

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PROTEÍNAS
PRODUZIDAS EM SISTEMA HETERÓLOGO SOBRE
Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
Crambidae)**

Carolina Veluci Brondi
Engenheira Agrônoma

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PROTEÍNAS
PRODUZIDAS EM SISTEMA HETERÓLOGO SOBRE
Diatraea saccharalis (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
Crambidae)**

Discente: Carolina Veluci Brondi

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi

Coorientadora: Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

2022

B869a	Brondi, Carolina Veluci Avaliação da toxicidade de proteínas produzidas em sistema heterólogo sobre <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) / Carolina Veluci Brondi. -- Jaboticabal, 2023 30 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi Coorientadora: Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza 1. Biotecnologia. 2. Toxinas inseticidas. 3. Manejo da Resistência de Insetos. 4. Broca-da-cana. 5. Cana-de-açúcar. I. Título.
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PROTEÍNAS PRODUZIDAS EM SISTEMA HETERÓLOGO SOBRE *Diatrea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

AUTORA: CAROLINA VELUCI BRONDI

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

COORIENTADORA: SILVANA APARECIDA CRESTE DIAS DE SOUZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



Profa. Dra. GREICE LUBINI (Participação Virtual)
FFCLRP/USP / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. NILZA MARIA MARTINELLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 14 de dezembro de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Carolina Veluci Brondi - Natural de Ribeirão Preto, SP, nascida dia 01 de julho de 1991, filha de Sérgio Brondi e Maria Silvia Veluci Brondi. Engenheira Agrônoma graduada no ano de 2016 pelo Centro Universitário Moura Lacerda, Ribeirão Preto-SP com bolsa de estudos concedida pelo Programa Universidade Para Todos (Prouni). Durante toda a graduação, participou do Grupo de extensão e pesquisa sobre controle biológico de pragas (Gbio) sob orientação do Prof. Dr. Alexandre de Sene Pinto. Realizou o estágio obrigatório de conclusão de curso na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)-Pecuária Sudeste na área de Entomologia Aplicada sob supervisão do Pesquisador Dr. Marcos Rafael Gusmão. Em 2018, realizou treinamento técnico no Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) na área de Biotecnologia Vegetal sob supervisão da Pesquisadora Dra. Silvana Creste. No segundo semestre de 2019, ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi e coorientação da Dra. Silvana Creste, sendo bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Email: carolinavelucib@gmail.com

*“Coragem não significa destemor, mas a
capacidade de encarar o desconhecido apesar de
todos os medos”*

Osho

Aos meus pais, Sérgio Brondi e Maria Silvia
Veluci Brondi, por todo amor, apoio e incentivo em
todos os dias da minha vida.

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me concedido disposição, saúde, força de vontade e sabedoria para chegar até aqui. Ele nunca me desamparou e me cercou de anjos da guarda visíveis e invisíveis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo: 134357/2019-1) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), por tanto aprendizado e crescimento.

Gratidão ao meu orientador, Professor Dr. Guilherme Duarte Rossi, pelo constante incentivo, apoio, direcionamento e encorajamento. Agradeço a confiança em mim depositada e a oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Gratidão à minha coorientadora e fonte de inspiração, Dra. Silvana Aparecida Creste Dias de Souza, por toda disposição, carinho, apoio e solicitude. Quanta sabedoria e generosidade concentradas em uma mulher linda e empoderada.

À Dra. Andressa Peres Bini, pelo auxílio, aprendizado, paciência e por contribuir no meu desenvolvimento profissional.

Ao Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), por toda estrutura fornecida para a realização desse trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Cana-IAC, em especial minha amiga-irmã, Marina Carnaz Serra Duarte, um presente que Deus colocou em meu caminho. Muito obrigada pelos muitos momentos de apoio, trocas, conhecimentos, descontração e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Insetos Ma. Ana Letícia Zero dos Santos, Dr. Ciro Pedro Guidotti Pinto e Ma. Sandy Sousa Fonseca por me auxiliarem sempre que precisei e pela amizade.

Às amigas que cultivei em Jaboticabal e que vou levar para vida inteira: Franciele Cristina da Silva e Sabrina Juvenal de Oliveira, obrigada pelo companheirismo e carinho de sempre.

Aos Professores Dra. Nilza Maria Martinelli e Dr. Daniel Júnior de Andrade, pela participação e colaboração no Exame Geral de Qualificação.

À Profa. Dra. Maria Helena de Souza Goldman, pelo fornecimento da cepa BL21 (DE3)-*CodonPlus*-RP utilizada nesse trabalho.

À Bióloga Josy Aparecida dos Santos pelo fornecimento de posturas de *Diatraea saccharalis* utilizadas nas investigações realizadas na presente dissertação.

Minha eterna gratidão à minha família, meus pais e minha irmã, por todo amor incondicional, carinho, respeito, confiança e admiração que sempre demonstraram por mim. Eles me incentivam diariamente a ser uma pessoa melhor e correr atrás de meus sonhos.

Aos meus sobrinhos, João Gabriel e José Miguel, que tem poderes mágicos, onde apenas com um sorriso me fizeram esquecer todas as ansiedade e angústias que me afligiam. Ensinam-me todos os dias sobre simplicidade, sinceridade, pureza e amor genuíno.

Ao meu namorado Saulo, por todo amor, carinho, paciência e por acreditar em mim até mesmo quando eu não acreditei.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. <i>Diatraea saccharalis</i> e seu manejo em cultivos de cana-de-açúcar.....	3
2.2. Produção de proteínas inseticidas para o manejo da broca-da-cana.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1. Síntese de genes e clonagem em plasmídeo de expressão.....	6
3.2. Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	6
3.3. Transformação de <i>E. coli</i> por eletroporação com os plasmídeos pET24a_Vip3Aa20 e pET24a_CfCBD.....	7
3.4. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	8
3.5. Produção das proteínas recombinantes Vip3Aa20 e CfCDB.....	8
3.6. Análise da expressão das proteínas em gel de poliacrilamida.....	9
3.7. Purificação, filtração e quantificação das proteínas recombinantes.....	10
3.8. Bioensaios de ingestão das proteínas recombinantes pela broca-da-cana....	11
3.9. Dissecção de intestinos e obtenção do extrato enzimático do epitélio do intestino médio e do conteúdo da membrana peritrófica da broca-da-cana.....	12
3.10. Hidrólise de Vip3Aa20 pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana.....	13
3.11. Hidrólise do peptídeo não identificado de <i>E. coli</i> pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana.....	13
3.12. Ligação do peptídeo não identificado de <i>E. coli</i> à quitina coloidal e à membrana peritrófica da broca-da-cana.....	14
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Produção das toxinas Vip3Aa20 e do peptídeo CfCBD.....	15
4.2. Purificação de Vip3Aa20 e do peptídeo não identificado de <i>E. coli</i>	17
4.3. Atividade inseticida de Vip3Aa20 sobre lagartas da broca-da-cana.....	19
4.4. Hidrólise de Vip3Aa20 com o conteúdo intestinal da broca-da-cana.....	19
4.5. Atividade inseticida do peptídeo não identificado de <i>E. coli</i> sobre lagartas da broca-da-cana.....	20
4.5. Hidrólise do peptídeo não identificado de <i>E. coli</i> pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana.....	21
4.6. Ligação do peptídeo não identificado de <i>E. coli</i> à quitina coloidal e à membrana peritrófica da broca-da-cana.....	22
5. DISCUSSÃO	23
6. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS.....	26

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PROTEÍNAS PRODUZIDAS EM SISTEMA
HETERÓLOGO SOBRE *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera:
Crambidae)**

RESUMO – O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Entre os fatores que prejudicam a produtividade do cultivo de cana-de-açúcar no País, destaca-se a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). O manejo da broca-da-cana no Brasil é realizado por meio da utilização de produtos químicos e biológicos e, mais recentemente, pela adoção de plantas transgênicas com resistência à broca-da-cana. Considerando as limitações e questões negativas associadas aos tipos de métodos de controle citados, como a evolução da resistência de populações da broca-da-cana às plantas transgênicas atualmente disponíveis, o conhecimento sobre novas proteínas com atividade inseticida abre caminho para o desenvolvimento de novas plantas transgênicas com modos de ação distintos. O presente trabalho foi realizado para avaliação de duas proteínas com possível atividade inseticida sobre a broca-da-cana. A toxina Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 foi escolhida por sua notável atividade inseticida sobre lepidópteros pragas. A outra proteína escolhida foi o peptídeo CfCBD derivado do parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) que apresenta um domínio ligante em quitina comumente associado a toxinas com atividade inseticida. A toxina Vip3Aa20 foi produzida, purificada e avaliada em bioensaios de alimentação utilizando folhas de cana-de-açúcar e dieta artificial como substratos alimentares. Não foi possível observar mortalidade significativa da broca-da-cana ao ingerir Vip3Aa20 nas concentrações de 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ng.cm⁻². A ativação da toxina Vip3Aa20 pelo conteúdo do intestino da broca-da-cana foi incompleta. O peptídeo CfCBD não foi produzido e, por equívoco, um peptídeo não identificado de *E. coli* foi purificado e avaliado em bioensaios de alimentação utilizando folhas de cana-de-açúcar como substrato alimentar. Valores de mortalidade de 100% da broca-da-cana foram observados após ingestão desse peptídeo na concentração de 6.400 ng.cm⁻². Porém, foi verificado que esse peptídeo não apresenta estabilidade e é completamente hidrolisado pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana, fato que provavelmente está associado à alta concentração necessária para esse peptídeo causar mortalidade nas lagartas. Os resultados obtidos na presente dissertação auxiliam o desenvolvimento de toxinas proteicas para o controle da broca-da-cana.

Palavras-chave: controle de pragas; biotecnologia, toxinas inseticidas, manejo da resistência de insetos; broca-da-cana; cana-de-açúcar.

