

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 13/02/2019.

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

**INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1, Cry2 E Vip3 DE *Bacillus
thuringiensis* NO CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis*,
Chrysodeixis includens E *Spodoptera frugiperda***

**Camila Soares Figueiredo
Bióloga**

2017

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

**INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1, Cry2 E Vip3 DE *Bacillus
thuringiensis* NO CONTROLE DE *Anticarsia gemmatalis*,
Chrysodeixis includens E *Spodoptera frugiperda***

Camila Soares Figueiredo

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

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)

2017

F475i Figueiredo, Camila Soares
Interação das proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda* / Camila Soares Figueiredo. -- Jaboticabal, 2017
v, 85 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Janete Aparecida Desidério

Banca examinadora: Vivian Boter Bergamasco, Sonia Marli Zingaretti, Odair Aparecido Fernandes, Ana Maria Guidelli Thuller

Bibliografia

1. Sinergismo. 2. BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles"). 3 lepidópteros-praga. 4. Receptores. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.52:632.937

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: INTERAÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY1, CRY2 E VIP3 DE *Bacillus thuringiensis* NO CONTROLE DE *Anticarsia gemmatilis*, *Chrysodeixis includens* E *Spodoptera frugiperda*

AUTORA: CAMILA SOARES FIGUEIREDO

ORIENTADORA: JANETE APPARECIDA DESIDERIO

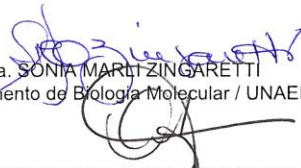
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:




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




Profa. Dra. VIVIAN BOTER BERGAMASCO
Departamento Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Araraquara, SP



Profa. Dra. SONIA MARTI ZINGARETTI
Departamento de Biologia Molecular / UNAERP - Ribeirão Preto, SP



Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. ANA MARIA GUIDELLI THULER
Departamento Engenharia Ambiental / Uniube - Uberaba, MG

Jaboticabal, 13 de fevereiro de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Camila Soares Figueiredo - nasceu em 16 de maio de 1988 em Jaboticabal - SP. Ingressou no curso de Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Câmpus de Jaboticabal em 2007, concluindo o curso de Bacharel em dezembro de 2010. Foi bolsista de iniciação científica pela agência de fomento à pesquisa FAPESP. Em 2011, iniciou o mestrado na área de Genética e Melhoramento de Plantas pela FCAV-UNESP com bolsa Fapesp e desenvolveu sua pesquisa na área de controle biológico com uso da bactéria *Bacillus thuringiensis*, utilizando no estudo ferramentas de biologia molecular. Titulou se mestre em fevereiro de 2013, e em março do mesmo iniciou o doutorado na FCAV-UNESP. Durante o doutorado, alternou entre bolsa Fapesp e Capes. Desenvolveu parte de sua pesquisa na University of Tennessee – Knoxville, USA. Email: camila_sfigueiredo@hotmail.com

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina ...”

Cora Coralina

Dedico este trabalho aos meus
pais, irmãos e amigos.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP) Câmpus de Jaboticabal pelo suporte durante a realização desta pesquisa,

Aos **professores** pertencentes ao curso de pós-graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pelas disciplinas oferecidas e ensinamentos proporcionados;

À todos **funcionários** da instituição pelo agradável convívio e auxílio prestado;

À **Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério** pela orientação, ensinamentos e confiança durante a realização deste trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela bolsa de doutorado (Processo # 2013/15128-2);

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal (**CAPES**) pela Bolsa PDSE (Processo # 99999.006204/2015-05);

Aos membros da banca de avaliação da qualificação e defesa que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho;

Aos membros do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada á Agropecuária;

Ao **Prof. Dr. Hélio José Montassier** e integrantes do Laboratório de Imunologia e Virologia FCAV-UNESP pela disponibilização de equipamentos do laboratório sempre que necessário;

Ao **Prof. Dr. Fernando José Zara** e a equipe Laboratório de Morfologia de Invertebrados da FCAV-UNESP pelo auxílio e disponibilização de equipamentos do laboratório;

Às amigas e companheiras de laboratório, organização de eventos acadêmicos e de vida **Ana Rita Nunes Lemes** e **Isis Sebastião**;

Ao **Prof. Dr. Juan Luis Jurat-Fuentes** e sua equipe pela oportunidade de realizar parte do doutorado no “laboratory Insect Physiology and Molecular Pathology – The University of Tennessee, Knoxville, USA”

À “**PhD Family da UTK**” pelo companheirismo durante o período de intercâmbio;

