

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

Estudo da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:  
Noctuidae) em cultivos de milho expressando a toxina Cry1F de  
*Bacillus thuringiensis* no Brasil

CRISTINA LIMA DE MACEDO

ORIENTADORA: MARIA LUCRÉCIA GEROSA RAMOS  
CO-ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

Brasília/ 2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

Estudo da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA:  
Noctuidae) em cultivos de milho expressando a toxina Cry1F de  
*Bacillus thuringiensis* no Brasil

CRISTINA LIMA DE MACEDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Microbiana da  
Universidade de Brasília como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor.

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR  
PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA

**ESTUDO DA SUSCEPTIBILIDADE DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM CULTIVOS DE MILHO EXPRESSANDO A TOXINA Cry1F DE *Bacillus thuringiensis* NO BRASIL**

**CRISTINA LIMA DE MACEDO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Banca Examinadora:

Dra. Maria Lucrecia Gerosa Ramos (Presidente da Banca)

Dra. Rose Monnerat Gomes (Orientadora)

Dra. Janice Lisboa De Marco (Examinador Interno) - UnB

Dra. Consuelo M. Rodrigues de Lima (Examinador Interno) - UnB

Dr. Paulo Roberto Queiroz Martins (Examinador Externo) – CENARGEN/ IMAmt – Instituto Matogrossense do Algodão

Dra. Maria Elita Batista de Castro (Examinador Externo) - CENARGEN

Dra. Erica Soares Martins (Suplente) – CENARGEN/ IMAmt – Instituto Matogrossense do Algodão

## FICHA CATALOGRÁFICA

Macedo, Cristina Lima

Estudo da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae) em cultivos de milho expressando a toxina Cry1F de *Bacillus thuringiensis* no Brasil./ Cristina Lima de Macedo. Orientação de Dra. Rose Gomes Monnerat – Brasília, 2016.

78 p.

Tese de doutorado (D) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, 2016.

1. Resistência cruzada 2. ensaio de ligação 3. toxina Cry 4. Cry1Amod 5. ALP e APN.
- I. Monnerat, R. G. Estudo da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae) em cultivos de milho expressando a toxina Cry1F de *Bacillus thuringiensis* no Brasil.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MACEDO, C. L. **Estudo da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae) em cultivos de milho expressando a toxina Cry1F de *Bacillus thuringiensis* no Brasil.** Brasília: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2016, 78 p. Tese de Doutorado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Cristina Lima de Macedo

TÍTULO DA TESE. **Estudo da susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: Noctuidae) em cultivos de milho expressando a toxina Cry1F de *Bacillus thuringiensis* no Brasil.**

GRAU: DOUTOR

ANO: 2016

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

---

Nome: Cristina Lima de Macedo

CPF: 053.656.374-88

Email: crispepi@yahoo.com.br

## Sumário

Índice de figuras.....	xii
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvi
Resumo.....	16
Abstract.....	17
1. Introdução Geral.....	17
2. Revisão Bibliográfica.....	22
2.1. A Cultura Do Milho No Brasil.....	22
2.2. <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	24
2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	26
2.4. Mecanismo de ação das proteínas Cry.....	27
2.5. Plantas Bt.....	31
2.6. Resistência de lepidópteros a plantas geneticamente modificadas.....	34
3. Hipótese.....	39
4. Objetivos.....	39
4.4. Objetivo geral.....	39
4.5. Objetivo Específicos.....	39
5. Material e Métodos.....	40
5.1 Origem dos insetos utilizados neste trabalho.....	40
5.2 Implantação da colônia de insetos sobreviventes no milho Bt.....	41
5.3 Determinação da susceptibilidade da população de <i>S. frugiperda</i> coletada em Cabeceiras de Goiás (Sf1) às toxinas expressas no milho.....	42
5.4 Determinação da susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas na Bahia às toxinas expressas no milho.....	47
5.5 Determinação da susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> à toxinas modificadas CryMod.....	48