INSECTICIDAL EVALUATION OF PROTEINS PRODUCED IN HETEROLOGOUS SYSTEM OVER *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)

ABSTRACT - Brazil is the largest producer of sugarcane in the world. The sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), is highlighted among the pests that reduce the productivity of sugarcane. In Brazil, sugarcane borer is controlled by the use of chemical and biological agents, and, more recently, by the adoption of transgenic plants resistant to the sugarcane borer. Considering the limitation and negative issues associated with each control tactic currently in use, such as the evolution of resistance in populations of sugarcane borer exposed to transgenic plants, the discovery of novel proteins with distinct modes of action for pest control would pave the way for the development of novel transgenic plants. The goal of the current work was to assess two proteins putatively lethal to the sugarcane borer. Vip3Aa20 derived from *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 was selected given its remarkable insecticidal effectiveness against lepidopteran pests. The other selected protein was the CfCBD peptide derived from the parasitoid *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) which contains a chitin binding domain frequently associated with insecticidal activity over lepidopteran larvae. Vip3Aa20 toxin was produced, purified, and applied in bioassays using sugarcane leaves or artificial diet as feeding substrates. No mortality was observed for the sugarcane borer exposed to Vip3Aa20 at 30, 60, 120, 240, 480, and 960 ng.cm⁻². An incomplete activation of Vip3Aa20 by the midgut juice of the sugarcane borer was observed. A non-identified peptide from *E. coli* was erroneously purified instead of the CfCBD. This peptide was tested using sugarcane leaves as feeding substrate and the sugarcane borer experienced a 100% mortality rate after ingesting this peptide at a concentration of 6,400 ng.cm⁻². However, it was shown that this peptide lacks stability and was entirely digested by the midgut juice of the sugarcane borer, which is probably associated with the high concentration of this peptide required to result in larval mortality. The findings of the current dissertation aid in the development of proteins to be used for the control the sugarcane borer.

Keywords: pest control; biotechnology, insecticidal toxins, insect resistance management; sugarcane borer; sugarcane.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil lidera o ranking mundial na produção de cana-de-açúcar e apresenta uma estimativa de produção de 572,9 milhões de toneladas de cana crua na safra 2022/2023 (Conab, 2022). Uma das principais pragas responsáveis por reduções na produtividade da cana-de-açúcar no Brasil é a broca-da-cana *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011; Dinardo-Miranda et al., 2013; Ferreira et al., 2018; Wilson et al., 2022). Os prejuízos provocados pela broca-da-cana sobre plantas de cana-de-açúcar podem ser diretos, representados pela formação das galerias no colmo da planta, ou indiretos, causados pela infestação de doenças provocadas por fungos fitopatogênicos oportunistas após abertura das galerias pelas lagartas (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011).

O controle da broca-da-cana pode ser realizado com a utilização de inseticidas químicos (Wilson et al., 2022), controle biológico por meio da liberação de parasitoides (Parra e Coelho Jr., 2019; Camarozano et al., 2021; Parra e Coelho Jr., 2022) ou utilização de plantas transgênicas (Cristofolleti et al., 2018; Dessoky et al., 2021). Apesar de apresentarem eficiência, todos os métodos de controle também apresentam desvantagens.

As desvantagens do controle químico são dadas pelo potencial impacto ambiental de inseticidas não seletivos, pela baixa eficiência dos inseticidas em função do hábito endofítico da broca-da-cana e/ou pela evolução da resistência da broca-da-cana aos inseticidas (Wilson et al., 2022). As desvantagens da utilização do controle biológico são dadas, muitas vezes, pela indisponibilidade dos agentes de controle biológico para manejo da praga em toda área cultivada com cana-de-açúcar bem como pela eficiência variável dos inimigos naturais em função das condições ambientais (Parra e Coelho Jr., 2019; Camarozano et al., 2021). Finalmente, plantas transgênicas resistentes à broca-da-cana não podem ser consideradas uma solução definitiva em função do risco de desenvolvimento da resistência em populações da broca-da-cana às plantas transgênicas e consequente redução da capacidade de controle (Ghimire et al., 2011).

Diante das desvantagens dos métodos de controle atualmente disponíveis, faz-se necessária a continuidade de pesquisas para obtenção de novos métodos de

controle que sejam complementares aos métodos existentes para o controle da broca-da-cana. Atualmente, plantas transgênicas de cana-de-açúcar com aprovação comercial para cultivo no Brasil expressam as toxinas Cry1Ab ou Cry1Ac do microrganismo *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 para o manejo da broca-da-cana (CTNBio, 2022). De modo a reforçar as estratégias de controle da broca-da-cana baseadas em plantas transgênicas que expressam toxinas, uma opção para continuidade de pesquisas é a identificação de novas toxinas proteicas para posterior incorporação dessas toxinas em novos eventos transgênicos de cana-de-açúcar, especialmente toxinas com modos de ação distintos dos utilizados comercialmente (Carrière et al., 2016).

Nesse cenário, as toxinas Vip3Aa de *B. thuringiensis* são apresentadas como uma possível alternativa para complementar o manejo da broca-da-cana. As toxinas Vip3Aa (Vip, do inglês *Vegetative insecticidal protein*) são produzidas por cepas específicas do microrganismo entomopatogênico *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de seu desenvolvimento (Estruch et al., 1996; Chakraborty et al., 2016a). As toxinas Vip3Aa ativas sobre lepidópteros apresentam modo de ação distinto das toxinas Cry1A (Chakraborty et al., 2020) e têm sido úteis para o controle de populações de lepidópteros pragas resistentes às toxinas Cry1A (Wei et al., 2017).

Outra fonte de moléculas bioativas com atividade inseticida ainda não explorada comercialmente são os insetos parasitoides (Beckage e Gelman, 2004; Rossi et al., 2012). O potencial inseticida das moléculas produzidas pelos parasitoides é dado pela extensa diversidade de fatores parasíticos que atuam durante o processo de regulação hospedeira (Rossi et al., 2012; Lin et al., 2019; Becchimanzi et al., 2020). Os fatores de regulação hospedeira podem ser de origem maternal, na qual os fatores são produzidos e injetados pela fêmea (veneno e vírus simbiotes) ou embrionária, na qual teratócitos e a larva do parasitoide atuam ativamente (Strand, 2014).

Recentemente, peptídeos associados ao veneno e aos teratócitos de *C. flavipes* foram descritos (Pinto et al., 2021; Pinto et al., 2022). Dentre os peptídeos descritos, destaca-se um peptídeo produzido pelos teratócitos de *C. flavipes* que apresenta domínio ligante em quitina (CfCBD) (GenBank nº de acesso MZ746719.1) de massa monoisotópica teórica de 11,05 kDa (9,14 kDa sem peptídeo sinal) por possuir oito cisteínas, sendo 6 delas no domínio ligante em quitina.

Proteínas e peptídeos que apresentam domínios ligantes em quitina são conhecidos por ligarem-se a polímeros de quitina bem como a resíduos de N-acetilglicosamina ou de outros açúcares (Duan et al., 2016). Em termos biotecnológicos, proteínas e peptídeos com domínios ligantes em quitina podem causar prejuízos ao desenvolvimento de insetos pragas após serem ingeridos pelos mesmos (Rossi et al., 2012). No controle de insetos pragas, os modos de ação que podem ocorrer de forma isolada ou conjunta associados às proteínas e aos peptídeos com domínio ligante em quitina são (i) ligação do peptídeo à quitina presente na membrana peritrófica, (ii) ligação do peptídeo a proteínas com resíduos de açúcares localizadas no lúmen intestinal e/ou (iii) a ligação a resíduos de açúcares as proteínas de membrana do epitélio (Rossi et al., 2012).

O presente trabalho foi realizado para produção e avaliação das proteínas inseticidas Vip3Aa20 de *B. thuringiensis* e CfCBD do parasitoide *C. flavipes* sobre lagartas da broca-da-cana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Diatraea saccharalis* e seu manejo em cultivos de cana-de-açúcar

Lagartas de *D. saccharalis* são comumente conhecidas como broca-da-cana e possuem três pares de pernas articuladas no tórax, quatro pares de pernas falsas no abdome, coloração branco-leitosa com manchas de coloração castanhas pelo corpo, cápsula cefálica marrom escura e, em seu último ínstar larval, apresenta cerca de 25 mm de comprimento (Gallo et al., 2002).

A broca-da-cana é considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar no Brasil, sendo encontrada em praticamente todas as áreas de cultivo no Brasil (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011; Dinardo-Miranda et al., 2013; Ferreira et al., 2018; Wilson et al., 2022). A broca-da-cana pode causar danos diretos pela abertura de galerias nos colmos que resultam em perda de peso do colmo, morte da gema apical da planta (coração morto), encurtamento de entrenós da planta, quebra da planta, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais (Gallo et al., 2002). Os danos indiretos decorrentes de infestações pela broca-da-cana são ocasionados pela

invasão dos colmos por fungos como *Fusarium moniliforme* e *Colletotrichum falcatum*. Esses fungos fitopatogênicos invertem a sacarose armazenada pela planta, o que reduz a eficiência dos processos de produção de álcool a partir da cana crua (Dinardo-Miranda et al., 2012).

Dentre as táticas de controle usadas para redução dos prejuízos causados pela broca-da-cana no Brasil, cita-se a aplicação de inseticidas químicos ou biológicos para o controle de lagartas recém-eclodidas que ainda não penetraram no colmo (Assis et al., 2022).

Em termos de controle biológico, a liberação do parasitoide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi, 1988 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) tem se destacado em função do parasitoide interromper o ciclo da broca-da-cana na fase de ovo, o que minimiza os danos à cultura. No Brasil, a área total tratada com *Trichogramma* spp. aumentou em 400% entre os anos de 2010 a 2018 (Parra, 2010; Parra and Coelho Jr., 2019). No entanto, a utilização de *Trichogramma* spp. para o controle da broca-da-cana em áreas de cana-de-açúcar é dificultada pelo trabalhoso sistema de produção (Parra e Coelho Jr., 2022).

