

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA INTERAÇÃO E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS
CRY1 E VIP3Aa DE *Bacillus thuringiensis*, Berliner EM
SPODOPTERA FRUGIPERDA (J. E. Smith) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

Claudio Damasceno Pavani

BIÓLOGO

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**EFEITOS DA INTERAÇÃO E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS
CRY1 E VIP3Aa DE *Bacillus thuringiensis*, Berliner EM
SPODOPTERA FRUGIPERDA (J. E. Smith) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE)**

Claudio Damasceno Pavani

BIÓLOGO

Orientador: Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

2013

Pavani, Claudio Damasceno
P337 e Efeitos da interação e toxicidade das proteínas Cry1 e
Vip3Aa de *Bacillus thuringiensis*, Berliner em *Spodoptera
frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) / Claudio
Damasceno Pavani. – Jaboticabal, 2013
iv, 44 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Manoel Victor Franco Lemos

Banca examinadora: Odair Aparecido Fernandes, Celso
Omoto

Bibliografia

1. *Proteína entomopatogênica*. 2. Controle biológico. 3.
Manejo de resistência. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:633.15

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CLAUDIO DAMASCENO PAVANI – nascido em Jaboticabal - SP, em 29 de setembro de 1987. Concluiu o ensino médio em 2005. Ingressou em março de 2007 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal - onde, em janeiro de 2010, recebeu o título de Biólogo. Foi bolsista de Iniciação Científica (FAPESP) durante o ano de 2007. Em agosto de 2011 ingressou no curso de mestrado em Microbiologia Agropecuária na mesma instituição.

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, Luis e Maria
do Carmo por terem acreditado e
fornecido condições para que eu
concluísse mais uma etapa desta vida.**

**Aos meus irmãos, Ismael, Luciana e
Victor, pelo apoio e carinho oferecidos
em todo momento de minha vida e principalmente neste.**

**A todos os meus amigos,
Pelo apoio e amizade durante todo o
mestrado.**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos meu orientador, pelo apoio, paciência, ensinamentos, credibilidade e compreensão que me proporcionou;

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pelo apoio e auxílios prestados;

Aos membros da banca, Prof. Dr. Celso Omoto e Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes pelas contribuições valiosas deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) pelo convívio agradável, e ajuda durante os experimentos;

À Eliane Cristina da Cunha Alves pela amizade, pronto atendimento, atenção e disposição;

Aos professores do curso de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, pela colaboração, incentivo e ensinamentos;

À empresa SGS Gravena, de Jaboticabal - SP por ceder os insetos utilizados neste trabalho;

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa pelo auxílio nas análises estatísticas;

Aos membros da banca de avaliação da qualificação: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza e Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério pelas sugestões, que contribuíram para o aperfeiçoamento deste estudo;

À Profa. Dra. Eliana G. M. Lemos e Dr. João Carlos Campanharo, pelo uso do laboratório;

Aos funcionários do Departamento de Biologia Aplicada à agropecuária, pela assistência e disposição;

Aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação do Câmpus, pelas orientações e paciência;

À CNPq pela concessão da bolsa de estudo;

À todos da Bio07 pela união e amizade;

Enfim, a todos os amigos da Universidade e da Cidade de Jaboticabal que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação científica e pessoal, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
1. Introdução	1
2. Objetivos	4
3. Revisão de literatura	5
3.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> : Características gerais e controle.....	5
3.2 <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
3.3 Proteínas Cry1	9
Figura 1: Etapas envolvidas nos mecanismos de ação de <i>B. thuringiensis</i>	10
3.4 Proteínas Vip3Aa	12
4. Materiais e métodos	15
4.1 Recebimento e estoque das proteínas Cry1 e Vip3Aa	15
4.2 Expressão das proteínas Cry1	15
4.3 Expressão da proteína Vip3Aa	17
4.4 Ativação das proteínas Cry1 e Vip3Aa	17
4.5 Eletroforese SDS-PAGE e quantificação das proteínas	18
4.6 Obtenção da população de <i>Spodoptera frugiperda</i>	19
Figura 2: Bandeja de poliestireno utilizadas nos bioensaios.	20
4.7 Bioensaios com as toxinas ativadas contra larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	20
4.8 Estimativa da CL ₅₀ e CL ₉₀	21
4.9 Análise dos Dados	21
5. Resultados e discussões	23
5.1 Expressão das proteínas Cry1 e Vip3Aa.....	23
Figura 3: Eletroforograma evidenciando a expressão das proteínas Cry e Vip de gel SDS-PAGE 12%.	23
5.2 Ativação das proteínas Cry1 e Vip3Aa	24
Figura 4: Eletroforograma para detecção das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa ativadas utilizando tripsina comercial em gel SDS-PAGE 12%.	25
5.3 Quantificação das proteínas Cry1 e Vip3Aa	25

Figura 6: Eletroforograma para detecção e quantificação das proteínas ativadas Cry1 em gel SDS-PAGE 12%.....	27
5.4 Bioensaios com <i>S. frugiperda</i>	27
Tabela 3. Atividade biológica das toxinas ativadas Vip3Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea contra larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	29
Tabela 4: Mortalidades das lagartas de primeiro ínstar de <i>S. frugiperda</i> com as toxinas Vip3Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea aplicadas separadamente para os ensaios de interação.	30
Tabela 5: Interação da toxina Vip3Aa com as Cry1Ab e Cry1Ca de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra o primeiro ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i>	31
Tabela 6: Interação da toxina Vip3Aa com a Cry1Ea de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra o primeiro ínstar de <i>Spodoptera frugiperda</i>	31
6. Conclusões	35
7. Referências	36

EFEITOS DA INTERAÇÃO E TOXICIDADE DAS PROTEÍNAS CRY1 E VIP3Aa DE *Bacillus thuringiensis*, Berliner EM *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J. E. Smith) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO – A bactéria *Bacillus thuringiensis* é conhecida como uma das melhores opções no controle biológico de pragas devido à ação entomopatogênica e especificidade de suas proteínas. As proteínas Vip3, que são secretadas durante o crescimento vegetativo de *B. thuringiensis* e Cry1, que são produzidas durante a fase de esporulação, atuam no controle de importantes pragas de lepidópteros. Um dos principais riscos ambientais associados à utilização de inseticidas é o potencial para o desenvolvimento de graus crescentes de resistência pelas pragas alvo. O uso de diferentes proteínas entomopatogênicas produzidos por *B. thuringiensis*, bem como os estudos que envolvem suas interações podem ajudar a superar o desenvolvimento de pragas resistentes. As proteínas utilizadas neste estudo foram preparadas a partir de estirpes recombinantes de *Escherichia coli* que expressam uma única toxina. Para a expressão das proteínas Cry1 células recombinantes foram inoculadas em meio TB com ampicilina e incubadas por 60 h a 28 °C. Enquanto que para a expressão de Vip3Aa o inóculo foi feito em meio LB (2x) e ampicilina, e induzidas com IPTG durante a incubação por 12 h sob agitação de 190 rpm, mantidas a 37 °C. As proteínas foram ativadas utilizando 10% de tripsina comercial, e visualizadas em gel SDS-PAGE 12%. Os bioensaios foram realizados com dieta artificial semissólida artificial adicionadas em bandejas de poliestireno de 128 poços de 1 cm de diâmetro. Cinquenta microlitros das toxinas ativadas foram espalhados sobre a superfície da dieta artificial e para cada concentração de proteína foram reproduzidos 4 repetições. Dezesesseis lagartas no primeiro instar de *Spodoptera frugiperda* foram utilizadas para a adição de um total de 64 larvas para cada concentração de proteína. Os bioensaios de interação de proteína revelou que a única combinação entre as proteínas Cry1 e Vip3Aa que apresentou interação sinérgica foi a que envolve Vip3Aa + Cry1Ab para larvas de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Proteína entomopatogênica, controle biológico, manejo de resistência.

ABSTRACT – *Bacillus thuringiensis* is known as one of the best options for biological control of pests due to the entomopathogenic and specific action of some of its proteins. The Vip3 proteins, that are secreted during the vegetative growth of *B. thuringiensis* and Cry1, which are produced during the sporulation phase, act controlling important lepidopteran pests. One of the most important environmental risks associated to the use of insecticides is the potential for the development of increasing degrees of resistance by the target pests. The use of different entomopathogenic proteins produced by *B. thuringiensis*, as well as the studies involving their interactions might help overcoming the development of resistant pests. The proteins used in this study were prepared from recombinant *Escherichia coli* strains expressing a sole toxin. For the expression of the Cry1 proteins, the recombinant cells were inoculated in TB broth containing ampicillin and incubated at 28°C during 60 h. While for the expression of the Vip3Aa protein the culture was made using LB 2X broth also containing ampicillin and induced with IPTG during incubation for 12 h at 190 rpm kept at 37°C. The proteins were activated using 10% commercial trypsin, and observed on 12% SDS-PAGE gels. The bioassays were carried out using artificial semi-solid diet added to polystyrene trays with 128 wells measuring 1 cm of diameter. Fifty microliters of activated toxins were spread over the surface of the artificial diet contained wells and for each protein concentration, four repetitions were reproduced. Sixteen *Spodoptera frugiperda* first instar larvae were used adding to a total of 64 larvae for each protein concentration. The protein interaction bioassays revealed that the Cry1 and Vip3Aa only combination that presented synergistic interaction was that involving Vip3Aa and Cry1Ab towards *S. frugiperda* larvae.

Keywords: proteins entomopathogenic, biological control, resistance management

1. Introdução

O complexo de espécies do gênero *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta alto potencial de dano em várias plantas cultivadas. Esses insetos atacam as culturas de milho, algodão e soja e têm aparecido com frequência em mamona, sorgo, tomate e em culturas frutíferas, causando prejuízos significativos para a alimentação diferentes órgãos das plantas (NORA et al., 1989. BAVARESCO et al., 2003;. SANTOS, 2007). No Brasil, *Spodoptera frugiperda* (Smith) é considerada uma praga primária em milho e algodão (Santos, 1997, 2007; Silvie et al., 2001.) Entre as alternativas de controle disponíveis para diminuir problemas de impacto ambiental está o controle biológico de pragas, usando bactérias, fungos, vírus e outros organismos com tais habilidades.

Produtos à base de *Bacillus thuringiensis* têm sido utilizados há mais de 60 anos e proporcionam inúmeras vantagens, tais como especificidade ao inseto-alvo, efeito não poluente ao ambiente e inocuidade a mamíferos e vertebrados (MONNERAT & BRAVO, 2000; CÁRDENAS et al., 2001). As células de *B. thuringiensis* (Bt) produzem proteínas entomopatogênicas durante a fase vegetativa de crescimento (proteínas inseticidas vegetativas - Vip) e na fase de esporulação (proteínas cristal - Cry). Ambas as categorias de proteínas são classificadas e denominadas de acordo com sua semelhança ao nível de sequências de aminoácidos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

A atividade tóxica das proteínas Cry da bactéria *B. thuringiensis* está ligada a três domínios conservados (WU et al., 2007). De acordo com o novo modelo de ação das proteínas Cry, tanto a região do domínio II como a do domínio III estão envolvidas no processo de reconhecimento e ligação das proteínas aos receptores de membrana, existentes nas microvilosidades do intestino das larvas dos insetos, e são responsáveis pela especificidade (BRAVO et al., 2007).

A toxicidade das proteínas Cry estava associada ao componente N-terminal, enquanto que o componente C-terminal determinava a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991).

Genes *cry1* codificam proteínas de aproximadamente 130 kDa que são agrupadas durante a esporulação. Estas proteínas são sintetizadas como protoxinas que são dissolvidas em meio alcalino no intestino do inseto e são ativadas por proteólise de toxinas, a proteína quando ativada perde metade do seu tamanho normal, neste caso cerca de 65 kDa. Essa ativação proteolítica pode ser realizada in vitro, utilizando uma variedade de proteases.

A grande maioria dos genes *cry* conhecidos pertence ao grupo *cry1*, e estes são certamente os mais estudados. Têm sido relatados, até agora, 730 genes *cry* diferentes, dos quais, 254 são de genes *cry1* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Estes genes foram os primeiros a serem caracterizados, bem como inseridos em plantas geneticamente modificadas (SAUKA & BENINTENDE, 2008).

