

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

**PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A DE *Bacillus thuringiensis*:
SINERGISMO E EFEITO SUB-LETAL NO CONTROLE DE
Heliothis virescens.**

Ana Rita Nunes Lemes

Engenheira agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro 2012

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

**PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A DE *Bacillus thuringiensis*:
SINERGISMO E EFEITO SUB-LETAL NO CONTROLE DE *Heliothis
virescens*.**

Ana Rita Nunes Lemes

Orientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

Co-Orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro 2012

L552p Lemes, Ana Rita Nunes Lemes
Proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis*: sinergismo e efeito subletal no controle de *Heliothis virescens*/ Ana Rita Nunes Lemes. -- Jaboticabal, 2012
ix, 65 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientadora: Janete Aparecida Desidério
Banca examinadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro, Juliana Regina Vieira da Costa

Bibliografia

1. proteínas inseticidas. 2. plantas piramidadas. 3. expressão heteróloga
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.937:633.51

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANA RITA NUNES LEMES – nasceu em 26 de abril de 1985 em Ituiutaba - MG. Concluiu o ensino médio em 2002. Ingressou na Universidade em 2005, concluindo o curso de Agronomia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal - SP em 2009. Em 2010 iniciou o mestrado na área de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal - SP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Sílvio e Maria das Graças por terem acreditado e fornecido condições para que eu concluísse mais uma etapa desta vida.

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

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me oferecido a oportunidade de viver e evoluir a cada dia;

À Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério minha orientadora, pelo apoio, paciência, ensinamentos, credibilidade e compreensão que me proporcionou;

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes pela co-orientação, amizade, carinho e ensinamentos oferecidos;

Ao Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos pelo apoio e auxílios prestados;

Aos colegas do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) pelo convívio agradável;

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

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra da Universidade de São Paulo-ESALQ por ceder os insetos utilizados neste trabalho;

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

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

Às amigas Gislaine Martins (Batatinha), Kelly Marques (Kuié), Ludmila dos Santos, Maria Beatriz Abdo (Turca), Fernanda Dias (Muja), Meire Alves, Viviane Matos, Vivian Bergamasco, Deise Reis, pelo apoio, carinho, amizade e ajuda fornecida durante todo o curso;

À Paula Brunini e Camila Davolos pelo carinho, disposição, companheirismo na elaboração deste trabalho e paciência para me ensinar;

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

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

Às minhas sobrinhas Elisa e Lara pela ternura;

Ao meu cunhado Joelson e minha cunhada Camila pelo carinho;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

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

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
SUMMARY –	IX
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. A CULTURA DO ALGODÃO <i>GOSSYPIMUM HIRSUTUM</i> L.....	4
3.2. A LAGARTA-DA-MAÇÃ DO ALGODOEIRO <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i>	5
3.3. RESISTÊNCIA DE INSETOS-PRAGA ÀS PROTEÍNAS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> .	7
3.4. A BACTÉRIA <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> E SUAS TOXINAS	9
3.4.1. PROTEÍNAS CRY1 DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	10
3.4.2. PROTEÍNAS VIP3A DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	12
3.5. EFEITOS DAS TOXINAS DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	16
3.6. PROTEÓLISE DAS PROTEÍNAS.....	17
IV. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A.....	19
4.2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CRY1	19
4.3. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS VIP3A	20
4.4. ELETROFORESE SDS-PAGE E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	21
4.5. BIOENSAIOS COM <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i>	23
4.5.1. BIOENSAIOS DE CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL ₅₀) PARA PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A	23
4.6. EFEITO SUB-LETAL E SINÉRGICO DE CRY1 E VIP3A A <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i> ..	24

4.7. INTERAÇÃO DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i> COM AS TOXINAS CRY1 E VIP3A <i>IN VITRO</i>	25
4.8. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	26
V. RESULTADOS	27
5.1. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A	27
5.2. QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A	28
5.3. BIOENSAIOS COM <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i>	29
5.4. EFEITO INSETCIDA SUB-LETAL E SINÉRGICO DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> A <i>HELIOTHIS VIRESCENS</i>	31
5.5. PROTEÓLISE DAS PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A DE <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> ..	35
VI. DISCUSSÃO	37
VII. CONCLUSÃO	44
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

PROTEÍNAS CRY1 E VIP3A DE *Bacillus thuringiensis*: SINERGISMO E EFEITO SUB-LETAL NO CONTROLE DE *Heliothis virescens*.

RESUMO - A bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) possui a capacidade de produzir inclusões protéicas (proteína Cry) e proteínas vegetativas (Vip). Estas proteínas podem ser tóxicas para insetos e por meio de transgenia, a expressão em plantas, podem também proporcionar controle de importantes pragas agrícolas. Nesse sentido, esta pesquisa teve por objetivo avaliar o potencial de controle das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3) em uma população brasileira da lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), bem como o efeito sub-letal e efeito sinérgico entre estas proteínas e a proteólise pelo suco do intestino do inseto praga em estudo. Para tanto, clones de *Escherichia coli* recombinantes portadores de genes únicos foram cultivados em meio para a indução das proteínas e os lisados obtidos foram utilizados para as análises de toxicidade por meio de bioensaios. Diferentes concentrações protéicas foram utilizadas para conduzir os bioensaios. A mortalidade foi avaliada e obteve-se a CL₅₀. Desta forma, observou-se que, dentre as proteínas testadas, Cry1Ac (CL₅₀ 39,89 ng.cm⁻²), Vip3A(2) (CL₅₀ 945,77 ng.cm⁻²) e Vip3A(3) (CL₅₀ 874,45 ng.cm⁻²) foram as mais tóxicas e houve correlação negativa entre a concentração de proteínas e o peso das lagartas. Nos ensaios referentes ao efeito sinérgico das proteínas, ativadas e não ativadas com tripsina comercial, foram encontradas possíveis combinações eficientes no controle da praga em estudo destacando-se Vip3A(2)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Ac, e Vip3A(2)/Cry1Ac. Os resultados referentes à interação das enzimas digestivas do intestino de *H. virescens* com as toxinas Cry1 e Vip3A permitiram constatar que as proteínas são ativadas.

Palavras-chave: Proteínas inseticidas, plantas piramidadas, expressão heteróloga.

***Bacillus thuringiensis* CRY1 AND VIP3A PROTEINS: SYNERGISM AND SUBLETHAL EFFECT ON THE CONTROL OF *Heliothis virescens*.**

SUMMARY – *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) produces protein inclusions (Cry proteins) and vegetative proteins (Vip). Such proteins may act as toxic to some insects and through transgenesis plants they may be able to control important agricultural pests. Thus this work aimed to evaluate the control potential of Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3A(1), Vip3A(2) and Vip3A(3) proteins in a Brazilian population of *Heliothis virescens* (tobacco budworm) (Lepidoptera: Noctuidae), as well as to analyze the sublethal and the synergic effects among these proteins and the proteolysis on the intestinal juice of this pest. In order to do this, *Escherichia coli* clones expressing each one of the above mentioned proteins were induced to produce them and the obtained lysates were used to determine the level of toxicity through bioassays with neonatal larvae of *H. virescens*. Different protein concentrations were used to carry out the bioassays. The mortality was evaluated and it was possible to detect the CL₅₀. It was possible to observe that among the tested proteins, Cry1Ac (CL₅₀ 39.89 ng.cm⁻²), Vip3A(2) (CL₅₀ 945,77 ng.cm⁻²) and Vip3A (3) (CL₅₀ 874,45 ng.cm⁻²) were the most toxic and showed a negative correlation between the protein concentration and larvae weight. During the bioassays concerning the synergistic effect of these proteins, which were either previously activated or not using commercial trypsin, there we found efficient combinations for the control of the pest under study in this work, being that the combinations Vip3A(2)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Ac and Vip3A(2)/Cry1Ac were considered the best ones. The results with reference to the interaction of the digestive enzymes from the intestine of *H. virescens* larvae when using the toxins Cry1 and Vip3A allowed us to detect that these proteins are activated.

Keywords: Insecticidal proteins, pyramided plants, heterologous expression.

I. INTRODUÇÃO

O controle de insetos-praga na agricultura e de insetos vetores de importantes doenças humanas ainda é realizado com o uso de inseticidas químicos. No entanto, o uso destes resulta em vários problemas, como a poluição ambiental, redução da população de organismos benéficos, seleção de populações de pragas resistentes aos inseticidas convencionais e aumento dos efeitos a saúde humana, como câncer e vários distúrbios no sistema imunológico (DEVINE & FURLONG, 2007). Devido a problemas relacionados ao uso excessivo de produtos químicos, a busca por métodos alternativos de controle de insetos-praga que permitam reduzir ou até mesmo substituí-los, inclui a obtenção de plantas geneticamente modificadas.

Dessa forma, *Bacillus thuringiensis* Berliner é considerada uma alternativa viável para essa finalidade. Trata-se de uma espécie de grande interesse, uma vez que é entomopatogênica a diferentes ordens de insetos-praga além da vantagem de possibilitar o isolamento e expressão de seus genes em outros organismos por meio da biotecnologia. Esta bactéria tem capacidade de produzir, durante a esporulação, inclusões cristalinas, compostas por proteínas denominadas δ -endotoxinas e também proteínas Vip, as quais são expressas no estágio vegetativo de crescimento da bactéria e não apresentam homologia de seqüência ou estrutura com as toxinas Cry (CAVADOS et al. 2001).

O emprego de plantas geneticamente modificadas na agricultura mundial contendo genes da bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (*Bt*), que codificam proteínas com ação inseticida, vem aumentando significativamente e, atualmente, o algodão *Bt* é o segundo Organismo Geneticamente Modificado (OGM) resistente a insetos mais cultivado no mundo, sendo apenas superado pelo milho *Bt* (JAMES, 2010).

A cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das mais tradicionais do Brasil e apresenta sinais de avanço nos últimos anos. A sua estimativa de produção para o ano agrícola de 2011 é da ordem de 5,0 milhões de toneladas (IBGE, 2011). Contudo, apesar das altas taxas produtivas, grandes prejuízos econômicos são causados anualmente nessa cultura devido ao ataque de insetos-praga, sendo este um dos principais problemas

agronômicos enfrentados. Dentre eles destaca-se a lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens* (Fabricius 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), devido a sua ocorrência em diversas regiões produtoras do país, aos grandes prejuízos provocados e também pela dificuldade de controle. Existe comercialmente algodão contendo genes de *B. thuringiensis* visando o controle desta praga, tais como Bollgard®, Bollgard® II, WideStrike® e recentemente, foi desenvolvido mais um evento o VipCot™.

A crescente liberação dos cultivos de plantas transgênicas expressando estas toxinas de *B. thuringiensis* permitiu a evolução da resistência de insetos, isso se deve a um grande número de fatores que interagem entre si. Tais fatores estão relacionados às características do material genético da planta transgênica, à bioecologia e genética da praga alvo, ao manejo da cultura e ao ambiente da região de cultivo (MAIA, 2003). Assim, a busca por novas toxinas inseticidas que apresentem modo de ação diferente das δ -endotoxinas é uma das estratégias empregada para driblar o desenvolvimento da resistência. Desse modo, torna-se conveniente a obtenção de plantas transgênicas com empilhamento múltiplo de genes visando o manejo de possível seleção de insetos-praga resistentes.

Considerando todas as explicações anteriores, este trabalho visou contribuir para o controle biológico de *H. virescens*, no sentido de se selecionar proteínas Cry1 e Vip3A com maior efetividade tóxica, com possível efeito sub-letal no desenvolvimento das lagartas, bem como analisar o efeito inseticida sinérgico entre as proteínas na mortalidade desta importante praga.

II. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram expressar as proteínas Cry1 e Vip3A, verificar a toxicidade e o possível efeito sub-letal no desenvolvimento de *Heliothis virescens*, analisar a existência de efeito inseticida sinérgico entre as diferentes combinações das proteínas ativadas e não ativadas e verificar a eficiência da proteólise das referidas toxinas com o suco intestinal do inseto.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A cultura do algodão *Gossypium hirsutum* L.

No ano de 2009, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de plantas geneticamente modificadas (GM) do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. O plantio de soja, milho e algodão transgênicos alcançou a marca de 21,4 milhões de hectares semeados, superando em 100 mil hectares a área plantada na Argentina (ISAAA, 2010). Desse total, 16,2 milhões de hectares são plantados com soja *Roundup Ready* (tolerante ao herbicida glifosato), 5 milhões de milho com genes de *B. thuringiensis* (*Bt*) (resistente a pragas) e 145 mil hectares com algodão transgênico, destes 116 mil correspondem ao algodão *Bt* e 29 mil são tolerantes a herbicida .

A lavoura de algodão no Brasil atingiu recentemente (safra 2010/2011), importância há muito tempo não vista. Os preços altos praticados no mercado interno e externo estimularam os produtores a aumentar a área de cultivo. É importante ressaltar que o algodão é uma planta que oferece diferentes produtos de utilização universal (PONCHIO, 2001; BALLAMINUT et al. 2006).

Em solo nacional esta cultura ocupa 8,5 milhões de hectares, sendo 4,9 milhões de hectares com algodão *Bt* e 3,6 milhões de hectares com algodão *Bt* mais herbicidas (JAMES, 2005). Um dos principais problemas agrônômicos desta cultura são os insetos-praga, os quais, anualmente, causam grandes prejuízos econômicos. Dentre eles destaca-se a lagarta-da-maçã, *Heliothis virescens*, devido a sua ocorrência em diversas regiões produtoras do país, aos grandes prejuízos provocados e também pela dificuldade de controle.

Desse modo, o algodão transgênico que contém genes de *B. thuringiensis* que produzem proteínas tóxicas para as lagartas *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) (Boddie) e *H. virescens* tem sido uma importante ferramenta de controle de insetos-praga desde o lançamento comercial em 1996. Esta planta expressando Cry1Ac de *B. thuringiensis*, comercializado para controlar *H. virescens* no campo, mostrou ser uma

tecnologia eficiente e ambientalmente segura (BETZ et al. 2000). Também, segundo QAIM & ZILBERMAN (2003), o uso de algodão transgênico resultou em diminuições significativas no uso de inseticidas em países em desenvolvimento e, em alguns casos, também em aumento na rentabilidade.

Seguindo esta tendência, foram introduzidas comercialmente variedades Bollgard (Monsanto Company, St. Louis, MO) com uma única toxina, Cry1Ac, a qual controla *H. virescens* (MAHAFFEY et al. 1995; JACKSON et al. 2003) e nos últimos anos, dois outros algodões transgênicos foram lançados sob o nome de BollgardII (Monsanto Company) e WideStrike (DowAgroSciences). BollgardII contém genes que produzem endotoxinas Cry1Ac e Cry1F (PELLOW et al. 2002). Ambos os algodões piramidados, principalmente BollgardII, mostraram ótimo controle de *Helicoverpa zea* em testes de campo (JACKSON et al. 2003, 2005).