Outra estratégia de controle biológico para o manejo da broca-da-cana no Brasil é baseada na liberação do parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae). Esse parasitoide é produzido e distribuído em aproximadamente 40% de toda extensão canavieira do Brasil (Parra, 2014). Entretanto, a eficácia de parasitoides no controle de *D. saccharalis* pode ser afetada por fatores temporais e ambientais (Gitahy et al., 2006).

Em termos de plantas transgênicas com resistência à broca-da-cana, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a comercialização de variedades de cana-de-açúcar geneticamente modificada no Brasil produzidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC): CTB141175/01-A (CTC20BT) (*Cry1Ab*), CTC91087-6, CTC75064-3, CTC79005-2, CTC95019-5 e CTC-92015-7 (*Cry1Ac*) (CTNBio, 2022). Dessa forma, observa-se que todas as variedades de cana-de-açúcar com resistência à broca-da-cana disponíveis comercialmente até o momento no Brasil expressam as proteínas inseticidas *Cry1Ab* ou *Cry1Ac*.

2.2. Produção de proteínas inseticidas para o manejo da broca-da-cana

Nos últimos anos, proteínas inseticidas têm sido estudadas como subsídio para o desenvolvimento de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com resistência à broca-da-cana (Falco e Silva Filho, 2003; Lemes et al., 2014; Silva et al., 2014; Iqbal et al., 2021). O uso de proteínas inseticidas para o manejo da broca-da-cana continua relevante, ainda mais considerando as dificuldades para implementação de novas tecnologias como o RNAi para o manejo dessa praga (Reis et al., 2022).

Inibidores de proteases derivados da soja expressos em plantas transgênicas de cana-de-açúcar resultaram em redução da capacidade de desenvolvimento de lagartas da broca-da-cana, mas não impediram a formação do sintoma de coração morto nas plantas infestadas pelas lagartas (Falco e Silva Filho, 2003).

Plantas transgênicas de cana-de-açúcar que expressam a toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* apresentaram sucesso para o controle da broca-da-cana (Braga et al., 2003). Porém, ao longo dos anos, populações de *D. saccharalis* resistentes a Cry1Ab foram selecionadas, fato que resulta na ineficiência do uso dessas plantas (Wu et al., 2009).

A toxina Cry2Ab2 de *B. thuringiensis* apresentou eficiência para o controle da broca-da-cana e não apresentou resistência cruzada com Cry1Ab, de forma que Cry2Ab2 foi eficiente para controlar lagartas da broca-da-cana resistentes a Cry1Ab (Wu et al., 2009).

Testes para a avaliação de toxinas Vip3Aa sobre a broca-da-cana indicam concentrações letais relativamente altas de Vip3Aa para obtenção da concentração letal necessária para a mortalidade de 90% ($CL_{90}=27,1 \mu\text{g.cm}^{-2}$) de uma população da broca-da-cana. Em termos comparativos, no mesmo trabalho, uma CL_{90} igual a $3,03 \mu\text{g.cm}^{-2}$ de Vip3Aa foi observada para lagartas do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lemes et al., 2014). Em outro trabalho, a espécie *Diatraea flavipennella* (Box, 1931) (Lepidoptera: Crambidae) apresentou $CL_{50}=0,329-1,150 \mu\text{g.cm}^{-2}$ para a toxina Vip3Aa, enquanto a espécie *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae) apresentou a mesma proteína $CL_{50}=0,028-0,084 \mu\text{g.cm}^{-2}$ (Lemes et al., 2017).

Ao avaliar a suscetibilidade de 6 populações da broca-da-cana a Vip3Aa20, foram observados valores de CL_{50} de Vip3Aa20 entre 61,18 e 367,86 ng.cm⁻² (Bernardi et al., 2014). Em híbridos comerciais de milho transgênico, a expressão da toxina Vip3Aa20 foi eficaz para o controle da broca-da-cana (Bernardi et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Síntese de genes e clonagem em plasmídeo de expressão

Os genes Vip3Aa20 (GenBank: DQ539888.1, proteína com atividade inseticida conhecida sobre lagartas de *D. saccharalis* - Bernardi et al., 2014 e Bernardi et al., 2015) e o gene codificante para um peptídeo ligante em quitina sem seu peptídeo sinal derivado do parasitoide *C. flavipes* (GenBank: MZ746719.1; Pinto et al., 2022) foram enviados para adequação de códon para expressão em *E. coli*, síntese e clonagem entre os sítios de restrição NdeI e XhoI com fusão dos peptídeos de interesse a uma cauda de 6xHis do vetor de expressão pET24a(+) na empresa Genone (Rio de Janeiro-RJ, Brasil).

Os plasmídeos recebidos foram ressuspensos em água Milli-Q na concentração de 200 ng.μL⁻¹ para posterior transformação de células de *E. coli*.

3.2. Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Para o preparo de células eletrocompetentes de *E. coli* das cepas DH10B e BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP, uma alíquota bacteriana de cada cepa estriada com auxílio de uma alça de platina em uma placa contendo meio LB sólido (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de NaCl e 15 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico). A placa estriada com alça de platina foi incubada por 16 horas a 37°C. A seguir, uma colônia isolada de cada cepa foi transferida e cultivada (20 horas; 37°C; 210 rpm) em 20 mL de meio LB líquido. Em seguida, 5 mL da suspensão bacteriana foram transferidos para um Erlenmeyer de 1000 mL contendo 350 mL de meio LB. O microrganismo foi cultivado por aproximadamente 2 horas a 37°C e agitação de 210 rpm até atingir a densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,3 e 0,35.

Posteriormente, a cultura foi incubada em gelo por 30 minutos e centrifugada (1792 g; 10 minutos; 4°C). O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas delicadamente em 40 mL de água estéril e 4°C. A suspensão de células foi novamente centrifugada (1792 g; 10 minutos; 4°C). As células sedimentadas foram ressuspensas delicadamente em 25 mL de água estéril a 4°C e o conteúdo total (25 mL) foi dividido em 2 tubos do tipo Falcon de 50 mL. Os tubos foram novamente centrifugados (1792 g; 10 min; 4°C) e os sobrenadantes foram descartados com cuidado para não perder células. As células sedimentadas foram ressuspensas delicadamente em volume final de 800 µL de glicerol 10% a 4°C. O volume final de células ressuspensas em glicerol 10% foi dividido em alíquotas de 40 µL em tubos do tipo Eppendorf (1,5 mL). As alíquotas de células eletrocompetentes de *E. coli* das cepas DH10B e BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

3.3. Transformação de *E. coli* por eletroporação com os plasmídeos pET24a_Vip3Aa20 e pET24a_CfCBD

Alíquotas de 2 µL de cada plasmídeo de interesse ressuspensos na concentração de 200 ng.µL⁻¹ foram individualmente adicionadas a 40 µL de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B (criação de um estoque de plasmídeos em células) ou de BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP (uso na produção heteróloga) previamente preparadas. Essa mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação previamente resfriada por 10 minutos no gelo. As cubetas contendo as células eletrocompetentes e os plasmídeos foram submetidas a um pulso de 1,8 kV/25 µF (eletroporador Gene Pulse, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) por 5 segundos. Imediatamente após o choque elétrico, as células foram ressuspensas delicadamente em 1 mL de meio LB líquido.

A seguir, as suspensões de células transformadas foram transferidas para tubos do tipo Eppendorf (1,5 mL) e incubadas durante 1,5 h a 37°C e agitação de 180 rpm. Após incubação, as culturas foram distribuídas uniformemente com o auxílio de uma alça de Drigalski sobre placas de Petri (diâmetro de 9 cm) contendo meio LB sólido suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina (antibiótico seletivo para células transformadas com os plasmídeos) e 50 µg.mL⁻¹ de streptomicina ou cloranfenicol

[antibióticos seletivos, respectivamente, para a cepas em uso de *E. coli* DH10 e BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP]. Finalmente, as placas com os cultivos de *E. coli* distribuídos sobre os meios foram incubados a 37°C durante 16-20 horas para observação das colônias transformadas.

3.4. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Células de *E. coli* DH10B contendo o plasmídeo pET24a_Vip3Aa20 e pET24a_CfCBD foram cultivadas (16-20 horas; 37°C; 220 rpm) em meio LB líquido suplementado com canamicina (50 µg.mL⁻¹) e estreptomicina (25 µg.mL⁻¹). Cada colônia cultivada foi obtida de uma placa de cultivo resultante de transformação por eletroporação ou de células estriadas a partir de estoques em glicerol 10% mantidos a -80°C.

O DNA plasmidial foi obtido pela utilização do kit comercial PureYield™ Plasmid Miniprep Sytem (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos extraídos foram armazenados em freezer -20°C até posterior uso.

3.5. Produção das proteínas recombinantes Vip3Aa20 e CfCDB

Colônias isoladas de *E. coli* BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP contendo os plasmídeos pET24a_Vip3Aa20 e pET24a_CfCBD foram cultivadas para o preparo de um pré-inóculo em 10 mL de meio LB (10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g.L⁻¹ de NaCl) suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e 50 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol em Erlenmeyers de 125 mL por 16 h, 37°C e agitação de 200 rpm.

Após esse período, 10 mL do pré-inóculo foram transferidos para um Erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio LB suplementado com 50 µg.mL⁻¹ de canamicina e 50 µg.mL⁻¹ de cloranfenicol. O cultivo foi realizado a 37°C sob agitação de 200 rpm até que a DO_{600nm} chegasse a 0,4 e 0,6.

Posteriormente, a indução da expressão foi realizada pela adição Isopropil β-D1-galactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 1 mM. Após indução da

produção das proteínas, os cultivos foram mantidos por 4 horas. Em seguida, as bactérias induzidas foram coletadas em tubos do Tipo Falcon (50 mL) e centrifugadas (17 400 g; 4°C; 5 min). O sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi ressuspensão com de 10 mL de tampão fosfato salino (0,02M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,02M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,5M NaCl; pH 7,4). A lise celular foi realizada pela adição de 300 μL de lisozima (10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 100 μL de DNase I (2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e MgCl_2 (855 mM) e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min.