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado compartilhando alegrias e estimulando meu crescimento **Aline F. Silva**, **Elisabeth O. Schirato**, **Carlos H. Caprio**, **Fernanda D. Pereira** (Muja) e **Mariana M. Borzi**;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	Página iii
ABSTRACT	v

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. REFERÊNCIAS	17

CAPÍTULO 2 - MODO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS Cry1, Cry2 e Vip3 *Bacillus thuringiensis* EM *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* E *Spodoptera frugiperda*

RESUMO.....	20
1. INTRODUÇÃO	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
3. RESULTADOS	31
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES	54
6. REFERÊNCIAS	55

CAPÍTULO 3 - IDENTIFICATION OF Cry1Ac-BINDING PROTEINS IN THE MIDGUT OF *Anticarsia gemmatalis* AND *Chrysodeixis includens* LARVAE USING PROTEOMIC ANALYSIS

ABSTRACT	60
1. INTRODUCTION	61
2. MATERIAL AND METHODS	63
3. RESULTS	66
4. DISCUSSION	76
5. CONCLUSIONS	79
6. REFERENCES	80

Interação das proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda*

Resumo - Este trabalho teve como objetivo estudar a toxicidade e a interação entre proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab e Vip3Aa em lagartas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda*. Lisados das proteínas foram utilizados em bioensaios com lagartas neonatas para determinar a CL₅₀ e CL₉₀ das proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab e Vip3Aa e realizar experimentos histopatológicos. Ensaios de competição, entre as proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 biotiniladas, foram realizados com as proteínas das vesículas de membrana da microvilosidade apical do intestino médio (“Brush Border Membrane Vesicles” - BBMV) das lagartas. Foi feita a purificação de receptores para toxina Cry1Ac a partir da BBMV de *A. gemmatalis* e *C. includens* por afinidade seguida da identificação das proteínas ligantes. As toxinas Cry1A e Cry2A demonstraram maior toxicidade para *A. gemmatalis* e *C. includens* que a proteína Vip3Aa, porém o inverso foi observado em *S. frugiperda*. As lagartas da espécie *A. gemmatalis* se mostraram mais suscetíveis as proteínas testadas do que as de *S. frugiperda* e *C. includens*. As espécies diferiram também quanto ao tipo de interação entre as toxinas. Enquanto para *S. frugiperda* e *C. includens*, as interações foram sinérgicas, para *A. gemmatalis* foram predominantemente antagônicas. As proteínas se uniram aos receptores presentes nas BBMV de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *C. includens*, permitindo inferir sobre a presença e ausência de competição pelos receptores. Alterações histopatológicas como vacuolização e ruptura foram observadas no intestino de lagartas *S. frugiperda*, alimentadas com Cry1Ab e Vip3Aa e *A. gemmatalis* e *C. includens*, alimentadas com Cry1Ac e Vip3Aa. A abordagem utilizada permitiu identificar possíveis receptores para *A. gemmatalis* e *C. includens* para a toxina Cry1Ac. A combinação de proteínas Cry e Vip, além de colaborar para o manejo da resistência, podem incrementar a toxicidade por meio da ação sinérgica.

Palavras-chave: sinergismo, BBMV (“Brush Border Membrane Vesicles”), lepidópteros-praga, receptores

**INTERACTION OF PROTEINS Cry1, Cry2 AND Vip3 *Bacillus thuringiensis* IN
CONTROL OF *Anticarsia gemmatalis*, *Chrysodeixis includens* AND *Spodoptera
frugiperda***

Abstract – This work aimed to study the toxicity and interaction between Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab and Vip3Aa proteins in neonate larvae of *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens*. Lysates containing proteins were used in bioassays for the determination of LC₅₀ and LC₉₀ of the Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab and Vip3Aa proteins. Histopathological experiments were realized with *A. gemmatalis*, *C. includens* (fed with Cry1Ac and Vip3Aa) and *S. frugiperda* (fed with Cry1Ab and Vip3Aa). Competition assays, among biotinylated Cry1, Cry2 and Vip3 proteins, were performed with brush border membrane vesicles (BBMV) proteins from *A. gemmatalis*, *C. includens* and *S. frugiperda*. Purification of Cry1Ac receptors from *A. gemmatalis* and *C. includens* BBMV was performed by affinity followed by identification of binding proteins. The Cry1A and Cry2A toxins demonstrated higher toxicity to *A. gemmatalis* and *C. includens* than the Vip3Aa protein, but the inverse was observed to *S. frugiperda*. *A. gemmatalis* larvae were more susceptible as Cry and Vip proteins than as *S. frugiperda* and *C. includens*. Species differed about type of protoxins interaction. While for *S. frugiperda* and *C. includens*, the protoxins showed as synergistic interactions, for *A. gemmatalis* they were predominantly antagonistic. It was possible to infer about presence and absence of competition of the receptors in the BBMV from *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* and *C. includens*. Histopathological changes as vacuolization and disruption were observed in the intestine from *S. frugiperda* larvae, fed with Cry1Ab and Vip3Aa and *A. gemmatalis* and *C. includens*, fed with Cry1Ac and Vip3Aa. Putative receptors were identified from *A. gemmatalis* and *C. includens* to Cry1Ac toxin. The combination of Cry and Vip proteins, as well as helping to manage resistance and can increase toxicity through synergistic action.