Também foram desenvolvidos algodões que produzem a proteína Vip3A e os dados de campo preliminares sugerem que o algodão produz a proteína Vip3A, COT202 e COT203, com níveis de controle para *H. Zea* semelhante ao BollgardII e variedades WideStrike (BRADLEY et al. 2004), mas o controle de *H. virescens* por Vip3A é menor do que a observada para a proteína Cry1Ac.

3.2. A lagarta-da-maçã do algodoeiro *H. virescens*

O inseto-praga deste estudo, *H. virescens*, é considerada uma das mais sérias pragas do algodoeiro, não só pelos prejuízos que causa na lavoura, mas pela resistência que tem ao efeito de grande número de inseticidas. Na cultura da soja, este inseto também destaca-se como importante problema fitossanitário, principalmente nas regiões produtoras do cerrado (TOMQUELSKI & MARUYAMA, 2009).

É uma espécie polífaga, amplamente distribuída no Brasil, com alta capacidade reprodutiva, podendo ter de duas a três gerações por ciclo da cultura dependendo da região (FITT et al. 2006). É capaz de sobreviver em clima temperado, sendo comum encontrá-la em regiões como nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá. No

Brasil, o maior centro de diversidade de *H. virescens* encontra-se nas regiões sudeste e centro-leste (POOLE et al. 1993).

Este inseto-praga é conhecido há muito tempo na América do Norte e no Brasil foi Hambleton, em 1935, quem primeiro registrou sua presença. Seu ciclo evolutivo passa por quatro fases bem distintas: ovo, lagarta, pupa e adulto. Da eclosão do ovo até a transformação em pupa sucedem-se seis estágios larvais. A lagarta é geralmente de coloração verde, com o ventre esbranquiçado e o dorso com duas estrias longitudinais mais intensas. Da postura do ovo até a duração do adulto (Figura 1), o período evolutivo da praga é de 3 a 5 dias de incubação larval, 24 a 29 dias de período larval, 17 a 48 dias de pupa e 16 a 19 dias de adulto.

O adulto é uma mariposa de asas anteriores esverdeadas, com três linhas oblíquas avermelhadas. Os ovos estriados e de coloração branca são depositados, de forma isolada, em tecidos novos da planta e cada fêmea produz em média 600 ovos. As lagartas recém nascidas alimentam-se apenas de folhas novas ou botões florais e com o desenvolvimento larval, passam a atacar também as maçãs, causando sérios prejuízos à cotonicultura. Além disso, as estruturas danificadas ficam mais expostas à penetração de microorganismos fitopatogênicos (GALLO et al. 2002). As lagartas depois de completamente desenvolvidas, abandonam as maçãs do algodoeiro, deixando-se cair no solo para transformarem-se em estado de pupa.



Figura 1: Ciclo de desenvolvimento de *Heliothis virescens*.

3.3. Resistência de insetos-praga às proteínas de *B. thuringiensis*

O fenômeno da evolução de resistência aos inseticidas é um dos graves problemas no controle de insetos-praga agrícola, entretanto, os casos de resistência não se limitam a inseticidas sintéticos, mas incluem uma ampla gama de produtos naturais, incluindo reguladores de crescimento e agentes de controle biológico, entre eles a toxina produzida por *B. thuringiensis*. Pragas alvo evoluem em resposta à seleção natural imposta pelos métodos de controle, limitando sua eficiência e viabilidade em longo prazo (HAWTHORNE, 1998).

Inicialmente, os casos de evolução da resistência de insetos a proteínas de *B. thuringiensis*, restringiam-se a biopesticidas à base de *Bt* aplicados em pulverização ou devido à seleção de linhagens resistentes a proteínas de *Bt* em condições de laboratório. Formulações contendo a toxina de *B. thuringiensis* foram usadas por mais de quarenta anos como inseticidas sem nenhuma evidência de resistência em situações de campo. O primeiro relato de falhas de formulações de *B. thuringiensis* no controle de pragas ocorreu nas Filipinas com *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) (VAN RIE & FERRÉ, 2000). Desde então, observa-se que populações de várias espécies de lepidópteros, coleópteros e dípteros, têm desenvolvido resistência à toxina *B. thuringiensis* em condições de laboratório (NEPPL, 2001).

Um fator importante na determinação da capacidade de uma espécie de inseto desenvolver resistência é a variabilidade genética, tanto dentro da mesma população quanto entre populações diferentes (FERRÉ & VAN RIE, 2002). Geralmente, os altos níveis de variação intraespecífica entre as populações refletem uma maior capacidade de desenvolver resistência. Este tipo de variabilidade tem sido detectado em diferentes espécies de insetos-praga, *H. virescens*, *H. zea*, *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), *P. xylostella*, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) (LUTTRELL et al. 1999; ALI et al. 2006; MONNERAT et al. 2006; SAEGLITZ et al. 2006, ALI & LUTRELL, 2007).

A evolução da resistência a toxinas de *B. thuringiensis* expressas em plantas transgênicas, numa população de insetos, é afetada por um grande número de fatores que interagem entre si e em relação às bases bioquímicas da resistência, qualquer alteração no modo de ação das toxinas de *B. thuringiensis* poderá influenciar no desenvolvimento da resistência. Essas alterações podem ser: 1) alteração no sítio de ligação da toxina à membrana; 2) modificação na atividade proteolítica no intestino do inseto; 3) aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial danificado. A primeira alteração é a que gera os maiores níveis de resistência, ela tem sido descrita tanto em populações resistentes capturadas em campo como em populações selecionadas artificialmente em laboratório. Além disso, esta alteração tem sido detectada em cepas resistentes a uma ou várias toxinas da família Cry1A de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) (Hübner) (VAN RIE et al. 1990), *P. xylostella* (FERRÉ et al. 1991) e *H. virescens* (LEE et al. 1995).

Quanto ao mecanismo que implica na alteração da atividade proteolítica do intestino do inseto, OPPERT et al. (1997) mostraram que há ligação genética entre a resistência a Cry1Ac e a ausência de uma protease intestinal em uma cepa de *P. interpunctella*. Em *H. virescens* tem-se observado que as lagartas resistentes mostram mais rápida recuperação do tecido epitelial após sua intoxicação com doses sub-letais da toxina Cry1Ac (MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al. 1999).

Embora algumas estratégias tenham sido praticadas com o intuito de reduzir a resistência, como por exemplo, área de refúgio, uma segunda metodologia está sendo usada recentemente, que é o uso de culturas piramidadas, ou seja, com empilhamento de múltiplos genes na mesma planta. As chances de ocorrer duas mutações simultaneamente nos dois receptores para toxinas agindo independentemente seriam muito menores. Esta última estratégia exige que: 1) os genes que codificam proteínas inseticidas apresentem um mecanismo de ação diferente ou local de ligação diferente, para evitar o aparecimento de resistência cruzada; 2) utilizar proteínas com toxicidade contra o mesmo organismo alvo; 3) existir baixa frequência de alelos de resistência na população do campo e os locos de resistência de ambos os genes não estarem ligados (BRAVO & SOBERÓN 2008, FERRÉ et al. 2008, TABASHNIK & CARRIÈRE, 2008).

Acredita-se que o desenvolvimento de resistência a *B. thuringiensis* diminui com estas plantas piramidadas, como no caso do algodão, devido à sua dupla ação e maior dose efetiva (GOULD et al. 2003). A maior dose efetiva deve, teoricamente, reduzir a sobrevivência dos indivíduos heterozigotos portadores de genes recessivos para a resistência.

A estratégia de pirâmide é suportada por testes de laboratório com lagarta do algodão e em análise recente com populações nos campos de algodão *Bt* na Índia com lagarta-rosada, *Pectinophora gossypiella* (SAUNDERS, 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae). Os estudos de laboratório mostraram que a lagarta do algodão pode desenvolver resistência a MVP, uma formulação *Bt* comercial baseado em Cry1Ac, mas não para Dipel ou XenTari, que contêm proteínas múltiplas Cry (AKHURST et al. 2003). A linhagem resistente também foi resistente a Cry1Ab, mas não a Cry2Aa ou Cry2Ab que se ligam a diferentes receptores (LIAO et al. 2002).

Assim, os estudos de ligação das proteínas Cry têm revelado uma estreita correlação entre o desenvolvimento de resistência cruzada ou resistência múltipla e a existência de sítios de ligação comuns para estas toxinas. Espécies de insetos que compartilham os mesmos sítios de ligação para determinadas toxinas, ao desenvolver resistência a uma das toxinas, podem desenvolver também resistência para o restante das toxinas que compartilham os mesmos sítios de ligação, como ocorre em *P. xylostella* (GRANERO et al. 1996) e *H. virescens* (JURAT-FUENTES & ADANG, 2001).

Atualmente, os programas de controle de resistência realizam numerosos estudos de campo, em relação a susceptibilidade, a fim de verificar se a resistência tem aumentado em diferentes populações de insetos após a aplicação de produtos *Bt* ou após a introdução da cultura-*Bt* (SIVASUPRAMANIAM et al. 2007).

3.4. A bactéria *B. thuringiensis* e suas toxinas

A bactéria *B. thuringiensis* é o microrganismo mais bem sucedido usado como biopesticida e representa uma importante alternativa aos inseticidas químicos atuais no controle de algumas espécies de insetos, devido à sua capacidade para controlar

especificamente a praga desejada, bem como a sua segurança ambiental (KAWANISHI & HELD, 1990; VAN FRANKENHUYZEN, 1993). É uma bactéria entomopatogênica gram-positiva, em forma de bastonete, formadora de esporos, da família Bacillaceae (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Encontra-se amplamente distribuída por todo o planeta, devido principalmente à sua capacidade esporulante, o que lhe confere uma elevada resistência ao calor e a seca (MARTIN & TRAVERS, 1989).

Ocorre em diversos ambientes e é facilmente isolada a partir de diferentes substratos por métodos relativamente simples e eficientes (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Destaca entre os organismos empregados no controle biológico, por produzir um número de toxinas inseticidas, incluindo, exotoxinas, enterotoxinas, toxinas Vips e endotoxinas. Sob certas restrições, como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis, esta bactéria entra em processo de esporulação, durante a fase estacionária. No início da esporulação, *B. thuringiensis* sintetiza uma grande quantidade de proteínas com atividade inseticida. As proteínas acumuladas formam um corpo de inclusão cristalina, razão pelas quais são denominadas Cry (YAMAMOTO & DEAN, 2000).

3.4.1. Proteínas Cry1 de *B. thuringiensis*

Durante sua esporulação, *B. thuringiensis* produz corpos de inclusão que contém uma série de proteínas (δ -endotoxinas) com atividade inseticida, proteínas Cry e proteínas Cyt. Dentro desta denominação se agrupam todas aquelas proteínas produzidas por *B. thuringiensis* que se acumulam na célula como um corpo de inclusão parasporal (cristal) e com atividade tóxica contra algum organismo alvo.

Mais de 200 genes de δ -endotoxinas têm sido descritos, classificados em 27 grupos de acordo com a homologia da seqüência de aminoácidos (CRICKMORE et al. 1998). As proteínas Cry possuem duas regiões distintas compostas por protoxinas, uma porção amino-terminal (N-terminal), normalmente variável, associada à toxicidade da proteína e uma porção carboxi-terminal (C-terminal), sendo esta conservada e associada à formação do cristal (BRAVO et al. 2007).

Apesar da sua diversidade de sequência, todas as proteínas Cry compartilham uma estrutura terciária semelhante, como exemplificada até agora por cristalografia de raios X. A porção C-terminal está envolvida na formação de cristais, mas não faz parte da toxina madura, pois é clivada no intestino do inseto. A porção N-terminal é a toxina em si, e compreende três domínios. Domínio I é um conjunto de sete hélices, seis das quais são anfipáticas que circundam a sétima hélice hidrofóbica, e este domínio é responsável pela inserção da membrana e formação de poros. Domínios II e III conferem especificidade de ligação ao receptor, assim, ajudando a definir a gama de hospedeiros (BOONSERM et al. 2006).

O modo de ação das proteínas Cry foi determinado, principalmente, em lagartas de lepidópteros (KNOWLES & DOW, 1993). As proteínas Cry provocam lise das células epiteliais intestinais das lagartas de insetos susceptíveis pela formação de poros na região apical das microvilosidades (ARONSON & SHAI, 2001; DE MAAGD et al. 2001; BRAVO et al. 2005). Os sintomas que são ressaltados a partir deste momento são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e por fim, morte (ARONSON et al. 1986).

Após a ingestão dos esporos e cristais pelo inseto, os cristais são solubilizados em pH alcalino, originando as protoxinas que em presença de enzimas digestivas (proteínases) são convertidas em 4 ou mais polipeptídeos tóxicos (δ -endotoxinas). Essas toxinas hidrolizadas cruzam a membrana peritrófica, ligam-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células colunares do intestino médio, interferindo no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana apical formando poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio (Figura 2). O inseto também pode morrer por inanição, uma vez que pouco tempo após a infecção o inseto cessa a alimentação (COPPING & MENN, 2000).

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac têm sido muito estudadas em lepidópteros acarretando uma série de evidências a respeito do funcionamento das proteínas Cry quando estas são ingeridas por insetos susceptíveis (BRAVO et al. 2007).

A partir dessas pesquisas, os genes dessas proteínas são utilizados na transformação de plantas, originando os cultivares transgênicos (MIKLOS et al. 2007).

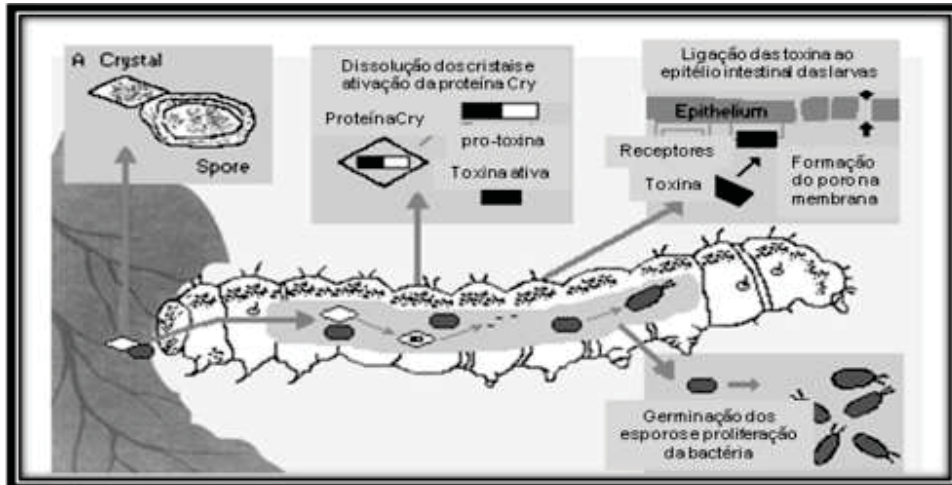


Figura 2: Etapas envolvidas no mecanismo de ação de *B. thuringiensis*.