Outra vantagem proporcionada por essa bactéria é o desenvolvimento de plantas transgênicas expressando genes codificadores de proteínas Cry e mais recentemente proteínas Vip. As toxinas produzidas por Bt são efetivas contra algumas das principais pragas de insetos, e não causa danos às pessoas e outros organismos.

Desse modo, as plantas transgênicas constituem-se em mais uma alternativa com grande potencial de proteção contra os ataques de insetos-praga. A primeira geração de plantas Bt comercializadas foram as que produziam uma única toxina, pertencente à família Cry1A para controlar larvas das principais pragas de lepidópteros (PERLAK et al., 2001). Uma das desvantagens da utilização de genes da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* em plantas é o aparecimento de insetos pragas resistentes às toxinas. Muitos insetos foram selecionados para resistência à toxina Bt no laboratório e, algumas populações, a toxinas Bt em campo (TABASHNIK et al., 2011).

Tabashnik et al. (2008) relataram um caso de resistência em campos de uma população de *Helicoverpa zea* a toxina Cry1Ac produzida por um algodão transgênico nos EUA. Store et al. (2010) relataram uma população de *S. frugiperda* resistente à proteína Cry1F expressa em milho transgênico em Porto Rico, e *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte à proteína Cry1Bb1 expressa em milho nos EUA (GASSMANN et al., 2011).

Duas etapas no modo de ação das proteínas Cry são consideradas importantes na toxicidade contra larvas suscetíveis: a alteração da ativação proteolítica da protoxina, e a perda da ligação dessa proteína a receptores localizados na membrana do intestino médio das larvas de insetos (FERRÉ et al., 2008).

A expressão simultânea de toxinas Bt com múltiplos modos de ação alternativos tem sido proposta como a melhor estratégia para retardar a evolução da resistência a plantas Bt (ZHAO et al., 2003).

2. Objetivos

Analisar a toxicidade das proteínas ativadas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa de *B. thuringiensis*, frente às populações de *Spodoptera frugiperda* por meio de bioensaios;

Determinar a CL₅₀ e CL₉₀ das proteínas mais eficientes no controle de lagartas de *S. frugiperda*;

Analisar o efeito da interação entre as proteínas Cry1 mais eficientes contra *S. frugiperda* com a proteína Vip3Aa.

3. Revisão de literatura

3.1 *Spodoptera frugiperda*: Características gerais e controle.

A lagarta-do-cartucho, lagarta-dos-milharais ou lagarta militar (*Spodoptera frugiperda*), é uma praga amplamente distribuída nas Américas. No Brasil, em todas as regiões do território nacional pode-se encontrar este inseto (MIRANDA & SUASSUNA, 2004). Além disso, adapta-se facilmente a diferentes latitudes e longitudes e possui excelente fecundidade (LABRADOR, 1967). *S. frugiperda* possui metamorfose completa; seu ovo é de coloração verde-clara logo após a oviposição, passando a alaranjada após 12 ou 15 horas de desenvolvimento. Próximos à eclosão, os ovos tornam-se escuros, devendo-se isso à cabeça negra da larva (CRUZ, 1995). A oviposição pelo inseto adulto (mariposa) é feita geralmente em massas de ovos (posturas), com média entre 100 a 250 ovos, os quais são sobrepostos (CRUZ, 1995). Cada fêmea pode depositar no máximo treze posturas, sendo que, em um dia, um indivíduo pode depositar oito posturas; a duração dessa fase é de três dias à temperatura de 25 °C (CRUZ, 1995). As larvas inicialmente são esbranquiçadas, passando por colorações escuras até quase negras (LUGINBILL, 1928). Alimentam-se, inicialmente, do cório do ovo e, ao encontrarem alimento, raspam os tecidos das folhas mais jovens (LEIDERMAN & SAUER, 1953). As larvas tecem fios de seda usados como meio de dispersão e/ou escape de inimigos naturais. Essa habilidade é perdida após o primeiro ínstar larval, aproximadamente dois dias após a eclosão (CRUZ, 1995).

Na fase larval ocorrem seis ínstaes e a duração de cada ínstar depende da temperatura; quanto maior a temperatura, menor o ciclo larval (CRUZ, 1995). Na planta de milho, a fase larval varia de 12 a 30 dias e ocorre dentro do cartucho da planta, local onde é encontrada somente uma lagarta desenvolvida devido ao hábito canibal (LUGINBILL, 1928). Ao completar seu desenvolvimento, a lagarta deixa a planta, dirigindo-se para o solo, onde se transforma em pupa. Esta possui cerca de 15 mm de comprimento e coloração avermelhada até quase preta, tendo esta fase de 10 a 12 dias de duração. O adulto mede cerca de 35 mm de envergadura e 15 mm de comprimento, com coloração cinza. Ocorre dimorfismo sexual nesta espécie,

sendo que o macho possui manchas mais claras nas asas anteriores. Machos e fêmeas possuem as asas posteriores de coloração clara, circundadas por linhas marrons. A longevidade do adulto é cerca de 12 dias e é a partir do terceiro ou quarto dia, após a emergência da fêmea, que se dá a oviposição. O ciclo completo de desenvolvimento do inseto, desde ovo até adulto, dura aproximadamente 30 dias (CRUZ, 1995).

S. frugiperda é uma praga que se alimenta de um grande número de hospedeiros (LUGINBILL, 1928). Ainda que apresente preferência alimentar por plantas da família Poaceae como milho, milheto, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar, também ataca plantas de outras famílias botânicas como alfafa, feijão, amendoim, batata, batata doce, repolho, espinafre, tomate, couve, abóbora, soja e algodoeiro (SILVA et al., 1968; ALI et al., 1989; CRUZ, 1995; BARLOW & KUHAR, 2005) acelga, alcachofra, alface, almeirão, berinjela, cebola, chicória, maracujazeiro, meloeiro, pessegueiro, pimentão e quiabo (SILVA et al., 1968).

Este inseto é de difícil controle devido à sua ampla gama de hospedeiros e sua grande capacidade de dispersão durante o período de cultivo (KNIPLING, 1980). A lagarta-do-cartucho é controlada basicamente com inseticidas químicos. A utilização abusiva destes produtos tem trazido vários problemas. Estes decorrem da falta de especificidade destes produtos, que leva à eliminação de muitos insetos não alvos, da sua toxicidade para a espécie humana e animais domésticos, do rápido aparecimento de resistência dos insetos e do seu acúmulo no meio ambiente, ocasionando sérios problemas de poluição (PFEIFER & GRIGEIATTI, 1996). O uso mais comum é dos inseticidas pertencentes ao grupo dos reguladores de crescimento (GRÜTZMACHER et al., 2000), que atua na síntese de quitina, alterando o processo de ecdise (GALLO et al., 2002). Esses inseticidas possuem alta especificidade, além de apresentarem baixa toxicidade para mamíferos (SCHROEDER & SUTTON, 1978). Atuam também sobre os adultos, que se contaminam ao se alimentarem provocando sua esterilidade, e reduzindo sua fecundidade e afetando a viabilidade dos ovos (ÁVILA & NAKAMO, 1999).

Dentre as dificuldades de controle deste inseto, destacam-se a localização da lagarta dentro do cartucho e a decisão do método de controle baseado nos sintomas externos das folhas perfuradas, os quais não comprovam a presença do inseto no

interior do cartucho (GALLO et al., 2002). Além disso, existem casos de relatos de evolução da resistência desta praga aos inseticidas químicos, (DIEZ-RODRIGUES & OMOTO, 2001), mostrando que este tipo de controle apresenta também sérias limitações práticas.

Segundo Cruz & Bianco (2001), o controle com inseticidas via pulverização torna-se pouco efetivo em plântulas devido à reduzida área foliar, dificultando a retenção do produto nas folhas e diminuindo o seu poder de ação residual. A utilização de produtos sistêmicos via tratamento de sementes, nesse caso, tem-se constituído em alternativa viável.

Buscando um controle mais eficiente, não poluente e específico à *S. frugiperda*, iniciou-se estudos utilizando *B. thuringiensis*. Embora estudos iniciais fossem considerados pouco eficientes no controle desta praga, atualmente, no Brasil e em outros países, muitas pesquisas têm demonstrado o potencial do controle biológico por meio de *B. thuringiensis* (VALICENTE et al., 1995; SILVA-WERNECK et al., 2000).

3.2 *Bacillus thuringiensis*

A história dessa bactéria possui mais de um século (BERLINER, 1915) e foi descrita pela primeira vez por Berliner (1911) quando este pesquisador isolou o bacilo da lagarta *Anagasta kuehniella*, uma mariposa que se desenvolve na farinha de trigo. Após essa descoberta, Berliner nomeou-o de *Bacillus thuringensis* em homenagem a província alemã de Thuringia. Embora esta tenha sido a primeira descrição, não foi o primeiro isolamento. Em 1901, um biólogo japonês, S. Ishiwata isolou a bactéria como o agente causal da doença do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, quando a mesma já estava morta e foi denominada como “sotto-disease” (ISHAWATA, 1901). Em 1908 Iwabuchi denominou esta bactéria de *Bacillus sotto ishiwata*, que mais tarde, foi determinado como nome inválido, e o nome mais recente, *Bacillus thuringensis*, foi mantido, (GLARE & O’CALLAGHAM, 2000). A partir desta descoberta, o bacilo foi isolado por outros pesquisadores

(MATTES,1927; OHBA,1984). Após aquele evento, a primeira tentativa de teste de campo envolvendo a bactéria *B. thuringiensis* foi conduzida por Husz (1929), através de um programa internacional de controle da lagarta européia do milho, *Ostrinia nubilalis*, em que se obtiveram resultados promissores. A partir daí, a bactéria *B. thuringiensis* foi considerada, pela indústria, como o primeiro entomopatógeno a ser amplamente explorado como agente de controle biológico (HALL,1967). A produção comercial da bactéria *B. thuringiensis* teve início na França, quando foi lançada no mercado, em 1938, com um produto denominado Sporeine (LAMBERT & PEFEROEN, 1992). No início de 1950, o interesse pela utilização deste patógeno aumentou nos Estados Unidos, principalmente para o controle de lepidópteros (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992). No início da década de 1970, já haviam vários produtos para o controle de Lepidoptera, e a descoberta da variedade israelensis, ativa sobre larvas de dípteros, revolucionou o controle de insetos vetores de doenças, particularmente dos gêneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* e *Simulium*. Em 1983, outra variedade letal para larvas de Coleoptera, chamado de *B. thuringiensis* variedade *tenebrionis*, foi descoberto. Posteriormente, variedades tóxicas a nematóides e ácaros foram encontradas, embora não sejam ainda utilizadas comercialmente (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Devido a esta característica de especificidade ao inseto-praga, não tendo efeito sobre muitos dos inimigos naturais, é muito estudada como agente de controle biológico (HALL, 1967).

O desenvolvimento da bactéria *B. thuringiensis*, faz-se em meios artificiais simples na presença de oxigênio, e em ambiente com certas restrições, como ausência de nutrientes, e esse bacilo entra em processo de esporulação, produzindo uma grande quantidade de proteína com atividade inseticida. Essas proteínas acumulam-se formando um corpo de inclusão protéica, fato este que as denominou de proteína Cristal (Cry), também chamada de δ -endotoxina (YAMAMOTO & DEAN, 2000; BRAVO et al., 2005). Algumas linhagens de *B. thuringiensis* produzem proteínas inseticidas no estágio vegetativo de crescimento (proteínas Vip), diferente das proteínas Cry, cuja expressão é restrita ao processo de esporulação. Essas proteínas são secretadas pelas células e não formam inclusões cristalinas; além disso não têm similaridade na sequência de aminoácidos (CRICKMORE et al., 2013).

3.3 Proteínas Cry1

As proteínas Cry são codificadas pelos genes *cry*, que se encontram preferencialmente localizados nos plasmídeos, geralmente conjugativos, e juntamente com uma frequente associação a elementos genéticos móveis determinam a grande diversidade desses genes e a consequente ocorrência de linhagens contendo diferentes combinações, portanto, com perfis de toxicidade distintos (LERECLUS et al., 1993). A expressão dos genes *cry* é regulada por dois mecanismos: um deles dependente dos fatores sigma específicos da fase de esporulação, no qual estão classificados a maioria dos genes *cry*, e o outro, independente do processo de esporulação, como os genes *vip*, cujos fatores são típicos da fase de crescimento vegetativo (VALADARES-INGLIS et al., 1998).

