlling the insect pests in this study. The binding assays showed that there was interaction between the proteins and the receptors of the two species of larvae. The heterologous competition assays showed no competition between Cry1 and Vip3 proteins for the same binding sites for both species studied. The results suggest that the combination of Cry1Aa or Cry1Ac with Vip3Aa for future events of sugarcane generation genetically modified could contribute to resistance management for these insects.

Keywords: biological control, *Diatraea flavipennella*, *Elasmopalpus lignosellus*, insecticidal proteins

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Adenilato ciclase
ALP - Fosfatase alcalina
AMPc - Adenosina monofosfato cíclico
APN - Aminopeptidase-N
BBMV - Brush Border Membrane Vesicles
BSA - Albumina sérica bovina
Bt - *Bacillus thuringiensis*
CAD - Caderina
CL₅₀ - Concentração que mata 50% da população testada
cm² - Centímetros quadrado
Cyt - Toxinas citolíticas
EDTA - Ditiotreitól
G - Grama
GPI - Glicosil fosfatidilinositol
IPTG - Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa - Quilodalton
mL - Mililitro
ng - Nanograma
nM - Milimolar
°C - Graus Celsius
PBS - Salina tamponada com fosfato (pH 7,4)
PKA - Proteína quinase A
PMSF - Fluoreto de Fenil Metil Sulfonila
PVDF - Fluoreto de Polivinilideno
Vip - Proteínas inseticidas vegetativas
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Fluxograma de material e métodos.....	17
Tabela 1. Ingredientes utilizados na preparação da dieta artificial utilizada nos bioensaios com <i>D. flavipennella</i>	21
Tabela 2. Ingredientes utilizados na preparação da dieta artificial utilizada nos bioensaios com <i>E. lignosellus</i>	22
Figura 2. A- lagartas de <i>E. lignosellus</i> de quarto instar; B- Retirada de intestino de <i>E. lignosellus</i>	25
Figura 3. Análise de SDS-PAGE 12% das proteínas Cry1 e Vip3.....	28
Tabela 3. Suscetibilidade de lagartas neonatas de <i>D. flavipennella</i> contra proteínas Cry1 e Vip3.....	29
Figura 4. Purificação das proteínas Cry1Aa (A) e Cry1Ac (B) após ativação com tripsina.....	33
Figura 5. Purificação da proteína Vip3Aa.....	33
Figura 6. Produção, Purificação e ativação das proteínas Cry1(A) e Vip3Aa.....	34
Figura 7. Análise por Dot Blot das frações das proteínas Vip3Aa (A) e Cry1Ia10 (B) biotiniladas. Os números são a sequência das frações biotiniladas eluídas da coluna P10 Desalting.....	35
Figura 8. Detecção do receptor putativo para as toxinas Cry1Aa (A), Cry1Ac (B) e Vip3Aa (C) em BBMV de <i>D. flavipennella</i>	36
Figura 9. Detecção do receptor putativo para as toxinas Cry1Aa (A), Cry1Ac (B) e Vip3Aa (C) em BBMV de <i>E. lignosellus</i>	36
Figura 10. Competição homóloga com: (1) Cry1Aa, (2) Cry1Ac, (3) Vip3Aa.....	40
Figura 11. Competição heteróloga. (1) Cry1Aa e Vip3Aa.....	41
Figura 12. Modelo proposto de ligação das proteínas Cry1 e Vip3A na BBMVs de <i>D. flavipennella</i> e <i>E. lignosellus</i>	42

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica no mundo e uma das mais importantes culturas do setor primário da agroindústria brasileira. Todavia, uma das principais limitações no cultivo da cana é a ocorrência frequente de pragas. Esta cultura é atacada por diversos insetos-praga (MENDONÇA et al., 1996; ALMEIDA, 2005; SRIKANTH et al., 2011), que provocam perdas na produção. Apenas no Brasil estas perdas podem atingir 10% (OLIVEIRA et al., 2014), devido ao ataque principalmente da broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) e cigarrinha-da-raiz, *Mahanarva* spp. (Hemiptera: Cercopidae).

Todavia, algumas pragas secundárias, tais como *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae) e *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) apresentam surtos populacionais e/ou são importantes em algumas regiões, como por exemplo, no nordeste brasileiro e podem também afetar a produtividade da cana-de-açúcar. Isso decorre, porque vários fatores podem causar mudança significativa na importância de diferentes pragas de forma que algumas pragas-chave perdem importância relativa enquanto outras que foram previamente consideradas secundárias agora representam grandes desafios para o controle de pragas.

Para o controle de insetos-praga de importância agrícola ainda tem sido utilizados os inseticidas químicos. No entanto, existe um interesse no desenvolvimento de alternativas efetivas aos químicos visto que eles são prejudiciais a saúde humana e ao ambiente. Muitas proteínas e moléculas que são eficazes contra as pragas agrícolas e inócuos para os mamíferos e outros organismos estão disponíveis na natureza.

Entre essas proteínas estão as proteínas inseticidas que são produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915, a qual tem sido utilizada no controle biológico como bioinseticidas (VALADARES-INGLIS et al., 1998). Uma das vantagens da utilização de *B. thuringiensis* é sua especificidade aos insetos sensíveis à ação de suas toxinas. Além disso, essa bactéria não possui efeito poluente ao meio ambiente, pois é inócua aos mamíferos, outros invertebrados e às plantas (WHITELEY;

SCHNEPF, 1986). Outra vantagem proporcionada por essa bactéria é a utilização dos seus genes em plantas transgênicas. Essas plantas geneticamente modificadas são capazes de produzir toxinas específicas de *B. thuringiensis*, que são tóxicas a insetos. Desse modo, as plantas transgênicas constituem-se em mais uma alternativa com grande potencial de proteção contra os ataques de insetos-praga, além dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*.

Culturas transgênicas que expressam proteínas de *B. thuringiensis* (Bt) são utilizadas no manejo de pragas em todo o mundo desde que foram comercializadas pela primeira vez em 1996 (TABASHNIK et al., 2013; JAMES, 2014). Estas necessitam de menos aplicações de agrotóxicos, reduzem custos de produção, proporcionam especificidade contra as pragas-alvo, além de promoverem a conservação dos inimigos naturais e não causarem danos ao meio ambiente e saúde humana quando comparada aos agrotóxicos (JAMES, 2002).

Apesar das vantagens apresentadas pelas plantas transgênicas, é recorrente a preocupação com o uso generalizado de plantas Bt, pois relatos indicam que a pressão sob insetos-alvo expostos a proteínas inseticidas acelera a seleção de organismos resistentes, além da preocupação com a emergência de pragas secundárias (ZHANG et al., 2013). A evolução da resistência em populações de pragas pode reduzir os benefícios econômicos e ambientais de plantas transgênicas. Alguns casos de resistência no campo já foram constatados; entre eles: *Busseola fusca* (Fuller) (Lepidoptera: Noctuidae) para milho *cry1Ab* na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007), *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) para algodão *cry1Ac* na China (LIU et al., 2010), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) ao milho *cry1F* em Puerto Rico (STORER et al., 2010), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae) para algodão *cry1Ac* na Índia (DHURUA; GUJAR, 2011) e *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) (Coleoptera: Chrysomelidae) para milho *cry3Bb1* nos EUA (GASSMANN et al., 2011) e recentemente foi documentada a resistência de *S. frugiperda* no Brasil (FARIAS et al., 2014).

Algumas variedades de cana já foram projetadas com genes *cry1Ab* e *cry1Ac*, que já estão presentes em cultivos comerciais de milho, algodão e soja, a fim de

controlar várias pragas primárias, com destaque para *D. saccharalis* (KOZIEL et al., 1993; WENG et al., 2011). Devido à disponibilidade de eventos comerciais com empilhamento múltiplo de genes, tornam-se importantes os estudos de proteínas para controle também de pragas secundárias bem como suas interações com os receptores de membrana do epitélio intestinal destes insetos. Estes estudos permitem estabelecer possíveis estratégias para reduzir a probabilidade da evolução da resistência.

Apesar de essas culturas transgênicas serem uma alternativa interessante no controle de pragas, elas podem ocasionar alguns problemas como o surgimento de populações resistentes (TABASHNIK et al., 2008). Portanto, o estudo da atividade das toxinas de Bt contra populações suscetíveis e resistentes de lagartas, e suas interações com os receptores das células epiteliais desses insetos torna-se muito importantes para a melhor compreensão do modo de resistência dos insetos.

Dessa forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3Aa e Vip3Ca contra *D. flavipennella* e *E. lignosellus* e avaliar a competição entre estas proteínas por receptores presentes no intestino médio destes lepidópteros-praga. Com isso, pretendeu-se sugerir as melhores combinações para construção de plantas de cana-de-açúcar geneticamente modificadas eficientes no controle destes insetos em estudo, bem como possibilitar o retardamento de eventual evolução da resistência destas pragas secundárias às proteínas de *B. thuringiensis*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) contribui de 60 a 70% da produção anual de açúcar do mundo. Mais recentemente, ela emergiu como uma importante cultura bioenergética (WACLAWOVSKY et al., 2010). É uma planta alógama, da família Poaceae e é uma das principais espécies agrícolas cultivadas no Brasil. A produção total de cana-de-açúcar destinada à indústria, estimada para a safra 2015/16 é de 654,6 milhões de toneladas, com acréscimo de 3,1% (19,8 milhões de toneladas) em relação à safra 2014/15 (CONAB, 2015).

Esta é uma cultura perene de grande porte, proveniente de regiões tropicais e subtropicais, adaptada a um amplo zoneamento climático, que vai da latitude 35° norte a -35° sul (BLUME, 1985). Segundo Food and Agricultural Organization of the United Nations - FAO (2009), os subprodutos da cana (etanol/açúcar) são *commodities* de comércio internacional, produzidos por cerca de 100 países em uma área de 23,8 milhões de hectares, que representa aproximadamente 1,5% da área total cultivada no mundo (CALGARO; COELHO, 2015).

Mundialmente, a cana-de-açúcar ocupa 25,4 milhões de hectares (FNP, 2014); apenas 0,5% dos 4,9 bilhões de hectares cultivados no mundo (FAO, 2013). A cultura é cultivada predominantemente na faixa tropical do planeta, nos países em desenvolvimento da América Latina, África e do Sudeste Asiático. A produção mundial de cana-de-açúcar alcançou quase 1,8 bilhões de toneladas em 2011, sendo os três maiores produtores mundiais o Brasil, a Índia e a China (FNP, 2014).

Apesar de sua importância econômica, a produção de cana-de-açúcar sofre com muitos problemas que são causados principalmente por fatores bióticos e abióticos. A suscetibilidade a várias doenças, ataque de insetos-praga e a seca são alguns dos principais fatores que contribuem para o baixo rendimento de teores de sacarose (RAZA et al., 2010). Em decorrência da sua posição de destaque na economia mundial,

a cultura da cana tem sido alvo em programas de melhoramento, buscando à introdução de características de interesse agrônômico, destacando-se a resistência a pragas, as quais são de difícil controle.

2.2. *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, podendo também crescer em anaerobiose (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), de hábito quimioheterotrófico, com temperatura ideal de crescimento em torno de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (MORAES; CAPALBO, 1986). Pertence a família Bacillaceae, esporulante, cosmopolita, presente em amostras de solo e trato digestivo de Arthropoda e outros invertebrados superiores (ROGOFF; YOUSTEN, 1969; WEI; HALE et al., 2003).

Esta bactéria foi isolada em 1901 no Japão, por Ishiwata e anos após, reisolada na Thuringia, causando epizootia em larvas de *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae) (FAST; ANGUS, 1965). Posteriormente, outras cepas de *B. thuringiensis* foram isoladas a partir de insetos moribundos coletados em campo, e finalmente, o seu potencial para controle de espécies nocivas foi reconhecido (LARSON; IGNOFFO, 1971; LEWIS; DUBOIS et al., 1974).

A partir daí, *B. thuringiensis* passou a ser usado com sucesso para o controle de importantes insetos-praga agrícola, devido, principalmente, à sua especificidade, que reflete diretamente na sua segurança para a saúde humana e dos organismos não-alvo. Formulações à base de *B. thuringiensis* têm sido utilizadas com sucesso para controlar uma ampla gama de pragas de lepidópteros, coleópteros e algumas espécies de mosquitos (SANAHUJA et al., 2011; SANCHIS, 2011).

A primeira tentativa de teste de campo envolvendo a bactéria *B. thuringiensis* foi conduzida por Husz (1929), por meio de um programa internacional de controle da lagarta *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) em que se obtiveram resultados promissores. Desde então, a bactéria *B. thuringiensis* foi considerada, pela indústria, como o primeiro entomopatógeno a ser amplamente explorado como agente de controle biológico (HALL, 1967). Produtos à base da bactéria *B. thuringiensis*

começaram a ser usados no controle biológico em 1938, com uma formulação bastante rudimentar desta bactéria, Sporeína, a qual foi produzida na França (LAMBERT; PEFEROEN, 1992). No Brasil, os primeiros estudos com produtos inseticidas de *B. thuringiensis* começaram na década de 1960 e continuaram até a década de 1990, sendo que três formulações comerciais importadas estavam disponíveis durante este período (POLANCZYK et al., 2012). Toxinas inseticidas desta bactéria têm sido empregadas para controlar importantes pragas agrícolas, urbanas e da silvicultura por mais de 60 anos (SANCHIS, 2011).

Esta bactéria tem capacidade de produzir e secretar diversas proteínas com atividade inseticida, como: α -exotoxinas, β -exotoxinas, δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), hemolisinas, exoenzimas, quitinases, fosfolipases e proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (HANSEN; SALAMITOU, 2000). As proteínas mais estudadas até o momento são Cry, Cyt e Vip, as quais apresentam ação tóxica para diferentes espécies de insetos-praga das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (GARCIA- ROBLES et al., 2001; QUESADA-MORAGA et al., 2004).

Até agora, foram descritos cinco grupos filogenéticos diferentes de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* (DE MAAGD et al., 2003; CRICKMORE et al., 2014). Estas proteínas incluem 3D-Cry (cry contendo 3 domínios), Cry binárias, Cry mosquitocidas, proteínas inseticidas vegetativas (Vip) e toxinas citolíticas (Cyt).

2.2.1 Proteínas Cry e Vip

Durante a fase estacionária do ciclo de vida da bactéria *B. thuringiensis* são produzidos corpos parasporais (cristais) contendo proteínas chamadas toxinas Cry que exibem atividade inseticida ou algum efeito tóxico experimentalmente constatados para um organismo alvo (CRICKMORE et al., 2014). Estas proteínas Cry são utilizadas para o desenvolvimento de culturas transgênicas e formulações inseticidas para pulverização visando o controle de insetos-praga (VAN RIE, 2000).