3.4.2. Proteínas Vip3A de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis também produz uma classe de proteínas chamadas VIPs (Proteínas Inseticidas Vegetativas) que são produzidas e secretadas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria (ESTRUCH et al. 1996) e também possui atividade entomopatogênica. Diferentemente das proteínas Cry, as quais se unem em cristais insolúveis dentro da célula mãe, Vip3A é secretada como proteína solúvel por algumas linhagens de *B. thuringiensis* durante a fase vegetativa de crescimento, dificultando sua aplicação no campo (ARORA et al. 2003).

Apresenta atividade tóxica contra cerca de 130 espécies de insetos das Ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera, estando inclusas importantes pragas agrícolas brasileiras como *S. frugiperda*, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae) e alguns vetores de doenças de importância mundial, pertencentes aos gêneros *Aedes*, *Culex* e

Anopheles (LERECLUS et al. 1993), além de atingir também alguns invertebrados como os nematóides e platelmintos (FEITELSON et al. 1993)

O modo de ação destas toxinas é por meio das proteínas ativas que se ligam aos receptores localizados nas microvilosidades das células colunares do epitélio intestinal das lagartas de insetos susceptíveis (DE MAAGD et al. 2001; BRAVO et al. 2005). A inserção da toxina promove a formação de poros na região apical das microvilosidades. A união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry e Vip, o que incentivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem a compreensão desse processo (MONNERAT & BRAVO, 2000). As metodologias mais utilizadas são os estudos cinéticos de união utilizando proteínas marcadas com biotina e “brush border membrane vesicles” (BBMVs).

As plantas transgênicas contendo genes de *B. thuringiensis* que expressam proteínas entomopatogênicas é uma opção viável para combater insetos-praga. Os transgênicos, segundo ZHAO et al. (2000), podem constituir uma contínua fonte de toxinas que favorecem seleção para genes resistentes dentro de populações de insetos. A seleção de isolados de *B. thuringiensis* e, conseqüentemente, a descoberta de novas proteínas com atividade inseticida é uma forma de incrementar o manejo de insetos-praga (ESCUADERO et al. 2004; MEDEIROS et al. 2005). Para obter sucesso na utilização destes em programas de manejo de insetos-praga, é necessária a adoção de isolados eficientes. Dessa forma, a seleção de isolados nativos pode fortalecer o desenvolvimento regional, pois a maioria dos produtos disponíveis no mercado é importada e apresenta elevados custos de produção (POLANCZYK et al. 2008).

As proteínas Vip foram descritas por ESTRUCH et al. (1996) e recebem essa denominação por serem produzidas na fase vegetativa de crescimento de *B. thuringiensis*. Sua concentração também permanece alta antes e depois da fase de esporulação. Essas proteínas são produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, adiantando a sua obtenção. Essa foi uma descoberta importante, pois atualmente não só se aproveita a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também é possível utilizar o seu sobrenadante (ESTRUCH et al. 1996).

A ação da proteína Vip3A tem sido pesquisada e demonstra iniciar sua atividade no epitélio intestinal do inseto assim como as proteínas Cry, no entanto devido a sua forma solúvel as proteínas Vips se ligam mais rapidamente aos receptores de membrana das células epiteliais do intestino do inseto susceptível e começa uma progressiva degeneração da camada epitelial (YU et al. 1997).

Desde a descoberta da toxina Vip, dois grandes grupos de toxinas Vip têm sido identificados em *B. thuringiensis*. Um dos grupos de toxinas Vip consiste de toxinas binárias que são feitos de dois componentes, Vip1 e Vip2 (WARREN, 1997). A combinação de Vip1 e Vip2 é altamente inseticida para um inseto agronomicamente importante, o crisomélideo do milho, *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), mas não mostra qualquer atividade inseticida para quaisquer insetos lepidópteros (HAN et al. 1999). O outro grupo é composto por toxinas Vip3, que não compartilham similaridade com nenhuma seqüência Vip1 ou Vip2.

O gene *vip3A* codifica uma proteína com atividade tóxica para insetos pouco sensíveis à maioria das proteínas Cry, e além disso, essa proteína apresenta ação sobre um espectro maior de espécies de insetos-praga, principalmente contra lepidópteros (LOGUERCIO et al. 2002). A primeira toxina identificada Vip3, Vip3Aa1, é altamente inseticida para várias pragas de lepidópteros de milho e algodão, incluindo *S. frugiperda* e *H. zea*, mas não apresenta atividade contra a broca do milho européia *O. nubilalis*, uma das maiores pragas de milho (ESTRUCH et al. 1996).

A localização dos genes responsáveis por sua produção ainda não foi determinada, embora existam vários conjuntos de *primers* que podem ser utilizados para identificá-las como *vip1* e *vip2* (RICE, 1999; FANG et al. 2007; SELVAPANDIYAN et al. 2001) *vip3A* (RICE, 1999), *vip3Aa* (SEIFINEJAD et al. 2008), *vip5* e *vip6* (LOGUERCIO et al. 2002).

A proteína Vip3A possui atividade inseticida contra um grande espectro de insetos-praga de importância agrônômica da ordem Lepidoptera e revela alta bioatividade para: *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hufnagel, 1767), *S. frugiperda*, *S. exigua* (ESTRUCH et al. 1996), *H. virescens*, *H. zea* (DOSS et al. 2002). No caso de *A. ipsilon*, Vip3A proporciona 260 vezes superior atividade inseticida do que

algumas proteínas Cry1A relatadas como sendo ativas contra esta praga (ESTRUCH et al. 1996; MACINTOSH et al. 1990). O espectro inseticida das proteínas Vip inclui certas pragas importantes, as quais têm mostrado insensibilidade para as proteínas Cry (BHALLA et al. 2005).

Segundo FANG et al. (2007) estas proteínas representam uma das maiores descobertas de toxinas com capacidade inseticida, sendo extremamente relevante a ausência de similaridade nas seqüências de aminoácidos destas proteínas com as seqüências de aminoácidos das endotoxinas, especialmente, em termos de manejo e evolução da resistência. Segundo DONOVAN et al. (2001), a proteína Vip3A pode ser sintetizada depois que esporos de *B. thuringiensis* são ingeridos por insetos, sugerindo que uma parte significativa da patogenicidade de *B. thuringiensis* contra *S. exigua* seja devida à produção de proteína Vip3A dentro de lagartas mortas. A mortalidade seria, então, resultante de germinação de esporos, crescimento e desenvolvimento de células bacterianas depois da ingestão pelas lagartas.

LEE et al. (2003) compararam o modo de ação da proteína Vip3A com Cry1Ab em experimentos de ativação proteolítica, ligação a BBMV ("Brush Border Membrane Vesicles") e habilidade para formar poros em dois diferentes ensaios *in vitro*. Os autores verificaram que Vip3A difere em várias etapas, quanto ao modo de ação, utilizando um alvo molecular diferente e formando distintos canais iônicos, comparada à Cry1Ab. A interação das proteínas Vip com os receptores do intestino das lagartas de diferentes lepidópteros coloca essas proteínas como uma segunda geração de toxinas de *B. thuringiensis*, com excelente potencial para o manejo da resistência dos insetos.

Assim a proteína Vip3A pode ser potencialmente útil no manejo de resistência de *H. zea* e *H. virescens* (LEE et al. 2003). Portanto, enriquecer a diversidade dos genes Vip3 disponíveis irá provavelmente, aumentar o espectro de atividade da família Vip3 e assim facilitar a aplicação para o controle de diferentes insetos-praga e retardar o processo de resistência nas populações de insetos, uma vez que estas proteínas Vip possuem diferenças estruturais em relação às demais proteínas de *Bt*.

3.5. Efeitos das toxinas de *B. thuringiensis*

Além da patogenicidade e virulência causada por *B. thuringiensis* contra insetos-praga, outros aspectos como os efeitos sub-letais sobre os indivíduos sobreviventes e efeito sinérgico entre as proteínas, embora difíceis de detectar, certamente ocorrem e representam um importante parâmetro, que auxilia na avaliação de sua atividade tóxica.

Diversos estudos têm sido realizados para encontrar o efeito sinérgico combinadas entre patógeno-patógeno ou patógeno-inseticida para controlar insetos-praga, em especial utilizando-se *B. thuringiensis* (BRODERICK et al. 2000; BRICKLE et al. 2001).

Tradicionalmente, as pesquisas relacionadas aos efeitos de inseticidas sobre insetos têm-se restringido a sua ação letal. No entanto, doses sub-letais podem afetar a fisiologia tanto das espécies alvo das aplicações como das espécies benéficas (REED & BASS, 1980; TAN 1981; PIENKOWSKI & MEHRING, 1983; BEACH & TODD, 1985; ROBERTSON et al. 1985; ABRO et al. 1993; VERKERK & WRIGHT, 1993).

O conhecimento dos efeitos sub-letais é relevante não apenas sobre os inimigos naturais, mas também sobre as espécies-praga, pois alterações nos processos fisiológicos desses insetos provocados por efeitos sub-letais podem ser favoráveis à atuação de predadores e parasitóides, pelo enfraquecimento da presa/hospedeiro.

Os parâmetros biológicos mais comumente afetados pela ação sub-letal são alteração no peso, atraso no desenvolvimento, redução da alimentação e até mesmo impedir que o inseto complete o seu ciclo de desenvolvimento (SIMS et al. 1996).

A relação intrínseca entre as toxinas e seus receptores pode levar a efeitos antagônicos ou sinérgicos. Neste sentido, LEE et al. (1996) constataram efeito antagônico entre as toxinas Cry1Aa e Cry1Ab para *Lymantria díspar* (Lepidoptera: Lymantriidae) (Linnaeus, 1758). Porém os mesmos autores verificaram um efeito sinérgico entre Cry1Aa e Cry1Ac para a mesma espécie, resultando num aumento da toxicidade de 4 a 7 vezes. Os mesmos efeitos de interação podem ser observados para formulações. AMEEN et al. (1998) observaram efeito aditivo entre Xentari e Dipel para *H. virescens*, porém entre Xentari e Dipel foi observado efeito antagônico. Além dos

lepidópteros, GLARE & O'CALLAGHAM (2000) listam vários exemplos de interação entre toxinas Cry para dípteros.

3.6. Proteólise das proteínas

O processamento proteolítico das toxinas Cry e Vip é uma etapa crucial na ativação e informações sobre a distribuição e interação destas toxinas sobre insetos alvo e não-alvo e é importante para explicar como a ação proteolítica de enzimas digestivas contribui para a tolerância às toxinas. A caracterização da protease presente nas principais atividades do intestino médio de lagartas de *H. virescens* é importante para entender a digestão de proteínas.

Segundo BRAVO et al. (2007) o pH do intestino médio dos insetos tem grande influência na atividade das toxinas. Algumas toxinas são ativadas em condições alcalinas, por exemplo, Cry1A, enquanto outras são ativadas em condições de pH neutro-ácido como a Cry1B. Portanto, em alguns casos, diferentes processamentos proteolíticos das toxinas em diferentes insetos podem ser uma etapa limitante na sua toxicidade.

Protoxina liberada é clivada por proteinases no intestino médio a um núcleo estável de toxinas (LIGHTWOOD et al. 2000), que então são capazes de se ligar à receptores na membrana. Ligação da toxina ao receptor leva a oligomerização de moléculas de toxina, formando poros que culminam com a morte do inseto (SCHNEPF et al. 1998; BRAVO et al. 2004;. GRIFFITTS et al. 2005). Mecanismos alterados de ativação da toxina são geralmente associados com baixos níveis de resistência (FERRE & VAN RIE, 2002). Em uma linhagem resistente de *P. interpunctella*, a alteração de proteinases do intestino é responsável por aproximadamente 90% da resistência (HERRERO et al. 2001).

As enzimas proteolíticas do intestino médio dos insetos podem estar envolvidas não só no processamento das toxinas *Bt*, mas também na sua degradação. Até agora, nenhum relatório definitivo comprova o papel de proteases do intestino médio nos mecanismos de resistência às toxinas *Bt*. No entanto, DAI & GILL (1993) indicaram que

a proteína dípteros-ativa CryIVD foi processada mais lentamente por um extrato de intestino médio de uma linhagem resistente *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) (Say, 1823), que por um extrato de uma linhagem suscetível. Em Lepidoptera, um estudo realizado por JOHNSON et al. (1990) não encontraram diferenças em proteases do intestino médio entre linhagens sensíveis e resistentes de *P. interpunctella* (para *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-11), e neste caso a resistência pode ser explicada por mudanças em um receptor de membrana do intestino médio (VAN RIE et al. 1990). Mas, mais recentemente, os pesquisadores (OPPERT et al. 1994) encontraram uma transformação incompleta e lenta da protoxina CryIA por extratos do intestino médio de outra estirpe de *P. interpunctella* quando comparados com os extratos da estirpe original suscetível e outra linhagem resistente, sugerindo que algumas cepas de *Bt* podem provocar um mecanismo de resistência em *P. interpunctella*.

Insetos que desenvolveram uma tolerância de proteínas *Bt* desenvolveram mecanismos que interferem em uma etapa ou em uma combinação de etapas envolvidas no modo de ação da endotoxina (Figura 2). Por exemplo, em *P. xylostella* e *P. interpunctella* tem sido demonstrado que a resistência é devido a mudanças no receptor de membrana do intestino médio (VAN RIE et al. 1990; FERRÉ et al. 1991). No entanto, com as linhagens de *H. virescens*, a resistência não foi acompanhada por mudanças significativas da ligação nos receptores de membrana (MACINTOSH et al. 1991; GOULD et al. 1992), apontando para outros fatores envolvidos no modo de ação da toxina como responsável pela resistência. Variações no processamento de toxina, pH intestinal e atividade da protease do intestino pode, portanto, fornecer a seletividade observado em algumas espécies de insetos (HAIDER et al. 1986; MILNE et al. 1990).