Para o total rompimento das células, as amostras mantidas em gelo foram submetidas a três sonicações em banho ultrassônico Unique (37 kHz) por 60 segundos com intervalos de 10 segundos entre as sonicações. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (17.400 g; 30 min; 4°C) e os sobrenadantes contendo as proteínas solúveis extraídas dos cultivos foram transferidos para tubos do tipo Falcon (50 mL). Tanto os sobrenadantes como os sedimentos foram coletados para análises posteriores.

3.6. Análise da expressão das proteínas em gel de poliacrilamida

Os perfis proteicos dos processos de produção das proteínas de interesse foram observados em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Sambrook e Russel, 2001) para verificar a eficiência da expressão. Em função do peso molecular, a toxina Vip3Aa20 foi analisada em SDS-PAGE 7,5% e o peptídeo CfCBD foi analisado em SDS-PAGE 15%. A eletroforese foi realizada em tampão TRIS-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM e SDS 0,1%) a 0,03A por gel utilizando o sistema "PowerPac HC Power Supply" (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Como referência de peso molecular, foi utilizado o marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Bio-rad) de acordo com as recomendações do fabricante. Após eletroforese, os géis foram corados com Coomassie-Brilliant Blue R-250 (0,1% m/V preparado em metanol 50% e ácido acético 10%) por 5 min sob agitação branda por 10 minutos com consequente lavagem em solução descorante (solução aquosa contendo metanol 10% e ácido acético 10%). As proteínas insolúveis foram ressuspensas em 10 mL de água e uma alíquota de 60 μL foi preparada pela adição de 12 μL de tampão de carregamento SDS-PAGE 6x (TRIS-

HCl pH 6,8 32 mM; glicerol 5,3%; SDS 1,05%, azul de bromofenol 0,003% e β -mercaptoetanol 5%). As amostras foram fervidas por 5 min em bloco seco e 20 μ L de cada amostra foram aplicados nos géis de SDS-PAGE.

3.7. Purificação, filtração e quantificação das proteínas recombinantes

As frações solúveis dos lisados celulares foram filtradas em filtros de 0,22 μ m e as amostras foram aplicadas em coluna "HisTrap™ HP Columns" de 1 mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Upsala Sweden) pré-equilibrada com tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 20 mM pH 7,4). As eluições foram feitas com o tampão de equilíbrio acrescido de imidazol nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM. Abaixo, segue a sequência de volumes das soluções que foram aplicadas na coluna durante o processo de purificação:

- 1- 5 mL de H₂O deionizada autoclavada;
- 2- 10 mL de tampão de equilíbrio (Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4);
- 3- 10 mL da fração solúvel do lisado proteico filtrado em filtro 0,22 μ m;
- 4- 15 mL de tampão de equilíbrio;
- 5- 5 mL de tampão de eluição acrescido de imidazol 10 mM;
- 6- Coleta de uma fração de 5 mL;
- 7- 5 mL de tampão de eluição acrescido de imidazol 10 mM;
- 8- Coleta de uma fração de 5 mL;
- 9- Repetição dos passos 5 a 8 alterando o tampão de eluição com concentrações de 25, 50, 75, 100 e 250 mM de imidazol;
- 10- 10 mL de H₂O deionizada autoclavada;
- 11- 5 mL de etanol 20% para manutenção da coluna.

Para remoção do imidazol utilizado para eluição das proteínas, foi realizada a diálise em membrana de celulose (12 MWCO, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) para as amostras das toxinas Vip3Aa20 em uma solução de água deionizada autoclavada em um volume de 2 L a 4°C pelo período de 24 horas, sendo realizada três trocas a cada 8 horas. A remoção do imidazol utilizado para eluição da proteína

CfCBD das colunas foi realizada por filtração em um filtro Amicon® Ultra (MWCO 10 kDa, Merck Millipore, Tullagreen, Ireland) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram liofilizadas durante 24 horas e ressuspensas em 1 mL de água deionizada.

As concentrações de proteínas totais nas amostras foram determinadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando o reagente Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e albumina de soro bovina (BSA) como padrão. As concentrações de proteínas totais também foram determinadas por densitometria em gel SDS-PAGE utilizando BSA nas concentrações de 2000, 1000, 500, 250 e 125 ng por canaleta do gel. A análise de densitometria foi realizada utilizando o programa ImageJ v.1.8 (National Institutes of Health, USA). Após purificadas, as amostras foram observadas novamente em SDS-PAGE 7,5% ou 15%.

3.8. Bioensaios de ingestão das proteínas recombinantes pela broca-da-cana

Para a determinação da concentração letal necessária para a mortalidade de 50% das lagartas (CL_{50}), diferentes concentrações da toxina Vip3Aa20 foram diluídas em água para as concentrações que resultariam em 30, 60, 120, 240, 480 e 960 $ng.cm^{-2}$.

Os bioensaios foram conduzidos utilizando discos foliares (diâmetro de 2 cm, área de $3,14 cm^2$) de cana-de-açúcar, variedade SP80-3280 (suscetível a broca-da-cana). Os discos foliares foram recobertos por 40 μL da toxina Vip3Aa20 (20 μL de cada lado) das respectivas concentrações e colocados em uma placa de cultivo de células de 12 poços cilíndricos de 2 cm de altura e área de $3,14 cm^2$ por poço. Para evitar o rápido secamento das folhas, no fundo de cada poço da placa foi colocado um disco de papel filtro (diâmetro de 2 cm) sobre 500 μL de ágar 1%. Em seguida, 20 neonatas da broca-da-cana foram cuidadosamente colocadas sobre cada disco foliar contendo as toxinas Vip3Aa20. Posteriormente, as placas foram cobertas com plástico filme e mantidas sob condições controladas ($25 \pm 2^\circ C$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h). Após 3 dias, as lagartas que não reagiram ao toque foram consideradas inviáveis. Os discos foliares foram escaneados e a área consumida foi

estimada com uso do software ImageJ v.1.8 (National Institutes of Health, USA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 repetições de 20 lagartas por tratamento. Os dados foram analisados quanto à normalidade por um teste de Shapiro-Wilk, homoscedasticidade pelo teste de Bartlett e as médias foram comparadas por Tukey ($\alpha < 0,05$). Os dados que não apresentaram requisitos para o teste de ANOVA foram analisados usando o teste de Kruskal-Wallis e as médias foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Outro bioensaio para avaliação da toxicidade de Vip3Aa20 sobre a broca-da-cana foi realizado utilizando dieta artificial preparada de acordo com Hensley e Hammond Jr. (1968). Cilindros de dieta (6 mm de diâmetro e 5 mm de altura) foram inseridos em placas do tipo ELISA de 96 poços e 10 μL da toxina Vip3Aa20 foram aplicados sobre a dieta de forma a obter as concentrações de 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ng.cm^{-2} . O tratamento controle foi realizado pela aplicação de 10 μL de água deionizada sobre a dieta. As placas foram deixadas abertas para evaporação do excesso de água por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, 2 lagartas neonatas da broca-da-cana foram colocadas sobre a dieta com o auxílio de um pincel fino em cada poço contendo as concentrações de Vip3Aa20. As placas foram cobertas com filme (Platemax Ultraclear Sealing Film, Axygen Inc. Union City, CA, USA) e mantidas sob condições controladas ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 h). O bioensaio foi mantido por 7 dias e foram realizadas 12 repetições de cada concentração avaliada, sendo cada repetição composta por 2 lagartas.

O bioensaio para avaliação de uma proteína não identificada de *E. coli* (que erroneamente foi purificada pensando-se ser CfCBD) foi conduzido da mesma forma que os ensaios de avaliação da toxina Vip3Aa20 utilizando discos foliares conforme descrito anteriormente. As concentrações do peptídeo não identificado utilizadas no bioensaio foram de 64, 640 e 6.400 ng.cm^{-2} em cada superfície do disco foliar.

3.9. Dissecção de intestinos e obtenção do extrato enzimático do epitélio do intestino médio e do conteúdo da membrana peritrófica da broca-da-cana

Lagartas da broca-da-cana em seu último ínstar e em alimentação ativa foram coletadas e tiveram seus intestinos dissecados. As lagartas foram anestesiadas em

gelo por 10 min e as dissecações foram realizadas em tampão fosfato salino (PBS). Para a dissecação dos intestinos, as lagartas tiveram suas cabeças e extremidades posteriores cortadas por um corte transversal e o tegumento foi retirado após a realização de um corte longitudinal na parte ventral das lagartas. O intestino posterior foi separado do intestino médio por meio de um corte transversal no ponto em que os túbulos de Malpighi se inserem no intestino. Os tecidos epiteliais dos intestinos foram separados da membrana peritrófica e seu conteúdo com a utilização de uma pinça. Cinco tecidos epiteliais foram transferidos e homogeneizadas em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com 500 μL de tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,0. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10.000g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi considerado o extrato enzimático. O conteúdo da membrana peritrófica (enzimas de baixo peso molecular secretadas pelas células do epitélio e que atravessam os poros da membrana peritrófica) foi coletado das membranas peritróficas dissecadas após uma centrifugação (10.000 g; 5 min; 4°C). O líquido sobrenadante compôs o conteúdo intestinal da membrana peritrófica.

3.10. Hidrólise de Vip3Aa20 pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana

A hidrólise da toxina Vip3Aa20 pelo conteúdo da membrana peritrófica da broca-da-cana foi testada incubando-se 20 μL de Vip3Aa20 purificada (93 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) com 5 μL do conteúdo da membrana peritrófica 10x diluído em tampão glicina-NaOH 100 mM pH 9,0 (4,5 μg de proteína total). Os tubos foram incubados por 15 min a 30°C e foram adicionados 4 μL de tampão de carregamento 6x. As amostras foram aquecidas (95°C; 10 min), aplicadas em SDS-PAGE 7,5% e reveladas conforme descrito anteriormente (item 3.6).