Keywords: synergism, BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles"), lepidopteran pest, receptors

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O setor agrícola é considerado um importante impulsionador da economia brasileira, sendo assim responsável pela alta no produto interno bruto (PIB) do país. No entanto, o ataque de insetos pragas se apresenta como um dos principais entraves para a produtividade.

As lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* apresentam polifagia como uma das principais características. Assim, atacam diversas culturas importantes para o agronegócio. O uso intensivo de eventos transgênicos Bt, plantas portadoras dos genes inseticidas de *Bacillus thuringiensis*, no cultivo do milho promove a rápida seleção de populações resistentes as proteínas desta bactéria. Até o momento tem se relatos sobre populações resistentes às proteínas Cry1Ab e Cry1F e baixa suscetibilidade à Cry1Ac no Brasil (BERNARDI et al., 2014b; MONNERAT et al., 2015a; OMOTO et al., 2016).

O plantio da soja Bt, portadora do gene Cry1Ac, desde 2010 foi liberado, para controle de pragas da soja com destaque a *Chrysodeixis includens*, sendo iniciado o plantio em 2013 (CTNBio, 2017). Esta lagarta tem se mostrado menos suscetível as toxinas Cry1 e Vip3 do que as lagartas da espécie *Anticarsia gemmatalis*, dentro da perspectiva de alta dose como forma de retardar a seleção de indivíduos resistentes, esta lagarta apresenta maior potencial de quebra da suscetibilidade à Cry1Ac (BERNARDI et al., 2012; CRIALESI-LEGORI et al., 2014).

A proteína Vip3Aa, uma das proteínas inseticidas vegetativas expressas por *B. thuringiensis*, tem ainda apresentado bons resultados no controle de *S. frugiperda* (BERNARDI et al., 2014a). As proteínas da classe Vip3A interagem de forma independente de classe Cry1, sendo assim, a combinação destas classes apresenta se

como uma alternativa para retardar a resistência das populações (SENA; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; FERRÉ, 2009).

As proteínas Cry1 e Vip3 de *B. thuringiensis* apresentam modo de ação com etapas semelhantes em diversas espécies de lepidópteros-praga, mas ainda existem muitos pontos a serem elucidados principalmente para as proteínas Vip3A. Após a ingestão, as proteínas Cry1 e Vip3A passam por processamento feito por enzimas digestivas, presentes no trato intestinal das lagartas, tornando-se toxinas ativas. A composição destas enzimas pode diferir de espécie para espécie (GÓMEZ et al., 2014). Populações resistentes podem inclusive diferir das suscetíveis quanto a velocidade de ativação das toxinas (CHAKROUN et al., 2016a).

As proteínas Cry1 e Vip3Aa, antes da ativação, apresentam 135 kDa e 88,5 kDa respectivamente, após a clivagem, as proteínas têm uma redução no tamanho devido à perda de aminoácidos, resultando em toxinas ativas de 60–70 kDa. A ativação permite que as proteínas Cry realizem interações com caderinas (CAD) e passem por uma clivagem que facilita o processo de oligomerização destas toxinas (GÓMEZ et al., 2014). Uma vez formados, os oligômeros, a afinidade das proteínas Cry para com os receptores APN (aminopeptidases) e ALP (fosfatases alcalinas) é significativamente aumentada e esta etapa tem se mostrado importante para ação inseticida (PORTUGAL et al., 2014). Até o momento, somente foram relatados receptores putativos para as proteínas Vip3Aa (ABDELKEFI-MERASTI et al., 2011; BERGAMASCO et al., 2013).