As protoxinas produzidas assumem formas morfológicas distintas evidenciadas através do estudo morfológico realizado por microscopia eletrônica, apresentando cristais bipiramidais, cuboidais, piramidais e esféricos, esses diferentes formatos de cristais encontrados, pode fornecer indicações sobre a atividade tóxica e, conseqüentemente, a ligação dessa toxicidade aos diferentes tipos de genes codificadores de proteína cristal, efetivos contra vários insetos das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (DE MAAGD et al., 2003). Essas diferenças estruturais e tóxicas também são reveladas pelos alinhamentos, mostrando regiões comuns entre genes *cry*, denominadas regiões conservadas, e regiões onde se apresentam diferenças na seqüência de nucleotídeos, resultando em diferentes proteínas Cry, ativas contra várias espécies de ordens distintas (SCHNEPF et al., 1998).

A patogenicidade e a especificidade de uma linhagem são determinadas pelos tipos de genes *cry* funcionais presentes. Estes genes codificam as proteínas Cry, que são sintetizadas na forma de protoxinas. 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).

O modo de ação das proteínas Cry foi determinado principalmente, em lagartas de lepidópteros (KNOWLES & DOW, 1993). Essas proteínas, quando ingeridas pelos insetos, são solubilizadas em condições específicas de pH, atuam no

sistema digestivo dos insetos e as protoxinas são convertidas em δ -endotoxinas. As toxinas hidrolisadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos nas células colunares do intestino médio, formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana, interferindo no gradiente iônico e no balanço osmótico da membrana apical. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio. O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que, pouco tempo após a infecção, para de se alimentar (HÖFTE & WHITELEY, 1989; COPPING & MENN, 2000; BRAVO et al., 2005), conforme se pode verificar na. Figura 1.

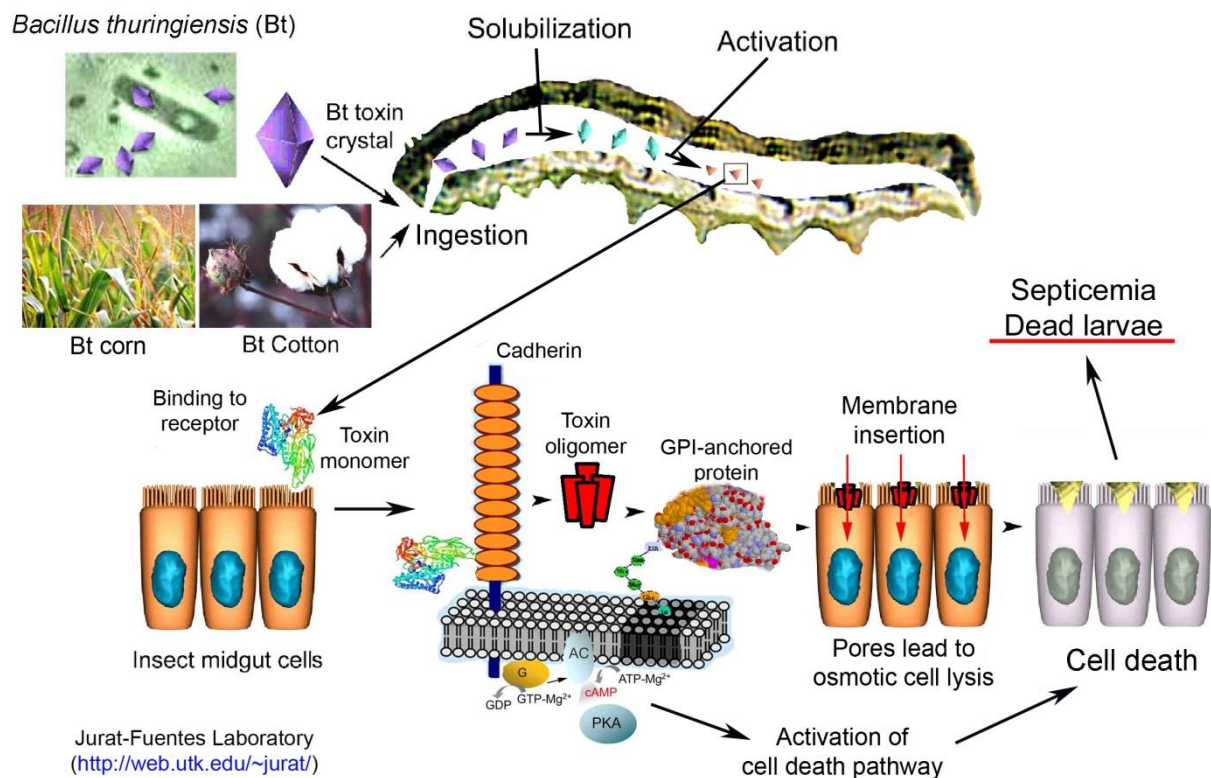


Figura 1: Etapas envolvidas nos mecanismos de ação de *B. thuringiensis*. Disponível em: <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>.

Segundo Parker & Fiel (2005), as proteínas Cry, também chamadas de toxinas Cry, produzidas pela bactéria *B. thuringiensis* e secretadas como uma proteína solúvel em água, pertencem a uma classe de toxina conhecida como toxina formadora de poros (PFT). Sendo compostas por três domínios com funções

distintas. As toxinas Cry, embora apresentem similaridade estrutural, demonstram diferenças consideráveis na sequência de aminoácidos e nas atividades tóxicas contra diferentes organismos, fato que auxilia esclarecer diferenças na especificidade inseticida.

O domínio I foi descrito pela primeira vez em Cry3Aa por Li et al. (1991) e, pelas propriedades deste domínio, sugere ser o domínio formador de poro da toxina Cry, ou seja, responsável pela inserção da toxina na membrana. Para isto, uma maior mudança conformacional é necessária a fim de transformar o domínio I e capacitar sua estrutura para inserção interna na membrana do hospedeiro (PIGOTT & ELLAR, 2007). O domínio II apresenta maiores variações na sua estrutura com diferenças consideráveis no tamanho, conformação e sequência dos “loops”. Acredita-se que o domínio II possa ter uma importância determinante na especificidade da toxina, sendo responsável pela ligação toxina-membrana (LI et al., 1991; PIGOTT & ELLAR, 2007). O domínio III apresenta menos variações estruturais do que o domínio II, e a diferença essencial encontra-se no tamanho, na orientação e sequências dos “loops” (BOONSERM et al., 2005), tendo a função de catalisar a ligação da toxina ao receptor (PIRES et al., 2004). De acordo com o modelo de ação das proteínas Cry, tanto a região do domínio II como a do domínio III estão envolvidos no processo de reconhecimento e ligação das proteínas aos receptores de membrana, existentes nas microvilosidades do intestino das larvas dos insetos, e são responsáveis pela especificidade (BRAVO et al., 2007).

Estudos detalhados da atividade das δ -endotoxinas demonstram existir duas etapas na ligação da toxina ao receptor, envolvendo processos reversíveis e irreversíveis. No primeiro caso, mesmo havendo afinidade dos receptores de membrana no intestino dos insetos com as proteínas Cry, algumas toxinas podem ligar-se aos receptores, sem que essa ligação seja suficiente para causar a morte das larvas de inseto. Isso se deve ao fato de essas toxinas apresentarem especificidade reduzida, resultando em uma ligação pouco estável e reversível com o receptor, ou seja, a toxina reconhece o receptor, mas não se liga irreversivelmente a ele, não se projetando para dentro da membrana. No segundo caso envolve uma ligação forte da toxina ao receptor e a inserção da toxina na membrana, com consequente desenvolvimento da doença no inseto (ARONSO & SHAY, 2001). Em

uma primeira abordagem de sistematização da classificação deste tipo de genes, Höfte & Whiteley. (1989) classificaram-nos de acordo com a sequência de aminoácidos de seus produtos e a especificidade de ação das toxinas. Como consequência do avanço da compreensão de seus mecanismos de ação, através de ferramentas da biologia molecular, novos genes *cry* foram sequenciados e catalogados, originando diversas exceções dentro desta classificação inicial. Por esta razão, Crickmore et al. (1998) propuseram uma nova maneira de classificar tais genes, baseada somente na sequência de aminoácidos codificada por eles, não levando em consideração o perfil de toxicidade.

Até o momento, a coleção de toxinas Cry possui aproximadamente 720 genes *cry* sequenciados e classificados em 51 classes com diferentes subdivisões, dependendo do grau de similaridade de seus aminoácidos (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

As proteínas Cry1 têm sido muito estudadas para o controle de lepidópteros acarretando uma série de evidências a respeito do funcionamento das proteínas Cry quando estas são ingeridas por insetos susceptíveis. (BRAVO et al., 2007).

As proteínas Cry1 de *B. thuringiensis* apresentam tamanho de 130 -140 kDa que exibem toxicidades específicas a numerosos insetos lepidópteros (ADANG. 1991, HÖFTE & WHITELEY., 1989). Várias proteínas Cry1, incluindo Cry1Bb, Cry1Ca, e Cry1Fa, são tóxicas para importantes pragas agrícolas que pertencem ao gênero *Spodoptera* (BAI et al., 1993, YAMAMOTO & POWELL. 1993).

3.4 Proteínas Vip3Aa

Ao contrário das proteínas Cry, as quais se unem em cristais insolúveis dentro da célula mãe, Vip é secretada como proteína solúvel por algumas linhagens de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de crescimento, limitando sua aplicação no campo (ARORA et al., 2003). Atualmente, existem mais de 60 sequências de genes Vip descritas as quais estão classificadas em quatro diferentes famílias: Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 .

A toxina binária Vip1(100 kDa) e Vip2 (52 kDa) tem ação conjunta mas com funções individuais. Apresentam atividade inseticida a larvas de insetos de algumas

espécies da ordem Coleoptera e de algumas ninfas de espécies da ordem Hemiptera (SAMPURNA & MAITI, 2011). O peptídeo Vip1 possui funções relacionadas à translocação e ligação a receptores no inseto e Vip2 possui função enzimática. A ligação da toxina binária a um receptor de 50 kDa na microvilosidade da membrana do intestino médio de afídeos do algodão (*Aphis gossypii*) foi comprovada por ensaios de união por meio de ligante “blotting” (SAMPURNA & MAITI, 2011).

Existem 70 genes *vip3* sequenciados divididos em três classes (*vip3A*, *vip3B* e *vip3C*) e onze subclasses: *vip3Aa* à *vip3Ai*, *vip3Ba* à *vip3Bb* e *vip3Ca* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/vip.html). A sequência de aminoácidos destas toxinas não compartilha homologia com quaisquer outras δ -endotoxinas conhecidas e tem demonstrado um amplo espectro inseticida (DOSS et al., 2002; MESRATI; TOUNSI; JAOUA, 2005). O gene *vip3A* codifica uma proteína de 88,5 kDa que é secretada no sobrenadante de culturas de *B. thuringiensis* (ESTRUCH et al., 1996).

Altos níveis de expressão em combinação com alta estabilidade das proteínas Vip favorecem a produção em larga escala nos sobrenadantes de culturas esporulantes. O gene *vip3Aa* codifica uma proteína com 791 aminoácidos e massa molecular de 88,5 kDa. Vip3Aa possui atividade inseticida contra um grande número de insetos-pragas de importância agrônômica da ordem Lepidoptera. (ESTRUCH et al., 1996).

O modo de ação das proteínas Vip3A vem sendo estudado e mostra ter atuação no epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry. Porém, devido à sua forma solúvel, essas proteínas se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível, resultando em degeneração da camada epitelial (YU et al., 1997).

A proteína Vip3A ativada se liga a receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das lagartas de insetos susceptíveis (BRAVO et al., 2005). A união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade das proteínas Vip, o que incentivou vários grupos de pesquisa a se dedicarem à compreensão desses processos (MONNERAT & BRAVO, 2000). A

inserção da toxina promove a formação de poros na região apical das microvilosidades.

As proteínas Vip representam uma das maiores descobertas de toxinas com capacidade inseticida, sendo extremamente relevante a ausência de similaridade nas sequências de aminoácidos destas proteínas com a sequência de aminoácidos das proteínas Cry, em termos de manejo e evolução de resistência (FANG et al., 2007).