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e preparação das proteínas Cry1 e Vip3A

As proteínas estudadas neste trabalho foram preparadas a partir de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* expressando uma única toxina. Células de *E. coli* XL-1 Blue foram transformadas com os genes *cry1Aa*, *cry1Ac* e *cry1Ca* e clones das proteínas Vip3A tipos Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3) foram obtidos com a transformação de *E. coli* WK6 contendo, na porção N terminal, uma sequência de 6 histidinas (6 x His), inseridos no vetor de expressão. Estes clones foram cedidos pelo Prof. Dr. Juan Ferré, da Universidade de Valência, Campus de Burjassot, Espanha.

Clones de *E. coli* foram cultivados em placa de Petri, contendo meio LB (2x) sólido (2g de triptona, 1g de extrato de levedura, 1g de NaCl, qsp 100ml pH7,2) com ampicilina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e incubada a 37°C por 12h, para a verificação da pureza da cultura. Em seguida, uma colônia isolada foi transferida para 3 ml de meio de cultura LB contendo ampicilina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e submetida a 37°C por 12h sob agitação horizontal a 200 rpm. Um volume de 500 μl da cultura foi adicionado a 500 μl de glicerol 100% e estocado em freezer -80°C (solução estoque).

4.2. Expressão das proteínas Cry1

Para a expressão das proteínas Cry1, 12 μl de cada clone foi inoculado em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura TB sólido (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 2,31 g de KH_2PO_4 , 12,54 g de K_2HPO_4 , 4 ml de glicerol, q.p.s. 1000 ml), glicose 2% (v/v) e ampicilina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), incubado por 24 h a 30°C . Após este período de crescimento uma colônia de células foi transferida para um pré-inóculo em erlenmeyer com capacidade de 250 ml, contendo 20 ml de meio TB, glicose 2% (v/v) e ampicilina ($100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) e incubou-se a 37°C , por 12 h sob agitação de 200 rpm. Após o tempo de crescimento das células, 2,5 ml desse cultivo foi transferido para 250 ml de

meio TB + ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e incubados durante 60 h, a 28°C sob agitação constante.

As células cultivadas foram coletadas por centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) por 8 min a 5.930 Xg . Para o início da lise celular foram adicionados 3 ml de tampão de suspensão (50 mM Tris/HCl pH 8,0 contendo 5 mM de EDTA e 100 mM de NaCl) por grama de célula e submetido a vigorosa agitação em aparelho tipo 'vortex'. Adicionou-se 800 μg de lizozima por grama de "pellet", e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 20 min. Adicionou-se 4 mg de desoxicolato de sódio por grama de "pellet" e incubou-se por 10 min a 37°C . Posteriormente, adicionou-se 200 μl por grama de "pellet" de uma solução $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de DNase I seguida de incubação por 30 min a 37°C sob agitação.

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

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

4.3. Expressão das proteínas Vip3A

Para a expressão das proteínas Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3), 12 μl das células estocadas foram cultivadas em placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura

LB (2x) acrescidos de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina por 12 h a 37°C . Uma colônia de células foi transferido para o pré-inóculo contendo meio LB (2x) e antibiótico e as culturas foram incubadas a 37°C , por 12 h sob agitação de 250 rpm.

Em seguida uma alíquota de 2 ml desta pré-cultura foi transferida para 200 ml de meio LB (2x) com antibiótico. As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação de 250 rpm até a DO_{600} atingir 1,2. Posteriormente uma alíquota desta pré-cultura foi transferida para um erlenmeyer de capacidade de 1 L contendo 200 ml de meio LB (2x) com ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) até que a DO_{600} atingisse 0,025. Em seguida incubou-se a 37°C sob agitação de 250 rpm até a DO_{600} atingir 0,6. A expressão da proteína foi induzida pela adição de IPTG, à concentração final de 1mM, por 12 h sob agitação de 190 rpm. Como monitoramento da expressão, uma cultura crescida nas mesmas condições não recebeu como indutor de expressão a solução de IPTG.

As células foram sedimentadas por centrifugação a 17.400 Xg por 30 min, lisadas em tampão fosfato (20 mM + 5M NaCl pH 7,4), 300 μl de lisozima ($100 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 100 μl de DNaseI ($1 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl de PMSF (0,1M) e incubadas por 30 min à 37°C com agitação de 50 rpm. Após estas etapas, as amostras foram submetidas à sonicação na metade da capacidade máxima de sonicação do aparelho por 3 vezes de 60 s, com 15 s de pausa. Após a sonicação o material foi centrifugado a 17.400 Xg por 30 min em centrífuga (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) a 4°C . O sobrenadante foi coletado por centrifugação e armazenado a -20°C .

4.4. Eletroforese SDS-PAGE e quantificação das proteínas

Alíquotas de proteínas Cry1 e Vip3A foram coletadas e visualizadas em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo LAEMMLI (1970), em equipamento para eletroforese vertical Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA). Utilizou-se a solução “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas, Vilnius, Lituania) como marcador de massa molecular.

As amostras a serem visualizadas em gel de SDS PAGE foram preparadas contendo: 20 μl do sobrenadante de cada proteína e 10 μl de tampão de amostra (62

mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β -mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol) sendo posteriormente aquecidas por 5 min a 100°C e uma alíquota de 15 μ l aplicada em gel de poliacrilamida.

Os géis de empilhamento e de separação foram preparados a 5% e 12% de acrilamida, respectivamente. Os reagentes utilizados na preparação do gel e concentrações encontram-se abaixo (Tabela 1). A cuba vertical Bio-Rad, modelo Mini-protean® II Cell foi preenchida com tampão de eletrodo (0,192 M glicina, 0,025 M Tris e 0,1% SDS) e submetida a corrente constante de 60 mA, 200 V por 90 min.

Tabela 1. Reagentes utilizados para a confecção dos géis.

Reagentes	Gel de Empilhamento (ml)	Gel de Separação (ml)
Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)	0,5	0
Tris-HCl (2,25 M pH 8,8)	0	0,8
Acrilamida - Bis (30:0,08%)	0,33	1,66
SDS (4 %)	0,125	0,115
TEMED (tetramethylethylenediamine)	0,006	0,015
Persulfato de amônio (10%)	0,02	0,065
H ₂ O	1,105	2,43

Após a eletroforese, as bandas polipeptídicas foram detectadas por meio da coloração do gel com *Coomassie-Brilliant Blue* 0,02% (metanol 30%, ácido acético 10%, sulfato cúprico 0,1% e água) por 15 min e descorado com sucessivas lavagens de solução descorante (metanol 10%, ácido acético 10% e água). Os géis foram analisados e fotodocumentados em aparelho scanner (HP Scanjet 3570c).

Para a quantificação das proteínas, novos géis de poliacrilamida foram preparados contendo cinco diferentes concentrações de BSA (0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg.ml⁻¹) e as respectivas proteínas. Estas foram quantificadas com o auxílio do software Bionumerics, sendo o padrão para quantificação da concentração final a soroalbumina

bovina (BSA). Os géis foram digitalizados e os valores de BSA foram inseridos ao programa como concentrações conhecidas. Com base nestes valores o software gerou uma curva de densitometria das concentrações e estimou a concentração de cada amostra aplicada.

Os valores de quantificação obtidos por essa metodologia foram apresentados em $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, esses foram transformados para $\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ em função da área da dieta artificial semi-sólida utilizada em cada parcela do bioensaio. Foi estipulado à aplicação de $25 \mu\text{l} \cdot \text{cm}^{-2}$ de dieta artificial, portanto os valores gerados em $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ foram multiplicados por 25 e obtivemos a quantidade em $\text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ de proteína. Em função desse valor as diluições foram preparadas utilizando a fórmula $C_1V_1=C_2V_2$.

4.5. Bioensaios com *H. virescens*

Os bioensaios foram conduzidos no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP. As lagartas neonatas utilizadas nos bioensaios foram provenientes do Laboratório de Biologia de Insetos, na ESALQ (Piracicaba-SP), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Roberto Postalí Parra.

Para a realização dos bioensaios, foram utilizados os lisados dos clones de *E. coli* contendo as proteínas Cry1 e Vip3A, separadamente, para determinação da atividade bioinseticida destas proteínas.

4.5.1. Bioensaios de concentração letal média (CL50) para proteínas Cry1 e Vip3A

Para a realização dos bioensaios e determinação da atividade bioinseticida das proteínas em *H. virescens*, lagartas neonatas foram alimentadas com dieta artificial. Diferentes concentrações das toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3), foram testadas, e para cada concentração de toxina 16 lagartas neonatas foram utilizadas. A partir da solução estoque de cada proteína utilizaram-se os

seguintes intervalos de concentrações: Cry1Aa 6,7 - 1200 ng.cm⁻², Cry1Ac 1 - 100 ng.cm⁻², Cry1Ca 20 - 12350 ng.cm⁻², Vip3A(1) 13 - 7000 ng.cm⁻², Vip3A(2) 25 - 10261,76 ng.cm⁻² e Vip3A(3) 50 - 2010,65 ng.cm⁻². Um volume constante de 50 µl das concentrações das amostras foram aplicados na superfície de uma dieta artificial descrita segundo MONNERAT et al. (2007) contida em placas de poliestireno de 128 poços ("Cell Wells, Corning Glass Works", Corning, New York). Para cada poço das placas de poliestireno, uma lagarta neonata foi adicionada. E estas foram incubadas a 25°C ± 2°C, com uma umidade relativa de 70 ± 10%, e um fotoperíodo de 14:10 h (luz:escuro). Todos os bioensaios foram realizados em triplicata e a mortalidade foi avaliada após cinco dias.

Como testemunha dos experimentos aplicou-se o mesmo volume de água destilada, tampão de solubilização para proteínas Cry e tampão fosfato utilizados em proteínas Vip na superfície da dieta artificial. Para obtenção da CL₅₀, os dados de mortalidade obtidos, para cada proteína, nas diferentes concentrações testadas foram submetidos a uma análise de PROBIT, utilizando o programa POLO-PC (ROBERTSON & PREISLER, 1992).

4.6. Efeito inseticida sub-letal e sinérgico de Cry1 e Vip3A a *H. virescens*

Com o objetivo de se observar possíveis efeitos sub-letais e efeito sinérgico entre as proteínas Cry1 e Vip3A, as lagartas sobreviventes de cada tratamento foram individualmente pesadas e novos bioensaios foram realizados com as respectivas CL₅₀ referentes a cada proteína.

Para analisar o efeito sub-letal, após a avaliação da mortalidade das lagartas utilizadas nos bioensaios de toxicidade mencionados acima, as lagartas sobreviventes foram pesadas em balança analítica devidamente calibrada, onde colocou-se em grupo as sobreviventes de cada tratamento e os pesos foram submetidos a análise estatística.

Em relação à análise do efeito sinérgico, novos bioensaios foram realizados utilizando a CL₅₀ encontrada para cada proteína. Para tanto as proteínas foram diluídas nos respectivos tampões de suspensão a partir da respectiva concentração encontrada

da CL₅₀. Foram testadas todas as combinações de Cry com Vip e as proteínas individualmente. Quando combinadas duas a duas (Cry + Vip) as proteínas foram preparadas de forma isolada e aplicadas juntas em cada poço na bandeja. Após 5 dias foi feita a análise de mortalidade e o experimento foi realizado em triplicata.

Realizaram-se também novos bioensaios para avaliar o efeito sinérgico entre as proteínas ativadas com tripsina comercial. Para tanto as proteínas foram incubadas com 1% de tripsina (m/m) a 37°C a 100 rpm por 1h. Primeiramente realizou-se a cinética da reação para saber qual o melhor tempo, portanto retirou-se a cada 15 min uma alíquota de 15 µl e visualizou em gel de poliacrilamida. Para avaliar a mortalidade das lagartas por estas proteínas ativadas, procedeu-se da mesma forma como descrito acima, utilizando a CL₅₀ de cada proteína.

4.7. Interação das enzimas digestivas de *H. virescens* com as toxinas Cry1 e Vip3A *in vitro*.

A proteólise das proteínas Cry1 e Vip3A foram realizadas para verificar a degradação das proteínas pelo suco intestinal do inseto em estudo. Para tanto, intestinos de *H. virescens* foram coletados e lavados superficialmente com tampão MET (300 mM Manitol, 5 mM EGTA, 20 mM Tris). Estes foram acondicionados em número de 10 para cada tubo de centrífuga e submetidos à centrifugação a 6000 Xg por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de centrífuga, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

O suco intestinal foi diluído na proporção de 1:5 com solução Tris HCl 20 mM pH 8,6. Para realizar os ensaios de proteólise, tubos de centrifuga contendo protoxinas e o suco intestinal diluído foram preparados na proporção 2:1 (120 µl de protoxina com 60 µl de suco intestinal diluído 1:5).

As amostras foram incubadas a 30°C sendo coletados 15 µl em diferentes intervalos de tempo, sendo: 15, 30, 60 min, 1h 30 min, 2h, 2h 30 min e 3 h. As alíquotas coletadas nos diferentes intervalos de tempo foram transferidas para novos tubos devidamente identificados e contendo 5 µl de tampão de amostra utilizado em

preparações para gel SDS PAGE, adicionado de B-mercaptoetanol. As reações de proteólise foram paradas pelo aquecimento das amostras a 99°C por 10 min e, resfriadas em gelo por 5 min, congeladas em N líquido e armazenadas a -80°C.

Para visualização dos resultados do ensaio de proteólise, as amostras armazenadas a -80°C foram aquecidas a 99°C por 2min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando-se da metodologia citada no item 4.4.

4.8. Análise dos resultados

Os dados de toxicidade, a partir dos bioensaios, foram analisados pelo software POLO-PC que realiza as análises probit dos resultados (ROBERTSON & PREISLER, 1992).

O efeito sinérgico foi analisado pelo método de análise de variância pelo Teste F e as médias foram agrupadas pelo método Scott & Knott ao nível de 5% de probabilidade. Para estudar o efeito da concentração em relação ao peso utilizou-se o método de análise de variância pelo Teste Tukey. A realização das análises foi feita por meio do software AgroEstat (BARBOSA & MALDONATO, 2011).

V. RESULTADOS

5.1. Expressão das proteínas Cry1 e VIP3A

O sistema de expressão heteróloga em *E. coli* possibilitou a obtenção das diferentes toxinas Vip3A e Cry1, as quais foram visualizadas por meio da técnica SDS-PAGE (Figura 3). A análise por meio desta técnica confirmou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 85 kDa correspondente as proteínas Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3). Pode-se verificar a presença de bandas mais intensas nas canaletas 3, 4 e 5, comprovando que os respectivos genes *vip3A* foram induzidos a expressarem as respectivas proteínas com a adição de 1mM de IPTG.