3.11. Hidrólise do peptídeo não identificado de *E. coli* pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana

O extrato enzimático obtido pela maceração dos tecidos do epitélio intestinal (item 3.9) foi diluído 200x em tampão glicina-NaOH 50mM pH 9,0. Em seguida, 2 μg do peptídeo não identificado de *E. coli* foram incubados a 30°C por 2 horas com 18 μL

do extrato enzimático do epitélio do intestino médio da broca-da-cana diluído 200x. Após incubação, foram adicionados 4 µL de tampão de carregamento 6x (TRIS-HCl pH 6,8 32 mM; glicerol 5,3%; SDS 1,05%, azul de bromofenol 0,003% e β-mercaptoetanol 5%). As amostras foram aquecidas (95°C; 10 min), aplicadas em SDS-PAGE 15% e reveladas conforme descrito anteriormente (item 3.6).

3.12. Ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à quitina coloidal e à membrana peritrófica da broca-da-cana

A quitina coloidal foi preparada de acordo com método modificado proposto por Ramírez et al. (2004). Para isso, uma parte (g) da quitina cristalina (Sigma-Aldrich) foi incubada com cinco partes (mL) de ácido clorídrico (37%) por 50 min em temperatura ambiente e agitação constante. Após a incubação, a solução de quitina + ácido clorídrico foi transferida para um béquer contendo 1 L de água deionizada.

A solução formada foi filtrada em sistema de filtração à vácuo para a retirada da água e coletou-se a quitina coloidal na parte retida pelo filtro. A quitina coloidal coletada foi sedimentada por centrifugação (4.000 g, 25°C, 10 min) e, após descartar o sobrenadante, o sedimento foi lavado (3x) com tampão de glicina-NaOH 50 mM pH 9,0 até que o pH da solução se estabilizasse em 9,0 (pH alcalino próximo do esperado para o conteúdo da membrana peritrófica da broca-da-cana). A quitina coloidal foi preparada na concentração de 15mg.mL⁻¹ de tampão glicina-NaOH 50mM.

Os ensaios de ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à quitina coloidal foram realizados pela incubação de 1 µL da proteína não identificada de *E. coli* (1 µg.µL⁻¹) com 19 µL de quitina coloidal (15mg.mL⁻¹ pH 9,0). As amostras foram incubadas por 1 hora a 30°C, centrifugadas (10.000 g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi coletado e aplicado em SDS-PAGE 15% conforme item 3.11 (presença nessa fração indicaria ausência de ligação). O sedimento da reação de ligação da proteína não identificada de *E. coli* que continha quitina coloidal também foi verificado em SDS-PAGE para verificar se houve ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à quitina (presença do peptídeo no sedimento).

Membranas peritróficas da broca-da-cana com seus conteúdos foram separadas dos tecidos epiteliais do intestino médio (item 3.9) e maceradas em tubo

do tipo Eppendorf (1,5 mL) com um micropistilo para auxiliar a remoção do conteúdo da membrana peritrófica. As membranas maceradas foram lavadas pelo menos 3x com PBS seguidas de centrifugação (10.000 g; 10 min; 4°C) e descarte do sobrenadante para lavar o conteúdo da membrana peritrófica de forma a manter apenas a membrana peritrófica da broca-da-cana nas amostras.

Os ensaios de ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à membrana peritrófica sem seu conteúdo foram realizados pela incubação de 1 µL da proteína não identificada de *E. coli* (1 µg.µL⁻¹) com 1 membrana peritrófica lavada da broca-da-cana resuspensa em 19 µL de tampão glicina-NaOH 50 mM pH 9,0. As amostras foram incubadas em banho-maria por 1 hora a 30°C e centrifugadas (10.000 g; 10 min; 4°C). O sobrenadante (conteúdo solúvel) foi transferido para outro tubo e o sedimento (membrana peritrófica) foi ressuspensão para serem analisados em SDS-PAGE 15%. Em caso de ligação de à membrana peritrófica da broca-da-cana, o peptídeo seria observado no sedimento. Caso o peptídeo não identificado de *E. coli* não se ligasse à membrana peritrófica da broca-da-cana, o peptídeo não identificado de *E. coli* seria observado no sobrenadante da reação.

4. RESULTADOS

4.1. Produção da toxina Vip3Aa20 e do peptídeo CfCBD

A toxina Vip3Aa20 foi expressa pelo cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)-*CodonPlus*-RP contendo o plasmídeo pET24a_Vip3Aa20 a 37°C após a indução da expressão com 1 mM de IPTG. Com a análise do gel SDS-PAGE 7,5%, foi possível observar que a toxina Vip3Aa20 foi expressa tanto na forma solúvel (Fig. 1A) como na forma insolúvel (Fig. 1B) em 1, 2, 3 e 4 horas após o início da indução da expressão.

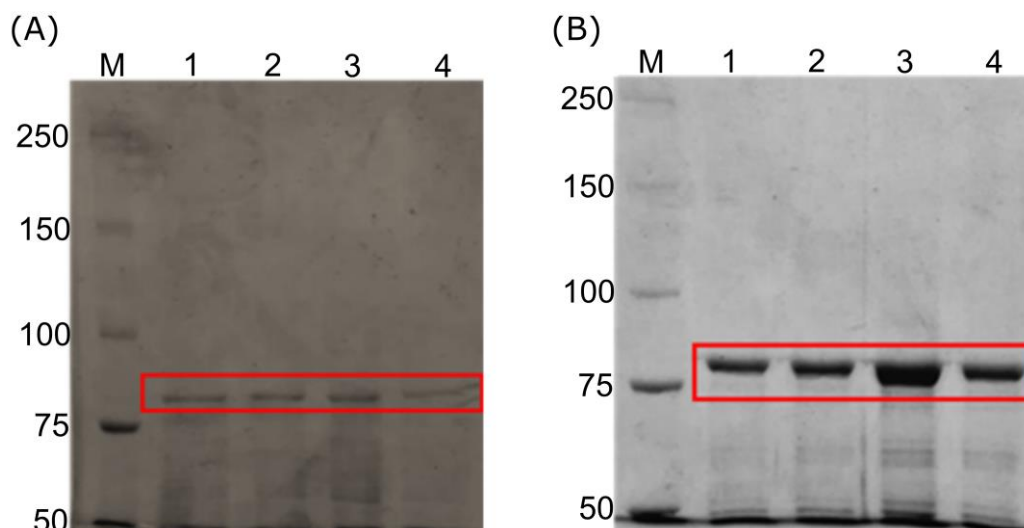


Figura 1. Perfil proteico de proteínas produzidas por *E. coli* BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP transformada com o plasmídeo pET24a_Vip3Aa20 em SDS-PAGE 7,5%. Destaque em vermelho para a toxina Vip3Aa20 nas formas (A) solúvel e (B) insolúvel obtidas em 1 (1), 2 (2), 3 (3) e 4 h (4) após indução dos cultivos com IPTG 1mM. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Bio-rad).

A proteína CfCBD não foi expressa pelo cultivo de *E. coli* BL21 (DE3)-*CodonPlus*-RP contendo o plasmídeo pET24a_CfCBD a 37°C com a indução da expressão com 1 mM de IPTG. Com a análise do gel SDS-PAGE 15%, não foi possível observar a presença de proteínas com peso molecular próximo de CfCBD (10,35 kDa, relativo ao peptídeo CfCBD sem peptídeo sinal e com a adição de uma cauda de seis histidinas). Porém, uma proteína com aproximadamente 14 kDa foi produzida tanto na forma solúvel (Fig. 2A) como na forma insolúvel (Fig. 2B) em 1, 2, 3 e 4 horas após o início da indução da expressão.

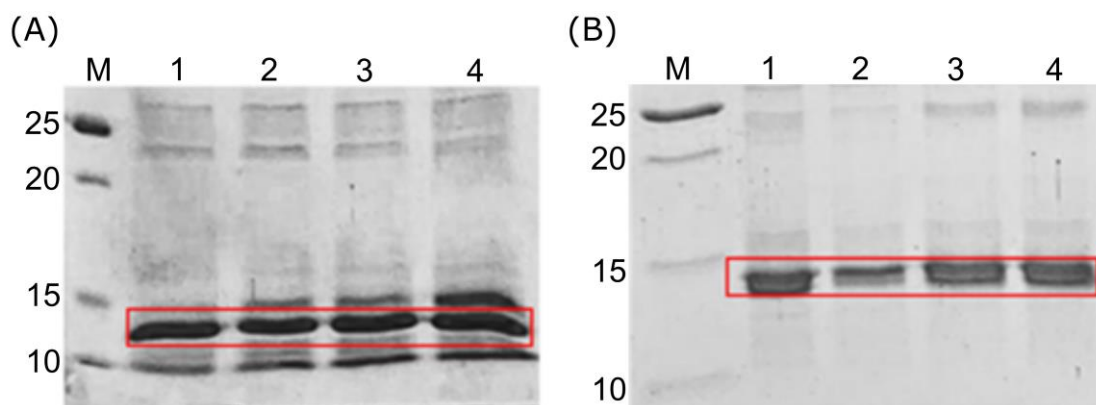


Figura 2. Perfil proteico de proteínas produzidas por *E. coli* BL21-*CodonPlus* (DE3)-RP transformada com o plasmídeo pET24a-*CfCBD* em SDS-PAGE 15%. Destaque em vermelho para a proteína não identificada de *E. coli* nas formas (A) solúvel e (B) insolúvel obtidas em 1 (1), 2 (2), 3 (3) e 4 h (4) após indução dos cultivos com IPTG 1mM. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Biorad).