4. Materiais e métodos

4.1 Recebimento e estoque das proteínas Cry1 e Vip3Aa

As proteínas estudadas neste trabalho foram preparadas a partir de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* expressando uma única toxina. Células de *E. coli* XL-1 Blue foram transformadas com os vetores de expressão contendo os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ca*, *cry1Ea* e clone da proteína Vip3Aa foi obtido com a transformação de *E. coli* WK6 contendo, na porção N terminal, uma sequência de 6 histidinas(6 x His), inseridos no vetor de expressão. Esses clones foram cedidos pelo Dr. Juan Manzanero Ferré, da Universidade de Valência, Câmpus de Burjassot, Espanha.

Clones de *E. coli* foram cultivados em placa de Petri, contendo meio LB (2x)sólido (2g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl, qsp 100 mL pH 7,2) com ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubadas a 37°C por 12 h, para verificação da pureza da cultura. Em seguida, uma colônia isolada foi transferida para 3 mL de meio de cultura LB contendo ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cultivadas a 37°C por 12 h sob agitação horizontal a 200 rpm. Um volume de 500 μL da cultura foi adicionado a 500 μL de glicerol 100% e estocado em freezer a -80°C (solução estoque).

4.2 Expressão das proteínas Cry1

Para a expressão das proteínas Cry1, os clones com seus respectivos genes foram descongelados em gelo picado e 12 μL foram inoculados em meio TB sólido (12g de triptona, 24g de extrato de levedura, 2,31g de KH_2PO_4 , 12,54 g de K_2HPO_4 , 4 mL de glicerol, q.s.p 1000 mL), glicose 2% (v/v) + ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubados por 24 h a 37°C . Após esse período uma colônia foi inoculada em um erlenmeyer de 250 mL, com pré inóculo contendo 20 mL de meio TB líquido, glicose 2% (v/v) e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), e incubados durante 12h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de crescimento das células, 2,5 mL do pré inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 1L contendo 250 mL de meio TB líquido +

ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e foram incubados por 60 h a 28°C sob agitação de 200 rpm.

As células cultivadas foram coletadas por centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) por 8 min a $5.930 \times g$. Os péletes obtidos foram pesados e mantidos por 30 min em freezer a -20°C . Para o início da lise celular foram adicionados 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5 mM de EDTA e 100 mM de NaCl) por grama de pélete e submetidos a vigorosa agitação em vórtex. Em seguida foram adicionados 800 μg de lisozima por grama de precipitado e incubados por 20 min a 25°C . Após, foram adicionados 4 mg de desoxicolato de sódio por grama de precipitado e incubados a 37°C por 10 min. Posteriormente foram adicionados 200 μL de DNase 1 (1 mg mL^{-1}) e incubados por 30 min a 37°C a 200 rpm. Em seguida, os péletes foram submetidos à sonicação para o rompimento dos corpos de inclusão. Em seguida, foram centrifugados a $39.200 \times g$ por 10 min a 4°C (Beckman®, Maryland, Estados Unidos).

Após esse período os péletes passaram por um tratamento de lavagem, no qual foram adicionados 20 mL de tampão de lavagem (20mM Tris/HCl pH 7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X 100) para cada 10 gramas de precipitado, misturado por agitação em vórtex e centrifugados durante 10 min a $39.200 \times g$ a 4°C , sendo esse passo repetido duas vezes. Após esse processo, uma solução de 20 mL de tampão PBS (salina tamponada com fosfato – 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (m/v) NaCl) foi utilizado como passo final nessa etapa de lavagem, seguido por agitação vigorosa em vórtex e centrifugados durante 10 min $39.200 \times g$ a 4°C . Esse processo foi repetido duas vezes.

Para a solubilização das proteínas Cry1 nos precipitados foram adicionados 10 mL de tampão de solubilização (50 mM NaHCO_3 , pH 10,0 contendo 10 mM NaCl + 10 mM de DTT) para cada 5 g de pélete e incubado por 2 h a 37°C a 200 rpm. Em seguida, realizou-se a centrifugação por 15 min a $39.200 \times g$ a 4°C . O sobrenadante contendo a protoxina solubilizada foi transferido para um novo tubo tipo 'Corning' (New York, USA) e estocados em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.3 Expressão da proteína Vip3Aa

A proteína Vip3Aa, foi cultivada em meio de cultura LB (2X) (2g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl, qsp100 mL pH 7,2) sólido, acrescido de ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), por 12 h a 37°C . Uma colônia isolada foi transferida para o pré inóculo contendo 20 mL de meio LB (2X) líquido e ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubados por 6 h a 37°C sob agitação a 250 rpm, até a densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm (DO_{600}) atingir 1,2.

Em seguida uma alíquota deste pré inóculo foi transferida para 200 mL de meio LB (2x) líquido com ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em um erlenmeyer de capacidade de 1 L, até que a DO_{600} atingisse 0,025. Em seguida incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm até a DO_{600} atingir 0,6. A expressão do gene foi induzida pela adição de IPTG, à concentração final de 1 mM, e mantidas por 12 h sob agitação a 190 rpm.

As células foram sedimentadas por centrifugação a $17.400 \times g$ por 30 min, e a lise realizada em tampão fosfato (20 mM + 5 mM NaCl pH 7,4), após a adição do tampão fosfato, foram adicionados 300 μL de lisozima ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), 100 μL de DNase 1 (1 mg mL^{-1}), 10 μL de PMSF (0,1M) e incubados por 30 min à 37°C com agitação de 50 rpm. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à sonicação por 3 vezes de 60 s, com 15 s de pausa. Após a sonicação o material foi centrifugado a $17.400 \times g$ por 30 min e a 4°C .

4.4 Ativação das proteínas Cry1 e Vip3Aa

Para a ativação das protoxinas Cry1 e Vip3Aa, realizou-se a incubação das proteínas com 10% de tripsina comercial (de acordo com a concentração de proteínas totais), a 37°C durante 2 h. A mistura foi centrifugada a $16.000 \times g$ e o sobrenadante contendo as toxinas Cry1 e Vip3Aa ativadas foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.5 Eletroforese SDS-PAGE e quantificação das proteínas

As proteínas Cry1 e Vip3Aa 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 qu Laboratories, Richmond, EUA). Utilizou-se a solução “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas, Vilnius, Lituania) como marcador de massa molecular.

As amostras 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% de glicerol; 5% β- mercaptanol e 0,02% de azul de bromofenol) sendo posteriormente aquecidas por 8 min a 100 °C e uma alíquota de 15 µL foram aplicadas no gel de poliacrilamida.

Os géis de empilhamento e de separação foram preparados a 5% e 12% de acrilamida, respectivamente. Os reagentes utilizados na preparação do gel e concentrações encontram-se na Tabela 1. A cuba vertical Bio-Rad, modelo Mini-Protean® II Cell foi preenchida com tampão de eletrodo (0,192 M de glicina e 0,1% de SDS) e submetidas à corrente constante de 60 mA, a 200 V por 90 min.

Tabela 1: Reagentes utilizados para a confecção dos géis

Reagentes	Gel de Empilhamento	Gel de separação
Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)	0,500	0,000
Tris-HCl (2,25 M pH 8,8)	0,000	0,800
Acrilamida-Bis(30:0,08%)	0,330	1,660
SDS (4%)	0,125	0,115
TEMED (tetramethylethylenediamine)	0,006	0,015
Persulfato de amônio (10%)	0,020	0,065
H ₂ O	1,105	2,430

Após a eletroforese, as bandas referentes a toxinas foram detectadas por meio da coloração do gel com Coomassie- Brilliant Blue 0,02% (metanol 30%, ácido acético 10%, sulfato cúprico 0,1% e água) por 15 min e descorado com sucessivas

lavagens de solução descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e água). Os géis foram analisados e foto documentados em aparelho scanner (HP Scanjet 3570c).

Para a quantificação das proteínas, novos géis de policrilamida foram preparados, contendo cinco diferentes concentrações da proteína soro albumina bovina (BSA) (0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05 mg mL⁻¹) e as respectivas proteínas. Estas foram quantificadas com o auxílio do software Bionumerics, sendo o padrão para quantificação da concentração final a proteína BSA. Os géis foram digitalizados e os valores de BSA foram inseridos no programa como concentrações conhecidas. Com base nestes valores o software Bionumerics gerou uma curva de densitometria das concentrações estimou a concentração de cada amostra aplicada.

Os valores de quantificação obtidos por essa metodologia foram apresentados em ng µL⁻¹ e transformados para ng cm⁻² em função da área da dieta artificial semissólida utilizada em cada parcela do bioensaio. Foi estipulada a aplicação de 25 µL cm⁻² de dieta artificial, portanto os valores gerados em ng µL⁻¹ foram multiplicados por 25 e obtivemos a quantidade em ng cm⁻² de proteína. Em função desse valor as diluições foram preparadas utilizando a fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, sendo, C_1 a concentração da solução mãe, V_1 o volume que precisa ser retirado da solução mãe, C_2 a concentração final da proteína e V_2 o volume final da solução.

4.6 Obtenção da população de *Spodoptera frugiperda*

Os ovos da população de *Spodoptera frugiperda* foram obtidas da criação do laboratório de criação de insetos da empresa SGS Gravena, de Jaboticabal - SP, e mantidas em copos plásticos de 250 mL contendo dieta artificial semissólida e colocadas até a sua eclosão em sala climatizada à temperatura de 28±1 °C, umidade relativa de 50±10% e fotoperíodo de 16:8 h.

A dieta artificial foi preparada com 240 g de feijão Carioca, 72 g de levedo de cerveja, 2,4 g de ácido sórbico, 7,3 g de ácido arcórbico, 4,4 g de nipagim, 20 g de carogenato, 6 mL de formol e 1 L de água. Essa dieta foi adicionada em bandejas de poliestireno com 8 quadrantes, sendo que cada quadrante continha 16 pocinhos de 1cm de diâmetro (Figura 2).

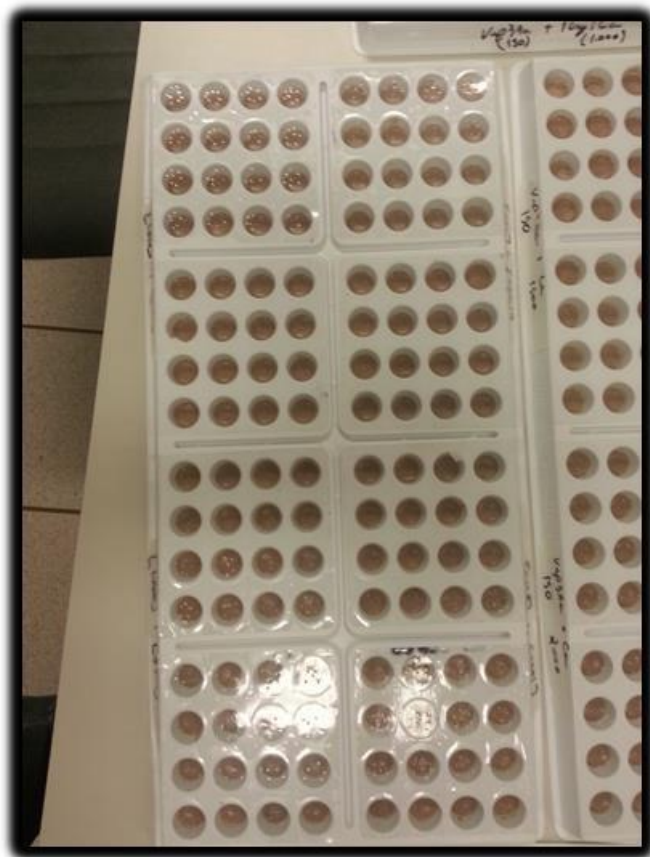


Figura 2: Bandeja de poliestireno utilizadas nos bioensaios.

4.7 Bioensaios com as toxinas ativadas contra larvas de *Spodoptera frugiperda*.

A susceptibilidade das larvas neonatas de *S. frugiperda* às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa foi testada por meio de bioensaios realizados no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), em sala climatizada a 28 ± 1 °C, UR de $50 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 16:8 h.

No qual 50 μ L das toxinas ativadas foram inoculadas sobre a superfície da dieta artificial semissólida conforme Wu et al. (2009). As concentrações mais adequadas para cada toxina foram estabelecidas em bioensaios preliminares, e para cada concentração foram utilizadas 4 repetições de 16 lagartas no primeiro instar de *S. frugiperda* totalizando 64 lagartas por concentração. Duas testemunhas foram

utilizadas nesse bioensaio, nas quais foram inoculadas, sobre a superfície da dieta artificial, água e tampão utilizado na solubilização das proteínas em substituição as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa.