As proteínas Cry são codificadas pelos genes *cry* e são assim denominadas visto que acumulam sua produção na periferia do esporo, formando uma inclusão cristalina

(YAMAMOTO; DEAN, 2000) e são classificadas de acordo com a homologia de suas sequências de aminoácidos. Elas estão incluídas nas toxinas formadoras de poros que representam uma das maiores classes de toxinas bacterianas (BRAVO et al., 2011). Até o momento, a coleção de toxinas Cry possui mais de 800 genes *cry* sequenciados e classificados (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html).

Entre as proteínas inseticidas Bt, as toxinas 3D-Cry representam a maior e mais estudada família de toxinas. A estrutura tridimensional das formas ativas das proteínas Cry consiste de três domínios e esses domínios proteicos das proteínas 3D-Cry apresentam conformações e funções diferentes. A toxicidade das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991). A parte N-terminal, ou seja, domínio I, é responsável pela inserção da toxina na membrana alvo e, conseqüentemente, pela formação de poros. Os domínios II e III (C-terminal) são responsáveis pela especificidade, pois estão relacionados com o reconhecimento dos receptores do intestino médio dos insetos alvo (DE MAAGD et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998; HERRERO et al., 2004; SOBERON et al., 2010).

Ao contrário das proteínas Cry, as quais se unem em cristais insolúveis dentro da célula mãe, as proteínas Vip (proteínas inseticidas vegetativas), descritas por Estruch et al. (1996), são secretadas como proteínas solúveis por algumas linhagens de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de crescimento. Atualmente, existem mais de 100 sequências de genes *vip* descritas, as quais estão classificadas em quatro diferentes famílias: Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 (<http://www.btnomenclature.info>). A Vip4 foi recentemente descoberta e análise *in silico* verificou uma massa molecular de aproximadamente 108 kDa (PALMA et al., 2014).

As proteínas Vip têm sido utilizadas em plantas transgênicas, combinadas às proteínas Cry ou não, com a finalidade de ampliar o número de pragas controladas e também para prolongar o uso da tecnologia Bt (LEE et al., 2006; SENA et al., 2009; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2013).

Proteínas Vip3Aa foram as primeiras a serem descobertas e as mais comuns dentro da família Vip3 e possuem toxicidade da mesma magnitude que a das proteínas

Cry contra insetos suscetíveis. Outra vantagem das proteínas Vip3A é que exibe um largo espectro inseticida contra uma variedade de lepidópteros-pragas, incluindo, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), *Heliothis virescens* (Fabricius), *Helicoverpa zea* (Boddie), *H. armigera*, *S. frugiperda*, *Spodoptera exíqua* (Hübner), e *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae), *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae), entre outros (VAN FRANKENHUYZEN; NYSTROM, 2002; MILNE et al., 2008), além de certas pragas importantes as quais têm mostrado insensibilidade para as proteínas Cry (BHALLA et al., 2005).

2.2.2 Modo de ação das proteínas de *Bacillus thuringiensis*

O modo de ação das proteínas Cry foi verificado, principalmente, em lagartas de lepidópteros (KNOWLES; DOW, 1993). Para explicar o modo de ação da proteína Cry existem dois modelos propostos. O primeiro modelo caracteriza-se pela formação de poros na membrana epitelial de células intestinais. Este modelo envolve interações sequenciais da proteína Cry com várias proteínas do intestino médio do inseto que facilitam a formação de uma estrutura oligomérica e induzem a sua inserção na membrana, formando poros que matam as células do intestino médio (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

O mecanismo de toxicidade inicia quando a lagarta ingere alimentos contaminados com esporos ou plantas transgênicas que expressam proteínas Bt. O cristal é solubilizado no intestino, liberando protoxinas que são ativadas por proteases em toxinas e estas se ligam de forma sequencial aos receptores localizados nas microvilosidades do epitélio intestinal. O primeiro receptor é uma proteína caderina (CAD), cuja interação permite a oligomerização da toxina. Esta estrutura oligomérica aumenta a sua afinidade para o segundo receptor, quer seja pela aminopeptidase-N (APN) ou pela fosfatase alcalina (ALP), sendo ancorado por glicosil fosfatidilinositol (GPI) na membrana lipídica (PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010). Finalmente, o oligômero é inserido na camada lipídica, formando poros na membrana, aumentando a permeabilidade desta. Estes eventos causam a lise celular e eventual ruptura e

desintegração das células do intestino médio (BRAVO et al., 2004; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

Estes estudos resultaram na formulação de um modelo para explicar o modo de ação que se baseia na formação de um oligômero (trímeros ou tetrâmeros) de toxinas ativas, inserção deste na membrana e subsequente formação do canal iônico (KNOWLES; ELLAR 1987; BRAVO et al., 2004).

Zhang et al. (2006), por outro lado, propôs um segundo modelo, que caracteriza-se pela transdução de sinais. A toxina Cry se liga à CAD, sendo que esta ligação desencadeia uma via intracelular que resulta na ativação da proteína G, a qual aciona a adenilato ciclase (AC), responsável pela produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclico). Os níveis de AMPc aumentam e ativam a proteína quinase A (PKA). A indução desta leva a uma sequência de alterações citológicas que incluem formação de bolhas na membrana e inchaço celular, levando à morte celular sem envolver formação de oligômeros, de poros e sem participação de outras proteínas receptoras.

Em ambos os modelos, as proteínas CAD são as primeiras receptoras que dão início ao mecanismo de ação das toxinas Cry nos insetos. Estas proteínas são consideradas importantes porque estão relacionadas com a resistência dos insetos à proteína Cry (GAHAN et al., 2001; XU et al., 2005; JIN et al., 2014).

Contrariamente a estes modelos, as experiências *in vitro* com *P. gossypiella* indicaram que tanto as formas de protoxina e de toxina ativada de Cry1Ac ligam-se a fragmentos de caderina (FABRICK; TABASHNIK, 2007). Estes resultados levantaram a possibilidade de que a ligação de protoxinas aos receptores do intestino médio pode matar insetos através de uma via diferente da via primária iniciada pela ligação de toxinas ativadas com os receptores do intestino médio. Além disso, ambas as formas (protoxinas e toxinas) incluem posteriormente a oligomerização e formação de poros, com um oligômero formado por protoxina e um oligômero diferente formado por toxina ativada (GOMEZ et al., 2014). Com base nesses resultados *in vitro*, Gomez et al. (2014) propuseram um novo modelo para o modo de ação de *B. thuringiensis*, ao qual denominaram como o "modelo dual", no qual tanto a protoxina e formas de toxina

ativada podem matar os insetos, exercendo o seu efeito tóxico através de uma via diferente.

Semelhante às proteínas Cry, Vip3Aa se liga aos receptores intestinais dos insetos, embora sítios de ligação não são compartilhados entre estas duas famílias de proteínas (LEE et al., 2003; LEE et al., 2006; SENA et al., 2009). Devido à sua forma solúvel, as proteínas Vip se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto suscetível, resultando em progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997).

A etapa de reconhecimento e ligação à membrana é considerada primordial para a especificidade de uma determinada cepa ou toxina e seu espectro de espécies-alvo. Os ensaios de ligação e competição, homóloga e heteróloga, têm sido usados para demonstrar que as toxinas ativadas têm uma alta afinidade de ligação às BBMV's (Brush Border Membrane Vesicles) dos insetos-alvo (WOLFERSBERGER, 1990). Adicionalmente, a presença de um padrão de ligação irreversível às BBMV's tem uma relação direta com a maior expressão da toxicidade (LIANG et al., 1995).

2.2.3 Resistência dos insetos às proteínas Bt

A evolução da resistência a toxinas de *B. thuringiensis* expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é afetada por um grande número de fatores que interagem entre si e são relacionados a características do material genético da planta transgênica, à bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo (MAIA, 2003). Quanto às bases bioquímicas da resistência, qualquer alteração no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* poderá acarretar no desenvolvimento da resistência: 1) modificação na atividade proteolítica no intestino do inseto; 2) alteração no sítio de ligação da toxina à membrana; 3) aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. A segunda alteração é a que gera os maiores níveis de resistência. Ela tem sido descrita tanto em populações resistentes capturadas em campo como em populações selecionadas artificialmente em laboratório. Esta alteração tem sido detectada em cepas resistentes a uma ou várias

toxinas da família Cry1A de *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) (VAN RIE et al., 1989), *P. xylostella* (FERRÉ et al., 1991) e *H. virescens* (LEE et al., 1995).

O plantio mundial de culturas geneticamente modificadas com proteínas de *B. thuringiensis* aumentou para aproximadamente 180 milhões de hectares em 2014, com um total acumulado de 648 milhões de hectares desde 1996 (JAMES, 2014). No entanto, apesar de formulações a base de *B. thuringiensis* e culturas *Bt* terem fornecido benefícios econômicos e ambientais (DOWNES et al., 2010; SANAHUJA et al., 2011; JAMES, 2014), a rápida evolução da resistência de pragas a proteínas de *B. thuringiensis* pode comprometer estas vantagens (TABASHNIK et al., 2013; JIN et al., 2015).

Assim, devido a extensiva adoção de culturas *Bt* surge a preocupação com a evolução da resistência dos insetos às toxinas de *B. thuringiensis* e isso implica numa diminuição de base genética na suscetibilidade às toxinas (TABASHNIK et al., 2013, 2014). De fato, algum grau de resistência desenvolvida em campo para as culturas *Bt* tem sido documentado em nove grandes espécies de pragas (TABASHNIK et al., 2008; KRUGER et al., 2009; LIU et al., 2010; STORER et al., 2010; DHURUA; GUJAR, 2011, GASSMANN et al., 2011; ZHANG et al., 2011; TABASHNIK et al., 2013). E devido a esses casos de resistência foi necessário desenvolver alternativas para retardar a evolução da resistência dos insetos a plantas *Bt*. Dessa forma, destaca-se o uso de plantas transgênicas com mais de um gene inserido, denominadas plantas piramidadas que são as plantas transgênicas de segunda geração.

A primeira geração de plantas resistentes a insetos (plantas-*Bt*) foi gerada por meio da transferência de um único gene *cry* no genoma da planta (FISCHHOFF et al., 1987; VAECK et al., 1987; PERLAK et al., 1990). Estas plantas transgênicas que expressavam as proteínas Cry1 foram desenvolvidas visando à resistência ao ataque de pragas, como no caso do milho *Bt*, que possui eventos expressando a proteína Cry1Ab e a proteína Cry1Fa, separadamente (WAQUIL et al., 2002).

No entanto, a expressão simultânea de múltiplas toxinas de *B. thuringiensis* com modos de ação alternativos tem sido proposta como a melhor estratégia para retardar a

evolução da resistência aos cultivos *Bt* (ROUSH, 1998; ZHAO et al., 2003) e para aumentar o espectro de atividade e eficácia desta tática de controle (STEWART et al., 2001; CHITKOWSKI et al., 2003; SIVASUPRAMANIAM et al., 2008). Assim, a segunda geração de plantas *Bt*, que apresenta uma combinação de dois ou mais genes de *B. thuringiensis* nas plantas, oferece aos produtores maior espectro de ação e reduz as chances de pragas alvo desenvolverem resistência (STORER et al., 2012).

No entanto, a durabilidade de plantas piramidadas pode ser reduzida por uma resistência cruzada, o que ocorre devido a resistência múltipla às toxinas de *B. thuringiensis* (TABASHNIK et al., 2014). Os estudos de ligação das proteínas Cry têm revelado uma estreita correlação entre o desenvolvimento de resistência cruzada ou resistência múltipla e a existência de sítios de ligação comuns para estas toxinas. Espécies de insetos que compartilham os mesmos sítios de ligação para determinadas toxinas, ao desenvolver resistência a uma das toxinas, podem desenvolver também resistência para o restante das toxinas que compartilham os mesmos sítios de ligação, como ocorreu em *P. xylostella* (GRANERO et al., 1996; SENDRA, 2002) e *H. virescens* (JURAT-FUENTES; ADANG, 2001).

A resistência cruzada é mais provável que ocorra entre as proteínas de *B. thuringiensis* que apresentam alta similaridade na sequência de aminoácidos porque tais proteínas são mais propensas a compartilhar os mesmos sítios de ligação (TABASHNIK et al., 1996; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ et al., 2013; ADANG et al., 2014; CARRIÈRE et al., 2015). Até agora, nenhuma resistência cruzada significativa tem sido descrito entre proteínas Cry e Vip3A (VÉLEZ et al., 2013; HUANG et al., 2014).

Por isso torna-se importante a escolha das combinações dos genes visando proteínas que se ligam a diferentes receptores no intestino do inseto visto que a alteração no sítio de ligação tem-se mostrado um mecanismo generalizado de resistência (JURAT-FUENTES; ADANG, 2006; CACCIA et al., 2010). Desta forma, plantas piramidadas, que produzem duas ou mais toxinas ativas contra a mesma praga, podem atrasar a evolução de resistência em relação às plantas com uma única toxina, especialmente se os insetos resistentes a uma toxina são mortos por outras toxinas (ROUSH, 1998; CARRIÈRE et al., 2015).

2.3. *Diatraea flavipennella*

A broca da cana-de-açúcar, *D. flavipennella*, destaca-se como um inseto de grande importância econômica, principalmente, nos canaviais nordestinos. Seus danos são semelhantes aos provocados pela broca *D. saccharalis*, a qual tem sua distribuição generalizada em todo o país (MENDONÇA et al., 1996; PINTO, 2006; DINARDO-MIRANDA, 2008). No estado de Alagoas sempre houve predominância de *D. saccharalis*, mas, nos últimos anos, tem havido inversão na prevalência passando a espécie *D. flavipennella* a ser a espécie mais importante (FREITAS et al., 2006).

O ciclo biológico completo, de ovo a adulto, desta broca da cana-de-açúcar dura em torno de dois meses (65 dias). As lagartas podem causar prejuízos diretos ou indiretos. Prejuízos diretos são causados pela abertura de galerias, perda de peso da cana, além de levar a planta à morte (coração morto), especialmente em canas novas. Quando faz galerias circulares (transversais), seccionam o colmo, provocando sua quebra pela ação de ventos, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais (PINTO et al., 2009; GARCIA, 2013).

Os prejuízos indiretos são consideráveis, uma vez que, por meio de orifícios e galerias permitem a entrada de fungos, *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon), que causam a podridão vermelha do colmo podendo abranger toda a região compreendida entre as diversas galerias. Os fungos causadores da podridão vermelha invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e o rendimento industrial no processo de produção de açúcar e/ou álcool (PINTO, 2006; GARCIA, 2013).