4.2. Purificação de Vip3Aa20 e do peptídeo não identificado de *E. coli*

Todas as amostras da fração solúvel de Vip3Aa20 foram reunidas em uma única amostra para a realização da purificação. As purificações foram realizadas em coluna de Níquel-Sepharose utilizando tampão de eluição contendo diferentes concentrações de imidazol (10, 25, 50, 75, 100 e 250 mM). Foi possível observar que a toxina Vip3Aa20 aderiu à resina da coluna e eluiu apenas nas concentrações de imidazol de 100 e 250 mM (Figura 3).

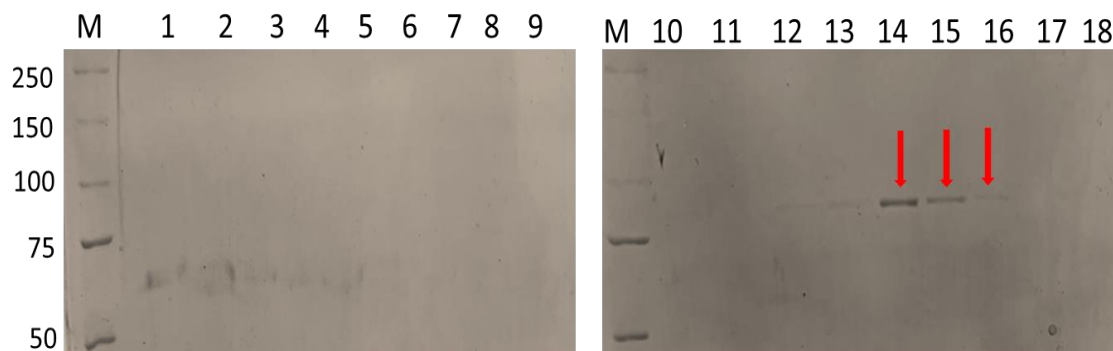


Figura 3. Perfil proteico de Vip3Aa20 em SDS-PAGE 7,5% após purificação em coluna Ni-Sepharose. (M): Marcador de peso molecular (kDa) “BioRad” Broad Range; As setas vermelhas indicam a toxina Vip3Aa20 purificada. (1), (2), (3), (4) e (5): Frações de lavagem da coluna; (6) e (7) :Frações eluídas com 10 mM de imidazol; (8) e (9): Frações eluídas com 25 mM de imidazol; (10) e (11): Frações eluídas com 50 mM de imidazol; (12) e (13): Frações eluídas com 75 mM de imidazol; (14) e (15): Frações eluídas com 100 mM de imidazol; (16), (17) e (18): Frações eluídas com 250 mM de imidazol.

O peptídeo não identificado de *E. coli* não aderiu à coluna de Ni-Sepharose e eluiu na primeira fração que não continha imidazol (Figura 4).

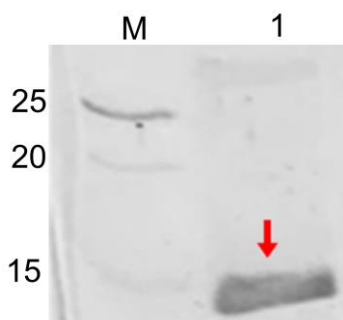


Figura 4. Peptídeo não identificado de *E. coli* após passagem por coluna Ni-Sepharose observado em SDS-PAGE 15%. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Bio-Rad Broad Range; (1): A seta vermelha indica o peptídeo não identificado de *E. coli*.

4.3. Atividade inseticida de Vip3Aa20 sobre lagartas da broca-da-cana

No bioensaio conduzido com folhas de cana-de-açúcar, os valores de mortalidade observados para todas as concentrações de Vip3Aa20 não diferiram entre si e foram aproximadamente de 5-10% (Figura 5A) e os valores de consumo foliar também não diferiram entre si com valores aproximados de 20% (Figura 5B).

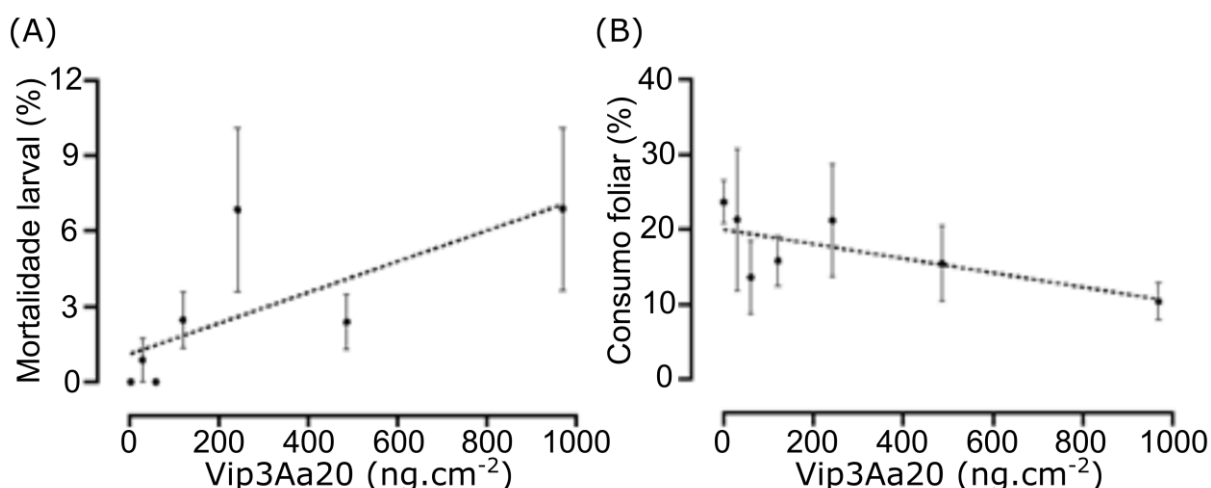


Figura 5. Mortalidade larval (%) (A) e consumo foliar (%) (B) da broca-da-cana observados 3 dias após a aplicação de diferentes concentrações da toxina Vip3Aa20 sobre discos foliares de cana-de-açúcar.

No bioensaio conduzido com a aplicação de diferentes concentrações (0, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 ng.cm⁻²) da toxina Vip3Aa20 sobre dieta artificial mantido por 7 dias, não foi observada mortalidade larval da broca-da-cana em nenhum dos tratamentos.

4.4. Hidrólise de Vip3Aa20 com o conteúdo intestinal da broca-da-cana

Uma taxa de hidrólise muito baixa foi observada para a toxina Vip3Aa20 pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana (Figura 6).

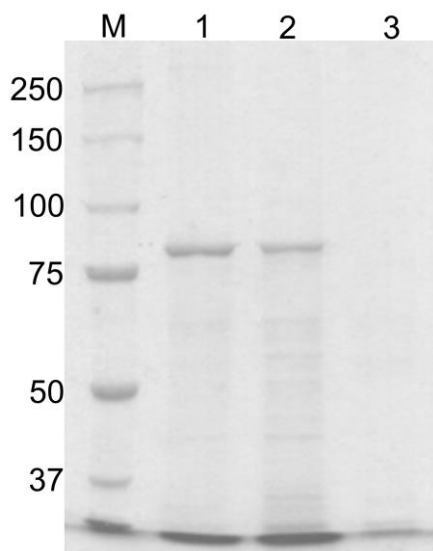


Figura 6. Hidrólise da toxina Vip3Aa20 incubada com o extrato enzimático do intestino médio de lagartas da broca-da-cana verificada em de gel SDS-PAGE 7,5%. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Bio-Rad Broad Range; (1): 20 μL Vip3Aa20 ($93\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) + 5 μL Gly-NaOH 100mM pH 9,0; (2): 20 μL Vip3Aa20 ($93\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) + 4,5 μg de conteúdo intestinal da broca-da-cana diluído em Gly-NaOH 100 mM pH 9,0; (3): 4,5 μg do conteúdo intestinal da broca-da-cana diluído em Gly-NaOH 100 mM pH 9,0. Obs: o conteúdo intestinal puro foi diluído 10x em Gly-NaOH 100 mM pH 9,0 e a quantificação por Bradford indicou uma concentração de $923\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Cinco μL (4,5 μg) do conteúdo diluído 10x foram utilizados no ensaio de hidrólise.

4.5. Atividade inseticida do peptídeo não identificado de *E. coli* sobre lagartas da broca-da-cana

A ingestão de folhas cobertas com $6.400\text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ do peptídeo não identificado de *E. coli* resultou uma redução de aproximadamente 100% da viabilidade de neonatas da broca-da-cana ($W=33.85$; $P<0.0001$) enquanto que as concentrações de 64 e $640\text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ do peptídeo não identificado de *E. coli* não alteraram a viabilidade larval (Figura 7A). As concentrações de 640 e $6.400\text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ do peptídeo não identificado de *E. coli* reduziram o consumo foliar em 52,9 e 99.1%, respectivamente, em relação ao controle ($W= 35.90$; $P<0.0001$; Figura 7B).