4.8 Estimativa da CL₅₀ e CL₉₀

Para determinação da concentração letal para 50% e 90% das lagartas (CL₅₀ e CL₉₀), para as proteínas Cry1 mais eficientes no controle de *S. frugiperda* foram utilizadas as concentrações 0; 50; 100; 250; 500; 1000; 2000; 3000 e 4000 ng cm⁻² e para a proteína Vip3Aa foram utilizadas as concentrações 0; 10; 50; 75; 100; 150; 200 e 400 ng cm⁻².

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições, com 16 lagartas por repetição. A mortalidade foi avaliada no sétimo dia após a exposição das lagartas à dieta com proteína. A CL₅₀ e a CL₉₀ foram estimadas por meio da análise do tipo Probit utilizando o programa de estatística POLO-PC (LeOra Software, Berkeley, CA).

4.9 Análise dos Dados

Os dados de mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* obtidos pela exposição às toxinas Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa ativadas, foram analisados segundo Fernández-Luna et al., (2010). Para tanto, foram calculadas dois tipos de mortalidade, a mortalidade larval esperada e a observada, onde primeiramente foi obtida a proporção observada de lagartas que sobreviveram à exposição da toxina (a) e a toxina (b) separadamente ($S_{(a)OBS}$ e $S_{(b)OBS}$). Com esse valor foi obtida a proporção de lagartas sobreviventes esperadas expostas à mistura das toxinas (a) e (b) ($S_{(ab)EXP}$), onde $S_{(ab)EXP} = S_{(a)OBS} \times S_{(b)OBS}$. Com os valores de $S_{(ab)EXP}$ foi calculada a mortalidade esperada para as lagartas expostas a cada mistura de toxina com a expressão : $Mort_{(ab)EXP} = (1 - S_{(ab)EXP}) \times 100\%$. Para calcular o número esperado de lagartas vivas e mortas foi multiplicada a mortalidade esperada pelo número total de lagartas ($n = 64$). Com as mortalidades esperadas de cada mistura, foram realizados

outros bioensaios em que a mortalidade observada foi analisada para a determinação da interação de sinergismo ou antagonismo, considerando que a hipótese de que sinergismo ocorre se o número de lagartas mortas observadas expostas a mistura for maior que o número de lagartas mortas esperadas e o inverso para a ocorrência de antagonismo. Utilizou-se o teste “exato” de Fisher (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/contingency1/>) para determinar se a diferença entre a mortalidade esperada e a observada era estatisticamente significativa para um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$)

5. Resultados e discussões

5.1 Expressão das proteínas Cry1 e Vip3Aa

O sistema de expressão heteróloga em *Escherichia coli* possibilitou a obtenção das diferentes toxinas Cry1 e Vip3Aa, as quais foram visualizadas por meio da técnica SDS-PAGE (Figura 3). A análise por meio dessa técnica confirmou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 85 kDa correspondente à proteína Vip3Aa. O mesmo resultado foi obtido por Chakrouna et al. (2012).

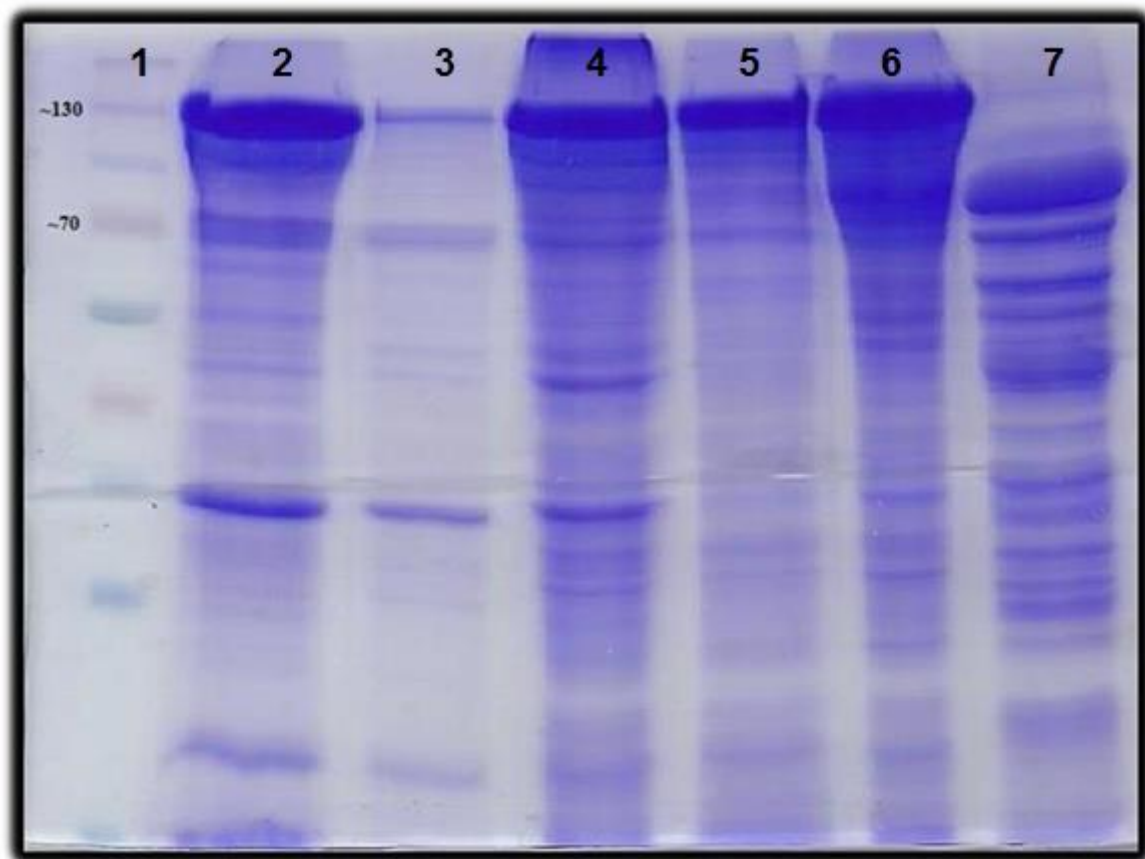


Figura 3: Eletroforograma evidenciando a expressão das proteínas Cry e Vip de gel SDS-PAGE 12%. Nas canaletas: 1: Marcador de Massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2: Cry1Aa; 3: Cry1Ab; 4: Cry1Ac; 5: CryCa; 6: CryEa; 7: Vip3Aa.

Lee et al. (2006) observaram que a toxina Vip3A possui um tamanho de aproximadamente 88 kDa e é processada para um fragmento de 62 kDa *in vivo* na digestão no intestino médio de lepidóptera, em digestão *in vitro* com tripsina e com suco do intestino.

O mesmo foi feito para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea, confirmando a presença de uma banda de aproximadamente 135 kDa (Figura 3). Genes *cry1* codificam proteínas de aproximadamente 130 kDa. Como já mencionado, estas proteínas são sintetizadas como protoxinas que são dissolvidos em meio alcalino no intestino do inseto e são ativados por proteólise de toxinas, neste caso cerca de 65 kDa. (SAUKA & BENINTENDE, 2008). Lee et al. (2006) estudaram também a protoxina Cry1Ac (130 kDa) e verificaram que pode ser facilmente ativada com tripsina formando um fragmento de 65 kDa.

5.2 Ativação das proteínas Cry1 e Vip3Aa

A confirmação da ativação com tripsina comercial foi feita utilizando gel de SDS-PAGE 12% (Figura 4). Foram detectadas bandas de cerca de 62 kDa para a proteína Vip3Aa e de 65 kDa para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea. Lee et al. (2003) também obteve para a proteína Vip3Aa ativada com tripsina comercial, uma banda de 62 kDa. Segundo Sauka & Benintende (2008), proteínas Cry1 quando ativadas apresentaram uma banda de aproximadamente 65 kDa. Em estudo realizado por Ma et al. (2012), os autores também obtiveram uma banda de 65 kDa para a proteína Cry1Ac ativada com tripsina comercial.

Segundo Lee et al. (2003), a etapa de ativação é importante para Vip3A, uma vez que Vip3A não ativada é incapaz de formar poros *in vitro*.

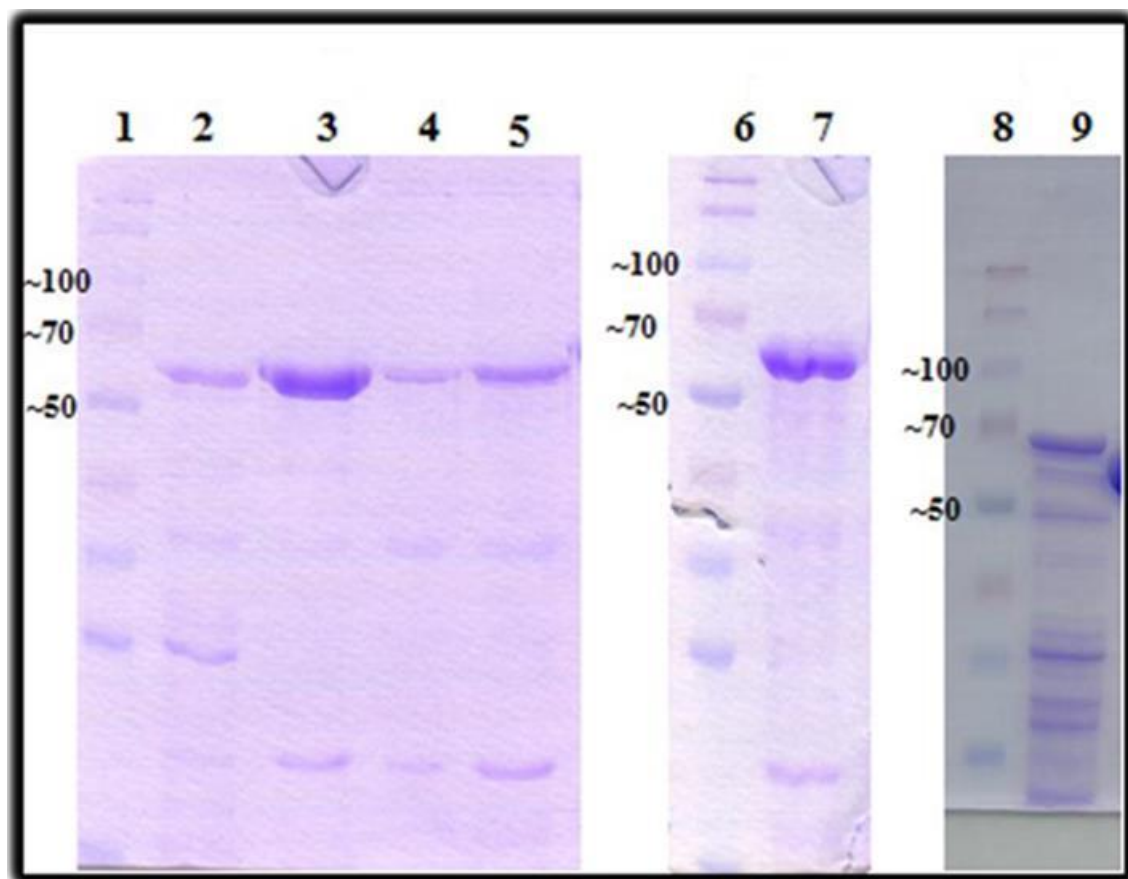


Figura 4: Eletroforograma para detecção das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa ativadas utilizando tripsina comercial em gel SDS-PAGE 12%. Canaleta 1, 6 e 8: marcador molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, canaleta 2: Cry1Aa, canaleta 3: Cry1Ab, canaleta 4: Cry1Ac, canaleta 5: Cry1Ca, canaleta 7: Cry1Ea e canaleta 9: Vip3Aa.

5.3 Quantificação das proteínas Cry1 e Vip3Aa

Para o uso das proteínas nos bioensaios, após a corrida eletroforética, as bandas referentes às proteínas foram quantificadas utilizando o software Bionumerics (Figuras 5 e 6). Foram obtidas as seguintes concentrações: 0,5 mg mL⁻¹ (Cry1Aa); 0,723 mg mL⁻¹ (Cry1Ab); 0,461 mg mL⁻¹ (Cry1Ac); 0,344 mg mL⁻¹ (Vip3Aa); 0,692 mg mL⁻¹ (Cry1Ca) e 0,369 mg mL⁻¹ Cry1Ea.