Após as proteínas Cry1 e Vip3 ligarem-se aos receptores presentes nas membranas das células intestinais de insetos suscetíveis e formarem poros na membrana, causam uma progressiva degeneração da camada epitelial, devido à formação de canais iônicos e por conseguinte desequilíbrio osmótico. Esses processos têm como consequência a parada alimentar e/ou septicemia (quando existe a presença de esporos), levando as larvas à morte (LEE; MILES; CHEN, 2006; KNAAK et al., 2010; ABDELKEFI-MERASTI et al., 2011). Os receptores para as proteínas podem ser diferentes de acordo com as espécies de lepidópteros estudadas (BERGAMASCO et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS

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 Invertebrate Pathology**, v. 106, p.250-254, 2011a.

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 Invertebrate Pathology**, v. 107, 198–201, 2011b.

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, p. 15–19, 2009.

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, p. 12497-12503, 2010.

ALDIN, E.; LUIZ, L.; LOURENCAO, A. L.; SCHLICK-SOUZA, E. C. Outbreaks of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in common bean and castor bean in São Paulo State, Brazil. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p.458-461, 2014

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxin**, v. 6, p.1222-1243, 2014.

BENFARHAT-TOUZRI, D., SAADAOU, M., ABDELKEFI-MESRATI, L., SAADAOU, I., AZZOUZ, H., TOUNSI, S. Histopathological effects and determination of the putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Da toxin in *Spodoptera littoralis* midgut. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 2, p.142-145, 2013.

BERGAMASCO, V. B.; GONÇALVES, J. F.; POLANCZYK, R. A.; DESIDÉRIO, J. A.; LEMOS, M. V. F. Expression of a new *Bacillus thuringiensis cry1Ia* gene in *Escherichia coli* with strong activity against cotton pests. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n.12, p. 526– 533, 2011.

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

BERNARDI, O.; MALVESTITI, G. S.; DOURADO, P. M.; OLIVEIRA, W. S.; MARTINELLI, S.; BERGER, G. U. *et al.*, Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 xMON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1083–109, 2012.

BERNARDI, O.; AMADO, D.; SOUSA, R. S.; SEGATTI, F.; FATORETTO, J.' BURD, A. D.; OMOTO, C. Baseline susceptibility and monitoring of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, 2014, v. 107, n. 2, p. 781-90, 2014a.

BERNARDI, O.; SORGATTO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, v. 58, p. 33-40, 2014b.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; MENDOZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN., M. **Different Models of the Mode of Action of Bt 3d-Cry Toxins**. In: Soberón M, Gao Y, Bravo A, eds. Bt resistance—characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Boston: CABI biotechnology, 2015, p. 138-149.

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

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

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; WALSH, T.; DOWNES, S.; JAMES, B.; FERRÉ, J. Characterization of the resistance to Vip3Aa in *Helicoverpa armigera* from Australia and the role of midgut processing and receptor binding. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24311, 2016a.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329 –350, 2016b

CHANKHAMHAENGDECHA, T. S.; TANTICHODOK, A.; PANBANGRED, W. Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SP41 against *Spodoptera exigua*. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. 122-128, 2008.

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, p.79-87, 2014.

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**, v. 62, n. 3, p. 807–813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em <http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html>. Acessado dia 30 de novembro de 2016.

CRUZ, I.; OLIVEIRA, L. J; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C. A. Efeito do nível de saturação de alumínio em solo ácido sobre os danos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em milho. **Annals of the Entomological Society of Brazil**, v. 25, p. 293-297, 1996.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle Biológico da lagarta-do-cartucho do milho, utilizando o parasitóide de ovos *Spodoptera frugiperda*, *Trichogramma pretiosum*. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, 2004, 4p. (Comunicado técnico/ Embrapa Milho e Sorgo, ISSN0101-5605, n. 98).

CTNBio (2017) Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Disponível em :<http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial//document_library_display/SqhWdohU4BvU/view/1684467#/liberacaocomercial/consultar-processo>. Acesso em: Janeiro de 2017).

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, p. 9-13, 1999.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 40, p. 193-199, 2001.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

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

FIGUEIREDO, C. S.; MARUCCI, S. C.; TEZZA, R. I. D.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Caracterização do gene *vip3A* e toxicidade da proteína Vip3Aa50 á lagarta-do-cartucho e á lagarta-da-soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1220–1227, 2013.

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

GLARE, T. R; O` CALLAGHAN, M. ***Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety***. Chichester: John Wiley, 2000. 350 p.

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

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

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. European **Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 3127–3135, 2004.

JURAT-FUENTES, J. L.; KARUMBIAIAH, L.; JAKKA, S. R. K.; NING, C.; LIU, C.; WU, K.; JACKSON, J.; GOULD, F.; BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; PERERA, O. P.; ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS ONE**, v.6, e17606, 2011.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.196-200, 2005.