O mesmo foi feito para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ca, confirmando a presença de uma banda de aproximadamente 135 kDa.

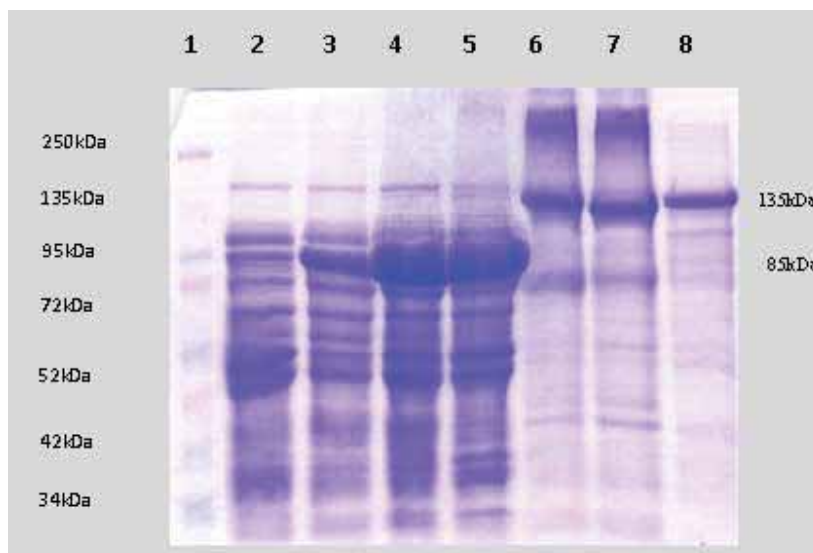


Figura 3. Eletroforograma evidenciando a expressão das proteínas Cry e Vip em gel SDS-PAGE 12%. Nas canaletas: 1: Marcador de Massa Molecular (kDa) “SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2: lisado de *E. coli* não induzido; 3, 4, 5: Vip3A(1), Vip3A(2) e

Vip3A(3) expressadas no lisado de *E. coli* com peso molecular de 85kDa; 6, 7, 8: Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ca expressadas no lisado de *E. coli* com peso molecular de 135kDa.

5.2. Quantificação das proteínas Cry1 e Vip3A

Após a corrida eletroforética, as bandas referentes às proteínas foram quantificadas (Figuras 4, 5 e 6) para uso nos bioensaios. Obtiveram-se as seguintes concentrações: 1,108 mg.ml⁻¹ (Vip3A(1)); 2,274 mg.ml⁻¹ (Vip3A(2)); 2,275 mg.ml⁻¹ (Vip3A(3)); 0,648 mg.ml⁻¹ (Cry1Aa); 0,622 mg.ml⁻¹ (Cry1Ac) e 0,494 mg.ml⁻¹ (Cry1Ca).

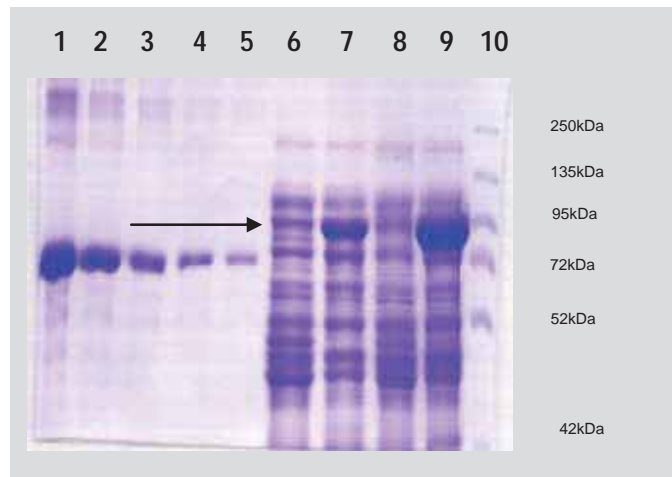


Figura 4. Detecção e quantificação das proteínas Vip em gel SDS-PAGE 12%. **1, 2, 3, 4 e 5:** BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg.ml⁻¹; **6:** Vip3A(1) não induzida; **7:** Vip3A(1) induzida; **8:** Vip3A(2) não induzida; **9:** Vip3A(2) induzida e **10:** marcador molecular (kDa) “SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas).

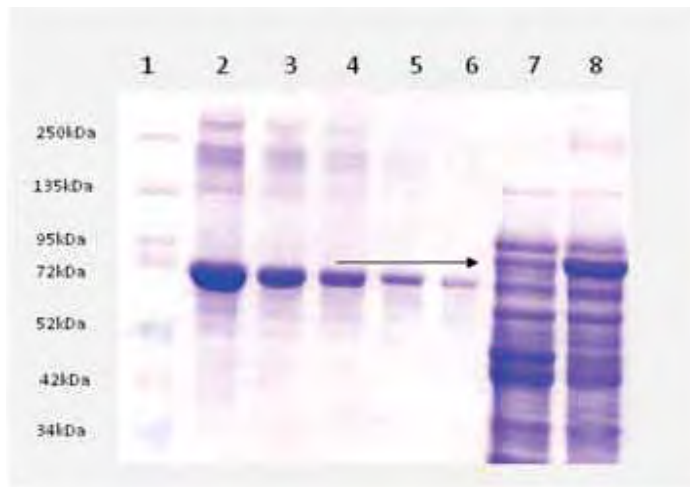


Figura 5. Detecção e quantificação das proteínas Vip em gel SDS-PAGE 12%. **2, 3, 4, 5 e 6:** BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg.ml⁻¹; **7:** Vip3A(3) não induzida; **8:** Vip3A(3) induzida; **1:** marcador molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas).

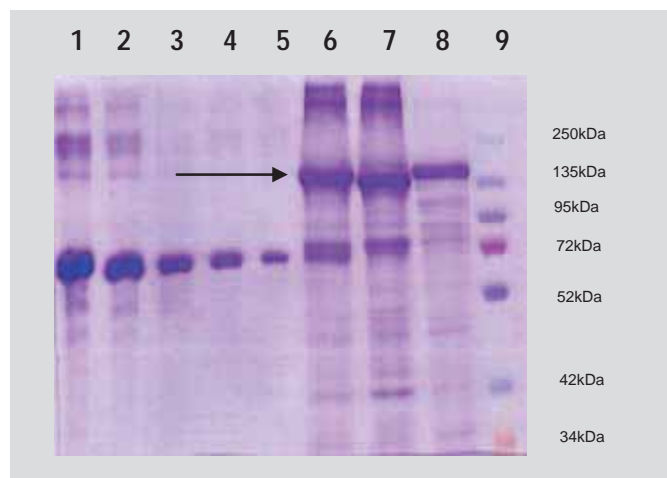


Figura 6. Detecção e quantificação das proteínas Cry em gel SDS-PAGE 12%. **1, 2, 3, 4 e 5:** BSA a 0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg.ml⁻¹; **6:** proteína Cry1Aa; **7:** proteína Cry1Ac; **8:** proteína Cry1Ca e **9:** Marcador de Massa Molecular (kDa) “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas).

5.3. Bioensaios com *H. virescens*

A toxicidade das proteínas Cry1 e Vip3A foram testadas em lagartas neonatas de *H. virescens*. As proteínas Cry1 foram utilizadas nos bioensaios após a solubilização e as proteínas Vip3A foram utilizadas na forma de lisado protéico, após indução da expressão.

Nos bioensaios com *H. virescens*, as CL_{50} das proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ca, Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3) foram aferidas (Tabela 2), sendo que entre as proteínas Vip3A as mais tóxicas para este estudo foram Vip3A(2) (CL_{50} de 945,77 $ng.cm^{-2}$) e Vip3A(3) (CL_{50} de 874,45 $ng.cm^{-2}$) e dentre as Cry1 destacou-se a Cry1Ac (CL_{50} de 39,89 $ng.cm^{-2}$), que também apresentou a menor CL_{50} em relação a todas as toxinas testadas. A proteína Vip3A(1) (CL_{50} de 1649,87 $ng.cm^{-2}$) exibiu toxicidade moderada enquanto Cry1Aa (CL_{50} de 3.502,90 $ng.cm^{-2}$) e Cry1Ca (CL_{50} de 3.102,30 $ng.cm^{-2}$) foram as proteínas menos ativas para esta população de insetos, nas condições analisadas.

Tabela 2. Bioensaios de dose/resposta das proteínas Cry1 e Vip3A com lagartas neonatas de *H. virescens*.

Toxinas	CL_{50} ($ng.cm^{-2}$) (IC min.-máx.) ¹	$b \pm (EP)^2$
Cry1Aa	3.502,90 (1.626,10 – 11.880,00)	1,03 \pm 0,16
Cry1Ac	39,89 (20,65 – 110,14)	1,38 \pm 0,22
Cry1Ca	3.102,30 (1.738,70 - 5.514,50)	1,35 \pm 0,22
Vip3A(1)	1.649,87 (1.277,11 – 2.344,39)	4,07 \pm 0,67
Vip3A(2)	945,77 (725,36 – 1.289,29)	2,36 \pm 0,33
Vip3A(3)	874,45 (708,11 - 1.026,38)	3,57 \pm 0,68

(IC min.máx.)¹: Intervalo de confiança (IC 95%); $b \pm (EP)^2$: Coeficiente angular da reta e Erro Padrão.

A exposição das lagartas aos tampões de diluição das proteínas Cry1 e Vip3A e à água destilada, usados como controles negativos não causaram mortalidade. Esses dados demonstram que a mortalidade de *H. virescens* foi atribuída às toxinas de *B. thuringiensis* Cry1 e Vip3A.

5.4. Efeito inseticida sub-letal e sinérgico de *B. thuringiensis* a *H. virescens*

Além da determinação da concentração letal (CL₅₀) verificou-se também o efeito sinérgico e que quanto maior a concentração das proteínas, maior a redução no peso das lagartas, o qual foi significativamente inferior a testemunha.

Os valores do peso (Figura 7 e 8) em grupo das lagartas sobreviventes de cada concentração revelam que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3) quando oferecidas às lagartas de *H. virescens* em concentrações inferiores as concentrações que causam 50% de mortalidade, reduzem o peso larval e causam efeitos os quais são classificados como sub-letais. Esses dados inferem que essas lagartas causarão danos inferiores às culturas, pois terão seu desenvolvimento retardado. Além disso, estarão mais vulneráveis às ações de agentes de controle biológico.

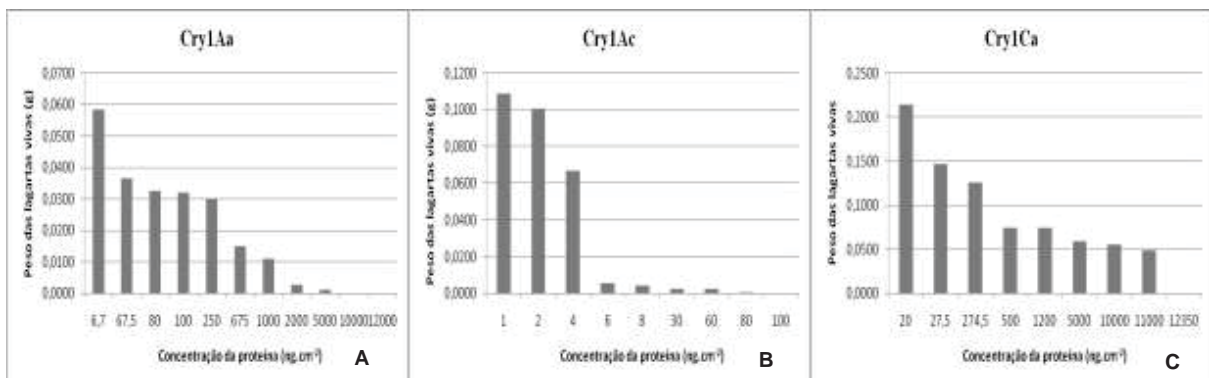


Figura 7. Efeitos sub-letais das proteínas Cry1 no peso das lagartas de *H. virescens* após cinco dias de exposição às diferentes concentrações.

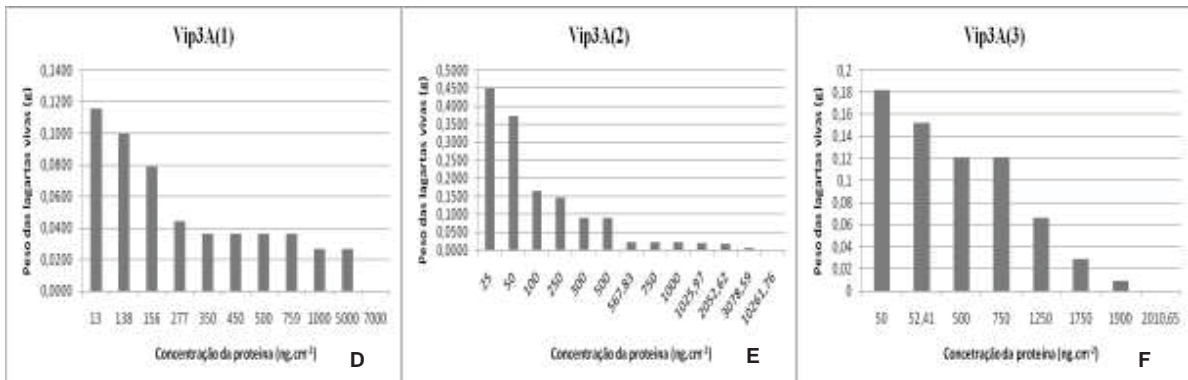


Figura 8. Efeitos sub-letais das proteínas Vip3A no peso das lagartas de *H. virescens* após cinco dias de exposição às diferentes concentrações.

As médias dos pesos diferiram e pode-se observar que Cry1Ac (Figura 7B) foi a proteína que se comportou melhor em relação ao peso, pois apresentou uma redução mais brusca e portanto a mais eficaz em relação ao efeito sub-letal. As proteínas Cry1Ca (Figura 7C) e a Vip3A(1) (Figura 7A) reduziram o peso, porém em concentrações mais elevadas, dessa forma foram menos eficientes. As proteínas Cry1Aa (Figura 7A), Vip3A(3) (Figura 8F) e Vip3A(2) (Figura 8E), indicaram por meio da mensuração baseada no peso, insetos mais leves e, portanto com atraso no desenvolvimento.