5.6	Ensaio de ligação de toxinas Cry marcadas com biotina à BBMV das populações de <i>S. frugiperda</i> susceptíveis e resistentes a Cry1F.....	52
5.7	Ensaio de competição homóloga e heteróloga de união de Cry1FA a membranas BBMV's de <i>S. frugiperda</i> susceptíveis e resistentes.....	55
5.8	Detecção da atividade enzimática de receptores do intestino de <i>S. frugiperda</i> resistentes a toxina Cry1F.....	56
5.8.1	Atividade de Aminopeptidase.....	57
5.8.2	Atividade de Fosfatase-Alcalina.....	57
5.9	Determinação da susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> aos produtos biológicos à base de Bt disponíveis no mercado Brasileiro.....	58
6.	Resultados e Discussão.....	59
6.1	Susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> a protoxina Cry1Fa.....	59
6.2	Determinação da susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas na Bahia às toxinas Bt.....	61
6.3	Ensaio de união de toxinas Cry a membranas da microvilosidade apical das células do intestino de larvas de <i>S. frugiperda</i> .....	65
6.4	Susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> a protoxinas Cry1Amod.....	70
6.5	Detecção da atividade enzimática de receptores do intestino de <i>S. frugiperda</i> resistentes a toxina Cry1F.....	73
6.6	Susceptibilidade das populações de <i>S. frugiperda</i> à bioinseticidas.....	78
7	CONCLUSÕES .....	81
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

*“Aos meus pais, Francisco Pepino e Adelaide,  
por todo amor a mim proporcionado,  
por ter investido e acreditado sempre na educação  
e me incentivado a trilhar os caminhos do  
conhecimento capaz de transformar as pessoas sempre  
para melhor.”*

*Dedico*

## DEDICO

*A Deus, por sempre estar à frente de todos os meus planos, pela minha saúde e por sempre cuidar de mim.*

*À base da minha vida: minha família!!!*

*Aos meus pais, Francisco Pepino de Macedo e Adelaide Maria Ferreira de Lima, que sempre foram meu exemplo em seguir sempre o caminho do bem, e a certeza que eles estavam bem onde quer que eu estivesse, que mesmo longe estiveram sempre presentes me apoiando, de qualquer decisão tomada para alcançar meus objetivos*

*Dedico também a meus irmãos, Leonardo e Linardo, pela paciência, pelos momentos vividos em família, por serem meus amigos, companheiros e acima de tudo, minha família.*

*Às minhas cunhadas, Carol e Ana Cláudia, por toda torcida, por ter me dado os meus melhores presentes, meus sobrinhos, João Vitor e Liana.*

*Ao Gabriel, obrigada pela sua força, por sua dedicação, pela espera paciente nos momentos de ausência, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida.*

*À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Rose Monnerat, pela oportunidade de fazer parte da família LBE, pela paciência, confiança, por me mostrar a beleza de se trabalhar com algo que realmente gosta, por compartilhar sua sabedoria e pelo incentivo a fazer sempre o melhor trabalho.*



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos recebidas até aqui e por mais essa etapa concluída em minha vida.

A todos os meus familiares que apesar da distância que nos separa, terem torcido e torcerem muito para o meu sucesso profissional, pelo amor e atenção de sempre.

Aos meus pais, pelo exemplo de união, por toda dedicação dispensada a mim, por todo o esforço para que eu pudesse continuar meus estudos! Amo vocês!

À minha orientadora a Dra. Rose Monnerat, por ter me dado a oportunidade de ir além, pela experiência profissional, pelo crescimento pessoal e acadêmico, por toda a experiência mais enriquecedora que eu já tive. Agradeço pelos conselhos, apoio e confiança. Muito obrigada por tudo!

À Dra. Erica e ao Dr. Paulo por sempre estarem dispostos a ajudar. Muito obrigada pela paciência e conversas de desabafos, onde parecia que tudo estava a dar errado, sempre tinha uma solução ao meu dispor. Muito obrigada!!!