Esta broca da cana-de-açúcar apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (BOTELHO; MACEDO 2002). Em campo, as fêmeas ovipositam em média 430 ovos, sendo frequentemente depositados nas folhas ainda verdes, tanto na face superior como inferior do limbo foliar e, ocasionalmente, na bainha. São de formato oval e achatado, sendo depositados em grupos. Quando os embriões estão desenvolvidos, os ovos adquirem forma elíptica e

coloração amarelada, tornando-se escuros, quando são visíveis as cápsulas cefálicas das lagartas no interior dos mesmos (BOTELHO, 2007; FREITAS et al., 2007).

2.4. *Elasmopalpus lignosellus*

A espécie *E. lignosellus*, foi primeiramente descrita por Zeller como *Pempelia lignosella* em 1848, sendo popularmente conhecida como “broca-do-colo” ou lagarta elasmó. Esta espécie ocorre nos EUA, com maior frequência nos Estados do Sul, América Central e do Sul (SAUER, 1939; VIANA, 2004). Sua distribuição está limitada às regiões tropical e temperada do hemisfério ocidental conforme VIANA (2004), ainda que PEREZ (1980) também relate sua ocorrência no Vietnã. No Brasil, esta praga vem ocorrendo com maior frequência em solos arenosos sob vegetação de cerrado e em períodos secos, após as primeiras chuvas, sobretudo no primeiro ano de cultivo (BARROS, 2009).

O adulto de *E. lignosellus* é uma mariposa de 16 a 24 mm de envergadura (DIXON, 1982; BARROS, 2009). As lagartas são de coloração verde azulada com cabeça marrom e medem 15 mm de comprimento quando completamente desenvolvidas (HOLLOWAY; SMITH, 1976). Elas movimentam-se com muita agilidade, constroem casulos revestidos de solo e de restos culturais, que ficam na entrada dos orifícios que fazem na planta e servem de refúgio. A lagarta forma uma câmara pupal no solo ligada ao talo da planta atacada.

No Brasil não existem informações sobre diapausa e número de gerações por ano de *E. lignosellus* (VIANA, 2004). Nos EUA passa o inverno como lagarta ou pupa e as mariposas emergem entre duas e três semanas após o final do inverno (BESSIN, 2004). O número de gerações pode variar de três a quatro por ano (LEUCK; DUPREE, 1965). Os adultos emergem no início da primavera, se acasalam e podem viver por até 10 dias em condições de campo (DIXON, 1982; BESSIN, 2004).

É uma praga polífaga que ataca mais de 60 espécies de plantas, causando sérios danos a várias culturas de importância econômica, como milho, cana-de-açúcar, trigo, soja, arroz, feijão, sorgo, amendoim e algodão. O dano é ocasionado pela lagarta

na região do colo, onde penetra e faz galerias, provocando o perfilhamento (no caso de poaceas) e/ou a morte da planta.

O ataque pode ser visualizado pelo murchamento e seca das folhas centrais, que é conhecido como coração morto. As perdas acarretadas estão relacionadas com a redução no estande, resultando no baixo rendimento da cultura. O ataque da lagarta causa a destruição da região de crescimento quando este se encontra abaixo do nível do solo ou destrói total ou parcialmente os tecidos meristemáticos responsáveis pela condução de água e nutrientes (VIANA et al., 2000; VIANA, 2004).

3. OBJETIVOS

Gerar informações sobre proteínas Cry1 e Vip3 para *D. flavipennella* e *E. lignosellus* e indicar a melhor combinação de proteínas para obtenção de cana-de-açúcar transgênica.

3.1. Objetivos específicos

- Expressar, purificar e ativar as proteínas Cry1 e Vip3 a partir de clones de *Escherichia coli* recombinantes;
- Verificar a toxicidade destas proteínas para *D. flavipennella* e *E. lignosellus* por meio de bioensaios;
- Analisar a ligação dessas toxinas aos receptores de membrana do epitélio intestinal das lagartas;
- Analisar a união dessas toxinas aos receptores contidos nas BBMV's, em ensaios de competição *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das proteínas Cry1 e Vip3

Clones de *Escherichia coli* recombinante XL-1 Blue portadores dos genes *cry1Aa*, *cry1Ac* e *cry1Ca* de *B. thuringiensis* utilizados neste estudo foram gentilmente fornecidos por Ruud de Maagd (Plant Research International, Wageningen, Holanda). O clone de *E. coli* BL21(D3) portador do gene *vip3Aa* foi obtido em laboratório após isolamento a partir da linhagem de *B. thuringiensis* HD-125 por Mendes (2011) e clonagem no vetor PET SUMO de *E. coli*. O clone de Vip3Ca foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Juan Ferré da Universidade de Valência, Câmpus de Burjassot, Espanha.

Após obtenção dos clones, estes foram cultivados e suas proteínas expressadas para realização de bioensaios, ensaios de ligand-blotting e ensaios de competição homóloga e heteróloga (Figura 1).

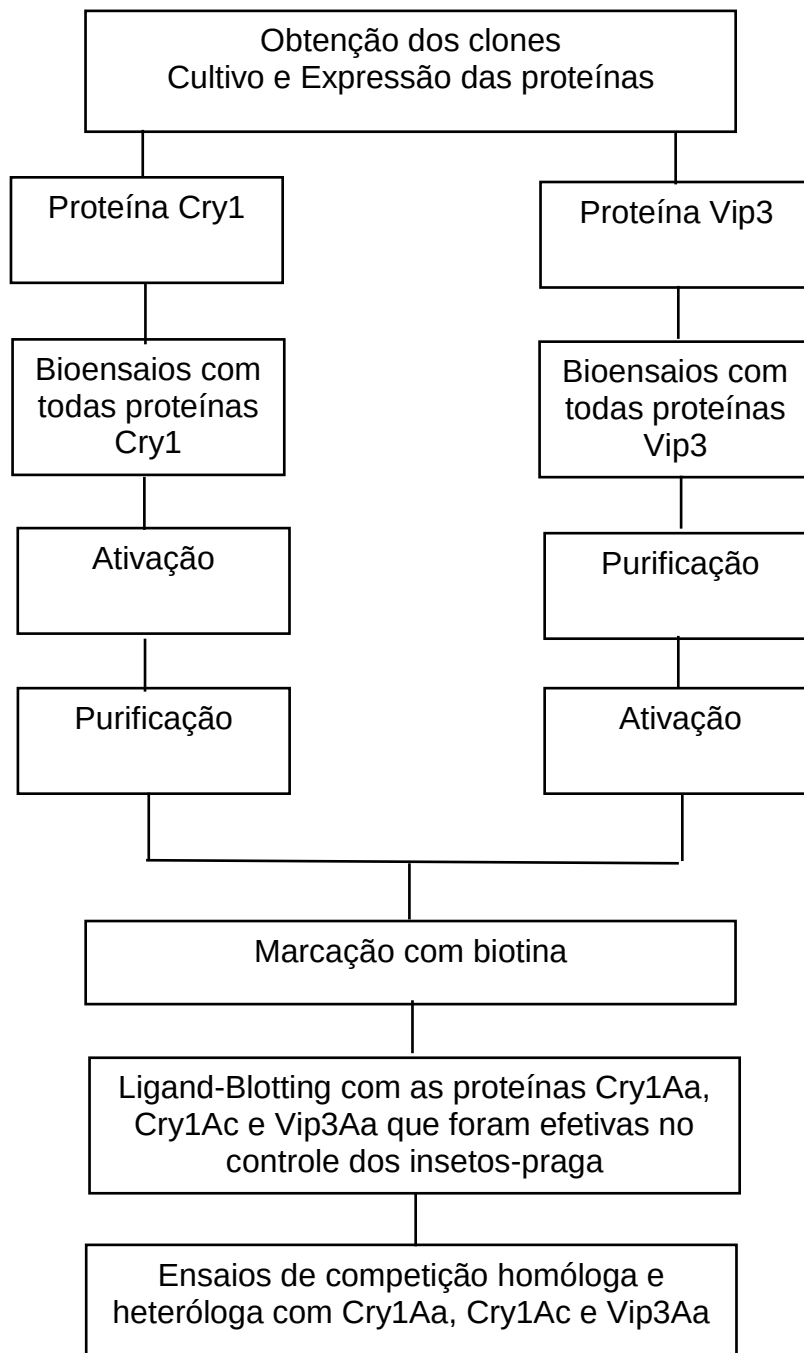


Figura 1. Fluxograma de material e métodos.

4.2. Expressão das proteínas Cry1

Para a expressão das proteínas Cry1, 12 µl de cada clone foram inoculados em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura TB sólido (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 2,31 g de KH_2PO_4 , 12,54 g de K_2HPO_4 , 4 mL de glicerol, 15 g/L de ágar, q.s.p. 1000 mL), glicose 2% (v/v) e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e incubado por 24 h a 37°C. Após este período de crescimento uma colônia de células foi transferida para um pré-inóculo em erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 20 mL de meio TB, glicose 2% (v/v) e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubou-se a 37°C, por 12 h sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de crescimento das células, 2,5 mL desse cultivo foi transferido para 250 mL de meio TB + ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubados durante 60 h, a 28°C sob agitação constante (200 rpm).

As células cultivadas foram coletadas por centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) por 8 min a 5.930 Xg e o “pellet” foi pesado, visto que as demais soluções foram adicionadas por grama de “pellet”. Para o início da lise celular foram adicionados 3 mL de tampão de suspensão (50 mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5 mM de EDTA e 100 mM de NaCl) por grama de célula e submetido a vigorosa agitação em aparelho tipo ‘vortex’. Adicionou-se 800 µg de lisozima por grama de “pellet”, e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min. Adicionou-se 4 mg de desoxicolato de sódio por grama de “pellet” e incubou-se por 10 min a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 200 µl por grama de “pellet” de uma solução 1 mg mL^{-1} de DNaseI seguida de incubação por 30 min a 37°C sob agitação. O material foi centrifugado a 39.200 Xg por 10 min a 4°C (Beckman®, Maryland, Estados Unidos).

Após a etapa de lise celular, o material foi lavado com tampão (20 mM Tris/HCl pH7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X 100), misturado por agitação em aparelho do tipo ‘vortex’ e centrifugado a 39.200 Xg por 10 min a 4°C. Uma solução de PBS (salina tamponada com fosfato - 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl) foi utilizada como passo final nesta etapa para lavagem, seguido de agitação em aparelho do tipo ‘vortex’ e de centrifugação a 39.200 Xg por 10 min a 4°C.

Para solubilização da proteína, adicionou-se 10 mL de tampão de solubilização (50 mM NaHCO_3 , pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT) seguida de incubação por 2 h a 37°C a 200 rpm. Em seguida, realizou-se a centrifugação por 15 min a 39.200 Xg a 4°C. O sobrenadante contendo a protoxina solubilizada foi transferido para um novo tubo e estocado a -20°C até o momento do uso.

4.3. Expressão das proteínas Vip3

Para a expressão das proteínas Vip3Aa e Vip3Ca, 12 μL das células estocadas foram cultivadas em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura LB (2x) (2g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl, 15g/L de ágar, q.s.p 100 mL pH 7,2) acrescidos de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de antibiótico (canamicina para Vip3Aa e ampicilina para Vip3Ca) por 12 h a 37°C. Uma colônia de células foi transferida para o pré-inóculo contendo meio LB (2x) e antibiótico e as culturas foram incubadas a 37°C, por 12 h sob agitação de 250 rpm.

Em seguida uma alíquota de 2 mL desta pré-cultura foi transferida para 200 mL de meio LB (2x) com antibiótico. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm até a DO_{600} atingir 1,2. Posteriormente, uma alíquota desta pré-cultura foi transferida para um erlenmeyer de capacidade de 1000 mL contendo 200 mL de meio LB (2x) com antibiótico (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) até que a DO_{600} atingisse 0,025. Em seguida incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm até a densidade óptica (DO_{600}) atingir 0,6. A expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), à concentração final de 1mM, por 12 h sob agitação de 190 rpm a 22°C para Vip3Aa e 37°C para Vip3Ca.

As células foram sedimentadas por centrifugação a 17.400 Xg por 30 min a 4°C, lisadas em tampão fosfato (20 mM + 5M NaCl pH 7,4) para Vip3Ca e 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) para Vip3Aa, 300 μL de lisozima (100 mg mL^{-1}), 100 μL de DNaseI (1 mg mL^{-1}), 10 μL de PMSF (Sigma) (0,1M) e incubadas por 30 min a 37°C com agitação de 50 rpm. Após estas etapas, as amostras foram mantidas em gelo

e submetidas à sonicação por 3 vezes de 60 s, com 15 s de pausa, com “power” em 60%. Após a sonicação o material foi centrifugado a 17.400 Xg por 30 min em centrífuga (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) a 4°C. O sobrenadante foi coletado após centrifugação e armazenado a -20°C.

4.4. Eletroforese SDS-PAGE e quantificação das proteínas

Alíquotas de proteínas Cry1 e Vip3 foram coletadas e visualizadas em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), em equipamento para eletroforese vertical Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA). Utilizou-se a solução “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas, Vilnius, Lituania) como marcador de massa molecular.

As amostras a serem visualizadas em gel de SDS-PAGE foram preparadas contendo: 20 µl do sobrenadante de cada proteína e 10 µl de tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β-mercapetanol e 0,02% de Azul de bromofenol). Posteriormente, foram aquecidas por 5 min a 100°C e uma alíquota de 15 µl aplicada em gel de poliacrilamida.

Para a quantificação das proteínas, novos géis de policrilamida foram preparados 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 o BSA.

4.5. Bioensaios e estimativa da concentração letal média (CL₅₀) com as proteínas Cry1 e Vip3 para *Diatraea flavipennella* e *Elasmopalpus lignosellus*

Os bioensaios com *D. flavipennella* foram conduzidos no Laboratório de Interações Insetos – Tóxicos (LIIT) do Departamento de Agronomia (Entomologia) da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife-PE. As lagartas neonatas utilizadas nos bioensaios foram provenientes da criação mantida neste laboratório pelo

professor Dr. Herbert Álvaro Abreu de Siqueira. Os ovos ficaram acondicionados sob temperatura de 27°C até a eclosão para a obtenção das larvas neonatas. Os bioensaios com *E. lignosellus* foram conduzidos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP. Ovos de *E. lignosellus* provenientes da empresa BUG Agentes Biológicos, Piracicaba-SP, foram acondicionados sob temperatura ambiente até a eclosão das larvas neonatas, que foram utilizadas nos bioensaios.

Para a realização dos bioensaios e determinação da atividade bioinseticida das proteínas em *D. flavipennella* e *E. Lignosellus*, lagartas neonatas foram alimentadas com dieta artificial específica para cada espécie estudada, conforme descrito nas Tabelas 1 e 2. Diferentes concentrações das toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3Aa e Vip3Ca foram testadas, e para cada concentração de toxina 16 lagartas neonatas foram utilizadas.