Além do efeito sub-letal levamos em consideração também o efeito sinérgico entre as proteínas, o qual foi analisado por meio do método de Scott & Knott. As médias de mortalidade diferiram e obteve-se três grupos distintos (Tabela 3), sendo que num dos grupos houve o agrupamento apenas dos controles (água destilada e tampões). As seguintes combinações de proteínas Vip3A(2)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Ac, Vip3A(2)/Cry1Ac e Vip3A(3)/Cry1Ac pertencem ao mesmo grupo e não diferiram entre si na mortalidade. Cabe destacar que dentre estas combinações, obteve-se uma mortalidade de 73% para Vip3A(2)/Cry1Aa, indicando um efeito sinérgico, uma vez que foram mais eficientes do que quando sozinhas, apresentando mortalidade superior a 50%, sugerindo assim, que uma destas combinações de proteínas apresenta potencial para compor uma planta piramidada de algodão. Assim, foi observado um efeito sinérgico das proteínas quando combinadas contra *H.*

virescens, pois o resultado da associação foi superior ao uso das proteínas isoladamente.

Pode-se observar que as proteínas testadas individualmente comprovaram a CL_{50} encontrada, uma vez que a mortalidade apresentou pouca variação, ficando em torno de 50%. Constatou-se também um efeito antagônico entre as proteínas Vip3A(3) com Cry1Ca, pois quando combinadas a mortalidade foi menor do que 50%.

Tabela 3: Resultados de mortalidade referente ao efeito sinérgico entre as proteínas não ativadas. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de significância.

Tratamento	% Mortalidade
Vip3A(2) + Cry1Aa	72,92 a
Vip3A(1) + Cry1Aa	68,75 a
Vip3A(1) + Cry1Ac	66,67 a
Vip3A(2) + Cry1Ac	62,50 a
Vip3A(3) + Cry1Ac	60,41 a
Vip3A(1)	52,08 b
Cry1Ac	52,08 b
Vip3A(3)	50,00 b
Vip3A(3) + Cry1Aa	50,00 b
Vip3A(2)	50,00 b
Cry1Aa	43,75 b
Cry1Ca	41,67 b
Vip3A(3) + Cry1Ca	37,50 b
Vip3A(1) + Cry1Ca	33,33 b
Vip3A(2) + Cry1Ca	31,25 b
Tampão Cry	0,00 c
Tampão Vip	0,00 c
Testemunha	0,00 c

Outro experimento com as proteínas ativadas com tripsina foi avaliado para verificar se o sinergismo das proteínas em estudo seria diferente, uma vez que elas já estão prontas para se ligarem aos receptores localizados na membrana do intestino. Os resultados mostraram que as proteínas quando ativadas apresentaram maior

mortalidade. As médias de mortalidade diferiram e obteve-se três grupos distintos (Tabela 4), sendo que num dos grupos houve o agrupamento apenas dos controles (água destilada e tampões).

Assim as melhores combinações de proteínas ativadas com tripsina foram Vip3A(1) + Cry1Aa, Vip3A(2) + Cry1Aa, Vip3A(1) + Cry1Ac e Vip3A(2) + Cry1Ac as quais apresentaram mortalidade maior comparadas com as proteínas sem serem ativadas. Observa-se que as proteínas Vip3A(2) e Vip3A(3) ativadas tiveram mortalidade acima de 50%, mesmo utilizando a sua CL_{50} , sendo mais eficientes no controle do inseto-praga.

Tabela 4: Resultados de mortalidade referente ao efeito sinérgico das proteínas ativadas com tripsina comercial. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de significância.

Tratamento (ativado com tripsina comercial)	% Mortalidade
Vip3A(1) + Cry1Aa	77,08 a
Vip3A(2) + Cry1Aa	77,08 a
Vip3A(1) + Cry1Ac	75,00 a
Vip3A(3)	70,83 a
Vip3A(2)	68,75 a
Vip3A(2) + Cry1Ac	68,75 a
Vip3A(3) + Cry1Aa	64,58 b
Vip3A(3) + Cry1Ca	64,58 b
Vip3A(3) + Cry1Ac	62,50 b
Cry1Ac	60,42 b
Cry1Aa	58,33 b
Vip3A(1) + Cry1Ca	56,25 b
Vip3A(1)	56,25 b
Vip3A(2) + Cry1Ca	54,17 b
Cry1Ca	54,17 b
Tampão Cry	0,00 c
Tampão Vip	0,00 c
Testemunha	0,00 c

Quando comparadas as proteínas não ativadas e ativadas, estas diferenciaram em apenas uma combinação, a Vip3A(3) + Cry1Ac. A combinação Vip3A(3) + Cry1Ac ativadas pertenceram ao grupo b, ao contrário de quando não ativadas, mostrando assim que não houve efeito sinérgico, uma vez que não diferiram de acordo com teste de Scott & Knott.

As porcentagens de mortalidade das proteínas de *B. thuringiensis* foram maiores quando estas foram ativadas com tripsina comercial (Tabela 5), ao contrário das proteínas sem tripsina, de acordo com a análise de Scott & Knott, sendo que o fator F desta análise foi significativo (27,19**), comprovando que existe diferença entre os tratamentos das proteínas com e sem tripsina comercial. Dessa forma, a efetividade bioinseticida pode ser aprimorada no controle de insetos-praga inserindo-se os genes já truncados, ou seja, com a retirada das sequências que resultam em aminoácidos presentes na protoxina, promovendo a expressão da proteína na sua forma de toxina ativa nas plantas transgênicas.

Tabela 5: Resultados de mortalidade referente ao efeito sinérgico das proteínas com e sem tripsina comercial. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott & Knott, ao nível de 5% de significância.

Tripsina comercial	% Mortalidade
Com	53,82 A
Sem	42,94 B

5.5. Proteólise das protoxinas Cry1 e Vip3A de *B. thuringiensis*

Um estudo da hidrólise das protoxinas foi conduzido para determinar se havia diferença na ativação destas por enzimas proteolíticas contidas nos extratos do intestino de *H. virescens*. As protoxinas Cry1 e Vip3A foram incubadas com extratos do intestino, e os produtos foram analisados por SDS-PAGE (Figura 9). As protoxinas Cry1

foram digeridas passando de 135 kDa para aproximadamente 72 kDa e Vip3A de 85 kDa para aproximadamente 60 kDa. O mesmo foi observado para as protoxinas ativadas com tripsina comercial. A maior parte do processo de ativação foi observada a ocorrer dentro de 15 min de incubação.

Dessa forma, os resultados das análises *in vitro* das proteínas digestivas presentes no intestino do inseto em estudo, indicam que o conteúdo digestivo de *H. virescens* atua na ativação da proteína, tal qual a tripsina comercial.

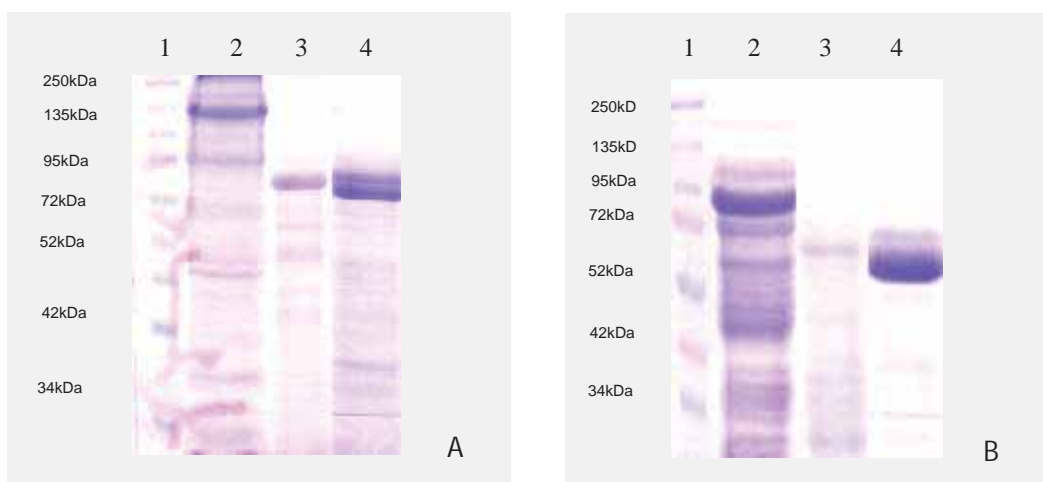


Figura 9: Ativação proteolítica de Cry1 (A - canaleta 2) e Vip3A (B - canaleta 2), por suco intestinal de *H. virescens* (canaleta 3) e com tripsina comercial (canaleta 4).

VI. DISCUSSÃO

O uso destes clones permitiu a expressão dos genes Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1Ca, Vip3A(1), Vip3A(2) e Vip3A(3) de *B. thuringiensis* em *E.coli* e a toxicidade das proteínas codificadas foi testada frente à lagarta de insetos-praga da ordem Lepidoptera, *H. virescens*, confirmando a ação efetiva das proteínas Cry1 e Vip3A, que foram tóxicas ao inseto em estudo. Genes *cry* de *B. thuringiensis* vêm sendo isolados e clonados em *E. coli* ou em *B. thuringiensis* mutantes para genes *cry* por vários pesquisadores (HERNANDEZ-MARTINEZ et al. 2008) como também os genes *vip3* (SENA et al. 2009; ABDELKEFI-MESRATI et al. 2011), responsáveis pela expressão de proteínas altamente tóxicas a um amplo espectro de insetos da ordem Lepidoptera.

A obtenção das proteínas Cry1 e Vip3A foram confirmadas por meio da técnica SDS-PAGE (Figura 3) e estas, após quantificadas, foram utilizadas nos bioensaios para determinar a CL₅₀ respectiva de cada proteína (Tabela 2). O emprego do bioensaio é uma estratégia importante para definir a toxicidade de uma proteína de *B. thuringiensis* e, dessa forma, selecionar a proteína com maior efetividade para o controle de insetos. Assim, nas análises dos bioensaios quantitativos realizados, cada proteína se comportou de uma maneira em relação à toxicidade, sendo a proteína Cry1Ac a mais tóxica para este estudo.

Avaliando a mortalidade de *H. virescens*, JURAT-FUENTES & ADANG (2001) relataram a CL₅₀ para as toxinas purificadas Cry1Aa e Cry1Ac, sendo estas 5,0 ng.cm⁻² e 0,5 ng.cm⁻², respectivamente, e também obtiveram resultados elevados, semelhantemente encontrado no presente trabalho, para a proteína Cry1Ea (CL₅₀ >9000 ng.cm⁻²). VAN RIE et al. (1989) também obtiveram resultados contrastantes, ao avaliarem a proteína Cry1Aa, obtendo uma CL₅₀ 10 vezes menos tóxica do que a encontrada por JURAT-FUENTES & ADANG (2001).

A suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* coletadas nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil nas safras agrícolas 2007/08 e 2008/09 foi avaliada e as concentrações letais médias (CL₅₀) das populações avaliadas

variaram de 0,18 a 0,66 μl de Cry1Ac/ml dieta sendo este resultado semelhante ao encontrado neste trabalho para Cry1Ac (ALBERNAZ, 2011).

O resultado deste trabalho corrobora os resultados obtidos por VAN RIE et al. (1990), que estudaram as proteínas Cry1Aa e Cry1C em relação a *H. virescens* e *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Boisduval). Para Cry1Aa encontraram CL_{50} de 157 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ e valores maiores que 1350 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ para *H. virescens* e *S. littoralis*, respectivamente, enquanto a CL_{50} da toxina Cry1C foi maior do que a maior concentração testada (2700 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) em *H. virescens*.

FORCADA et al. (1999) estudaram a CL_{50} em três linhagens de *H. virescens*: parental suscetível (CPN) e duas linhagens resistentes a *Bt* (CPN'CP73-3 e KCB). Os resultados mostraram que a linhagem KCB (11487,00 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi 400 vezes mais resistente à toxina Cry1Ac do que a CPN (28,23 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$); CPN'CP73-3 (542,90 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi apenas cerca de 20 vezes mais resistentes, enquanto que a CP73-3 (2277,13 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$) foi cerca de 80 vezes mais resistente.

Os resultados da CL_{50} para as proteínas Vip3A foram menores do que os encontrados para Cry1Aa e Cry1Ca, mostrando neste trabalho ser mais efetivas quando comparadas. JACKSON et al. (2007) estudaram o impacto da toxina Vip3A sobre a mortalidade de populações de *H. virescens* que têm diferentes mecanismos e níveis de resistência à Cry1Ac e determinaram a CL_{50} entre 158 e 243 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, mostrando que estas populações foram igualmente suscetíveis a toxina Vip3A. ALI & LUTTRELL (2011) relataram estudos com populações de campo e de laboratório de *H. zea* e *H. virescens*, as principais pragas do algodão provenientes de sete estados dos EUA, expostas a Vip3A, de 2004 a 2008. Os autores constataram CL_{50} entre 19 a 97 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ e 40,7 a 109 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente, sendo que as populações de campo foram, em média, mais suscetíveis do que colônias de laboratório.

As diferenças nos valores de CL_{50} encontradas entre os trabalhos analisados e os resultados obtidos no presente trabalho podem estar relacionadas com a diversidade de populações da praga *H. virescens* no âmbito mundial, além de elucidar uma possível população resistente. No estudo realizado por JURAT-FUENTES & ADANG (2001), os autores utilizaram insetos-praga da localidade de Louisiana, EUA.

A variação da eficiência no controle de *H. virescens* pode ser explicada por uma série de fatores ligados ao modo de ação desta bactéria, principalmente pela ligação da toxina ativada a receptores no epitélio intestinal, sendo que, este fator é determinante no desenvolvimento da doença no inseto-alvo (POLANCZKY & ALVES, 2003). Podem também estar relacionadas com a forma de criação das lagartas utilizadas e oscilações naturais da susceptibilidade das populações de insetos utilizadas nos bioensaios (WIRTH et al. 2004).

Resultados relacionados à resistência de população foram relatados por JURAT-FUENTES et al. (2002). Toxinas foram testadas em populações suscetíveis e resistentes de *H. virescens* e os autores observaram que as toxinas eram mais ativas contra lagartas suscetíveis do que para as resistentes. Nestes bioensaios não observaram qualquer mortalidade, mesmo com concentrações elevadas de Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Fa para as lagartas resistentes. Nenhuma mortalidade foi observada para as lagartas resistentes com 2 mg.ml⁻¹ de toxina de Cry1Ac, ao contrário do encontrado por LEE et al. (1995), os quais relataram uma CL₅₀ de 0,5 mg.ml⁻¹. Segundo os autores, esta é uma evidência que sugere que houve um aumento na resistência após a seleção da população em laboratório.