À Dra. Lucrécia pela colaboração de ter me acolhido no programa. Meu muito obrigado!

À todos os membros da banca, por toda ajuda!

À Dra. Alejandra Bravo e Dr. Mario Soberón pela hospitalidade de ter me recebido no laboratório, onde pude aprender e enriquecer meus conhecimentos, por toda a assistência, por estarem sempre dispostos a ajudar, e pelos conselhos indispensáveis.

À Dra. Isabel Gómez e Dr. Sabino Pacheco, por toda a disponibilidade, pelo incentivo, pelo valioso auxílio durante os experimentos realizados, pelos momentos de descontração e pelas saídas para conhecer a culinária mexicana. Muito obrigada!

À Daniela Martinez (Dani), por se juntar a mim no meio desse caminho, por todo o carinho, a companhia do dia a dia e o apoio indispensável no aprendizado da língua espanhola.

À todos os amigos que tive a satisfação de conhecer durante minha temporada no México: Martín, Oswaldo, Ádan e Maggie. Agradeço por tornar meus dias mais divertidos e mais mexicanos do que nunca, rssss.

Aos companheiros do laboratório de Microbiologia: Arleen, Josué, Diana, Vianca, Mary, Blanca por toda ajuda e compartilhamento de aprendizado. Aos técnicos Jorge Sanchez, por toda orientação no uso dos equipamentos e familiarização no laboratório, e LizBeth pela gentileza de estar sempre disposta a ajudar. Aos amigos que dividiram bancadas e muitos momentos importantes: Carlinha, Briana (Bri), Marina (Ina), Rayane, Elias, Anabele e Marcela. Obrigado pelos momentos divertidos, pelas discussões sérias e, principalmente, por todo o apoio, pelos longo e prazeroso tempo de convivência.

À todos do LBE: Flávia, Bárbara, Sandro, Marcelo Castro, Jório, Fernanda, Evelin, Marcel, Ester, Marcelo Berçot, Zonaite e Neila pela amizade, conversas e companheirismo; ao Zezinho, pelo apoio técnico e por toda a paciência.

À Lílian pelos ensinamentos de todos esses anos no LBE, pelo exemplo de profissionalismo e pelos momentos de descontração.

Às amigas Daniela e Saluana, amigas de todas as horas. A alegria, bondade e generosidade são características que as definem perfeitamente. A amizade de vocês é um presente que ganhei da vida e vou levá-la comigo para sempre.

A secretária do programa de pós-graduação em Biologia Microbiana, Luciana Medeiros, por sempre estar prontamente disposta a tirar qualquer dúvida, pela simpatia, dedicação e empenho em ajudar os alunos e melhorar o programa, obrigada por toda atenção.

Agradeço a todos os colegas de doutorado, alguns desde o mestrado, que vivenciaram momentos de estudo, de escrita de tese e de tensão, como a qualificação, no decorrer desta jornada.

À EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela ajuda financeira para a realização desta tese.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa de Ensino Superior, pela concessão de bolsa que otimizou o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada por tudo!

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Dano causado pela lagarta do cartucho, <i>S. frugiperda</i> , em planta de milho	23
<b>Figura 2</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	25
<b>Figura 3</b>	Estrutura tridimensional da toxina Cry2Aa	28
<b>Figura 4</b>	Demonstração de uma protoxina em seu modelo clássico (setas pretas) e no modelo “dual” (seta vermelha)	29
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática do mecanismo de ação de toxinas Cry em lepidópteros a nível molecular	31
<b>Figura 6</b>	Ensaio de ligação da toxina Cry1Fa	52
<b>Figura 7</b>	Ensaio de competição das toxinas Cry1A	53
<b>Figura 8</b>	Ensaio de ligação das toxinas Cry2A	54
<b>Figura 9</b>	Ensaio de competição heteróloga entre Cry1F e toxinas Cry1A em <i>S. frugiperda</i>	56
<b>Figura 10</b>	Atividade específica de aminopeptidase e fosfatase-alcálica em diferentes populações de <i>S. frugiperda</i>	57
<b>Figura 11</b>	Gel SDS-PAGE da atividade específica de ALP das diferentes populações de <i>S. frugiperda</i>	60
<b>Figura 12</b>	Western blot de anti-ALP de <i>Manduca sexta</i> das populações Sf1, Sf2, Sf5, Sf6 e Sf7	61