Tabela 1: Ingredientes utilizados na preparação da dieta artificial utilizada nos bioensaios com *D. flavipennella*.

Ingredientes	Quantidade
Cloreto de colina	1 g
Sacarose	135 g
Sais de Wesson*	10 g
Farelo de soja	105 g
Ácido ascórbico	5 g
Ácido sórbico	3 g
Colmo de cana triturado	80 g
Nipagin	4,5 g
Ágar/caragenato	50 g
Solução vitamínica**	30 mL
Vita gold	1 mL
Wintomylon ou tetrex	5 mL
Formoldeído	3 mL
Água	2400 mL

* Carbonato de cálcio: 21,000; Fosfato de cálcio: 14,900; Sulfato de cobre X 5HO: 0,039; Fosfato férrico: 1,470; Sulfato de magnésio: 9,000; Sulfato manganoso: 0,020; Sulfato de potássio e alumínio: 0,009; Cloreto de potássio: 12,000; Iodeto de potássio: 0,005; Monofosfato de potássio: 31,000; Cloreto de sódio: 10,500; Fluoreto de sódio: 0,057. Quantidade em porcentagem.

** Niacinamida: 1,00 g; Pantotenato de cálcio: 1,00 g; Riboflavina: 0,50 g; Tiamina: 0,25 g; Piridoxina: 0,25 g; Ácido fólico: 0,10 g; Biotina: 0,02 mg; Vitamina B1000 mg/mL): 2,00 mL. Quantidade para 1L de solução.

Tabela 2: Ingredientes utilizados na preparação da dieta artificial utilizada nos bioensaios com *E. lignosellus*.

Ingredientes	Quantidade
Feijão	60 g
Germe de trigo	30 g
Levedo de cerveja	19 g
Agar	7 g
Ácido ascórbico	2 g
Ácido sórbico	0,6 g
Tetraciclina	0,022 g
Nipagin	1,10 g
Complexo vitamínico*	0,7 mL
Água	375 mL
Óleo de girassol	1,5 mL

* Composição da solução vitamínica (Parra, 1979): niacinamida, 110 g; pantotenato de cálcio, 1,0 g; tiamina, 0,5 g; piridoxina, 0,25 g; ácido fólico, 0,1 g; biotina, 0,02 g; vitamina B12 (1000 mg/cc), 2,0ml; água destilada, 1000 ml.

Os bioensaios foram realizados em placas de poliestireno com 128 orifícios (“Cell Wells, Corning Glass Works”, Corning, New York) e as diferentes concentrações das amostras foram aplicadas na superfície da dieta artificial contidas nestas placas. Em cada poço das placas de poliestireno, uma lagarta neonata foi adicionada. As placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, e fotoperíodo de 14:10 h (luz:escuro). Todos os bioensaios foram realizados em triplicata e a mortalidade foi avaliada após 15 dias para *D. flavipennella* e após sete dias para *E. lignosellus*.

Como testemunha dos experimentos aplicou-se o mesmo volume de tampão de solubilização para proteínas Cry1 e tampão de lise para Vip3 na superfície da dieta artificial. Para obtenção da CL_{50} , os dados de mortalidade obtidos, para cada proteína, nas diferentes concentrações (*D. flavipennella*: $7,8125 - 500 \text{ ng cm}^{-2}$; *E. lignosellus*: $0,781 - 6400 \text{ ng cm}^{-2}$) testadas foram submetidos a análise de PROBIT, utilizando o programa Polo-Plus (LeOra Software, Berkeley, CA, USA).

4.6. Purificação das proteínas

As proteínas Cry1 e Vip3, presentes nos lisados, foram purificadas em colunas HiTrap HP (Amersham) e HisTrap HP (Amersham) de 1 mL, respectivamente. Para tanto, o lisado foi inicialmente filtrado em filtro 0,45 μ m e mantido em gelo. Em seguida, a coluna HiTrap foi preparada adicionando-se os tampões na seguinte ordem: 5 mL de tampão A (20mM Tris pH 8,6), 5 mL de tampão B (tampão A e 1 M NaCl), 5 mL de tampão A. Em seguida, adicionou-se 5 mL da proteína à coluna e, posteriormente, 5 mL de tampão A e 5 mL de tampão C (tampão A com 0,5 M NaCl) para a eluição da proteína, sendo coletadas frações de 500 μ l. Em seguida a coluna foi submetida às lavagens com 5 mL de tampão B, 5 mL de tampão A, 5 mL de água e 5 mL de etanol 20% para regeneração da mesma.

O lisado de Vip3 foi submetido à coluna de purificação HisTrap HP – 1mL, carregada com 0,1 M de NiSO₄, devidamente preparada conforme instruções do fabricante. Primeiramente a proteína foi filtrada em filtro de 0,45 μ m; posteriormente passou na coluna 10 mL de água milliQ, seguido de 8 mL de tampão de equilíbrio (tampão fosfato 0,2 M; NaCl 5 M; imidazol 40 mM; água milliQ), 10 mL da amostra de proteína, 8 mL de tampão de equilíbrio, 10 mL de tampão de eluição (tampão fosfato 50 mM; pH 8,0; NaCl 5 M; imidazol 500 mM; água milliQ) para eluição da proteína sendo coletadas frações de 1 mL em tubos eppendorf. Para finalizar passou na coluna 5 mL de tampão de equilíbrio, depois 10 mL de tampão de eluição e por fim 3 mL de etanol 20%. Posteriormente as frações coletadas foram analisadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 12% e condições conforme item 4.4.

4.7. Ativação e marcação das proteínas

As proteínas Cry1 foram purificadas por troca iônica em colunas HiTrap HP (Amersham) e as Vip3 por afinidade a histidina em colunas HisTrap HP (Amersham). As proteínas Cry1 foram ativadas antes de serem purificadas, já as proteínas Vip3 foram primeiramente purificadas e então ativadas com tripsina devido à presença da cauda de

histidina necessária quando se utiliza coluna Histrap na purificação. As proteínas foram ativadas com tripsina em concentração final de 10% (tripsina bovina – Sigma) a 37°C por 1 h e 30 min, com agitação a 200 rpm e, em seguida, a enzima foi inativada pela centrifugação a 17000 Xg, 4°C por 10 min.

As proteínas foram então marcadas com biotina, usando-se o “Kit ECL Biotinylation Module” (GE Healthcare). Esta reação de marcação consistiu da incubação por 2 h de 1000 µg de proteína com 40 µl do reativo de biotinilação, sob leve agitação em temperatura ambiente. As proteínas foram eluídas em coluna G-25 (P10 Desalting) (GE Healthcare). Para tanto, a coluna foi lavada com 5 mL de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) + 0,1% BSA e em seguida com 20 mL de PBS. Posteriormente o volume da reação foi aplicado no centro da coluna G-25. A proteína foi eluída com 20 mL de PBS e as amostras foram coletadas a cada 10 gotas por tubo eppendorf, quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e estocadas a 4°C.

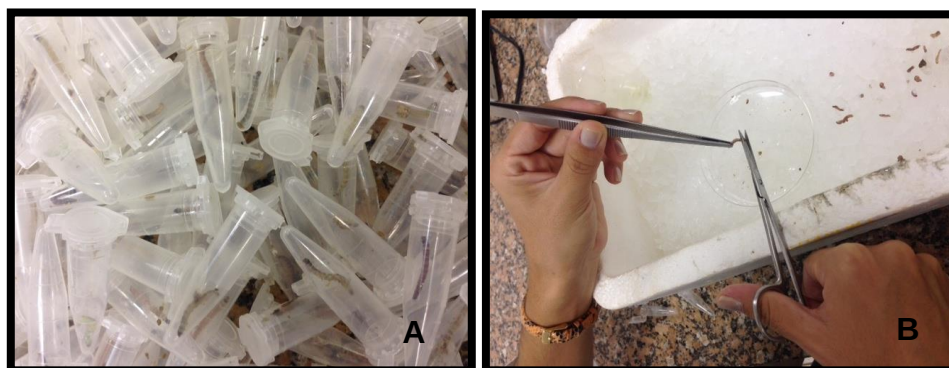
Alíquotas de 1,5 µl das frações coletadas foram aplicadas em membranas de PVDF (GE Healthcare) para análise por “Dot Blot”, para a verificação das frações contendo as proteínas de interesse marcadas com biotina. Após a absorção das proteínas pela membrana, esta foi submetida ao bloqueio com 10 mL de PBS contendo 15% de leite em pó desnatado e 0,01% Tween-20, sob agitação suave por 5 min. A membrana foi, então, lavada por 3 vezes com PBST e, em seguida, foi incubada por 10 min sob agitação suave em uma solução contendo o conjugado estreptavidina/peroxidase numa diluição de 1:2000 (HRP) (GE Healthcare), para ligação específica à biotina. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST e a revelação foi feita com 10 mL da solução NBT/BCIP (Sigma) conforme instruções do fabricante, parando posteriormente a reação com adição de água.

4.8. Coleta de intestino e preparo de BBMV

Os intestinos médios de lagartas de quarto instar de *D. flavipennella* e *E. lignosellus* foram retirados com auxílio de tesouras e pinças (Figura 2), lavados e

conservados em solução tampão MET gelado [250 mM Manitol, 17 mM Tris-HCl e 5 mM ácido etileno glicol-tetra-acético (EGTA), pH 7,5], congelados em nitrogênio líquido e estocados a -80°C (HERNÁNDEZ et al., 2004) para serem usados no preparo das vesículas (BBMV). A preparação das vesículas seguiu o método de precipitação diferencial de magnésio descrito por Wolfersberger et al. (1987) e quantificadas pelo método de Bradford (1976).

Figura 2: **A** - lagartas de *E. lignosellus* de quarto instar; **B**- Retirada de intestino de *E. lignosellus*.



Para tanto, as alíquotas de intestino foram transferidas para tubos contendo 10 mL de tampão de homogeneização (300 mM de Manitol, 17mM de Tris-HCl, 10 mM de HEPES, 5mM de EGTA, 2mM de DTT, 1mM de EDTA e 1mM de PMSF, pH 7.4) e foram submetidas por 9 vezes a homogeneização com duração de 30 s por vez e pausa de 30 s a 3000 rpm em um aparelho homogeneizador Turrax (Marconi, Piracicaba, SP). Após a homogeneização, foram adicionados 10 mL de solução gelada de $MgCl_2$ a 24 mM e a mistura foi incubada em gelo por 15 min. Após este tempo de espera, as amostras foram centrifugadas a 2.500 Xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 Xg por 1 h e 30 min a 4°C. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2,5 mL de tampão de homogeneização e 5 mL de $MgCl_2$ e estes foram incubados em gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 2.000 Xg por 15 min

a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo e centrifugado a 20.000 Xg por 40 min a 4°C. O sobrenadante deste processo foi descartado e o sedimento diluído em 500 µl de tampão de homogeneização. A concentração das BBMV's foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e alíquotas foram armazenadas a -80°C para posterior uso.

4.9. Ligand-Blotting

O Ligand-Blotting foi feito de acordo com o trabalho de Abdelkefi-Mesrati et al. (2011), com 20 µg de intestino e 40 nM de proteína. Após a corrida eletroforética foi feita a transferência e em seguida a membrana PVDF (GE Healthcare) foi submetida ao bloqueio com 10 mL de TBS (Tris-buffered saline (TBS) (1X) - 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl) contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,01% Tween-20, sob agitação suave por 1 h. A membrana foi, então, lavada com TBST (Tris-buffered saline (TBS) (1X) - 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) por 5 min e, em seguida, foi incubada por 2 h com a proteína de interesse, a qual foi diluída em TBST. A membrana foi então lavada novamente com TBST 3 vezes por 5 min. Posteriormente a membrana foi incubada por 1 h em uma solução contendo o conjugado estreptavidina/peroxidase numa diluição de 1:2000 (HRP) (GE Healthcare), para ligação específica à biotina. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBST e a revelação foi feita com 10 mL da solução NBT/BCIP (Sigma), conforme instruções do fabricante parando posteriormente a reação adicionando água.

4.10. Testes de competição homóloga e heteróloga das proteínas Cry1 e Vip3

Os ensaios de competição homóloga e heteróloga foram realizados conforme Abdelkefi-Mesrati et al (2011). Para tanto, utilizou-se a proteína ativada e marcada com biotina (100 ng), excesso da proteína competidora não marcada (50, 100, 500 e 1000 vezes) na presença de 10 µg BBMV's de cada espécie de inseto. As reações foram

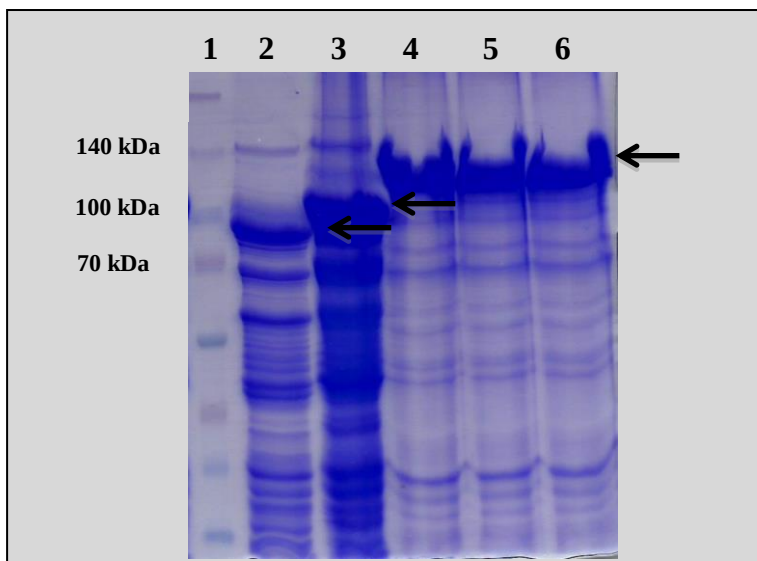
incubadas por 1 h e 30 min a 28°C a 140 rpm. A seguir, o material foi centrifugado a 13000 rpm em microcentrífuga, 4°C, 10 min. As BBMV's foram lavadas duas vezes com 500 µl de PBS e centrifugadas a 13000 rpm em microcentrífuga e dissolvidas em 20 µl de PBS. As amostras foram incubadas a 100°C durante 5 min juntamente com 10 µl de tampão de amostra Laemmli 4X e eletroforizadas em gel SDS-PAGE (9%). Após o término da eletroforese, foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (GE Healthcare). As proteínas biotiniladas ligadas às BBMV's foram detectadas com o conjugado estreptavidina/peroxidase numa diluição de 1:2000 (HRP) (GE Healthcare) e reveladas com 10 mL da solução NBT/BCIP (Sigma).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Expressão e análise das proteínas Cry1 e Vip3

Após a confirmação por SDS-PAGE de que os clones apresentavam expressão das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3Aa e Vip3Ca (Figura 3), seguiu-se com a indução da expressão das mesmas em maior volume para obtenção dos lisados, visando sua aplicação nos bioensaios de *D. flavipennella* e *E. lignosellus*. A análise por meio de SDS-PAGE confirmou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 135 kDa para as proteínas Cry1, de 85 kDa para Vip3Ca e de 100 kDa para Vip3Aa, pois esta proteína Vip3Aa possui 85 kDa e por ter sido clonada no vetor Pet-Sumo, ela tem um aumento de 15 kDa relativo à proteína SUMO.