Essas toxinas de *B. thuringiensis* têm sido empregadas com sucesso nos últimos anos para controlar os mais importantes insetos-praga agrícolas, mas nem todos os insetos são alvos de toxinas Cry e prevê-se que a resistência de insetos a estas toxinas se tornarão mais frequentes nos próximos anos. Assim, a atividade de toxinas Cry pode ser melhorada por meio da adição de inibidores de serina protease, quitinases, toxinas Cyt, um fragmento do receptor caderina contendo um sítio de ligação da toxina e principalmente uma proteína Vip, a qual tem sítio de ligação diferente das Cry, auxiliando no manejo da resistência (PARDO-LÓPEZ et al. 2009).

Com o intuito de retardar a evolução da resistência às toxinas de *B. thuringiensis*, uma estratégia é a produção de plantas piramidadas. Esta estratégia baseia-se no pressuposto de que a evolução simultânea de resistência às toxinas que têm diferentes modos de ação será difícil para os insetos-praga. Segundo DOSS et al. (2002) as diferentes atividades das proteínas Vip3 podem ser devidas as alterações nos

aminoácidos, ou a outros fatores como a sensibilidade dos insetos geograficamente distintos, e ainda diferença nos estágios larvais utilizados para ensaios de toxicidade. Dessa forma, uma combinação ideal seria proteínas Cry com Vip, uma vez que apresentam sítios de ligação distintos na membrana do intestino dos insetos.

Tendo em vista os casos freqüentes de resistência, uma das formas de se manejá-la em populações de campo é a utilização de novas combinações de proteínas de *B. thuringiensis* que apresentem perfis diferenciados quanto ao conteúdo de genes *cry* e *vip*, como os encontrados neste estudo.

Segundo PRAÇA et al. (2004), a toxicidade de alguns isolados a insetos-alvo pode ocorrer por causa das interações sinérgicas entre as toxinas de *B. thuringiensis* encontradas, ou mesmo pela interação destas com os esporos, concordando com os nossos resultados.

Dessa forma, avaliamos o efeito inseticida sinérgico entre as proteínas. Pode-se constatar um efeito sinérgico entre as proteínas estudadas, uma vez que foram mais eficientes quando combinadas duas a duas (Cry+Vip) do que quando sozinhas, apresentando mortalidade superior a 50%, sugerindo assim, que uma destas combinações de proteínas apresenta potencial para compor uma planta piramidada de algodão. Observamos também que as proteínas ativadas com tripsina comercial apresentaram maior porcentagem de mortalidade, podendo então serem inseridas desta forma na planta transgênica.

Um dos elementos-chave no modo de ação da toxina *Bt* é a sua ligação ao receptor específico na superfície da membrana epitelial do intestino médio. Em estudos *in vitro* BBMV, com *H. virescens* suscetíveis e resistentes, têm sido observado alterações nas propriedades de ligação ao receptor em populações resistentes (LEE et al. 1995; JURAT-FUENTES et al. 2004) indicando que a ligação do receptor é um fator crítico no desenvolvimento de resistência. Foi detectado três sítios de ligação para *H. virescens*, o sítio A, com a proteína caderina como elemento chave (JURAT-FUENTES et al. 2004), que é reconhecido por Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F e Cry1J; o sítio B por sua vez sendo reconhecido pelo Cry1Ab e Cry1Ac, e por fim o sítio de ligação C

que é reconhecido apenas pelo Cry1Ac (VAN RIE et al. 1989; JURAT-FUENTES & ADANG, 2001).

Para comprovar que toxinas Cry e Vip não competem entre si pelo mesmo sítio de ligação, LEE et al. (2006) analisaram a resistência cruzada entre Vip3A e Cry1Ac disponíveis comercialmente. Ensaio de competição de ligação BBMV de homólogos e heterólogos com *H. virescens* foram realizados para demonstrar as relações dos sítios de ligação entre estas toxinas. Constataram que quantidades excessivas de toxina Cry1Ac não inibem a ligação da toxina Vip3A, indicando que Cry1Ac não se liga aos sítios de Vip3A. A falta de resistência cruzada entre Cry1Ac e Vip3A é provavelmente devido à diferenças nas sequências de aminoácidos (ESTRUCH et al. 1996). Esta falta de ligação de Vip3A a todos os receptores Cry1Ac conhecida corrobora este trabalho, visto que a toxina Cry1Ac combinada com as Vip3A atuou em sinergismo.

A construção de plantas piramidadas de algodão, com mais de um transgene de *B. thuringiensis*, diminuem as chances das populações de inseto se tornarem resistentes e, portanto, as combinações sugeridas por este trabalho apresentam potencial para obtenção de novos eventos de algodão geneticamente modificado, além de incentivar novas investigações sobre ensaios de competência com as proteínas estudadas por meio da técnica de BBMV.

Nas avaliações de patogenicidade das proteínas que apresentaram uma efetividade inferior, devem ser considerados outros parâmetros. Um efeito sub-letal poderia mostrar uma eficiência de controle, prejudicando o desenvolvimento das lagartas, afetando a emergência destas e, a malformação ou a fecundidade das fêmeas poderia também ser afetada. Segundo GORE et al. (2005), em larvas de *H. zea* e *H. virescens* alimentadas com dietas constituindo concentrações de proteínas Cry1Ac e Cry2Ab, observaram atraso no desenvolvimento larval, em dosagens elevadas.

Dessa forma, além da determinação da concentração letal (CL₅₀) e do efeito sinérgico, verificou-se também que as proteínas Cry1Ac, Cry1Ca e Vip3A(2) promoveram a redução no peso das lagartas que foi significativamente inferior a testemunha.

Segundo JURAT-FUENTES et al. (2002), embora não tenha sido encontrada mortalidade com as toxinas testadas, estas causaram diminuição no crescimento das lagartas resistentes. MASCARENHAS & LUTTRELL (1997) também observaram redução no peso de lagartas de *H. zea* alimentadas com algodão *Bt*, expressando a endotoxina Cry1A de *B. thuringiensis*, em comparação aos insetos alimentados com uma cultivar convencional de algodão.

Resultados similares foram encontrados por EIZAGUIRRE et al. (2005), ao avaliarem o efeito sub-letal de *B. thuringiensis* sobre o desenvolvimento larval de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) (Lefèvre) e por POLANCZYK & ALVES (2005) ao verificarem o efeito sub-letal de alguns isolados de *B. thuringiensis* a lagartas de *S. frugiperda*.

Outra análise realizada foi a de proteólise para verificar a ativação das proteínas no suco do intestino de *H. virescens*, pois esta etapa em que as protoxinas são ativadas passando para toxinas é importante, visto que, após esta etapa ocorre a ligação das toxinas aos receptores do intestino promovendo a formação de poros e morte do inseto. Os resultados de digestão *in vitro* observados por meio da técnica SDS-PAGE mostraram que as enzimas do intestino médio do inseto-praga em estudo são capazes de ativar as proteínas Cry1 e Vip3A.

Outros trabalhos também reportaram a atividade proteolítica do intestino médio de *H. virescens* e seu possível papel no desenvolvimento de resistência às proteínas *Bt*. (FORCADA et al. 1996). Os perfis eletroforéticos de extratos do intestino médio de uma linhagem suscetível e de uma resistente de *H. virescens* e sua capacidade de degradar toxinas *Bt* foram comparados. Os resultados de digestão *in vitro* corroboram os nossos resultados, uma vez que mostraram que as enzimas do intestino médio de ambas as linhagens são capazes de processar e degradar as proteínas *Bt* e observaram também que as duas cepas têm a mesma atividade proteolítica.

LEE et al.(2006) observaram que a toxina Vip3A (88 kDa) é processada para um fragmento de 62 kDa *in vivo* na digestão no intestino médio de Lepidoptera, em digestão *in vitro* com tripsina e com suco do intestino. Estudaram também a protoxina

Cry1Ac (130 kDa) e verificaram que pode ser facilmente ativada tanto com tripsina como com extratos do suco intestinal de lepidópteros a 65 kDa.

Resultados similares foi obtido por (KARUMBIAH et al. 2007) que realizaram um estudo da hidrólise da protoxina, o qual foi conduzido para determinar se havia diferenças na ativação da protoxina por extratos do intestino de diferentes linhagens de *H. virescens*. A protoxina Cry1Ac foi incubada com extratos do intestino por diferentes períodos, e os produtos foram analisados por SDS-PAGE, constatando sua ativação.

ABDELKEFI-MESRATI et al. (2011) verificaram a ativação proteolítica de Vip3A16, 90kDa, a um fragmento de aproximadamente 63kDa por meio da ação do suco do intestino de *S. littoralis* e também por tripsina. Esses dados confirmam que o primeiro passo da atividade inseticida foi realizado e corroboram os resultados encontrados neste trabalho para ativação das protoxinas.

Segundo LEE et al. (2003), a etapa de proteólise é importante para a ativação de Vip3A, uma vez que Vip3A não transformado é incapaz de formar poros *in vitro*. Eles observaram que ocorreu proteólise da toxina Vip3A por proteases do intestino de lepidópteros e da tripsina, sendo observado uma ativação de Vip3A (88 kDa) para uma forma de aproximadamente 62 kDa, mas sozinha, a ativação da toxina não é um fator determinante para a especificidade de insetos, uma vez que a protoxina Vip3A pode ser processada pela ação do suco intestinal de insetos não suscetíveis como *O. nubilalis* (YU et al. 1997).

Portanto, as diferenças observadas em relação a CL₅₀ e efeito sinérgico das proteínas em estudo, sugerem envolvimento direto de proteases na resistência observada e mostram que só a proteólise não é um fator determinante para a atividade inseticida, mas que esta etapa de seleção *in vitro* da ativação das proteínas, a qual antecede os ensaios *in vivo* com insetos alvo, tem mostrado resultados satisfatórios e, assim, impulsionando mais estudos.

A biotecnologia possibilita que genes, isolados de *B. thuringiensis*, que codificam proteínas com propriedades inseticidas possam expressar adequadamente em plantas, para o controle de insetos-pragas em grandes culturas. A construção de plantas piramidadas de algodão, com mais de um transgene de *B. thuringiensis*, diminuem as

chances do inseto se tornar resistente e, portanto, nossos resultados incentivam novas investigações sobre ensaios de competência com as proteínas estudadas neste trabalho por meio da técnica de BBMV. Tais estudos podem levar ao conhecimento de novas proteínas com potencial inseticida promissor no controle de insetos.

VII. CONCLUSÃO

Os estudos conduzidos neste trabalho mostraram que as proteínas entomopatogênicas de *B. thuringiensis* atuam de forma diferenciada em *H. virescens*, evidenciando que as proteínas Cry1Ac, Vip3A(2) e Vip3A(3) quando testadas isoladamente, foram as mais eficientes.

A análise do efeito inseticida sinérgico demonstrou que as melhores combinações de proteínas ativadas ou não com tripsina comercial foram: Vip3A(2)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Aa, Vip3A(1)/Cry1Ac, e Vip3A(2)/Cry1Ac. Estas combinações representam alternativas ao manejo da resistência no controle biológico de *H. virescens*, com a produção de novas plantas piramidadas de algodão.

Todas as proteínas reduziram o peso das lagartas afetando o seu desenvolvimento e, por fim, a análise de proteólise apontou que todas as proteínas são ativadas pelas enzimas presentes no suco do intestino de *H. virescens*, tal como a tripsina comercial, não sendo, portanto, esta a razão de se obter baixa mortalidade para algumas das toxinas testadas sem prévia ativação.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABRO, G.H.; CORBITU, T.S; CHRISTIE P.T.; WRIGHT, D.J. Sub-lethal effects of abamectin on *Plutella xylostella* L. and *Spodoptera littoralis* Boisduval larvae. **Crop Protection**, Guildford, v.12, p. 39-44. 1993.

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

ALBERNAZ, K. C. **Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil.** 2011. Tese – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ALI, M.I., LUTTRELL, R.G., YOUNG, S. Susceptibilities of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.99, p.164–175, 2006.

ALI, M.I., LUTTRELL, R.G. Susceptibility of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v.100, p.921–931, 2007.

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Susceptibility of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A insecticidal protein expressed in VipCot™ cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.108, p.76-84, 2011.

AMEEN, A. O.; FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v.33, n.2, p.129-134, 1998.

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

ARONSON, A. L.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiology Review**, Palo Alto, v. 50, p.1-24, 1986.

ARORA, N. et al. Relocating expression of vegetative insecticidal protein into mother cell of *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 310, p. 158-162, 2003.

BALLAMINUT, C. E.; MOREIRA, M.S.; ALMEIDA, R. E. M. 2006. **Fitotoxicidade, perdas na produção e qualidade na fibra**. 2006. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. **AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos. Versão 1.1.0.694, 2011. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 2011.

BEACH, R. M.; TODD, J. W. Toxicity of avermectin to larva and adult soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) and influence on larva feeding and adult fertility and fecundity. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 78, p. 1125-1128, 1985.

BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insects pest. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.32, p.156-173, 2000.

BHALLA, R., et al. Isolation, characterization and expression of a novel vegetative insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 467-472, 2005.

BOONSERM, P.; ANGSUTHANASOMBAT, M.; LESCAR, C.; J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8- angstrom resolution. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3391–3401, 2006.

BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J. W.; JACKSON, R. E. VipCot₂: field performance in North Carolina under conditions of high bollworm populations, p. 1362-1364. In: BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 2004, San Antonio. Proceedings ...Memphis:**National Cotton Council of America**, 2004.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 26, p.573-579, 2008.

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

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

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

BRICKLE, D. S.; TURNIPSEED, S. G.; SULLIVAN, J. Efficacy of insecticides of different chemistries against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in transgenic *Bacillus thuringiensis* and conventional cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 86-92, 2001.

BRODERICK, A. N.; GOODMAN, K. F.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Synergy between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 29, n. 1, p. 101-107, 2000.

CAVADOS, C.F.G.; FONSECA, R.N.; CHAVES, J.Q.; RABINOVITCH, L.; ARAÚJOCOUTINHO, C.J.P. Identification of Entomopathogenic *Bacillus* Isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) Larvae and Adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p.1017-1021, 2001.

COPPING, L. G.; MENN, J. J. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science**, Sussex, v.56, n.5, p.651-676, 2000.

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

DAI, S. M.; GILL, S. S. In vitro and in vivo proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. Israelensis CRIVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 23, p. 273-283, 1993.

DE MAAGD, R. A.; ALEJANDRA, B.; CRICKMORE, N. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics**, London, v. 17, p. 193–199, 2001.

DEVINE, G. J.; FURLONG, M. J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agriculture and Human Values**, v. 24, p. 281-306, 2007.

DONOVAN, W. P.; DONOVAN, J. C.; ENGLEMAN, J. T. Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toward *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.78, p.45-51, 2001.