KNAAK, N., FRANZ, A. R., SANTOS, G. F. AND FIUZA, L. M. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 677-684, 2010.

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

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 d-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4648–4657, 2003.

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

LEMES A. R. N.; DAVOLOS, C. C.; CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; FERNANDES, O. A.; FERRÉ, J.; LEMOS, M. V. F.; DESIDERIO, J. A. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, v.9, e107196, 2014

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE et al. ***Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide**: theory and practice. Chichester: John Wiley, 1993. p. 37-70.

LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of cry1 gene contents of Bt strains by use of DNA microarrays **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5391-5398, 2005.

LI, H.; SHU, C.; HE, X.; GAO, J.; LIU, R.; HUANG, D.. Detection and identification of vegetative insecticidal proteins vip3 genes of *Bacillus thuringiensis* strains using polymerase chain reaction-high resolution melt analysis. **Current Microbiology**, v. 64, p. 463–468, 2012.

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

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA L.; SOARES, C. M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A.e Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2015a.

MONNERAT, R., MARTINS., E., QUEIROZ, P., PRAÇA, L., SOARES., C. M. 2015. **Insect Resistance to Bt toxins in Brazil and Latin America**. In: Soberón M, Gao Y, Bravo A, eds. Bt resistance—characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Boston: CABI biotechnology. 138-149.

RICIETTO, A. P.; GOMIS-CEBOLLA, J.; VILAS-BÔAS, G. T.; Ferré, J. Susceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 141, p.1-5, 2016.

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**, v. 21, n. 9, p. 937–946, 2011.

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

SMITS, P. H. Insect pathogens: their suitability as biopesticides, In: EVANS, H. F. (Ed.). **Microbial insecticides: novelty or necessity?** Nottingham: Major Design & Production, p. 21-28, 1997.

SOBERÓN, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p.1337-1349, 2009.

SONG, F.; CHEN, C.; WU, S.; SHAO, E.; LI, M.; GUAN, X.; HUANG, Z. Transcriptional profiling analysis of *Spodoptera litura* larvae challenged with Vip3Aa toxin and possible involvement of trypsin in the toxin activation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23861, 2016.

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**, v. 103, p.1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

TANAKA, S.; MIYAMOTO, K.; NODA, H.; ENDO, H.; KIKUTA, S.; SATO, R. Single amino acid insertions in extracellular loop 2 of *Bombyx mori* ABCC2 disrupt its receptor

function for *Bacillus thuringiensis* Cry1A band Cry1Ac but not Cry1Aa toxins. **Peptides**, v. 78, p.99–108, 2016.

VARANI, A. M.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, C. C.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, E. C. C.; DESIDÉRIO, J. A. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* strain T01-328, a Brazilian isolate that produces a soluble pesticide protein Cry1Ia. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, e00817-13, 2013.

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

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRINKO, N. B.; TAUSSIG, R.; BULLA, L. A. 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.

WARREN G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: Carozzi NB, Koziel M (eds) **Advances in insect control, the role of transgenic plants**. Taylors & Francis Ltd, London, p. 109–121, 1997

YU, X.; ZHENG, A.; ZHU, J.; WANG, S.; WANG, L.; DENG, Q.; LI, S.; LIU, H.; LI, P. Characterization of Vegetative Insecticidal Protein *vip* genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. **Current Microbiology**, v. 62, p. 752–757, 2011.

WEISER, J. (1986) **Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union**. In: Krieg, A. and Huger, A.M. (eds) *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft BerlinDahlem Heft 233*. Paul Parey, Berlin, p. 37–50