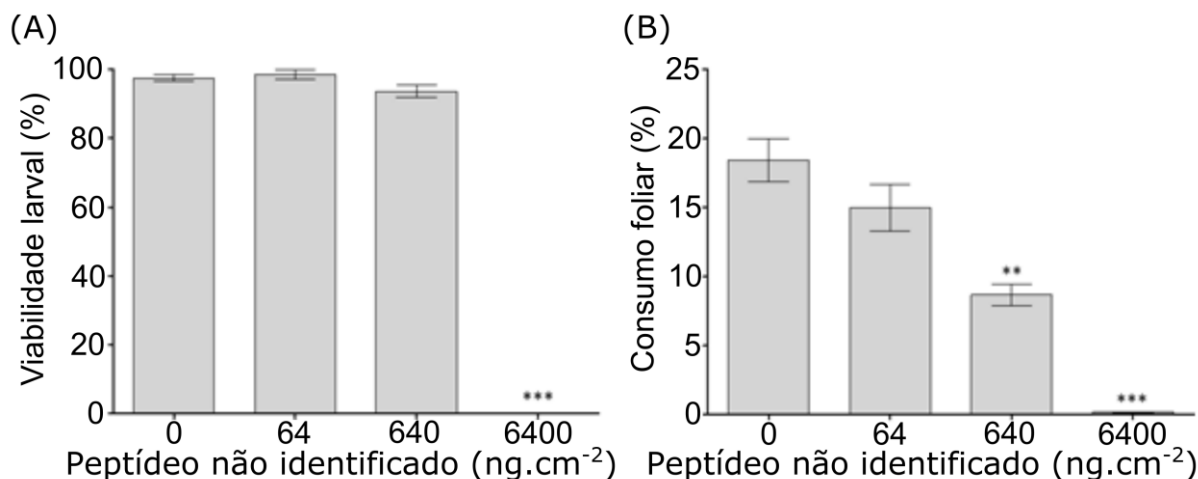


Figura 7. Viabilidade larval (%) (A) e consumo foliar (%) (B) da broca-da-cana alimentada com folhas de cana-de-açúcar recobertas com peptídeo não identificado de *E. coli*. As barras verticais representam médias $\pm$ erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças significativas em comparação com o controle (água) pelo teste de comparação múltipla de Dunnet (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4.5. Hidrólise do peptídeo não identificado de *E. coli* pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana

O peptídeo não identificado de *E. coli* foi completamente hidrolisado pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana (Figura 8).

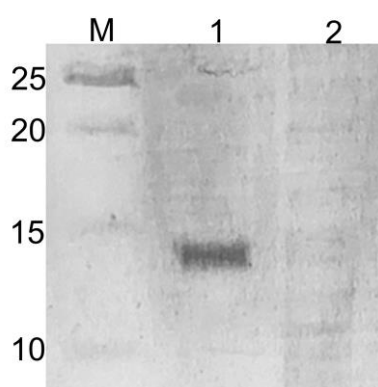


Figura 8. Hidrólise do peptídeo não identificado de *E. coli* incubado com o extrato enzimático do intestino médio de lagartas da broca-da-cana verificada em gel SDS-PAGE 15%. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Bio-Rad Broad Range; (1):

peptídeo não identificado de *E. coli* incubado sem extrato enzimático, (2): peptídeo não identificado de *E. coli* incubado com extrato enzimático.

4.6. Ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à quitina coloidal e à membrana peritrófica da broca-da-cana

Não foi observada ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à quitina coloidal em pH 9,0 (Figura 9).

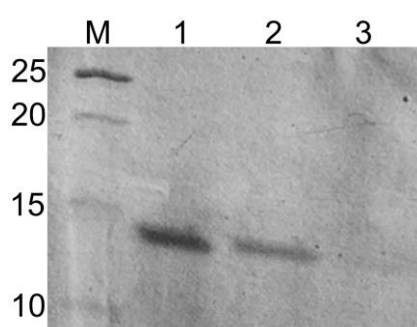


Figura 9. Ensaio de ligação de um peptídeo não identificado de *E. coli* incubado com quitina coloidal verificada em gel SDS-PAGE 15%. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Bio-Rad Broad Range; (1): peptídeo não identificado de *E. coli*; (2): sobrenadante da incubação do peptídeo com quitina coloidal; (3): sedimento da incubação do peptídeo com quitina coloidal.

Além de incapacidade de ligação do peptídeo não identificado de *E. coli* à membrana peritrófica da broca-da-cana em pH 9,0 em função da ausência do peptídeo no sedimento da reação, foi verificado que o peptídeo não identificado de *E. coli* foi completamente hidrolisado ao ser incubado com a membrana peritrófica, pois o mesmo não pode ser observado no sobrenadante da reação (Figura 10).

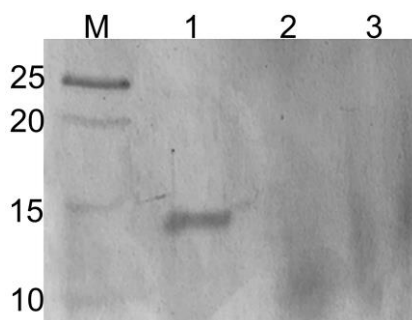


Figura 10. Ensaio de ligação de um peptídeo não identificado de *E. coli* incubado com a membrana peritrófica da broca-da-cana verificada em gel SDS-PAGE 15%. (M): Marcador de peso molecular (kDa) Bio-Rad Broad Range; (1): peptídeo não identificado de *E. coli*; (2): sobrenadante da incubação do peptídeo com a membrana peritrófica; (3): sedimento da incubação do peptídeo com a membrana peritrófica.

5. DISCUSSÃO

A produção de proteínas para sua utilização no manejo de insetos pragas ganhou destaque nos últimos anos em função da possibilidade de expressão dessas proteínas em plantas transgênicas (Mall et al., 2019; ISAAA, 2021). As primeiras plantas transgênicas comerciais com atividade inseticida foram desenvolvidas para expressarem proteínas Cry1A de *B. thuringiensis* para o manejo de lepidópteros pragas (Mall et al., 2019).

Com o decorrer do uso dessas plantas em grandes campos de cultivos comerciais, casos de resistência de insetos a essas toxinas começaram a aparecer (Jurat-Fuentes et al., 2021). Como consequência, as empresas desenvolvedoras das plantas transgênicas passaram a intensificar as ações de manejo da resistência de insetos às plantas transgênicas com ações de implementação de refúgio, piramidação de genes codificadores de proteínas inseticidas, desenvolvimento de novas proteínas inseticidas como Vip3Aa com modos de ação diferentes da primeira geração de proteínas e desenvolvimento de novas modalidades de controle de insetos pragas como o RNAi (Christiaens et al., 2020).

O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a toxina Vip3Aa20 como forma de controle da broca-da-cana. A toxina Vip3Aa20 foi escolhida em função de sua eficácia para o manejo de lepidópteros pragas, entre esses a broca-da-cana (Bernardi et al., 2014; Bernardi et al., 2015), e por apresentar modo de ação diferente das toxinas Cry1Ab e Cry1Ac atualmente disponíveis em eventos comerciais de cana-de-açúcar (CTNBio, 2022).

De maneira inesperada, não foi possível observar toxicidade da toxina Vip3Aa20 sobre a broca-da-cana. Essa observação difere dos resultados do trabalho de Bernardi et al. (2014) no qual foram observados valores de CL_{50} de Vip3Aa20 entre 61,18 e 367,86 ng.cm⁻² para seis populações da broca-da-cana e do trabalho de Bernardi et al. (2015) no qual foi observada mortalidade de 100% da broca-da-cana ao ingerir plantas transgênicas de milho que continham concentrações de Vip3Aa20 superiores a 1000 ng.mg⁻¹ de proteínas totais solúveis do tecido das plantas.

O modo de ação das toxinas Vip3Aa não é completamente desvendado, mas sabe-se que as toxinas Vip3Aa (peso molecular ~88 kDa) precisam ser ingeridas e ativadas por proteases do intestino dos insetos suscetíveis no interior da membrana peritrófica. Em seguida, as frações hidrolisadas de Vip3Aa com peso molecular reduzido e núcleos resistentes à ação de proteases (~65, 50 e 20 kDa), atravessam os poros da membrana peritrófica e encontram proteínas na membrana do epitélio do intestino médio que atuam como receptoras das toxinas Vip3Aa (Song et al., 2016; Bel et al., 2017; Banyuls et al., 2018). Próximo do epitélio do intestino médio, há a oligomerização das frações hidrolisadas com consequente destruição das células do epitélio do intestino médio que implicará na morte dos insetos suscetíveis (Shao et al. 2020).

No presente trabalho, foi verificada uma baixa taxa de ativação da toxina Vip3Aa20 pelo conteúdo intestinal da broca-da-cana. Com essa baixa taxa de ativação (hidrólise), as toxinas Vip3Aa20 ingeridas pela broca-da-cana mantiveram-se em sua maior parte com seu peso molecular de aproximadamente 89 kDa. Proteínas com esse peso molecular não são esperadas que atravessem os poros da membrana peritrófica (Santos e Terra, 1986). Desse modo, as proteínas acabam passando direto pelo intestino por dentro da membrana peritrófica da broca-da-cana sem terem contato com o epitélio do intestino médio, local em que a toxicidade de Vip3Aa20 ocorre, e

são excretadas nas fezes do inseto. Uma taxa de ativação lenta foi previamente associada com a resistência de lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, [1808]) (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes à Vip3Aa (Chakroun et al., 2016b).

O peptídeo não identificado de *E. coli* (~14 kDa) foi purificado por equívoco durante o processo de obtenção de outra proteína, CfCBD (10,35 kDa). A avaliação do peptídeo não identificado de *E. coli* mostrou que o mesmo não possui estabilidade ao ambiente digestivo da broca-da-cana e apresentou toxicidade às lagartas apenas em uma concentração muito alta (6.400 ng.cm⁻²). Em termos comparativos, proteínas Cry1A de *B. thuringiensis* apresentam valores de CL₅₀ entre 0,4-43 ng.cm⁻² sobre a broca-da-cana (Davalos et al., 2015). No momento, estudos de identificação da proteína não identificada de *E.coli* para fins de desenvolvimento de táticas de controle de insetos pragas não são justificáveis.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com atividade inseticida sobre a broca-da-cana com toxinas Vip3Aa20 deve considerar a observação do presente trabalho em que a taxa de ativação (hidrólise) de Vip3Aa20 pela broca-da-cana pode ser insuficiente para resultar em toxicidade desejável para o manejo desse inseto praga.