Figura 3. Análise de SDS-PAGE 12% das proteínas Cry1 e Vip3. **1** – Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); **2** – proteína Vip3Ca; **3** – proteína Vip3Aa; **4** – proteína Cry1Aa; **5** – proteína Cry1Ac; **6** – proteína Cry1Ca.



O perfil de expressão proteica obtido é compatível com o descrito na literatura, apresentando massa molecular de 130 a 135 kDa para as proteínas Cry1 (LIGHTWOOD et al., 2000, BRAVO et al., 2007) e, aproximadamente, 88,5 kDa para as proteínas Vip3 (LOGUERCIO et al., 2002, CHAKROUN et al., 2012).

Após a corrida eletroforética, as bandas referentes às proteínas foram quantificadas para posteriormente serem utilizadas nas diluições das doses testadas nos bioensaios.

5.2. Bioensaios com proteínas Cry1 e Vip3 para *Diatraea flavipennella* e *Elasmopalpus lignosellus*

A análise da toxicidade de proteínas de *B. thuringiensis* por meio do uso do bioensaio é uma estratégia importante para selecionar a proteína com maior efetividade para o controle do inseto em estudo. A toxicidade das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac,

Cry1Ca, Vip3Aa e Vip3Ca foi testada em lagartas neonatas de *D. flavipennella* e de *E. lignosellus* e as concentrações letais média (CL₅₀) foram aferidas (Tabela 3).

Tabela 3. Suscetibilidade de lagartas neonatas de *D. flavipennella* e *E. lignosellus* contra proteínas Cry1 e Vip3.

Proteína	Inseto	CL ₅₀ (IC min – max) ^c
Cry1Aa	<i>D. flavipennella</i>	105,49 (58,17 – 181,32)
Cry1Ac	<i>D. flavipennella</i>	8,59 (3,42 – 13,53)
Cry1Ca	<i>D. flavipennella</i>	64,04 (38,51 – 102,22)
Vip3Aa	<i>D. flavipennella</i>	494,91(328,88 – 1144,99)
Vip3Ca	<i>D. flavipennella</i>	>2000
Cry1Aa	<i>E. lignosellus</i>	73,63 (40,75 – 131,19)
Cry1Ac	<i>E. lignosellus</i>	15,63 (9,35 – 24,61)
Cry1Ca	<i>E. lignosellus</i>	36,10 (20,92 – 61,29)
Vip3Aa	<i>E. lignosellus</i>	49,89 (28,72 – 84,21)
Vip3Ca	<i>E. lignosellus</i>	481,04 (314,97 – 771,98)

Os valores representam a média de três replicatas de 16 larvas por replicata (n = 48).

^b Coeficiente angular da reta e Erro Padrão.

^c Valores expressos em ng cm⁻² com Intervalo de Confiança (IC 95%).

^d Não determinado.

As proteínas da família Cry1 e da família Vip3 se mostraram eficientes no controle de *D. flavipennella* com exceção da Vip3Ca, que mesmo com a maior concentração testada (2000 ng cm⁻²), não resultou na mortalidade do inseto. As proteínas Cry1Aa e Cry1Ca foram igualmente efetivas visto que houve sobreposição no intervalo de confiança. Já a proteína Cry1Ac foi aproximadamente 12 vezes mais efetiva do que a Cry1Aa e 7 vezes mais efetiva do que a Cry1Ca para este inseto.

Pode-se observar que de acordo com a avaliação da toxicidade as mesmas proteínas foram eficientes para controle tanto de *D. flavipennella* como de *E. lignosellus*. Entre as proteínas da família Cry1, a Cry1Ac e Cry1Ca apresentaram a mesma

efetividade de controle, o mesmo ocorrendo para Cry1Ca e Cry1Aa, visto que houve sobreposição dos intervalos de confiança entre essas proteínas. Essa sobreposição não ocorreu entre Cry1Ac e Cry1Aa; portanto, a Cry1Ac foi aproximadamente 5 vezes mais eficiente do que a Cry1Aa. Para as proteínas Vip3, destaca-se a Vip3Aa, a qual foi 10 vezes mais eficiente para o controle da população do que a proteína Vip3Ca.

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca e Vip3Aa foram efetivas no controle destes insetos; no entanto destaca-se que Cry1Ac e Vip3Aa foram as proteínas que apresentaram menor CL₅₀ dentro de cada grupo estudado. Estudos com as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac já haviam demonstrado eficácia no controle da broca-do-colmo *D. saccharalis* em comparação a Cry1Ab e Cry1Fa (TAN et al., 2011; ZHANG et al., 2013). Outros autores também estudaram o efeito das proteínas Cry1Aa e Cry1Ac em *D. saccharalis* e também encontraram que estas foram efetivas no controle desta espécie, a qual pertence ao mesmo gênero que a relatada neste trabalho e é um inseto-praga da cana-de-açúcar (MACEDO et al., 2012). Os resultados obtidos por Silva (2013) corroboram os obtidos neste trabalho visto que ao estudarem isolados de *B. thuringiensis* com genes *cry1*, verificaram que aqueles que apresentavam os genes *cry1Aa* e *cry1Ac* foram mais eficazes no controle de uma população de *D. flavipennella*, sugerindo a eficiência destes dois genes, o que pode ser comprovado quando os bioensaios deste trabalho foram realizados com as proteínas expressas isoladamente em sistema heterólogo.

O resultado deste trabalho apresentou resultados similares aos obtidos por Li & Bouwer (2014) que também verificaram que a proteína Cry1Ac apresentou menor CL₅₀ do que Cry1Aa e Cry1Ca para o lepidóptero *H. armigera*.

Já em relação à proteína Vip3, Palma et al. (2012) relataram baixa susceptibilidade à Vip3Ca3 em *O. nubilalis* e *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Tortricidae), semelhante ao encontrado no presente trabalho para *D. flavipennella* em que mesmo com a maior concentração testada não houve mortalidade para Vip3Ca. Porém, os mesmos autores encontraram efetividade desta proteína para outros lepidópteros-praga corroborando o resultado deste trabalho para *E. lignosellus*.

Quanto à eficiência de Vip3A no controle de lepidópteros-praga, Baranek et al. (2015), ao estudarem a toxicidade das proteínas Vip3Aa58 e Vip3Aa59 constataram que estas foram efetivas no controle de *S. exigua* (Hübner). Outros trabalhos também reportaram a eficácia da proteína Vip3A no controle de diferentes lepidópteros-praga (LEMES et al., 2014; CRIALESI-LEGORI et al., 2014; MARUCCI et al., 2015).

Estudos anteriores, verificaram a diferença entre a toxicidade para a ordem Lepidoptera dentre as distintas proteínas Cry e Vip3 (SENA et al., 2009). SENA e seus colaboradores (2009) avaliaram a toxicidade das proteínas Vip3Aa, Vip3Af, Cry1Ab e Cry1Fa em *S. frugiperda*, obtendo CL_{50} de 49,3 ng cm⁻², 21 ng cm⁻², 867 ng cm⁻², e de 170 ng cm⁻², respectivamente, demonstrando que as proteínas Vip3A foram mais tóxicas que as proteínas Cry1 para a população de *S. frugiperda* estudada, ao contrário do encontrado neste trabalho em que as proteínas Cry1 foram mais eficazes do que as Vip3.

Estudos realizados com plantas transgênicas demonstraram a eficácia do gene *cry1Ac* em amendoim para o controle de *E. lignosellus* (SINGSIT et al., 1997) e também verificaram a eficácia das toxinas Cry (Cry1F, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry9C) em milho, no controle deste inseto (VILELLA et al., 2002; OKUMURA et al., 2013). Há também o milho MIR162 (Syngenta) que tem o gene *vip3Aa* que controla vários lepidópteros-praga, incluindo, *E. lignosellus* (SYNGENTA, 2012). No mercado já foram lançadas outras culturas que apresentam a proteína Cry1Ac, entre elas, soja (MON87701) e algodão (Bollgard®).

Até o presente momento as informações sobre o uso das proteínas Cry1 e Vip3 no controle de *D. flavipennella* e *E. lignosellus* são escassas. A não efetividade da proteína Vip3Ca a lagartas de *D. flavipennella* pode estar associada ao fato desta proteína não se unir aos receptores presentes no intestino do inseto como verificado por Rang et al. (2004) com a proteína Cry1Ea em *D. saccharalis*.

A suscetibilidade entre as duas espécies estudadas mostra que as proteínas podem não atuar de maneira semelhante entre os insetos, por isso a importância de se avaliar a toxicidade. Essa diferença de suscetibilidade também foi reportada para inseticidas biológicos a base de *B. thuringiensis*, em que *Anticarsia gemmatilis*

(Hübner, 1818) (Lepidoptera: Eribiidae) foi 1,5 a 5,6 vezes mais suscetível que *Chrysodeixis includens* (Hübner, 1821) (Lepidoptera: Noctuidae) (MORALES et al., 1995).

5.3. Purificação, ativação e marcação das proteínas com biotina

Após a análise da expressão e verificação da toxicidade das proteínas frente aos insetos-praga estudados, foi possível selecionar as proteínas mais efetivas e realizar estudos de ligação destas proteínas às BBMV's de cada inseto. Portanto, foram escolhidas Cry1Ac e Vip3Aa visto que foram as proteínas que apresentaram melhor controle para ambos os insetos-praga e também a proteína Cry1Aa pois esta apresentou CL₅₀ diferente da Cry1Ac (não houve sobreposição do intervalo de confiança) para ambos os insetos.

As proteínas Cry1Aa e Cry1Ac foram quantificadas por Bradford e ativadas com tripsina 1%. A ativação foi verificada por meio de gel SDS-PAGE e, posteriormente, as proteínas foram purificadas (Figuras 4A e 4B), manualmente, em coluna HiTrap Q. A proteína Vip3Aa também foi quantificada por Bradford e ativada com tripsina 1% após purificação (Figura 5) em coluna HisTrap HP.

Figura 4: Purificação das proteínas Cry1Aa (A) e Cry1Ac (B) após ativação com tripsina. **1** – Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); **2** – primeira fração da purificação; **3** – segunda fração da purificação; **4** – terceira fração da purificação; **5** – quarta fração da purificação da proteína.

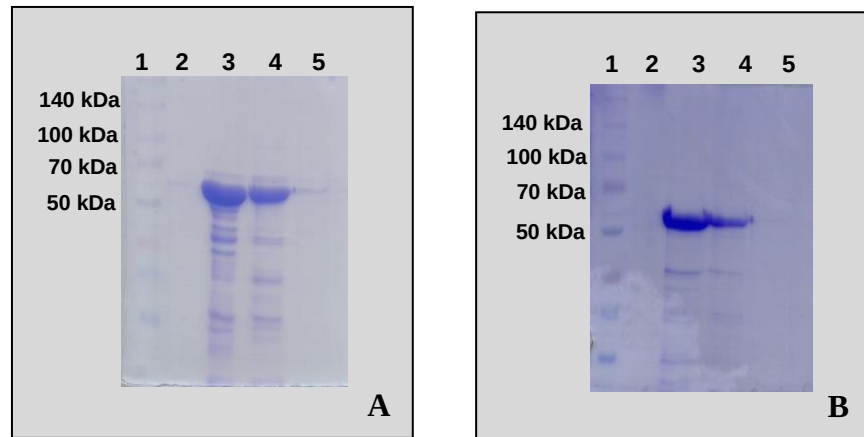
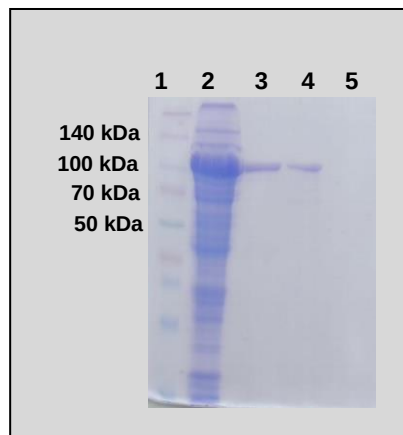


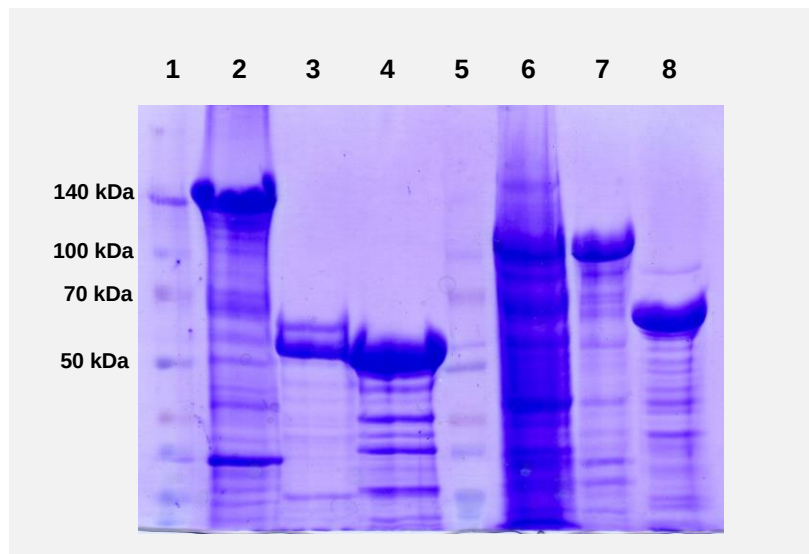
Figura 5: Purificação da proteína Vip3Aa. **1** – Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); **2** – Proteína Vip3Aa sem purificar, **3, 4 e 5** – frações da proteína purificada.