5. CONCLUSÕES

- Este estudo demonstra a eficiência das proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab e Vip3Aa no controle de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*.
- As proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry2Ab são mais tóxicas para *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* que a proteína Vip3Aa.
- As combinações Cry1Ab/Cry1Ac, Cry2Ab/Cry1Ac e Cry1Ac/Cry2Aa concorrem por receptores da BBMV de *Anticarsia gemmatalis*, portanto, não são indicadas para o manejo da resistência;
- A combinação Vip3Aa+Cry2Aa foi a mais promissora no controle de *Anticarsia gemmatalis* pelo sinergismo e ausência de competição por receptores apresentados pelas proteínas;
- As proteínas Cry1Ac, Cry2Aa e Vip3Aa apresentaram sinergismo e não competiram pelos receptores, indicando serem benéficas ao manejo da resistência de *Chrysodeixis includens*.
- As proteínas Vip3Aa e Cry2Ab foram mais tóxicas que Cry1Ab, Cry1Ea, Cry1Ca e Vip3Ca para lagartas de *Spodoptera frugiperda*.
- As proteínas Cry1Ac e Cry2Aa apresentam toxicidade contra lagartas de *Spodoptera frugiperda*.
- As proteínas Cry1Ab, Cry2Ab e Vip3Aa apresentaram sinergismo e não competiram pelos receptores, indicando serem benéficas ao manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda*.
- As proteínas Cry1Ea, Cry1Ca e Vip3Ca apresentaram sinergismo em bioensaios contra *Spodoptera frugiperda*.
- Cry1Ab e Vip3 causam prejuízos ao epitélio intestinal de *Spodoptera frugiperda*.
- Cry1Ac e Vip3 causam prejuízos ao epitélio intestinal de *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*.

6. REFERÊNCIAS

BENFARHAT-TOUZRI, D.; SAADAOU, M.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; SAADAOU, I.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S. Histopathological effects and determination of the putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Da toxin in *Spodoptera littoralis* midgut. **Journal Invertebrate Pathology**, v. 112, n. 2, p. 142-145, 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, p. 152–158, 2013.

BERNARDI, O.; AMADO, D.; SOUSA, R. S.; SEGATTI, F.; FATORETTO, J.; BURD, A. D.; OMOTO, C. Baseline susceptibility and monitoring of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p.781-90, 2014a.

BERNARDI, O.; SORGATTO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, v. 58, p. 33-40, 2014b.

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

CARRIERE, Y.; FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? **Trends in Biotechnology**, v. 34, p. 291–302, 2016.

CHANKHAMHAENGDECHA, T. S.; TANTICHODOK, A.; PANBANGRED, W. Spore stage expression of a vegetative insecticidal gene increase toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* SP41 against *Spodoptera exigua*. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. 122-128, 2008.

CHEN, L. Z.; LIANG, G. M.; ZHANG, J.; WU, K. M.; GUO, Y. Y. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hu"bner). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 3, 61–73, 2010a.

CHEN, Y.; TIAN, J. C.; SHEN, Z. C.; PENG, Y. F.; HU, C.; GUO, Y. Y.; YE, G. Y. Transgenic rice plants expressing a fused protein of Cry1Ab/Vip3H has resistance to rice stem borers under laboratory and field conditions. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1444-1453, 2010b.

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, p. 79-87, 2014.

ESCUADERO, R. I.; BANYULS, N.; BEL, Y.; MAEZTU, M.; ESCRICHE, B.; MUÑOZ, D.; CABALLERO, P.; FERRÉ, J.. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, p. 51–55, 2014.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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.; SHEM Z. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 956–961, 2007.

FIGUEIREDO, C. S.; MARUCCI, S. C.; TEZZA, R. I. D.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Caracterização do gene vip3A e toxicidade da proteína Vip3Aa50 á lagarta-do-cartucho e á lagarta-da-soja. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1220–1227, 2013.

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

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, p. 3182–3188, 2011.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; VAN RIE, J.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Shared midgut binding sites for Cry1A.105, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac and Cry1Fa proteins from *Bacillus thuringiensis* in two important corn pests, *Ostrinia nubilalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, e68164, 2013.

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

HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; BERNARDI, O.; MALAQUIAS, J.B.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; AMARAL, F. S.A.; OMOTO, C. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34864, 2016.

JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; MUÑOZ-GARAY, C.; GÓMEZ, I.; SAAB-RINCON, G.; DAMIAN-ALMAZO, J. Y.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M.; BRAVO A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21222–21229, 2007.

KNAAK, N.; FRANZ, A. R.; SANTOS, G. F.; FIUZA, L. M. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 677-684, 2010.

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

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

LEMES A. R. N.; DAVOLOS, C. C.; CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; FERNANDES, O. A.; FERRÉ, J.; LEMOS, M. V. F.; DESIDERIO, J. A. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS ONE**, v.9, e107196, 2014.

LEMES, A. N.; FIGUEIREDO, C. S.; SEBASTIÃO, I.; SILVA, L. M.; ALVES, R. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDÉRIO, J. A. Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ**, v. 5, e2866, 2017.

LIMA, G. M. S.; AGUIAR, R. W. S.; CORRÊA, R. F. T.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M.; NAGATA, T; DE-SOUZA, M. T.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO B. M. Cry2A toxins from *Bacillus thuringiensis* expressed in insect cells are toxic to two lepidopteran insects. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 2941-2948, 2008.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA L.; SOARES, C. M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2015a.