REFERÊNCIAS

- Assis HLBD, Paiva PEB, Dinardo-Miranda LL, Yamamoto PT (2022) Estimating the relationship of sugarcane borer larvae and crop damage based on adult captures and climate variables. **Scientia Agricola** 80.
- Banyuls N, Hernández-Martínez P, Quan Y, Ferré J (2018) Artefactual band patterns by SDS-PAGE of the Vip3Af protein in the presence of proteases mask the extremely high stability of this protein. **International Journal of Biological Macromolecules**, 120, 59-65.
- Becchimanzi A, Avolio M, Bostan H, Colantuono C, Cozzolino F, Mancini D, Chiusano ML, Pucci P, Caccia S and Pennacchio F (2020) Venomics of the ectoparasitoid wasp *Bracon nigricans* **BMC Genomics** 21 (1):1-15.
- Beckage NE, Gelman DB (2004) Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. **Annual Review of Entomology** 49:299-330.
- Bel Y, Banyuls N, Chakroun M, Escriche B, Ferré J (2017) Insights into the structure of the Vip3Aa insecticidal protein by protease digestion analysis. **Toxins** 9(4), 131.
- Ben Hamadou-Charfi D, Boukedi H, Abdelkefi-Mesrati L, Tounsi S, Jaoua S (2013) *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **Journal of Invertebrate Pathology** 114:139-143.
- Bernardi O, Amado D, Sousa RS, Segatti F, Fatoretto J, Burd AD, Omoto C (2014) 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**, 107(2), 781-790.
- Bernardi O, Bernardi D, Amado D, Sousa RS, Fatoretto J, Medeiros FC, Conville J, Burd T, Omoto C (2015) Resistance risk assessment of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein expressed in corn. **Journal of Economic Entomology**, 108(6), 2711-2719.
- Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248- 254.
- Braga DP, Arrigoni ED, Silva-Filho MC, Ulian EC (2003) Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of New Seeds** 5(2-3), 209-221.

Camarozano CT, Coelho A, Silva RBQD, Parra JRP (2021) Can *Trichogramma atopovirilia* Oatman & Platner replaces *Trichogramma galloi* Zucchi for *Diatraea saccharalis* (Fabricius) control? **Scientia Agricola** 79

Carrière Y, Fabrick JA, Tabashnik BE (2016) Can pyramids and seed mixtures delay resistance to Bt crops? **Trends in Biotechnology** 34(4):291-302

Chakrabarty S, Jin M, Wu C, Chakraborty P, Xiao Y (2020) *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. **Pest Management Science** 76(5):1612-1617.

Chakraborty M, Banyuls N, Bel Y, Escriche B, Ferré J (2016a) Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 80(2): 329-350.

Chakraborty M, Banyuls N, Walsh T, Downes S, James B, Ferré J (2016b) Characterization of the resistance to Vip3Aa in *Helicoverpa armigera* from Australia and the role of midgut processing and receptor binding. **Scientific Reports** 6(1):1-11.

Cheavegatti-Gianotto A, de Abreu HMC, Arruda P, Bessalho Filho JC, Burnquist WL, Creste S & César Ulian E (2011). Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical plant biology** 4(1):62-89.

Christiaens O, Niu J, Taning CNT (2020) RNAi in insects: a revolution in fundamental research and pest control applications. **Insects** 11(7):415.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v.1, n.1 (2022). Brasília: Conab, 2022-. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em 16 set 2022.

Cristofolletti PT, Kemper EL, Capella AN, Carmago SR, Cazoto JL, Ferrari F, Galvan TL, Gauer L, Monge GA, Nishikawa MA, Santos NZ, Semeao AA, Silva L, Willse AR, Zanca A, Edgerton MD (2018) Development of transgenic sugarcane resistant to sugarcane borer. **Tropical Plant Biology** 11(1):17-30.

CTNBio. Conselho Técnico de Nacional de Biossegurança. **Liberações comerciais**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br>>. Acesso em: 01 de julho 2022.

Davolos CC, Hernández-Martínez P, Cialesi-Legori PC, Desidério JA, Ferré J, Escriche B, Lemos MVF (2015) Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 127:32-34.

Dessoky ES, Ismail RM, Elarabi NI, Abdelhadi AA, Abdallah NA (2021) Improvement of sugarcane for borer resistance using *Agrobacterium* mediated transformation of Cry1Ac gene. **GM Crops & Food** 12(1):47-56.

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Costa VP, Anjos IA, Lopes DOP (2013) Reação de cultivares de cana-de-açúcar à broca do colmo. **Bragantia** 72:29-34.

Dinardo-Miranda LL, Dos Anjos IA, Costa VP, Fracasso JV (2012) Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 47(1):1-7.

Duan CJ, Feng YL, Cao QL, Huang MY, Feng JX (2016) Identification of a novel family of carbohydrate-binding modules with broad ligand specificity. **Scientific Reports**, 6(1):1-8.

Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JÁ, Koziel MG (1996) 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** 93:5389-5394.

Falco MC, Silva-Filho MC (2003) Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry** 41(8):761-766.

Ferreira CADS, Santana MV, Santos JBD, Santos TTMD, Lôbo LM, Fernandes PM (2018) Yield and technological quality of sugarcane cultivars under infestation of *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). **Arquivos do Instituto Biológico**, 85:e0042017.

Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Baptista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zucchi RA, Alves SB, Vendramim JD, Marchini LC, Lopes JRS, Omoto C (2002). **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ.

Ghimire MN, Huang F, Leonard R, Head GP, Yang Y (2011) Susceptibility of Cry1Ab-susceptible and-resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. **Crop Protection** 30(1):74-81.

Gitahy PM, Galvão PG, Simões Araújo JL, Baldani JI (2006) Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. **Embrapa Agrobiologia**. 44p. (Embrapa Agrobiologia - Documento 214).

Hensley SD, Hammond AH. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, 61(6):1742-1743, 1968

Iqbal A, Khan RS, Khan MA, Gul K, Jalil F, Shah DA, Rahman H, Ahmed T (2021). Genetic engineering approaches for enhanced insect pest resistance in sugarcane. **Molecular Biotechnology** 63(7):557-568.

ISAAA. 2021. **Breaking Barriers with Breeding**: A Primer on New Breeding Innovations for Food security. ISAAA Brief No. 56. ISAAA: Ithaca, NY

Jurat-Fuentes JL, Heckel DG, Ferré J (2021). Mechanisms of resistance to insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 66:121-140.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227(5259):680-685.

Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferre J, Lemos MVF, Desiderio JA (2014). Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 9(10):e107196.

Lemes ARN, Figueiredo CS, Sebastião I, Silva LM, Alves RC, Siqueira HAA, Lemos MVF, Fernandes AO, Desidério JA (2017) Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ**, 5, e2866.

Lin Z, Wang RJ, Cheng Y, Du J, Volovych O, Han LB, Li JC, Hu Y, Lu ZY, Lu Z and Zou Z (2019) Insights into the venom protein components of *Microplitis mediator*, an endoparasitoid wasp. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 105:33-42.

Mall T, Gupta M, Dhadialla TS, Rodrigo, S (2019). Overview of biotechnology-derived herbicide tolerance and insect resistance traits in plant agriculture. **Transgenic Plants**, 313-342.

Parra JRP (2010) Mass rearing of egg parasitoids for biological control programs. p. 267-292. In: Cónsoli FL, Parra JRP, Zucchi RA (eds). **Egg parasitoids in agroecosystems with emphasis on Trichogramma**. Springer.

Parra JRP (2014) Biological Control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola** 71(5):420-429.

Parra JRP, Coelho Jr A (2019) Applied biological control in Brazil: From laboratory assays to field application. **Journal of Insect Science** 19(2):1-6.

Parra JRP, Coelho Jr, A (2022) Insect Rearing Techniques for Biological Control Programs, a Component of Sustainable Agriculture in Brazil. **Insects** 13(1):105.

Pinto CPG, Walker AA, Robinson SD, Chin YKY, King GF, Rossi GD (2021) Venom composition of the endoparasitoid wasp *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) and functional characterization of a major venom peptide, **Toxicon** 202:1-12.

Pinto CP, Walker AA, Robinson SD, King GF, Rossi GD (2022) Proteotranscriptomics reveals the secretory dynamics of teratocytes, regulators of parasitization by an endoparasitoid wasp. **Journal of Insect Physiology** 139:104395.

Ramírez MG, Avelizapa LIR, Avelizapa NGR, Camarillo RC (2004) Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR a useful substrate to select chitinolytic

microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods** 56:213-219.

Reis MA, Noriega DD, Alves GS, Coelho RR, Grossi-de-Sa MF, Antonino JD (2022) Why is oral-induced RNAi inefficient in *Diatraea saccharalis*? A possible role for DsREase and other nucleases. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 186:105166.

Rossi GD, Labate MTV, Labate CA, Vinson SB, Consoli FL (2012) Characterization of a *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae)-derived chitinase and its potential for pest control. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 104:96-102.

Sambrook J and Russel DW (2001) **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2344p.

Santos CD, Terra WR (1986) Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* larvae and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. **Insect Biochemistry** 16(4):691-700.

Shao E, Zhang A, Yan Y, Wang Y, Jia X, Sha L, Guan X, Wang P, Huang Z (2020) Oligomer formation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin. **Toxins** 12(4):274.

Silva DS, Oliveira CF, Parra JRP, Marangoni S, Macedo ML (2014) Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer. **Journal of Insect Physiology** 61:1-7.

Song F, Chen C, Wu S, Shao E, Li M, Guan X, Huang Z (2016) Transcriptional profiling analysis of *Spodoptera litura* larvae challenged with Vip3Aa toxin and possible involvement of trypsin in the toxin activation. **Scientific Reports** 6(1):1-10.

Strand MR (2014) Teratocytes and their functions in parasitoids. **Current Opinion Insect Science** 6:68-73.

Wei Y, Wu S, Yang Y, Wu Y (2017) Baseline susceptibility of field populations of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin and lack of cross-resistance between Vip3Aa and Cry toxins. **Toxins** 9(4):127.

Wilson BE, Salgado LD, Villegas JM (2022) Optimizing chemical control for *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in sugarcane. **Crop Protection** 152:105843.

Wu X, Leonard BR, Zhu YC, Abel CA, Head GP, Huang F (2009) Susceptibility of Cry1Ab-resistant and-susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology** 100(1):29-34.