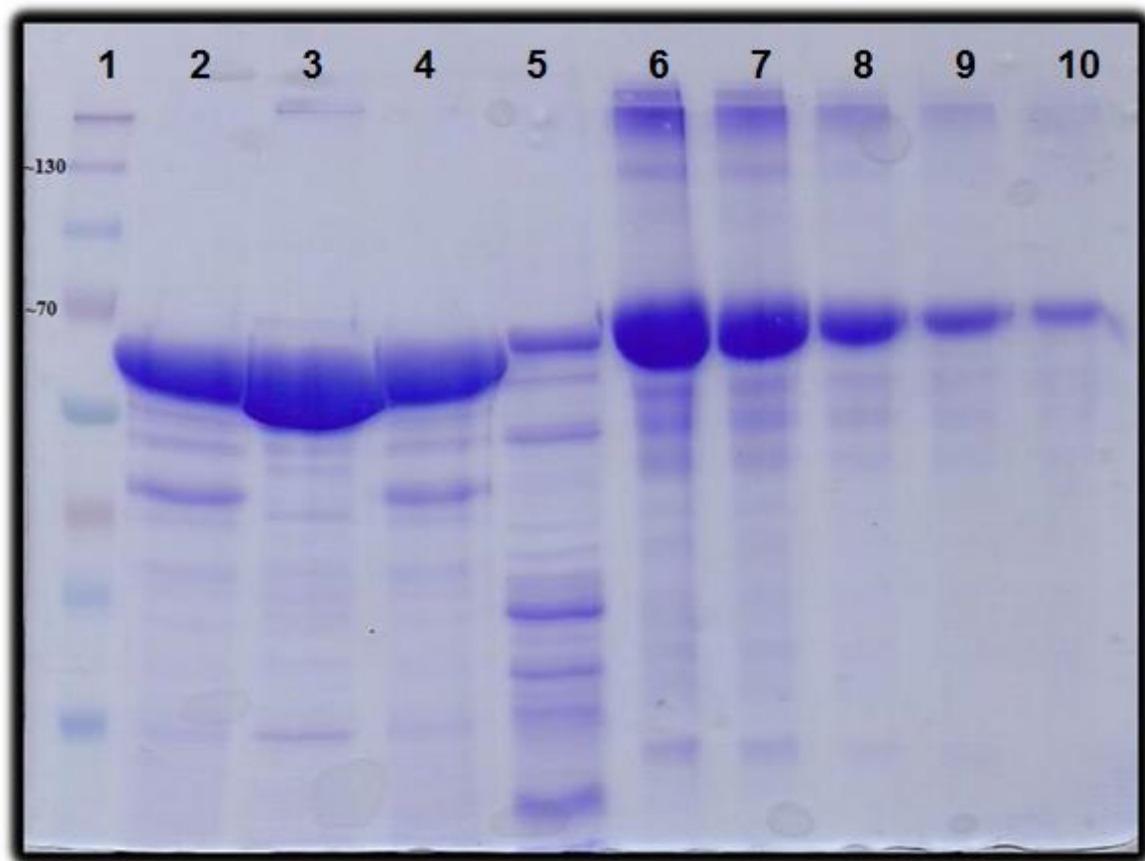


Figura 5: Eletroforograma para detecção e quantificação das proteínas ativadas Cry1 e Vip3Aa em gel SDS-PAGE 12%. Canaleta 1: Marcador de Massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2: Cry1Aa; 3: Cry1Ab; 4: Cry1Ac; 5: Vip3Aa; 6, 7, 8, 9 e 10: BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05 mg mL⁻¹.

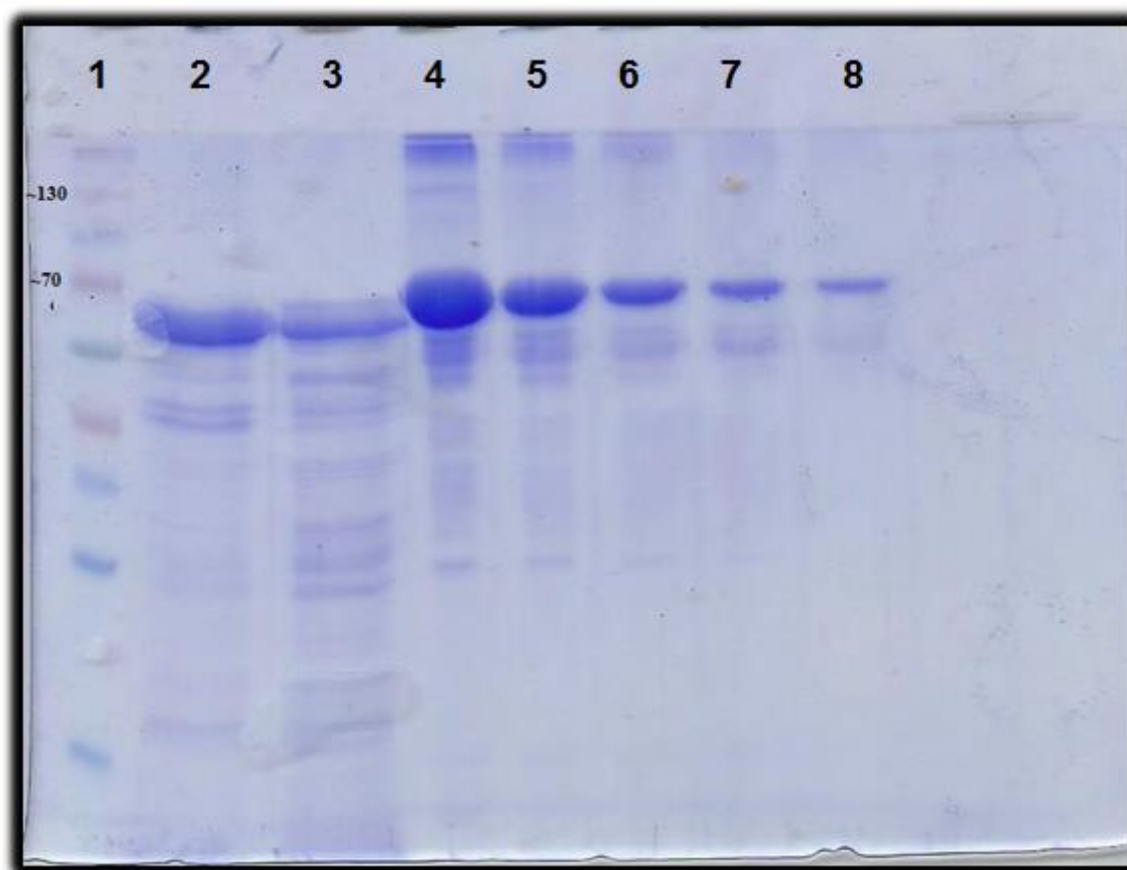


Figura 6: Eletroforograma para detecção e quantificação das proteínas ativadas Cry1 em gel SDS-PAGE 12%. Canaleta 1: Marcador de Massa molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2: Cry1Ca; 3: Cry1Ea; 4, 5, 6, 7 e 8: BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,05 mg mL⁻¹.

5.4 Bioensaios com *S. frugiperda*

As toxicidades das proteínas Cry1 e Vip3Aa foram testadas em lagartas neonatas de *S. frugiperda*. As proteínas Cry1 foram utilizadas nos bioensaios após a solubilização, e a proteína Vip3Aa foi utilizada em forma de lisado protéico, após indução da expressão.

Nos bioensaios com lagartas neonatas de *S. frugiperda*, as CL₅₀ das proteínas Cry1Aa e Cry1Ac não foram determinadas, pois a concentração mais alta das duas toxinas testadas (2000 ng cm⁻²) não foi efetiva contra as lagartas neonatas de *S. frugiperda* (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados das mortalidades testadas para proteínas cry1Aa e Cry1Ac de *B. thuringienses* contra larvas neonatas de *S. frugiperda*.

Toxina	Concentração (ng cm ⁻²)	^(a) Mortalidade esperada	Mortalidade observada (%)
Cry1Aa	50	NA	0
	300	NA	1,560
	500	NA	3,125
	1500	NA	6,250
	2000	NA	9,375
Cry1Ac	50	NA	0
	150	NA	0
	300	NA	0
	500	NA	0
	1500	NA	0
	2000	NA	0

^(a) Mortalidades esperadas para toxinas sozinhas não foram calculadas.

Luo et al. (1999) verificaram que Cry1Fa foi altamente tóxica, e Cry1Ac não foi tóxica para lagartas de *S. frugiperda*, utilizando a técnica de BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles"), a partir de intestino médio de lagartas de *S. frugiperda*. Esses autores demonstraram que Cry1Ac ligou-se irreversivelmente às BMMVs, sugerindo que alguns componentes da membrana são necessários para a formação dos poros induzida por Cry1Ac, e que a ligação da toxina é necessária, mas não suficiente para a toxicidade.

Sena et al. (2009), através de estudos de BBMV, demonstraram que a proteína Vip3Aa se liga a receptores diferentes em relação às proteínas Cry1Ab e Cry1Fa no intestino médio das lagartas de *S. frugiperda*. Mas apenas a detecção de ligação das proteínas aos receptores não significa necessariamente que elas apresentam toxicidade (DUMAS, 2009). A população de *S. frugiperda* utilizada nesse estudo foi bastante tolerante às toxinas Cry1Aa e Cry1Ac, pois em concentrações de 2000 ng cm⁻² apresentaram baixas mortalidades (9,375% e 0%, respectivamente).

Para as proteínas Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Ea e Vip3Aa as CL₅₀ foram aferidas (Tabela 3). As lagartas neonatas de *S. frugiperda* foram mais sensíveis à toxina Vip3Aa do que a todas as proteínas Cry1 testadas.

Tabela 3. Atividade biológica das toxinas ativadas Vip3Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea contra larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda*.

Proteína	^(a) CL ₅₀ (ng cm ⁻²) ^(c) (IC Min. - Máx.)	^(b) CL ₉₀ (ng cm ⁻²) ^(c) (IC Min. - Máx.)	^(d) b ± EP	^(e) X ²
Cry1Ab	422,35 (289,57–581,39)	1988,70 (1324,37–3808,10)	2,059 ± 0,159	5,8398
Cry1Ca	283,57 (205,85 – 387,37)	1084,63 (724,77 – 2094,63)	2.200 ± 0.187	6,3896
Cry1Ea	320,78 (223,43–475,64)	1227,12 (771.47 – 2501.79)	2,199 ± 0,175	6,1287
Vip3Aa	75,049 (59,06–90,10)	193,84 (152,47 – 293,16)	3,110 ± 0,315	7,9823

^(a) Concentração letal para 50% dos indivíduos; ^(b) Concentração letal para 90% dos indivíduos; ^(c) (IC Min. - Máx.): Intervalos de confiança mínimo e máximo com 95% de probabilidade; ^(d) b ± E P: Coeficiente angular da reta ± o erro padrão da média; ^(e) valores de chi-quadrado.

Sena et al. (2009) verificaram a toxicidade de Vip3Aa, Vip3Af, Cry1Ab e Cry1Fa em *S. frugiperda*, e também demonstraram que as proteínas Vip3A foram mais tóxicas do que as proteínas Cry1Ab e Cry1Fa. Os autores encontraram uma Cl₅₀ de 49,3 ng cm⁻² para a toxina Vip3Aa e de 867 ng cm⁻² para a toxina Cry1Ab. A mesma observação foi feita por Bergamasco et al. (2013), em populações de *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides* em que a toxina Vip3Aa foi mais efetiva do que a Cry1la10 com Cl₅₀ de 24,66; 3,90; 2,78 e 3,44 ng cm⁻², respectivamente. No entanto, para a população de *S. eridania* a toxina Cry1la10 foi mais efetiva do que a toxina Vip3Aa apresentando uma Cl₅₀ de 1,93 ng cm⁻² e 3,44 ng cm⁻², respectivamente.

Tendo em vista os casos frequentes de resistência, uma das formas de se manejá-la em populações de campo é a utilização de novas combinações de proteínas de *B. thuringiensis* que apresentam perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry* e *vip*. Segundo Praça et al. (2004), a toxicidade de alguns isolados a insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas de *B. thuringiensis* encontradas. Portanto, após os estudos realizados com cada toxina individual foram realizados os bioensaios com as toxinas combinadas

que se destacaram no controle de lagartas de *S. frugiperda*. (Vip3Aa/Cry1Ab, Vip3Aa/Cry1Ca e Vip3Aa/Cry1Ea), cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4: Mortalidades das lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* com as toxinas Vip3Aa, Cry1Ab, Cry1Ca e Cry1Ea aplicadas separadamente para os ensaios de interação.