A ativação das proteínas (Figura 6) corroboraram os resultados obtidos por Abdelekefi-Mesrati et al. (2009) e Lee et al. (2006), resultando em proteínas ativadas com aproximadamente 62 kDa. Esta etapa da ativação das proteínas por tripsina é

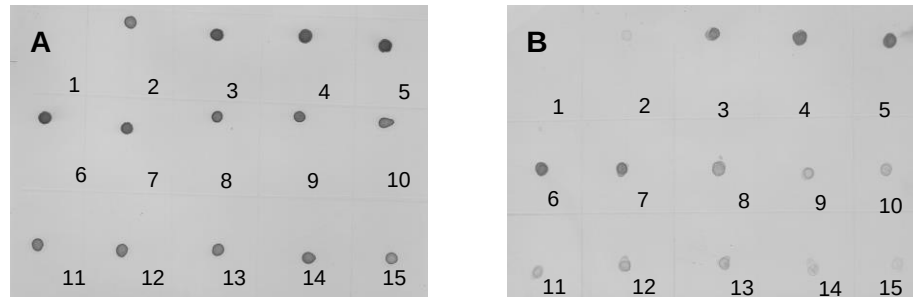
necessária para que se possa determinar sua atividade tóxica *in vitro*. Isso é imprescindível, visto que *in vivo*, no lúmen do intestino médio das lagartas, ocorre o evento da proteólise, ou seja, a protoxina passa a ser toxina com posterior ligação das toxinas aos receptores.

Figura 6: Produção, Purificação e ativação das proteínas Cry1 e Vip3Aa. **1** – Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); **2** – Produção da proteína Cry1; **3**– Ativação da proteína Cry1; **4** – Purificação da proteína Cry1; **5** – Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); **6** – Produção da proteína Vip3Aa; **7** – Purificação da proteína Vip3Aa; **8** – Ativação da proteína Vip3Aa.



As proteínas purificadas e ativadas posteriormente foram marcadas com biotina e as frações eluídas em coluna P10 Desalting foram detectadas pela análise por “Dot Blot” (Figura 7), o que permitiu a detecção das frações mais fortemente marcadas com a biotina. Estas frações foram utilizadas nas etapas posteriores nos ensaios de união com BBMV das espécies estudadas.

Figura 7. Análise por “Dot Blot” das frações das proteínas Cry1 (A) e Vip3Aa (B) biotiniladas. Os números são a sequência das frações biotiniladas eluídas da coluna P10 Desalting.



5.4. Detecção dos receptores por Ligand-Blotting

A identificação do receptor é importante visto que a interação das proteínas com o receptor no intestino do inseto é o primeiro passo na toxicidade da toxina. O método do “Ligand-blotting” também é usado para identificar ligações de proteínas. Ele tem sido usado em vários estudos de detecção de receptores de membrana da proteína Cry1Ab presentes em insetos alvos (SHIMADA et al., 2006; ARENAS et al., 2010; CACCIA et al., 2012; FLORES- ESCOBAR et al., 2013).

A análise “Ligand-blotting” permitiu demonstrar a união das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Vip3Aa marcadas com biotina aos receptores presentes nas BBMVs de *D. flavipennella* e *E. lignosellus*. Essa análise evidenciou a presença de bandas com tamanho aproximadamente de 65 kDa, 70 kDa e 130 kDa para a proteína Cry1Aa, de 70 kDa e de 130 kDa para Cry1Ac e Vip3Aa em *D. flavipennella* e *E. lignosellus* (Figuras 8 e 9).

Figura 8. Detecção do receptor putativo para as toxinas Cry1Aa (A), Cry1Ac (B) e Vip3Aa (C) em BBMVs de *D. flavipennella*.

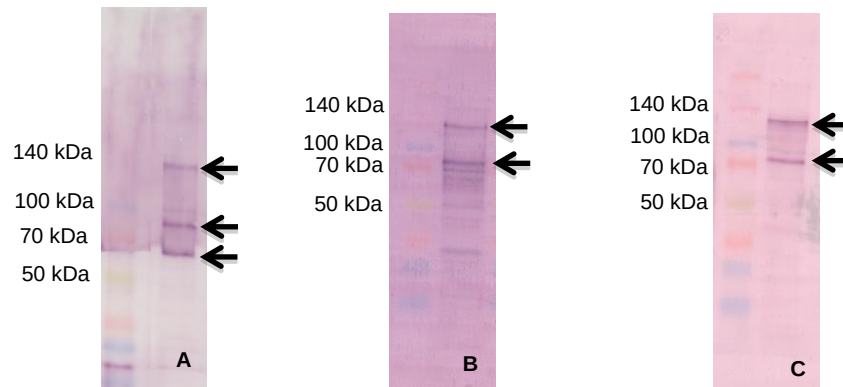
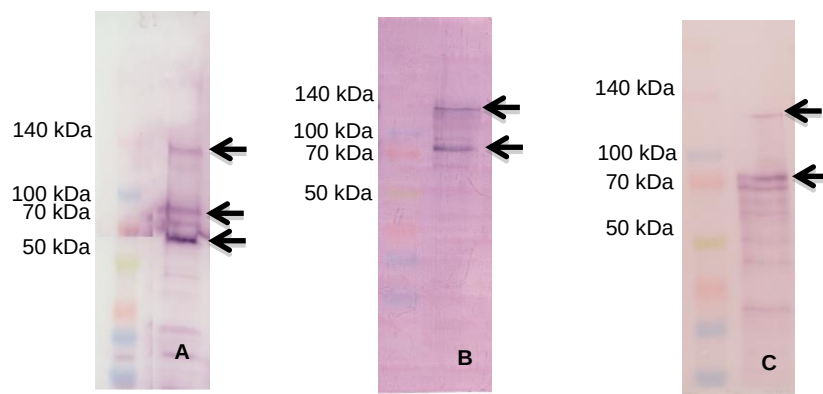


Figura 9. Detecção do receptor putativo para as toxinas Cry1Aa (A), Cry1Ac (B) e Vip3Aa (C) em BBMVs de *E. lignosellus*.



Bravo e colaboradores (2007) descreveram em um modelo para o mecanismo de ação das toxinas Cry1A que os receptores caderina, aminopeptidase-N e fosfatase alcalina desempenham um papel fundamental na interação desta proteína com o intestino médio de lagartas da ordem Lepidoptera. Assim é possível que estes receptores estejam envolvidos na ligação das toxinas Cry1Aa e Cry1Ac às BBMVs dos insetos-praga estudados.

De acordo com a literatura fosfatases alcalinas apresentam tamanho molecular entre 62 kDa e 68 kDa (FERNÁNDEZ et al., 2006; JURAT-FUENTES; ADANG, 2006) e aminopeptidases-N entre 130 kDa e 150 kDa (HUA et al., 2004; PACHECO et al, 2009; RAJAGOPAL et al., 2003), podendo estar na forma de homodímero de 130 kDa, formado por monômeros de 65 kDa (MALIK et al., 2006). Além destas proteínas tem também os receptores do tipo caderina, com tamanho molecular ao redor de 210 kDa (FLANAGAN et al., 2005; HUA et al., 2004; JURAT- FUENTES; ADANG, 2006). Assim fundamentado nessas informações, os receptores putativos para Cry1Aa, Cry1Ac e Vip3Aa podem consistir em fosfatases alcalinas e aminopeptidases-N, para os dois insetos estudados.

Portanto, pode-se inferir que os receptores putativos, detectados em *D. flavipennella* e *E. lignosellus* para Cry1Aa, Cry1Ac e Vip3Aa podem ser similares, entretanto podem não ser o mesmo receptor, apesar de seus tamanhos coincidirem com o tamanho de receptores descritos em outros trabalhos. Todavia, testes devem ser realizados para que se comprove essa hipótese e a caracterização desses receptores putativos por atividade enzimática ou sequenciamento de seus aminoácidos poderão determinar as similaridades ou dissimilaridades entre eles levando à compreensão dos mecanismos de união das toxinas Cry1A e Vip3A aos receptores dos insetos em estudo.

Semelhantemente ao encontrado neste trabalho, Han et al. (2014) também verificaram a presença de duas ou mais bandas nos ensaios de ligand-blotting com as BBMV de *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Os autores detectaram maior intensidade de ligação de Cry1Ac às BBMV de *C. suppressalis* do que para *S. inferens*. Em BBMV de *C. suppressalis*, a proteína Cry1Ac apresentou bandas de aproximadamente 15, 75, 115, e 200 kDa de tamanho, enquanto que em *S. inferens*, as bandas foram de 15, 42, 100, e 140 kDa. Verificaram também que o ensaio com a proteína Cry1Ca originou bandas de 27, 33 e 40 kDa em *C. suppressalis* de aproximadamente 30, 33, 40 e 100 kDa em *S. inferens*. O padrão de ligação da proteína Cry1Ac em BBMV de *C. suppressalis*

encontrado por Han et al. (2014) foi semelhante a de relatos anteriores (XU et al., 2009) e apoia a existência de vários locais de ligação de Cry1Ac às BBMV's.

Resultados semelhantes também foram encontrados por Rang e colaboradores (2004), que demonstram por meio de ensaios de ligação que Cry1Ab e Cry1Ac ligam-se às BBMV's de *S. frugiperda* e de *D. saccharalis*. Macedo et al. (2012) também relataram que as BBMV's de *D. saccharalis* apresentaram ligações quando submetidas à marcação das proteínas biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac.

Interações de Vip3Aa com BBMV de insetos suscetíveis envolvem moléculas de ligação específicas diferentes das reconhecidas pelas proteínas Cry1A. Análise de Ligand-blotting com proteínas Vip3A revelou bandas com tamanhos de 80 e 110 kDa em *Manduca sexta* (Linnaeus) (Lepidoptera: Sphingidae) e para Cry1Ab de 120 e 210 kDa (LEE et al., 2003). O mesmo estudo demonstrou que Vip3A foi incapaz de se ligar ao APN e a caderina de *M. sexta*, sendo que Cry se liga a ambas proteínas de membrana (LEE et al., 2003).

Em *Prays oleae* (Bernard) (Lepidoptera: Praydidae) e *Agrotis segetum* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Noctuidae) Vip3Aa apresentou uma banda de 65 kDa, enquanto Cry1Ac apresentou uma banda de 210 kDa em *P. oleae* e de 120 kDa em *A. segetum* (BEN HAMADOU-CHARFI et al., 2013). Em outros estudos os autores obtiveram para *S. littoralis* bandas de 55 e de 100 kDa com Vip3Aa e para *Ephesia kuhniella*, *S. frugiperda*, *S. albula*, *S. cosmioides* e *S. eridania* bandas de 65 kDa (ABDELKEFI-MESRATI et al., 2011, BERGAMASCO et al., 2013).

5.5. Análises das competições homóloga e heteróloga entre Cry1 e Vip3

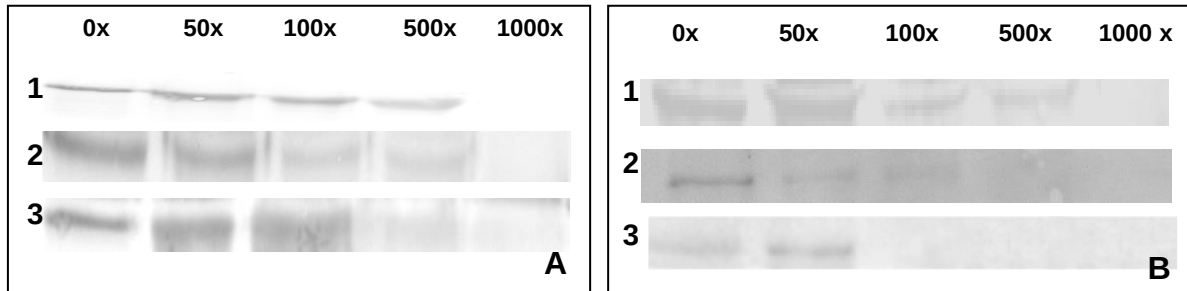
A primeira geração de plantas geneticamente modificadas com genes de *B. thuringiensis* apresentavam apenas genes individuais; no entanto com o surgimento da segunda geração de plantas geneticamente modificadas, as quais expressam múltiplos genes de *Bt*, torna-se cada vez mais importante avaliar não só o efeito inseticida das proteínas, mas também a interação destas quando combinadas, a fim de se analisar a existência de competição ou não entre estas toxinas *Bt* quanto à ligação das mesmas

aos receptores no intestino do inseto em estudo. Dessa forma foram realizados ensaios de competição homóloga e heteróloga.

A competição homóloga foi evidenciada nas membranas pela ausência da banda que se refere à proteína marcada unida aos receptores das BBMV, ou seja, ocorreu a competição por estes quando se adicionou excesso da mesma proteína competidora homóloga não marcada, levando à interação com os sítios receptores e impedindo totalmente a união da toxina marcada, a qual foi eliminada da membrana por meio das lavagens e, portanto, não haveria marcação a ser detectada.

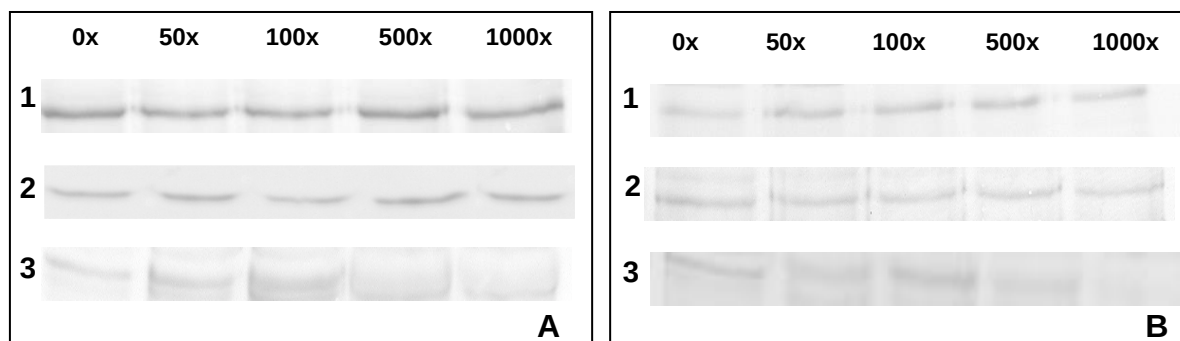
A adição de 50, 100 e 500 vezes da proteína competidora Cry1Aa reduziu gradativamente a união da proteína Cry1Aa marcada à BBMV de *D. flavipennella* e de *E. lignosellus* (Figuras 10A1 e 10B1) até que o excesso de 1000 vezes impediu totalmente a união da Cry1Aa marcada aos sítios receptores. Na competição homóloga com Cry1Ac a adição de excessos de 50, 100, 500 vezes da proteína competidora Cry1Ac também reduziu gradativamente a união da proteína Cry1Ac marcada à BBMV de *D. flavipennella* (Figura 10A2) e para *E. lignosellus* verifica-se que a competição pelos receptores foi bastante evidente já a partir do excesso de 100 vezes de Cry1Ac não marcada (Figura 10B2). A adição de um excesso de 500 vezes da proteína competidora Vip3Aa não marcada foi suficiente para impedir notadamente a união da proteína Vip3Aa marcada à BBMV de *D. flavipennella* (Figura 10A3) e, para *E. lignosellus* um excesso de 100 vezes impediu a união da proteína marcada (Figura 10B3).