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

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, É. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. de S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 11-16, 2004.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M. ; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727–1736, 2016.

RUIZ, L. M.; SEGURA, C.; TRUJILLO, J.; ORDUZ, S. In vivo binding of the Cry11Bb toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. medellin to the midgut of mosquito larvae (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p. 73–79, 2004.

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

TABASHNIK, B. E. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, n. 10, p. 3343–3346, 1992.

VARANI, A. M.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, C. C.; LEMOS, E. G. M.; ALVES, E. C. C.; DESIDÉRIO, J. A. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* strain T01-328, a Brazilian isolate that produces a soluble pesticide protein Cry1Ia. **Genome Announcements**, v. 1, n. 5, e00817-13, 2013.

WOLFERSBERGER, M.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, F. V.; GIORDANA, B.; HANOZET, M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 301-308, 1987.

ZHOU, Z.; WANG, Z.; LIU, Y.; LIANG, G.; SHU, C.; SONG, F.; ZHOU, X.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; ZHANG, J. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. **Microbiology Open**, v. 5, n. 4, p. 659–669, 2016

5. CONCLUSIONS

It is first time that putative receptors were identified from *A. gemmatalis* and *C. includens* BBMV. This information contributes to understand the mechanism of action of Cry1Ac in the most relevant lepidopteran pests of soybeans.

6. REFERENCES

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, 12497–12503, 2010.

ATSUMI, S.; MIYAMATO, K.; YAMAMOTO, K.; NARUKAWA, J.; KAWAI, S. et al. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, p. 1591–1598, 2012.

BAYYAREDDY, K.; ANDACHT, T. M.; ABDULLAH, M. A.; ADANG, M. J. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 279-86, 2009.

BAXTER, S. W.; BADENES-PERÉZ, F. R.; MORRISON, A.; VOGEL, H.; Crickmore, N.; KAIN, W.; WANG, P.; HECKEL, D. G.; JIGGINS, C. D.. Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. **Genetics**, v.189, p. 675–679, 2011.

BERNARDI O, MALVESTITI GS, DOURADO PM, OLIVEIRA WS, MARTINELLI S, BERGER GU *et al.*, Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 xMON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 68, p.1083–109, 2012.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA. R. ZHUANG, M., GIL, L S. S., SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab poreforming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1667, p. 38–46, 2004.

CACCIA, S.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. S.; MAHON, R. J.; DOWNES, S.; JAMES, W.; BAUTSOENS, N. L. 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, n. 4, e9975, 2010.

CANCINO-RODEZNO, A., LOZANO, L., OPPERT, C., CASTRO, J. I., LANZ-MENDOZA, H., ENCARNACIÓN, S, EVANS, A. E., GILL, S. S., SOBERÓN, M., JURAT-FUENTES, J. L., BRAVO, A. Comparative Proteomic Analysis of *Aedes aegypti* Larval Midgut after Intoxication with Cry11Aa Toxin from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS One**, v. 7, n. 5, e37034, 2012.

CANDAS, M.; LOSEVA, O.; OPPERT, B.; KOSARAJU, P.; BULLA, L. A.; JR. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*: alterations in the Indianmeal moth larval gut proteome. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, p. 19-28, 2003.

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, p. 79-87, 2014.

CHEN, L. Z.; LIANG, G. M.; ZHANG, J.; WU, K. M.; GUO, Y. Y. Proteomic analysis of novel Cry1Ac binding proteins in *Helicoverpa armigera* (Hu"bner). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 3, p. 61–73, 2010.

DANIEL, A.; SANGADALA, S.; DEAN, D. H.; ADANG, M. J. Denaturation of either *Manduca sexta* aminoapeptidase N or *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins exposes binding epitopes hidden under nondenaturing conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2106-2112, 2002.

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, p. 898–903, 2011.

FABRICK, J. A.; MATHEW, L. G.; TABASHNIK, B. E.; LI, X. Insertion of an intact CR1 retrotransposon in a cadherin gene linked with Bt resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella*. **Insect Molecular Biology**, v. 20, p. 651–665, 2011

FERREIRA, C.; CAPELLA, A. N.; SITNIK, R.; TERRA, W. R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 107, p. 631–640, 1994.

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

GAI Z.; ZHANG, X.; WANG, X.; PENG, J.; LI, Y.; LIU, K.; HONG, H. Differential proteomic analysis of *Trichoplusia ni* cells after continuous selection with activated Cry1Ac toxin. **Cytotechnology**, v. 65, n. 3, p. 425-35, 2013.