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

EIZAGUIRRE, M.; TORT, S.; LÓPEZ, C.; ALBAJES, R. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. **Journal of Economic Entomology**, Lonham, v. 98, p. 464-470, 2005.

ESCUADERO, I. R.; IBÁÑEZ, I.; PADILLA, M. A.; CARNERO, A.; CABALLERO, P. Aislamiento y caracterización de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* procedentes de muestras de tierra de Canarias. **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v.30, n.4, p.703-712, 2004.

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

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

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Technology**, New York, v. 10, p. 271-275, 1993.

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

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S.C. Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM): **Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops** within IPM Programs. p.41-85, 2008.

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

FITT, G. P.; OMOTO, C.; MAIA, A. H.; WAQUIL, J. M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; HUAN, N. H. E.; ANDOW, D. A. Resistance risks of Bt cotton and heir management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publications, 2006. p.300-345.

FORCADA, C.; ALCÁCER, E.; GARCERÁ, M. D.; TATO, A.; MARTÍNEZ, R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin in Three Strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and SEM Study of the Larval Midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 42, p. 51–63, 1999.

FORCADA, C.; ALCICER, E.; GARCERI, M. D.; MARTINEZ, R. Differences in the Midgut Proteolytic Activity of Two *Heliothis virescens* Strains, One Susceptible and One Resistant to *Bacillus thuringiensis* Toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 31, p. 257-272, 1996.

GALLO, D.; O. HAKANO, S.; SILVEIRA NETO, R. P. L.; CARVALHO, G. C.; BERTI, J. R. P.; PARRA, R. A.; ZUCCHI, S. B.; ALVES, J. D.; VENDRAMIM, L. C.; MARCHINI, J. R. S.; LOPES, C. OMOTO. **Entomologia econômica**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

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

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; HERRERO, S.; SAYYED, A. H.; ESCRICHE, B.; LIU, Y. B.; MEYER, S. K.; WRIGHT, D. J.; TABASHNIK, B. E.; FERRÉ, J. Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xyostella*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4610-4613, 2001.

GORE, J.; ADAMCZYK, J. J.; BLANCO, C. A. Selective feeding of tobacco budworm and bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) on meridic diet with different concentrations of

Bacillus thuringiensis proteins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n 1, p. 88-94, 2005.

GOULD, F.; A. MARTINEZ-RAMIREZ, A; ANDERSON, J; FERRE, F. J.; SILVA, W.; MOAR, J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings National Academy**. U.S.A., v. 89, p. 7986-7990, 1992.

GOULD, T. D.; GRAY, N. A.; MANJI, H. K. Effects of a glycogen synthase kinase-3 inhibitor, lithium, in adenomatous polyposis coli mutant mice. **Pharmacol**, v. 48, p. 49–53, 2003.

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

GRIFFITTS, J. S.; HASLAM, S. M.; YANG, T.; GARCZYNSKI, S. F.; MULLOY, B.; MORRIS, H.; CREMER, P. S.; DELL, A.; ADANG, M. J.; AROIAN, R.V. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, Washigton, v. 307, p. 922–925, 2005.

HAIDER, M. Z.; KNOWLES, B. H; ELLAR, D. J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta- endoxotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.156, p.531-540, 1986.

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

HAWTHORNE, D. Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal Economic of Entomology**, Lanham., v.91, p.565-571, 1998.

HERNANDEZ-MARTINEZ, P.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.97, p.245–250, 2008.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Fifferents mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**. 67: 1085-1089, 2001.

IBGE (2011) In: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201112_5.shtm>. Acessado em 26 de maio de 2011.

ISAAA. 2010. International Service for the Acquisition of Agri-Bitech Applications Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acessado em 03 de junho de 2011.

JACKSON, R. E.; BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J. W. Comparative efficacy of Bt technologies against bollworm in North Carolina, pp. 1373Ð1378. In: Proceedings of the BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 2005, New Orleans. Proceedings... Memphis: **National Cotton Council of America**, 2005. p.1373-1378.

JACKSON, R. E.; BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J. W. Field perfomance of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* endotoxins against bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie). **Journal of Cotton Science**, v.7, p.57-64, 2003.

JACKSON, R. E.; MARCUS, M. A.; GOULD, F.; BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J. W. Cross-resistance responses of Cry1Ac-selected *Heliothis virescens* (Lepidoptera:

Noctuidae) to the *Bacillus thuringiensis* protein Vip3A. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.100, n.1, p.180-186, 2007.

JAMES, C. Uptake of GM crops in 2005: 2005. Ithaca: **ISAAA** Briefs, 2009. 275p.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2009 the first fourteen years, 1996 to 2009. **ISAAA** Brief, 2009. 41p. Executive Summary.

JOHNSON, D. E.; BROOKHART, G. L.; KRAMER, K. J.; BARNETT, B. D.; MCGAUGHEY, W. H. Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the indian meal moth, *Plodia interpunctella*: Comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae. **Journal Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 55, p. 235-244, 1990.

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

JURAT-FUENTES, J.L.; GAHAN, L.J.; GOULD, F.L.; HECKEL, D. G.; ADANG, M. J. The HevCaLP protein mediates binding specificity of the Cry1A class of *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Biochemistry**, Washington, v.43, p.14299-14305, 2004.

JURAT-FUENTES, J. L.; GOULD, F. L.; ADANG, M. J. Altered Glycosylation of 63- and 68-Kilodalton Microvillar Proteins in *Heliothis virescens* Correlates with Reduced Cry1 Toxin Binding, Decreased Pore Formation, and Increased Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1 Toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.11, p.5711-5717, 2002.

KAWANISHI, C. Y.; HELD, G. A.; Viruses and bacteria as sources of insecticides. In: HODGSON E; KUHR RJ (Ed.). **Safer Insecticides: Development and USC**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 351-383.

KARUMBIAIAH L.; OPPERT B.; JURAT-FUENTES J. L.; ADANG M. J. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis* susceptible and -resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.146, p.139–146, 2007.

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

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

LEE, M. K.; CURTISS, S. ALCANTARA, E.; DEAN, H. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria díspar*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.583-586, 1996.

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

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

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

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**, 1993. p. 37-70.

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

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

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

LUTTRELL, R. G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology**. v. 92, p.21–32, 1999.

MACINTOSH S. C.; STONE T. B.; JOKERST R. S.; FUCHS R. L. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. **Proceedings National Academy Science**. v.88, p. 8930-4933, 1991.

MACINTOSH, S. C. et al. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **Journal of Invertbrate Pathology**, San Diego, v.56, p.258-266, 1990.

MAHAFFEY, J. W.; BRADLEY, J. R.; VAN DUYN, J. W. B.T. cotton: Field performance in North Carolina under conditions of unusually high bollworm populations. In: THE BELTWIDE COTTON CONFERENCE, 1995, San Antonio. Memphis: **National Cotton Council of America**, 1995.

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

MARTIN, P. A. W.; TRAVERS, R. S. Worldwide abundance and distribution of *B. thuringiensis* isolates. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p. 2437-2442, 1989.

MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; GOULD, F.; FERRÉ, J. Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science Technology**, Oxford, v. 9,p. 239-246, 1999.

MASCARENHAS, V. J.; LUTTRELL, R. G. Combined effect of sublethal exposure to cotton expressing the endotoxin protein of *Bacillus thuringiensis* and natural enemies on

survival of Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Environmental Entomology**, College Park, v.26, n.4, p.939-945, 1997.

MEDEIROS, P. T.; FERREIRA, M. C.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; SOUZA DIAS, J. M. C.; MONNERAT, R. G. Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas no controle da traçadas-crucíferas *Plutella xylostella*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1145-1148, 2005.

MIKLOS, J. A.; ALIBHAI, M. F.; BLEDIG, S. A.; CONNOR-WARD, D. C.; HOLMES, B. A.; KOLACZ, K. H.; KABUYE, V. T.; MACRAE, T. C.; PARADISE, M.; TOEDEBUSCH, A. S.; HARRISON, L. A. Characterization of soybean exhibiting high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1A transgene that confers a high degree of resistance to lepidopteran pests. **Crop Science Society of America**, Machism, v. 47, p.148-157, 2007.

MILNE, R.; GE A. Z.; RIVERS, D.; DEAN, D. H. Specificity of insecticidal crystal proteins: Tmplications for industrial standardization. In Hickle LA, Fitch WL (eds): **Analytical Chemistry of *Bacillus tkuringiensis***. Washington: American Chemical Society, 1990. p 22-35.

MONNERAT, R. S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2000. v3, p. 163-200.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUIEROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M. D.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A.; RAUSELL, C.; CERÓN, J.; IBARRA, J. E.; RINCON-CASTRO, M. C. del; ESPINOZA, A. M.; MEZA-BASSO, L.; CABRERA, L.; SÁNCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from

Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p.7029-7035, 2006.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; DE MEDEIROS, P. T. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v.41, p. 291-295, 2007.

NEPPL, C. C. **Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins**. 2001. 35f. Thesis (B.A.) – University of Chicago, Chicago, 2001.

OPPERT, B.; KRAMER, K. J.; BEEMAN, R. W.; JOHNSON, D.; MCGAUGHEY, W. H. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal Biological Chemistry**. v. 272, p. 23473–23476, 1997.

OPPERT, B.; KRAMER, K. J.; JOHNSON, D. E.; MACINTOSH, S. C.; MCGAUGHEY, W. H. Altered protoxin inactivation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 198, p. 940–947, 1994.

PARDO-LÓPEZ L.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTA, RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, H. C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, New York, v.30, p.589-595, 2009.

PELLOW, J.; HUANG, X.; ANDERSON, D.; MEADE, T. Novel insect resistance traits from Dow AgroSciences, CD-ROM H043.pdf. In: BELTWISE COTTON CONFERENCE, 2002, Atlanta. Proceedings...Memphis: **National Cotton Council of America**, 2002.

PIENKOWSKI, R. L.; MEHRING, P. R. Influence of avernectin B and carfofuran on feeding by alfalfa weevil larvae (Coleoptera: Curculionidae). K. **Economic Entomology**, Lanham, v. 76, p. 1167-1169, 1983.

POLANCZYK, R. A.; VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Utilização de *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas agrícolas na América Latina, p. 111 – 136. In ALVES, S. B., LOPES, R. B. (Ed.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 44, 2008.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociencia**, v.7, n.2, p.1-10, 2003.

POLANCZYK, R.A.; ALVES, S.B. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.62, n.5, p.464-468, 2005.

PONCHIO, L. A. **Paridade de preços nos mercados nacional e internacional do algodão e a competitividade da cotonicultura brasileira**. 2011. 48f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

POOLE, R.W.; MITTER, C.; HUETTEL, M. **A revision and cladistic analysis of the *Heliothis virescens* species group (Lepidoptera: Noctuidae) with a preliminary morphometric analysis of *Heliothis virescens***. Minnesota: Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station, 1993. 185p. (Technical Bulletin, 185).

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

QAIM, M.; ZILBERMAN, D. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. **Science**, Washington, v. 299, p. 900-902, 2003.

REED, T.; BASS, M. H. Larval and postlarval effects of diflubenzuron on the soybean looper. **Journal Economic Entomology**, v. 73, p. 332-338, 1980.

RICE, W. C. Specific primers for the detection of vip3A insecticidal gene within a *Bacillus thuringiensis* collection. **Letters and Applied Microbiology**, v.28, n.5, p.378-382, 1999.

ROBERTSON, J. J.; RICHMOND, C. E.; PREISLER, H. K. Lethal and sublethal effects of avermectin B, on the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal Economic of Entomology**. v. 78, p. 1129-1132, 1985.

ROBERTSON, J. L.; PREISLER, H. **Pesticide bioassays with arthropods**. Boca Raton: CRC Press, Fla., 1992.

SAEGLITZ, C.; BARTSCH, D.; EBER, S.; GATHMANN, A.; PRIESNITZ, K. U.; SCHUPHAN, I. Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer in Germany. **Journal Enconomic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 1768-1773, 2006.

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

SEIFINEJAD, A.; SALEHI-JOUZANI, G. R.; HOSSEINZADEH, A.; ABDMISHANI, C. Characterization of Lepidoptera-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Biological Control**, Orlando, v.44, n. 2, p.: 216-226, 2008.

SELVAPANDIYAN, A., et al. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.67, p.5855- 5858, 2001.

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

SIMS, S.R.; GREENPLATE, T.B.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. (Ed.). **Molecular genetics and evolution of pesticides resistance**. Washington: American Society, 1996. p.229-242.

SIVASUPRAMANIAM, S.; HEAD, G. P.; ENGLISH, L.; LI, Y. J.; VAUGHN, T. A global approach to resistance monitoring. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, p. 224-226, 2007.

TABASHNIK, B. E.; CARRIÉRE, Y. Evolution of insect resistance to transgenic plants. In TILMON, K. J. (Ed.). **Specialization, speciation, and radiation**. the evolutionary biology of herbivorous insects. University of California Press, 2008.

TAN, K. H. Antifeeding of cypermethrin and permethrin at sub-lethal levels against *Pieris brassicae* larvae. **Pesticide Science**, Oxford, v. 12, p. 619-626, 1981.

TOMQUELSKI, G. V.; MARUYAMA, L. C. T. Lagarta-da-maçã em soja. **Revista Cultivar**, Pelotas, v.117,p.20-22,2009.

VAN FRANKENHUYZEN, K. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In ENTWISTLE P. F.; CORY J. S.; BAILEY M. J.; HIGGS S (Ed.): ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley and Sons, 1993. p 1-35.

VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MELLAERT, H. Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n. 5, p. 1378-1385, 1990.

VAN RIE, J.; FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: CHARLES, J.F.; DELECLUSE, A.; NIELSEN-LEROUX (ed.), **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications, p.219-237, 2000.

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

VERKERK, R. H. J.; WRIGHT, D. J. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. **Pesticide Science**, Oxford, v. 37, p. 83-91, 1993.

WARREN, G. W. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p. 109–121. In N. B. CAROZZI and M. G. KOZIEL (Ed.). **Advances in insect control: the role of transgenic plants**. London: Taylor & Francis, 1997.

WIRTH, M. C.; JIANNINO, J. A.; FREDERICI, B. A.; WALTON, W. E. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and *Bacillus sphaericus*. **Journal Medical Entomology**, v. 5, p. 935-941, 2004.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In: CHARLES, J. F. et al. (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Ottawa: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 81 – 100.

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

ZHAO, J. Z.; COLLINS, H. L.; TANG, J. D.; CAO, J.; EARLE, E. D.; ROUSH, R. T.; HERRERO, S.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J.; SHELTON, A. M. Development and characterization of diamondback moth resistance to transgenic broccoli expressing high levels of Cry1C. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3784-3789, 2000.