Figura 10: Competição homóloga com: (1) Cry1Aa, (2) Cry1Ac, (3) Vip3Aa marcadas com biotina, com excesso de 50x, 100x, 500x, 1000x das respectivas proteínas competidoras não marcadas e com 10 µg de BBMV de *D. flavipennella* (A) e *E. lignosellus* (B).



Nas Figuras 11A1 e 11B1 observa-se que a competição heteróloga com Cry1Aa marcada e os excessos de 50, 100, 500 e 1000 vezes de Vip3Aa não ocorreu, ou seja, a adição destes excessos não promoveu a interação de Vip3Aa aos receptores e, portanto, não impediu a união da proteína marcada Cry1Aa aos receptores das BBMV de ambos os insetos, o que resultou na presença da banda quando a membrana foi revelada. Para as análises com Cry1Ac e Vip3Aa (Figuras 11A2 e 11B2) verifica-se também que não houve competição entre as proteínas para nenhuma das espécies estudadas, ou seja, mesmo o excesso de 1000 vezes da competidora Vip3Aa não impediu a união total de Cry1Ac aos sítios receptores. No entanto, verificou-se a existência de competição heteróloga entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac, em que o excesso de 500 vezes da proteína Cry1Aa não marcada reduziu notadamente a ligação da Cry1Ac marcada até que a adição de 1000 vezes da proteína competidora, impediu totalmente a união da proteína marcada Cry1Ac às BBMV de *D. flavipennella* e *E. lignosellus*.

Figura 11: Competição heteróloga. (1) Cry1Aa e Vip3Aa com excesso de 50x, 100x, 500x, 1000x da proteína competidora não marcada Vip3Aa, (2) Cry1Ac e Vip3Aa com excesso de 50x, 100x, 500x, 1000x da proteína competidora não marcada Vip3Aa, (3) Cry1Aa e Cry1Ac com excesso de 50x, 100x, 500x, 1000x da proteína competidora não marcada Cry1Aa; com 10 µg de BBMV de *D. flavipennella* (A) e *E. lignosellus* (B).



As análises de competição heteróloga envolvendo as proteínas Cry1Aa/Vip3Aa Cry1Ac/Vip3Aa não mostraram competição pelo mesmo receptor corroborando o descrito na literatura para vários insetos-praga. Vários autores mostraram ausência de sítios de ligação partilhados entre Vip3Aa e Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Fa, Cry2Ae e Cry2Ab que tinha sido confirmada em várias espécies de insetos, e entre Vip3Af com Cry1Ab e Cry1F em *S. frugiperda* (LEE et al., 2006; SENA et al., 2009; LIU et al., 2011, GOUFFON et al., 2011; BEN HAMADOU-CHARFI et al., 2013; CHAKROUN; FERRÉ 2014; JAKKA et al., 2015).

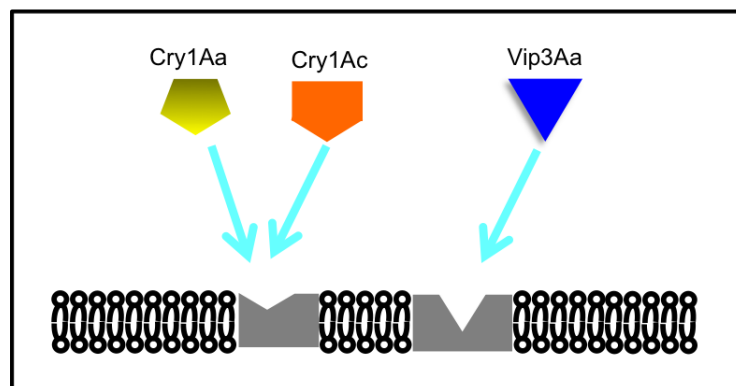
Resultados similares ao deste trabalho evidenciaram competição entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac sugerindo que estas compartilham o mesmo sítio de ligação aos receptores e que Cry1Aa/Vip3Aa e Cry1Ac/Vip3Aa não apresentaram competição entre si para os receptores presentes em *D. saccharalis* (DAVOLOS, 2014; DAVOLOS et al., 2015).

Outros estudos demonstraram que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ab compartilham o mesmo sítio de ligação em populações de *H. zea*, *P. xylostella* e *P.*

gossypiella (KARIM et al., 2000; ESTELA et al., 2004; GONZÁLES-CABRERA et al., 2006).

Dessa forma, após verificar as competições heterólogas entre Cry1Aa, Cry1Ac e Vip3Aa foi possível elaborar o modelo de ligação (Figura 12) destas proteínas para *D. flavipennella* e *E. lignosellus*. Este modelo corrobora outros trabalhos que também constataram competição entre Cry1 para o mesmo sítio de ligação e ausência de competição entre Cry1 e Vip3A para outras espécies de insetos-praga (SENA et al., 2009; CHAKROUN; FERRÉ, 2014).

Figura 12. Modelo proposto de ligação das proteínas Cry1 e Vip3A na BBMV de *D. flavipennella* e *E. lignosellus*.



Competição heteróloga com toxinas Cry1A e BBMV de *Heliothis* revelou três sítios de ligação para proteínas Cry1A. Foi determinado um sítio que é compartilhado por Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac; outro sítio que é reconhecido por Cry1Ab e Cry1Ac; e também verificaram um único sítio para Cry1Ac (VAN RIE et al., 1989; ESTELA et al., 2004). Em contraste, proteínas Cry2A e Vip3A ligaram-se a sítios únicos diferentes dos encontrados para Cry1A (LEE et al., 2006; GOUFFON et al., 2011).

Tendo em vista os casos frequentes de resistência, uma das formas de manejo em populações de campo é a utilização de plantas piramidadas com mais de um

transgene. Alguns casos de desenvolvimento de resistência de insetos-praga a toxinas Cry foram relatados (TABASHNIK et al., 2000) e, assim, a combinação de proteínas inseticidas, com diferentes sítios receptores, apresenta-se como eficiente alternativa para o manejo de resistência, já que haveria menor probabilidade de ocorrência simultânea de mutações em dois sítios receptores que impediriam a união das toxinas, levando ao possível surgimento de resistência pelos insetos-praga.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho são indicativos de que as combinações das proteínas Cry1Aa/Vip3Aa e Cry1Ac/Vip3Aa apresentam grande potencial de controle destas pragas e podem ser usadas na construção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar, visto que ainda não há variedades para controle das mesmas.

6. CONCLUSÕES

Os dados aqui apresentados revelam potencial de controle das proteínas Cry1Ac e Vip3Aa de *B. thuringiensis* à *D. flavipennella* e *E. lignosellus*. A proteína Vip3Ca não é indicada para o controle de *D. flavipennella*. Constatou-se a presença dos receptores para aminopeptidase e fosfatase alcalina nas três proteínas estudadas. Ensaio de união sugeriram um modelo com dois receptores distintos (Cry1Aa e Cry1Ac; Vip3Aa). Dentre as proteínas estudadas Cry1Aa/Vip3Aa e Cry1Ac/Vip3Aa merecem destaque, visto que não competem pelo mesmo receptor no intestino dos insetos estudados e portanto, podem ser combinadas para obtenção de plantas transgênicas piramidadas de cana-de-açúcar. No entanto, a combinação Cry1Aa/Cry1Ac não seria indicada, visto que ambas ocupam o mesmo sítio receptor para ambos os insetos.

7. REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; CHAKROUN, M.; KAMOUN, F.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S.; ROUIS, S.; JAOUA, S. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 3, p. 198-201, 2011.

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELLAMI-BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 2, p. 250-254, 2011.

ABDELKEFI-MESRATI, L.; ROUIS, S.; SELLAMI, S.; JAOUA, S. *Prays oleae* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3LB differs from that of Cry1Ac toxin. **Molecular Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 15-19, 2009.

ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. **Advances in Insect Physiology**, v. 47, p. 39–87, 2014.

ALMEIDA, L. C. **Bicudo da Cana-de-açúcar**. Piracicaba: Centro De Tecnologia Canavieira, 2005. p.1-3. (Boletim Técnico C.T.C).

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12497–12503, 2010.

BARANEK, J.; KAZNOWSKI, A.; KONECKA, E.; NAIMOV, S. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 and Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 130, p. 72–81, 2015.

BARROS, R. Pragas do milho safrinha. Tecnologia e Produção: Milho safrinha e culturas de inverno 2009. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/58414164/07-Pragas-Do-Milho-Safrinha>> Acesso em: 20 set. 2015.

BEN HAMADOU-CHARFI, D.; BOUKEDI, H.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, n. 2, p. 139-43, 2013.

BERGAMASCO, V. B.; MENDES, D. R. P.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 2, p. 152–158, 2013.

BESSIN, R. The common stalk borer in corn. Entomology. 2004. Disponível em; <<http://www.ca.uky.edu/entomology/entfacts/ef100.asp>> Acesso em: 06 set. 2015.

BHALLA, R.; DALAL, M.; PANGULURI, S. K.; JAGADISH, B.; MANDAOKAR, A. D.; SINGH, A. K.; KUMAR, P. A. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 2, p. 467–472, 2005.

BLUME, H. **Geography of sugar cane**: environmental, structural and economical aspects of cane sugar production. Berlin: Dr. Albert Bartens Verlag, 1985. 248 p.

BOTELHO, P. S. M. **Controle biológico e controle químico de pragas em cana-de-açúcar**. Workshop tecnológico sobre pragas da cana-de-açúcar. Piracicaba: ESALQ/USP, 2007. 76p.

BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Eds.), **Controle biológico no Brasil**: parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. p. 477-494.

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

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

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

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, 2011.

CACCIA, S.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; MAHON, R.J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; BAUTSOENS, N.; VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Binding site alteration is responsible for

field- isolated resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins in two *Helicoverpa* species, **PLoS One**, v. 5, e9975, 2010.

CACCIA, S.; MOAR, W.; CHANDRASHEKHAR, J.; OPPERT, C.; ANILKUMAR, K.; JURAT-FUENTES, J.; FERRÉ, J. Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in the midgut lumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.16, p.5690– 5698, 2012.

CALGARO, M.; COELHO, D. S. Respostas de variáveis fisiológicas e tecnológicas da cana- de-açúcar. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 46, n. 1, p. 11–20, 2015.

CARRIÈRE, Y.; CRICKMORE, N.; TABASHNIK, B. E. Optimizing pyramided transgenic crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 161–168, 2015.

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

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. *In vivo* and *in vitro* binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites using ¹²⁵I-radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 6258–6265, 2014.

CHITKOWSKI, R. L.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, M. J.; BRIDGES, W. C. JR. Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 3, p.755–762, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar, disponível em:<
http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_15_15_44_37_boletim_can_a_portugues_-_1o_lev_-_14.pdf>, acesso em 12 ago 2015.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVOLOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 2, p. 79-87, 2014.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. (2014) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em; <<http://www.btno-nomenclature.info/>> Acesso em: 15 out. 2014.

DAVOLOS, C. C. **Efeitos da interação e toxicidade das proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* em *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Crambidae).** 2014. 63p.Tese (Doutorado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.

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.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409–433, 2003.

DE MAAGD, R.; KWA, M.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Applied and Environment Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1537–1543, 1996.

DHURUA, S.; GUJAR, G. T. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science**, v. 67, n. 8, p. 898–903, 2011.

DINARDO-MIRANDA, L. L. Pragas. In: **Cana-de- açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008. p.349-404.

DIXON, W. N. Lesser cornstalk borer damage to forest nursery seedlings in Florida. USFS Tree Planter's Notes, Florida. **Entomology Circular**, 236, v. 33, n. 12, p. 37-39, 1982.

DOWNES, S. Adaptive management of pest resistance by *Helicoverpa* species (Noctuidae) in Australia to the Cry2Ab Bt toxin in Bollgard II cotton. **Evolutionary Applications**, v. 3, p. 574–584, 2010.

ESTELA, A.; ESCRICHE, B.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1378-1384, 2004.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. P. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v. 93, p. 5389-5394, 1996.

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

FAO. **Statistical yearbook 2013**: world food and agriculture. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess_yearbook/en/#.VDwCm_IdV-4>. Acesso em: 01 ago. 2014.

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

FAST, P. G.; ANGUS, T. A. Effects of Parasporal Inclusions of *Bacillus thuringiensis* Var. Sotto Ishiwata on the Permeability of the Gut Wall of *Bombyx Mori* (Linnaeus) Larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 20, p. 29-32,1965.

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

FERRÉ, J.; REAL, M. D.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M. Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 12, p. 5119-5123, 1991.

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

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

FLORES-ESCOBAR, B.; RODRÍGUEZ-MAGADAN, H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Differential Role of *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and alkaline phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.15, p.4543– 4550, 2013.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. Cana-de-açúcar. In; _____. **AGRIANUAL 2014:** anuário estatístico da agricultura. São Paulo, 2014. p. 197-227.

FREITAS, M. R. T.; SILVA, E. L.; MENDONÇA, A. L.; SILVA, C. E.; FONSECA, A. P. P.; MENDONÇA, A. L.; SANTOS, J. S.; NASCIMENTO, R. R.; SANTANA, A. E. G. The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Fl. **Entomology**, v. 90, n. 2, p. 309-313, 2007.

FREITAS, M. R.; FONSECA, A. P.; SILVA, E. L.; MENDONÇA, A. L.; SILVA, C. E.; MENDONÇA, A. L.; NASCIMENTO, R.; SANTANA, A. E. The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the states of Alagoas, Brazil. **Florida Entomologist**, v. 89, n. 4, p. 539-540, 2006.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science**, v. 293, p. 857–860, 2001.

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

GARCIA, J. F. **Manual de identificação de pragas da cana**. Campinas, 2013, 220 p.
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, p. 1-7, 2011.

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

GOMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; MATUS, V.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, v. 459, n. 2, p. 383–396, 2014.

GONZALEZ-CABRERA, J.; FARINÓS, G. P.; CACCIA, S.; DÍAZ-MENDOZA, M.; CASTAÑERA, P.; LEONARDI, M. G.; GIORDANA, B.; FERRÉ, J. Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2594-2600, Apr 2006.

GOUFFON, C.; VAN VLIET, A.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; JURAT-FUENTES, J. L. Binding sites for *Bacillus thuringiensis* Cry2Ae toxin on heliothine brush border membrane vesicles are not shared with Cry1A, Cry1F, or Vip3A toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3182–3188, 2011.