Toxina	Concentração (ng cm ⁻²)	Mortalidade (%)	
		^(a) Esperada	^(b) Observada
Vip3Aa	25	NA ^(b)	20,31
	50	NA	37,50
	100	NA	62,50
Cry1Ab	250	NA	32,81
	500	NA	50,00
	1000	NA	75,00
Cry1Ca	500	NA	37,50
	1000	NA	57,81
	2000	NA	87,50
Cry1Ea	250	NA	37,50
	500	NA	57,81
	1000	NA	87,50

(a) A mortalidade esperada não foi calculada para as toxinas sozinhas; (b) Cada valor para mortalidade observada representa quatro repetições de 16 lagartas, totalizando 64 lagartas.

Tabela 5: Interação da toxina Vip3Aa com as Cry1Ab e Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis* contra o primeiro ínstar de *Spodoptera frugiperda*.

Interação	Concentração (ng cm ⁻²)	Mortalidade (%)		p
		Esperada	^(a) Observada	
Vip3Aa/Cry1Ab	25/250	46,50	68,75	0,0098 [*]
	25/500	60,00	81,25	0,0057 [*]
	25/1000	80,00	87,50	0,1700 ^{ns}
	50/250	58,00	75,00	0,0303 [*]
	50/500	69,00	82,81	0,0490 [*]
	50/1000	84,00	87,25	0,4000 ^{ns}
	100/250	73,80	82,81	0,1425 ^{ns}
	100/500	81,00	87,25	0,2330 ^{ns}
	100/1000	90,00	95,31	0,2459 ^{ns}
Vip3Aa/Cry1Ca	25/500	50,00	7,81	0,0001 [*]
	25/1000	66,40	45,31	0,0162 [*]
	25/2000	90,00	70,31	0,0033 [*]
	50/500	60,00	37,50	0,0065 [*]
	50/1000	74,00	50,00	0,0053 [*]
	50/2000	92,00	62,50	0,0001 [*]
	100/500	77,00	45,31	0,0003 [*]
	100/1000	84,00	50,00	0,0001 [*]
	100/2000	95,00	75,00	0,0011 [*]

^(a) Cada valor para mortalidade observada representa quatro repetições de 16 lagartas, totalizando 64 lagartas; ^{ns}; ^{*} Não significativo e significativo, respectivamente, com 95% de intervalo de confiança estatística, pelo teste de Fisher.

Tabela 6: Interação da toxina Vip3Aa com a Cry1Ea de *Bacillus thuringiensis* contra o primeiro ínstar de *Spodoptera frugiperda*.

Interação	Concentração (ng cm ⁻²)	Mortalidade (%)		p
		Esperada	^(a) Observada	
Vip3Aa/Cry1Ea	25/250	46,50	45,31	0,5000 ^{ns}
	25/500	65,20	50,00	0,0534 ^{ns}
	25/1000	70,20	57,81	0,0985 ^{ns}
	50/250	58,00	37,50	0,0166 [*]
	50/500	73,00	45,31	0,0010 [*]
	50/1000	77,00	50,00	0,0016 [*]
	100/250	74,80	37,50	0,0001 [*]
	100/500	83,60	45,31	0,0001 [*]
	100/1000	86,00	62,50	0,0021 [*]

^(a) Cada valor para mortalidade observada representa quatro repetições de 16 lagartas, totalizando 64 lagartas. ^{ns}; ^{*} Não significativo e significativo, respectivamente, com 95% de intervalo de confiança estatística, pelo teste de Fisher.

Os resultados demonstraram que ocorreu apenas sinergismo na mistura de Vip3Aa com Cry1Ab, em concentrações de 25/250, 25/500, 50/250 e 50/500 ng cm⁻², respectivamente ($p < 0,05$). No entanto, quando as toxinas Vip3Aa e Cry1Ab são combinadas em altas doses, a interação torna-se não significativa ($p > 0,05$). Para a mistura das toxinas Vip3Aa/Cry1Ca, em todas as concentrações testadas, a mortalidade esperada foi maior que a observada ($p < 0,05$), apresentando interação antagônica. A mistura das toxinas Vip3Aa/Cry1Ea, quando a Vip3Aa está em concentração de 25 ng cm⁻², não apresentou diferença entre a mortalidade observada e a esperada ($p > 0,05$), portanto, quando em baixas concentrações da toxina Vip3Aa, essa mistura não apresenta sinergismo e nem antagonismo. Porém, quando a concentração da Vip3Aa foi aumentada (50 e 100 ng cm⁻²), os resultados das misturas das toxinas Vip3Aa/Cry1Ea foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) apresentando interação antagônica. Essas duas combinações de toxinas (Vip3Aa/Cry1Ca e Vip3Aa/Cry1Ea) não são indicadas para serem implementadas em plantas transgênicas piramidadas no manejo de resistência de *S. frugiperda*.

Adamczyk & Mahaffey (2008) demonstraram que o algodão transgênico que continha a proteína vegetativa Vip3A foi mais eficaz contra o *S. exigua* e *S. frugiperda* do que o algodão transgênico que continha a proteína Cry1Ab. Entretanto, o algodão *cry1Ab* foi mais eficiente contra *Heliothis virescens*, comparado com o algodão transgênico *vip3A*. Esses autores também observaram que não ocorreu interação sinérgica para o algodão transgênico que continha o gene *vip3A/cry1Ab* para as pragas testadas por eles, pois em plantas Bt a quantidade de proteínas Cry e Vip são relativamente altas. Os dados deste artigo corroboram os desses autores para concentrações altas de Cry1Ab e Vip3Aa, em que as diferenças entre mortalidade esperada e observada não foram estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

No estudo realizado por Greenplate et al. (2003), os autores concluíram que, em uma planta de algodão com duas toxinas (Cry2Ab e Cry1A), o maior efeito tóxico foi devido à toxina Cry2Ab e que a ação combinada das toxinas foi aditivo contra *H. virescens*, *H. zea* e *S. frugiperda*.

No trabalho de Bergamasco et al. (2013), em que foi estudada a interação entre proteína Cry1Ia10 e Vip3Aa para lagartas neonatas de *S. frugiperda*, *S. albula*,

S. cosmioides e *S. eridania*, foi encontrado efeito sinérgico das toxinas quando combinadas, contra *S. frugiperda*, *S. albula* e *S. cosmioides*. Contudo, em *S. eridania*, Cry1Ia10 e Vip3Aa podem competir para o mesmo receptor, e por meio de bioensaios Cry1Ia10 foi mais eficiente do que Vip3Aa, mas quando essas proteínas foram combinadas ocorreu efeito antagônico. Esses resultados sugerem que a utilização desses genes em plantas piramidadas pode não ser eficaz na prevenção do desenvolvimento da resistência em *S. eridania*.

Xue et al. (2005) estudaram a atividade sinérgica entre Cry1Aa e Cry1C de *B. thuringiensis* contra *S. exigua* e *Helicoverpa armigera*. Em todos os casos, a mistura Cry1Aa/Cry1C apresentou efeito sinérgico. O mecanismo da sinergia não está ainda claramente compreendido, e diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar o seu mecanismo molecular. Uma das hipóteses é que os poros individuais feitos por diferentes toxinas nas membranas do intestino das lagartas podem agir cooperativamente e apresentar maior toxicidade. Estes poros “híbridos” podem aumentar a capacidade da membrana osmótica, causando maior mortalidade de larvas (Xue et al., 2005).

Trabalhos como esses são importantes, pois a Comissão Técnica de Biossegurança (CTNBio), vem aprovando no Brasil a solicitação de várias empresas multinacionais para a liberação comercial de culturas geneticamente modificados (OGMs) com eventos piramidados com os genes “Bt”. Portanto estudos que evidenciem se esses eventos piramidados são realmente eficazes no controle de insetos-pragas alvos são de extrema importância. Pois agricultores que plantam os OGMs piramidados podem reduzir a área destinada ao plantio de refúgios. O Refúgio é uma parte de uma lavoura plantada com híbridos que não contenham a proteína “Bt”. Se apenas híbridos com a tecnologia “Bt” forem plantados na lavoura, os poucos insetos que desenvolverem resistência a essa proteína e sobreviverem, poderão cruzar com outros insetos resistentes, transmitindo a resistência para seus descendentes. Por isto, os pesquisadores consideram que a melhor maneira de evitar o desenvolvimento de populações de insetos resistentes ao transgênico “Bt” é combinar lavouras de plantas “Bt” com áreas plantadas com híbridos convencionais, isto é, sem a proteína Bt. Estas áreas devem ser plantadas na mesma época e com híbridos de mesmo ciclo. Desta maneira, os poucos possíveis insetos resistentes

que sobreviverem na lavoura “Bt” irão cruzar com insetos suscetíveis presentes na lavoura convencional. A progênie (descendentes destes insetos) será suscetível e, assim, poderá ser controlada com plantios futuros de lavouras “Bt”.

A CTNBio aprovou em 2010 o milho geneticamente modificado com genes *cry* e *vip* combinados, o milho Bt11xMIR162x GA21 que contém os genes *cry1Ab* e *vip3Aa20* (BRASIL, 2006). De acordo com esse trabalho é uma mistura eficaz no controle de *S. frugiperda*, mas a CTNBio também liberou por exemplo o milho MON890347NK603 que contém os eventos *cry1A105* e *cry2Ab* (BRASIL, 2006), mas para *S. frugiperda* as toxinas Cry1A não são eficazes, pois esta espécie apresenta uma tolerância natural as toxinas Cry1A, também liberou em 2009 o algodão com os eventos “Bt” *cry1Ac* e *cry1F*, segundo esse trabalho *S. frugiperda* apresenta tolerância a toxina Cry1Ac. Portanto, essas culturas geneticamente modificadas não deveria, serem consideradas um OGM piramidado, por tanto, os agricultores que plantarem esse milho não deveriam reduzir a sua área de refúgio.

6. Conclusões

A proteína Vip3Aa é mais eficiente do que as proteínas Cry1 no controle de *Spodoptera frugiperda*.

A combinação da proteína Vip3Aa com a Cry1Ab, em baixas concentrações das duas proteínas, mostra-se promissora para a transformação dos genes *vip3Aa* e *cry1Ab* em plantas geneticamente modificadas.

Quando a proteína Vip3Aa é combinada com a Cry1Ca para todas as concentrações testadas, e com Cry1Ea em altas concentrações da Vip3Aa, essas combinações não são indicadas para a transformação desses genes em plantas geneticamente modificadas.

7. Referências

ADAMCZYK, J. J. J.; MAHAFFEY, J. S. Efficacy of Vip3A and Cry1Ab transgenic traits in cotton against various lepidopteran pests. **Florida Entomological Society**, Lanhan, v. 91, n. 4, p. 570-575, 2008. Disponível em: <<http://link.periodicos.capes.gov.br/ez87.periodicos.capes.gov.br>>. Acessado em: 23 maio 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040-91.4.570>.

ADANG, M. J. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: gene structure, action and utilization. In: MARAMOROSCH, K. (Ed.). **Biotechnology for biological control of pests and vectors**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 3-24.

ALI, A.; LUTTREL, R. G.; PITRE, H. N.; DAVIS, F. M. Distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) egg masses on cotton. **Environmental Entomology**, College Park, v. 18, n. 5, p. 881-885, 1989.

ARONSO, A. I.; SHAY, Y. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin are so effective: unique features of their mode of action. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 195, n. 1, p. 1- 8, 2001.

ARORA, N.; SELVAPANDIVAN, U.; AGRAWAL, N.; BHHATNAGAR, R. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 310, n. 1, p. 158-162, 2003.

ÁVILA, C. J.; NAKANO, O. Efeito do regulador de crescimento lufenuron na reprodução de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 293-299, 1999.

BAI, C. D.; DEGHEELE, S.; JANSSENS.; LAMBERT, B. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 62, n. 3, p. 211–215, 1993.

BARLOW, V. M.; KUHAR, T. P. **Fall armyworm in vegetable crops**. [Blacksburg]: Virginia Cooperative Extension, 2005. p. 1-3. Disponível em: <<http://www.ext.vt.edu/pubs/entomology/444-015/444-015.html>>. Acesso em: 23 maio 2013.