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.

GAHAN, L. J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 12, e1001248, 2010.

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

GUO, Z.; KANG, S.; CHEN, D.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHU, X.; BAXTER, S. W.; ZHOU, X.; JURAT-FUENTES, J. L.; ZHANG, Y. MAPK signaling pathway alters expression of midgut ALP and ABCC genes and causes resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in diamondback moth. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 4, e1005124, 2015.

GUO, Z.; KANG, S.; ZHU, X.; XIA, J.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHANG, Y. Down regulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 59, p. 30-40, 2015a.

GUO, Z.; KANG, S.; ZHU, X.; XIA, J.; WU, Q.; WANG, S.; XIE, W.; ZHANG, Y. The novel ABC transporter ABCH1 is a potential target for RNAi based insect pest control and resistance management. **Scientific Reports**, p. 5, p.13728, 2015b.

HECKEL, D. G. Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, p.103–110, 2012.

HECKEL, D. G. (2015) **Roles of ABC Proteins in the Mechanism and Management of Bt Resistance**. In: Soberón M, Gao Y, Bravo A, eds. Bt resistance—characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins. Boston: CABI biotechnology, p138-149.

JAKKA, S. R.; GONG, L.; HASLER, J.; BANERJEE, R.; SHEETS, J. J.; NARVA, K.; BLANCO, C. A.; JURAT-FUENTES J. L. Field-Evolved Mode 1 Resistance of the Fall Armyworm to Transgenic Cry1Fa-Expressing Corn Associated with Reduced Cry1Fa Toxin Binding and Midgut Alkaline Phosphatase Expression. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 1023-34, 2015.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. A proteomic approach to study Cry1Ac binding proteins and their alterations in resistant *Heliothis virescens* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 95, p.187–191, 2007.

JURAT-FUENTES, J. L.; KARUMBIAIAH, L.; JAKKA, S. R. K.; NING, C.; LIU, C.; WU, K.; JACKSON, J.; GOULD, F.; BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; PERERA, O. P., ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS ONE**. 6, 2011.

KHAJURIA, C., BUSCHMAN, L. L., CHEN, M.-S., SIEGFRIED, B. D., ZHU, K.Y. Identification of a novel aminopeptidase P-like gene (*OnAPP*) possibly involved in Bt toxicity and resistance in a major corn pest (*Ostrinia nubilalis*). **PLoS ONE**, v. 6, n.8, 2011.

KRISHNAMOORTHY, M.; JURAT-FUENTES, J. L.; MCNALL, R. J.; ANDACHT, T.; ADANG, M. J., Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, p. 189-201, 2007.

MONNERAT, R. et al. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to

Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2015.

MCNALL, R. J., ADANG, M. J. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 999-1010, 2003.

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

PORTUGAL, L.; GRINGORTEN, J. L.; CAPUTO, G. F.; SOBERÓN, M.; MUÑOZ-GARAY, C.; BRAVO, A. Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. **Peptides**, v. 53, p. 292–299, 2014.

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**, v. 103, p.1031-1038, 2010.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

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

TANAKA, S., MIYAMOTO, K., NODA, H., JURAT-FUENTES, J.L., YOSHIZAWA, Y. et al. The ATP-binding cassette transporter subfamily C member 2 in *Bombyx mori* larvae is a functional receptor for Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **The FEBS Journal**, v. 280, p. 1782–1794, 2013.

TIEWSIRI, K., WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p.14037–14042, 2011.

ZHOU, Z., WANG, Z., LIU, Y., LIANG, G., SHU, C., SONG, F., ZHOU, X., BRAVO, A., SOBERÓN, M., ZHANG, J. Identification of ABCC2 as a binding protein of Cry1Ac on brush border membrane vesicles from *Helicoverpa armigera* by an improved pull-down assay. **Microbiology Open**, v. 5, n. 4, p. 659–669, 2016

XU, L., FERRY, N., WANG, Z. et al. A proteomic approach to study the mechanism of tolerance to Bt toxins in *Ostrinia furnacalis* larvae selected for resistance to Cry1Ab **Transgenic Research**, v. 22, p. 1155–1166, 2013.

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

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

YANO, S. A. C., SPECHT, A., MOSCARDI, F., CARVALHO, R. A., DOURADO, P. M., MARTINELLI, S., HEAD, G. P., SOSA-GÓMEZ, D. R. High susceptibility and low resistance allele frequency of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to Cry1Ac in Brazil. **Pest Management Science**, v.72, p.1578–1584, 2016.