GRANERO, F.; BALLESTER, V.; FERRE, J. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins Cry1Ab and Cry1Fa share a high affinity binding site in *Plutella xylostella* (L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 224, n. 3, p. 779– 783, 1996.

HALL, I. M. Some fundamental aspects of applied insect pathology. **Advances in Pest Control Research**, New York, v. 4, p. 13-24, 1967.

HAN, L.; HAN, C.; LIU, Z.; CHEN, F.; JURAT-FUENTES, J. L.; HOU, M.; PENG, Y. Binding Site Concentration Explains the Differential Susceptibility of *Chilo suppressalis* and *Sesamia inferens* to Cry1A-Producing Rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5134–5140, 2014.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, ARMELLE; NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Netherland: Kluwer Academic Plubishers, p. 41- 64, 2000.

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

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; VAN RIE, J.; ESRICHE, 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**, e68164, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0068164

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

HERRERO, S.; GONZALEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; BAKKER, P. L.; DE MAAGD, R. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domain II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 3, p. 507–513, 2004.

HOLLOWAY, R. L.; SMITH JUNIOR, J. W. Lesser cornstalk borer response to photoperiod and temperature. **Environmental Entomology**, Washington, DC, v. 5, n. 5, p. 996-1000, 1976.

HUA, G.; JURAT-FUENTES, J.L.; ADANG, M.J. Fluorescent-based assays establish *Manduca sexta* Bt-R1a cadherin as a receptor for multiple *Bacillus thuringiensis* Cry1A

toxins in *Drosophila* S2 cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, p. 193-202, 2004.

HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER, R. L. JR.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P.; ANDOW, D. A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G. D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS One**, v. 9, e112958, 2014.

HUSZ, B. On the use of *Bacillus thuringiensis* in the fight against the corn borer. **Institute Corn Borer Investigation Scienc Reporter**, v. 2, p. 99-110, 1929.

JAKKA, S.; FERRÉ, J.; JURAT-FUENTES, J. L. Cry Toxin Binding Site Models and their Use in Strategies to Delay Resistance Evolution. IN: SOBERÓN, M.; GAO, Y.; BRAVO, A. (Eds). **Bt Resistance: Characterization and Strategies for GM Crops Producing *Bacillus thuringiensis* Toxins**; 2015. pp. 138-149.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2014. *ISAAA Briefs* 49 (ISAAA, Ithaca, NY, 2014).

JAMES, C. Global status of commercialized transgenic crops. 2002 ISAAA Brief no 27 ISAAA: Ithaca, NY.

JIN, L.; ZHANG, H.; LU, Y.; YANG, Y.; WU, K.; TABASHNIK, B.; WU, Y. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 169–174, 2015.

JIN, T.; CHANG, X.; GATEHOUSE, A.; WANG, Z.; EDWARDS, M.; HE, K. Downregulation and mutation of a Cadherin gene associated with Cry1Ac resistance in the Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **Toxins**, v. 6, n. 9, p. 2676-93, 2014.

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

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. **Biochemistry**, v. 45, n. 32, p. 9688-9695, 2006.

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, n. 3, p. 198-216, 2000.

KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crystal δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. **BioEssays**, Cambridge, v. 15, n. 7, p. 469-476, 1993.

KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins with different insect specificity, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 924, p. 509–518, 1987.

KOZIEL, M. G.; BELAND, G. L.; BOWMAN, C.; CAROZZI, N. B.; CRENSHAW, R.; CROSSLAND, L.; DAWSON, J.; DESAI, N.; HILL, M.; KADWELL, S.; LAUNIS, K.; LEWIS, K.; MADDOX, D.; MCPHERSON, K.; MEGHJI, M. R.; MERLIN, RHODES, E. R.; WARREN, G. W.; WRIGHT, M.; EVOLA, S. V. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. **Nature Biotechnology**, v. 11, p. 194–200, 1993.

KRUGER, M. J.; VAN RENSBURG, J. B. J.; VAN DEN BERG, J. Perspective on the development of stem borer resistance to Bt maize and refuge compliance at the Vaalharts irrigation scheme in South Africa. **Crop Protection**, v. 28, p. 684–689, 2009.

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

LAMBERT, B.; PEFEROEN, M. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **BioScience**, Washington, v. 42, n. 2, p. 112-122, 1992.

LARSON, L. V.; IGNOFFO, C. M. Activity of *Bacillus thuringiensis*, varieties thuringiensis and galleriae, against fall cankerworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 64, n. 6, p. 1567-1568, 1971.

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

LEE, M. K.; RAJAMOHAN, F.; GOULD, F.; DEAN, D. H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ -endotoxin in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.3836-3842, 1995.

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

LEMES, A. R. N.; DAVOLOS, C. C.; CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; FERNANDES, O. A.; FERRÉ, J.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Synergism and Antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, v. 9, p.1-8, 2014.

LEWIS, F. B.; DUBOIS, N. R.; GRIMBLE, D.; METTERHOUSE, W.; QUIMBY, J. Gypsy moth: efficacy of aerially-applied *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 67, n. 3, p. 351-354, 1974.

LI, H.; BOUWER, G. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 121, p. 7–13, 2014.

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

LIANG, Y.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* CryIA -endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 24719–24724, 1995.

LIGHTWOOD, D. J.; ELLAR, D. J.; JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5174-5181, 2000.

LIU, F.; XU, Z.; ZHU, Y. C.; HUANG, F.; WANG, Y.; 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 Sciences**, 66, 155– 161, 2010.

LIU, J.; YANG, A.; SHEN, X.; HUA, B.; SHI, G. Specific binding of activated Vip3Aa10 to *Helicoverpa armigera* brush border membrane vesicles results in pore formation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 92–97, 2011.

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

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

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

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

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.

MENDES, D. R. P. **Expressão dos genes vip3Aa e cry1la em *Escherichia coli* efetivos no controle de *Spodoptera frugiperda***. 2011. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2011.

MENDONÇA, A. F. Guia das principais pragas da cana-de-açúcar In MENDONÇA, A.F. (Ed.). **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceio: Insetos & Cia, 1996. p. 3-48.

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

MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba: Manole, 1986. p.297-310.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; KASTELIC, J. G.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; PARO, F. E.; SOLDORIO, I. L. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 593-598, 1995.

OKUMURA, R. S.; MARIANO, C. D.; DALLACORT, R.; ZORZENONI, T. O.; ZACCHEO, P. V. C.; OLIVEIRA, C. F. N.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; LOBATO, A. K. S. Agronomic efficiency of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize hybrids in pests control on Lucas do Rio Verde city, State of Mato Grosso, Brazil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, p. 2232-2239, 2013.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, v. 56, p. 50-54, 2014.

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

PALMA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; MAEZTU, M.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; ESCUDERO, I. R.; ESCRICHE, B.; et al. Vip3C, a Novel Class of Vegetative Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7163–7165, 2012.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, p. 3296-325, 2014.

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 Letters**, v. 37, p.3–22, 2013.

PEREZ, J. R.; VAN KHU, N.; THI VAN, T.; CASTRO, S. Enfermedades y plagas de la caña de azúcar en la Republica Socialista de Viet-nam. **Ciencias de la Agricultura**, n. 6, p. 156-158, 1980.

PERLAK, F. J.; DEATON, R. W.; ARMSTRONG, T. A.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R. Insect resistant cotton plants. **Biotechnology**, v. 8, p. 939–943, 1990.

PINTO, A. S. **Controle de pragas da cana-de-açúcar**. Sertãozinho: Biocontrol, 2006. 64p.

PINTO, A. S.; MACHADO, P. S.; OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos da cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2009. 160p.

POLANCZYK, R.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B. (Eds) **Controle Microbiano de pragas na America Latina**. 3 ed. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 2012. p. 111– 136.

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

RAJAGOPAL, R.; AGRAWAL, N.; SELVAPANDIYAN, A.; SIVAKUMAR, S.; AHMAD, S.;

BHATNAGAR, R. K. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 971–978, 2003.

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

RAZA, G.; ALI, K.; MUKHTAR, Z.; MANSOOR, S.; ARSHAD, M. The response of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) genotypes to callus induction, regeneration and different concentrations of the selective agent (geneticin -418). **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.8739-8747, 2010.

ROGOFF, M. H.; YOUSTEN, A. A. *Bacillus thuringiensis*: microbiological considerations. **Annual Review Microbiology**, v. 23, p. 357-386, 1969.

ROUSH, R. T. Two-toxins strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not Philos. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 353, p. 1777–1786, 1998.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: acentury of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 283–300, 2011.

SANCHIS V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, p. 217–231, 2011.

SAUER, H. F. G. Notas sobre *Elasmopalpus lignosellus* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), séria praga dos cereais no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 10, p. 199-206, 1939.

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

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

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

SHIMADA, N.; MIYAMOTO, K.; KANDA, K.; MURATA, H. Binding of Cry1Ab toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin to proteins of the bovine intestinal epithelial cell: An in vitro study. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v.42, n.1-2, p.45–49, 2006.

SILVA, L. M. **Caracterização molecular e atividade de isolados de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para as brocas da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) e *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae)**. 2013. 51p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

SINGSIT, C.; ADANG, M. J.; LYNCH, R. E.; ANDERSON, W. F.; WANG, A.; CARDINEAU, G.; OZIAS-AKINS, P. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer. **Transgenic Research**, v. 6, p. 169–176, 1997.

SIVASUPRAMANIAM, S.; MOAR, W. J.; RUSCHKE, L. G.; OSBORN, J. A.; JIANG, C.; SEBAUGH, J. L.; BROWN, G. R.; SHAPPLEY, Z. W.; OPPENHUIZEN, M. E.; MULLINS, J. W.; GREENPLATE, J. T. Toxicity and characterization of cotton expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Ab2 proteins for control of lepidopteran pests. **Journal of Economic Entomology**, v. 101, p. 546–554, 2008.

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

SRIKANTH, J.; SUBRAMONIAN, N.; PREMACHANDRAN, M. Advances in transgenic research for insect resistance in sugarcane. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 52–61, 2011.

STEWART, S. D.; ADAMCZYK, J. J. JR.; KNIGHTEN, K. S.; DAVIS, F. M. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) lar- vae. **Journal of Economic Entomology**, v. 94, p. 752–760, 2001.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; JAMES, W. B.; 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, p. 1031–1038, 2010.

STORER, N. P.; KUBISZAK, M. E.; KING, J. E.; THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, p. 294–300, 2012.

SYNGENTA PARTICIPATIONS AG. LONG, N.; BOTTOMS, J.; MEGHJL, M.; HART, H.; QUE, Q.; PULLIAM, D. **Corn Event MIR162**. US 8,232,456 B2, 3 dez. 2009, 31 jul. 2012.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, p. 510–521, 2013.

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

TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; de MAAGD, R. A.; DENNEHY, T. J. Cross-resistance of pink bollworm (*Pectiniphora gossypiella*) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4582–4584, 2000.

TABASHNIK, B. E.; MALVAR, T.; LIU, Y.; FINSON, N.; BORTHAKUR, D.; SHIN, B.; PARK, S. H.; MASSON, L.; DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 2839–2844, 1996.

TABASHNIK, B. E.; MOTA-SANCHEZ, D.; WHALON, M. E.; HOLLINGWORTH, R. M.; CARRIÈRE, Y. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, p. 496–507, 2014.

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

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSSENS, S.; DE BEUCKELEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGU, M. V.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, p. 33–37, 1987.

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

VAN FRANKENHUYZEN, K.; NYSTROM, C. 2002. The *Bacillus thuringiensis* toxin specificity database. <<http://www.glfrc.forestry.ca/bacillus/>>.

VAN RENSBURG, J. B. J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African journal of plant and soil Abbreviation**, v. 24, p. 147–151, 2007.

VAN RIE, J. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, p. 463–469, 2000.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HÖFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, v.186, p.239-247, 1989.

VÉLEZ, A. M.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; MOELLENBECK, D.; MEAGHER, R. L.; CHIRAKKAL, H.; SIEGFRIED, B. D. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 103, p. 700-13, 2013.

VIANA, P. A. Lagarta-elasma. In: SALVADORI, J. R.; ÁVILA, C. J.; SILVA, M. T. B. Pragas de solo no Brasil. Passo Fundo: Embrapa Trigo; Dourados: **Embrapa Agropecuária Oeste**; Cruz Alta: Fundacep Fecotrigo, p. 379-408, 2004.

VIANA, P. A.; CRUZ, I.; WAQUIL, J. M. Danos da lagarta-elasma à cultura do milho e medidas para o seu controle. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2000, 3p. (Comunicado Técnico/ Embrapa Milho e Sorgo, 1518-4269, n. 20).

VILELLA, F. M. F.; WAQUIL, J. M.; VILELA, E. F.; SIEGFRIED, B. D.; FOSTER, J. E. Selection of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) for survival on Cry 1A(b) Bt toxin. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 12-17, 2002.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, v.8, p.263-276, 2010.

WAQUIL, J. M.; VILLELA, F. M. F.; FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo, Sete Lagoas**, v. 1, n. 3, p. 1-11, 2002.

WEI, J. Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 5, p. 2760-2765, 2003.

WENG, L. W.; DENG, H.; XU, J. L.; LI, Q.; ZHANG, Y. Q.; JIANG, Z. D.; LI, Q. W.; CHEN, J. W.; ZHANG, L. H. Transgenic sugarcane plants expressing high levels of

modified *cry1Ac* provide effective control against stem borers in field trials. **Transgenic Research**, v. 20, p. 759–772, 2011.

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

WOLFERSBERGER, M. G.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, V. F.; GIORDANA, B.; HANOZETA, G. 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. 86, p. 301-308, 1987.

WOLFERSBERGER, M.G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia**, v. 46, p. 475– 477, 1990.

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

XU, Y.; YANG, Y.; WU, Y. Ligand blot analysis of Bt Cry1A toxin binding with the midgut brush border membrane vesicle receptors of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Acta Entomology**, v. 52, p. 153– 158, 2009.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. IN: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Edit.). **Entomopathogenic Bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.

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

ZHANG, H.; YIN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, Y.; WU, S.; TABASHNIK, B. E.; WU, Y. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. **PloS ONE**, v. 6, n. 8, p. 22874, 2011.

ZHANG, L.; HUANG, F.; LEONARD, R. B.; CHEN, M.; CLARK, T.; ZHU, Y. C.; WANGILA, D. S.; YANG, F.; NIU, Y. Susceptibility of Cry1Ab maize-resistant and susceptible strains of sugarcane 3 borer (Lepidoptera: Crambidae) to four individual Cry proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 112, p. 267-272, 2013.

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

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; ANTHONY SHELTON, M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1493–1497, 2003.