BAVARESCO, A.; GARCIA, M. S.; GRUTZMACHER, A. D.; RINGENBERG, R.; FORESTI, J. Biologia comparada de *Spodoptera cosmioides* (Walk.) (Lepidoptera: Noctuidae) em cebola, mamona, soja e feijão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 6, p. 993–998, 2003.

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 124, n. 4, p. 587-616, 1992.

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**, Maryland Heights, v. 112, n. 2, p. 152-158, 2013.

BERLINER, E. Über die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. **Zeitschrift für Gesamte Getreide Wesen**, Hamburg, v. 2, p. 29-56, 1915.

BERLINER, E. Ueber die Schlattsucht der Mehlmotenraupe. **Zeitschrift für Gesamte Getreide Wesen**, v. 25, p. 3.160-3.162, 1911.

BOONSERM, P.; DAVIS, P.; ELLAR, D. J.; LI, J. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of molecular biology**, London, v. 348, n. 2, p. 363–382, 2005.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **CTNBio**. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/17811.html>>. Acesso em: 01 maio 2013.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L. I., LATROU, K., GILL, S. S. (Ed.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam: Elsevier BV, 2005. p. 175-206.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxins**, kindlington, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

CÁRDENAS, M. I.; GALÁN-WONG, L.; FERRÉ-MANZANERO, J.; PEREYRA-ALFÉREZ, B. Selección de toxinas contra *Trichoplusia ni*. **Ciencia Uanl**, Nuevo Leon, v. 4, n. 1, p. 51-62, 2001.

CHAKROUNA, M.; BEL, A. Y.; CACCIAA, S.; ABDELKEfi-MESRATI, L.; ESCRICHEA, B.; FERRÉA, J. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 110, n. 3, p. 334–339, 2012.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest management science**, Sussex, v. 56, n. 8, p. 651-676, 2000.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. ***Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature**. [S.l.: s.n., set. 2005]. Disponível em: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/. Acessado em maio de 2013.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt>. Acesso em: 23 jan. 2013.

CRUZ, B. P. B.; FIGUEIREDO, M. B.; ALMEIDA, E. Principais doenças e pragas do amendoim no Estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo, v. 28, n. 7, p. 189-195, 1962.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. p. 45. (Circular Técnica, 21).

CRUZ, I.; BIANCO, R. Manejo de Pragas na Cultura do Milho Safrinha. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 6., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 79-112.

CRUZ, I.; SANTOS, J. P.; WAQUIL, J. M. Controle químico da lagarta-do-cartucho em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, n. 5, p. 677-684, 1982.

CRUZ, I.; TURPIN, F. T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estágios de crescimento da cultura de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

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

DE MAAGD, R.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has involves toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, Maryland Heights, v. 17, p. 193-199, 2001.

DIEZ-RODRIGUES, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

DOSS, V. A.; KUMAR, K. A.; JAYAKUMAR, R.; SEKAR, V. Cloning and expression of the vegetative insecticidal protein (vip3V) gene of *Bacillus thuringiensis* in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 26, n. 1, p. 82-88, 2002.

DUMAS, V. F. **Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia germinalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2009.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; CRAIG, J. A.; KOIZEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against Lepidopteran insects. **Proceedings National Academy Science**, Calcutá, v. 93, n. 11, p. 5389- 5394, 1996.

FANG, J.; XU, X.; WANG, P.; ZHAO, J-Z.; SHELTON, A. M.; CHENG, J.; FENG, M-G.; SHEN. Z. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 3, p. 956-961, 2007.

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

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM). In: ROMEIS, J.; SHELTON, A. M.; KENNEDY, G. G. (Ed.). **Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM Programs**. New York: Springer, 2008. p. 41–85.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. 3. ed. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10, p. 920.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXMELL, J. L.; KEWSHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-evolved resistance to Bt maize by Western Corn Rootworm. **PloS ONE**, Berkeley, v. 6, n. 7, p. e22629, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0022629>>. Acesso em: 01 ago 2013.

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

GREENPLATE, J. T.; MULLINS, J. W.; PENN, S. R.; DAHM, A.; REICH, B. J.; OSBORN, J. A.; RAHN, P. R.; RUSCHKE, L.; SHAPPLEY, Z. W. Partial characterization of cotton plants expressing two toxin proteins from *Bacillus thuringiensis*: relative toxin contribution, toxin interaction, and resistance management. **Journal Applied Entomology**, Berlin, v. 127, n. 6, p. 340–347, 2003.

GRÜTZMACHER, A. D.; MARTINS, J. F. da S.; CUNHA, U. S. da. Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. In: PARFITT, J. M. B. **Produção de milho e sorgo em várzea**. Pelotas: EMBRAPA Clima Temperado, 2000. p. 87-102.

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

HAN, S.; CRAIG, J. A.; PUTNAM, C. D.; CAROZZI, N. B.; TAINER, J. A. Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. **Nature Structural Biology**, New York, v. 6, n. 10, p. 932-936, 1999.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Review**, Washington, v. 53, n. 2, p. 242-255, 1989.

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

ISHAWATA, S. On a severe flacherie (sotto disease). **Dai Nihon Sanshi Kaiho**, [S.l.], v. 114, p. 1-5, 1901.

KNIPLING, E. F. Regional management of the fall armyworm – a realistic approach? **Florida Entomologist**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 468-480, 1980.

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.

LABRADOR, J. R. **Estudio de biología y combate del gusano cogollero del maíz *Laphygma frugiperda* S. & A.** Maracaibo, Venezuela: Universidad del Zulia, 1967. p. 83.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

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

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, n. 4, p. 1043-1047, 2006.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4648-4657, 2003.

LEIDERMAN, L.; SAUER, H. F. G. A lagarta dos milho. **O Biológico**, São Paulo, v. 19, n. 6, p. 105-113, 1953.

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

LI, J. D.; CARROL, J. J.; ELLAR, D. J. Cristal structure of insecticide delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. **Nature**, London, v. 353, n. 6347, p. 815-821, 1991.

LUGINBILL, P. **The fall armyworm**. Washington: United States Department of Agriculture, 1928. p. 90. (Technical Bulletin, 34).

LUO, K.; BANKS, D.; ADANG, M. J. Toxicity, binding, and permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ - endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 2, p. 457-464, 1999.

MA, G.; RAHMAN, M. M.; GRANT, W.; SCHMIDT, O.; ASGARI, S. Insect tolerance to the crystal toxins Cry1Ac and Cry2Ab is mediated by the binding of monomeric toxin to lipophorin glycopids causing oligomerization and sequestration reactions. **Developmental and Comparative Immunology**. Oxford, v. 37, n. 1, p. 184-192, 2012.

MATTES, O. Parasitre Krankheiten der Mehlmotenlarven und Versuche ber ihre Verwendbarkeit als biologisches. **Gesellschaft Zur Berförderung der Gesamten Naturwissenschaften Zu Marburg**, Marburg, v. 62, p. 381-417, 1927.

MESRATI, L. A.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. Characterization of a novel vip3-type gene from *Bacillus thuringiensis* and evidence of its presence on a large plasmid. **FEMS Microbiology Letters**, West Sussex, v. 244, n. 2, p. 353–358, 2005.

MIRANDA, J. E.; SUASSUNA, N. D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: Embrapa CNPA, 2004. p. 48.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, 2000. v. 3, p. 163-200.

NORA, I.; REIS FILHO, W.; STUKER, H. Danos de lagartas em frutos e folhas de macieira: mudanças no agroecossistema ocasionam o surgimento de insetos indesejados nos pomares. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 2, p. 54–55, 1989.

OHBA, M.; AIZAWA, K.; SUDO, S. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural faros of Fukuoka Prefecture, Japan. **Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu**, Kyushu, v. 30, p. 152-155, 1984.

PARKER, M. W.; FIEL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, Elmsford, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PERLAK, F. J.; OPPENHUIZEN, M.; GUSTAFSON, K.; VOTH, R.; SIVASUPRAMANIAM, S.; HEERING, D.; CAREY, B.; IHRIG, R. A.; ROBERTS, J. K. Development and commercial use of Bollgard cotton in the U. S. A. Early promises versus today's reality. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 489–501, 2001.

PFEIFER, T. A.; GRIGIATTI, T. A. Future perspectives on insect pest management: engineering the pest. **Journal of Invertebrate Pathology**, Maryland Heights, v. 67, n. 2, p. 109-119, 1996.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PIRES, V. M.; HENSHAW, J. L.; PRATES, J. A.; BOLAM, D. N.; FERREIRA, L. M.; FONTES, C. M.; HENRISSAT, B.; PLANAS, A.; GILBERT, H. J.; CZJZEK, M. The crystal structure of the family 6 carbohydrate binding module from *Cellvibrio mixtus* endoglucanase 5a in complex with oligosaccharides reveals two distinct binding sites with different ligand specificities. **The Journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 20, p. 21560–21568, 2004.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estípes de *B. thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepdoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, n. 1, p. 11-16, 2004.

SAMPURNA, S.; MAITI, M. K. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 21, n. 9, p. 937-946, 2011.

SANTOS, W. J. Manejo das pragas do algodão com destaque para o Cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. (Ed.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília, DF: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p. 403–521.

SANTOS, W. J. Manejo Integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: SOBRENOME, N. **Algodão**. Rondonópolis, MT: Fundação MT, 1997. p. 48–71. (Boletim, 02).

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

SAYYED, A. H.; HAWARD, R.; HERRERO, S.; FERRÉ, J.; WRIGHT, D. J. Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 4, p. 1509-1516, 2000.

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, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCHROEDER, W. J.; SUTTON, R. A. *Diaprepes abbreviatus*: suppression of reproductive potential on citrus with an insect regulator plus spray oil. **Journal of Economic Entomology**, Maryland Heights, v. 71, n. 1, p. 69-70, 1978.

SENA, J. A. D.; HERNANDEZ-RODRIGUES, C. S.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 7, p. 2236–2237, 2009.

SILVA A, G. A.; GONÇALVES, C. R.; GALVÃO, D. M.; GONÇALVES, A. J. L.; GOMES, J.; SILVA, N. M.; SIMONI, L. **Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968. Tomo 1, parte 2, p. 622.

SILVA-WERNECK, J. O.; ABREU NETO, J. R. M. V.; TOSTES, A. N.; FARIA, L. O.; DIAS, J. M. C. S. Novo isolado de *Bacillus thuringiensis* efetivo contra a lagarta do cartucho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 35, n. 1, p. 221-227, 2000.

SILVIE, P.; LEROY, T.; BELOT, J. L.; MICHEL, B. Manual de Identificação das pragas e seus danos no algodoeiro. **Boletim Técnico**, Cascavel, n. 34, p. 100, 2001.

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

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J.; HECKE, D. G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 12, p. 1128-1135, 2011.

VALADARES-INGLIS, M. C. C.; SHILER, W.; DESOUZA, M. T. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v. 1, p. 201-230.

VALICENTE, F. H.; COSTA, E. F. da. Controle da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda*, (J. E. Smith), com o *Baculovirus spodoptera* aplicada via água de irrigação. **Anais da Sociedade Entomológica da Brasil**, Brasília, DF, v. 24, n. 1, p. 61- 67, 1995.

WU, J. Y.; ZHAO, F. Q.; DENG, G.; QIN, S.; BAO, Q. Y. Adaptative evolution of cry genes in *Bacillus thuringiensis*: implications for their specificity determination. **Genomics Proteomics and Bioinformatics**, London, v. 5, n. 2, p. 102-110, 2007.

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

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

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. INSECTICIDAL PROTEINS PRODUCED BY BACTERIA PATHOGENIC TO AGRICULTURAS PESTS. IN: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (ED.). **ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA: FROM LABORATORY TO FIELD APPLICATION**. NETHERLANDS: KLUWER ACADEMIC PUBLISHER, 2000. P. 81-100.

YAMAMOTO, T.; POWELL, G. K. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins: recent advances in understanding its insecticidal activity, p. 3–42. In: KIM, L. (Ed.). **Advanced engineered pesticides**. New York, N.Y: Marcel Dekker Inc., 1993.

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**, Washington, DC, v. 63, n. 2, p. 532-536, 1997.

ZHAO, J-Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D. M.; SHELTON, A. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 12, p. 1493–1497, 2003.