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b>	Lista dos principais países que empregam cultivares transgênicos e suas respectivas áreas de produção no mundo	32
<b>Tabela 2</b>	Toxinas de Bt presentes nos eventos transgênicos aprovados pela CTNBio (safra 2012/2013)	33
<b>Tabela 3</b>	Eventos de milho GM aprovados no Brasil	34
<b>Tabela 4</b>	Populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> coletadas durante o estudo	40
<b>Tabela 5</b>	Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra <i>S. frugiperda</i>	42
<b>Tabela 6</b>	Inseticidas biológicos utilizados no controle biológico de lagartas	47
<b>Tabela 7</b>	Toxicidade das diferentes toxinas Cry para larvas de <i>S. frugiperda</i> da população SfLab e Sf1	48
<b>Tabela 8</b>	Porcentagem de mortalidade de diferentes gerações (F2 e F8) de larvas de <i>S. frugiperda</i> oriundas da Colônia Cabeceiras (Sf1)	48
<b>Tabela 9</b>	Porcentagem de mortalidade de <i>S. frugiperda</i> em populações brasileiras	50
<b>Tabela 10</b>	Toxicidade das diferentes toxinas Cry1Amod para larvas de <i>S. frugiperda</i> da população SfLab e Sf1	56
<b>Tabela 11</b>	Toxicidade dos diferentes produtos biológicos para larvas de <i>S. frugiperda</i> da população de SfLab e Sf1	62

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALP	Fosfatase Alcalina
APN	Aminopectidase N
$\beta$	Beta
BBMVs	Brush-border membrane vesicle – vesículas da borda escovada da membrana apical de células do intestino
BSA	Albumina Sérica Bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CADR	Caderina
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal que mata 50% da população testada
DNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol tetracético
g/mL	Grama/mililitro
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido N-2-hidroxi-etilpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampère
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sulfato de magnésio heptahidratado
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Cloreto de manganês tetra hidratado
m/v	Massa/ Volume
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de sódio anidro
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma = 10 <sup>-9</sup> grama
PBS	Phosphate buffered saline ou tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride

rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturado com SDS
subsp.	Subespécie
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Tris-HCl	Tris aminometano-ácido clorídrico
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
x <i>g</i>	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
Δ	Delta
3D	Três domínios
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar (micromol por litro)
μm	Micrômetro
±	Mais ou menos
-	Menos

## Resumo

Em 2015, o Brasil foi o segundo maior em hectares plantados com culturas geneticamente modificadas ficando atrás somente para os Estados Unidos. Em 2013, produtores de milho da região do Cerrado brasileiro relataram que ao longo dos quatro anos em que o milho Bt expressando Cry1F está sendo cultivado, a eficácia de controle diminuiu significativamente, forçando-os a utilizar produtos químicos para reduzir os danos causados por *S. frugiperda*. Uma colônia de *S. frugiperda* foi estabelecida a partir de indivíduos coletados em 2013, no Brasil, a partir de plantas de milho Cry1Fa (Sf1) demonstrou ter, pelo menos, níveis de resistência mais de dez vezes mais elevados em comparação com a colônia susceptível (Sflab). Ensaio em laboratório com folhas de milho mostrou que, em comparação com a população SfLab, as larvas Sf1 foram capazes de sobreviver alimentando-se de folhas de milho Cry1Fa. A população Sf1 foi mantida sem pressão de seleção por oito gerações e demonstrou manter altos níveis de resistência à toxina Cry1Fa. Sf1 apresentaram maior resistência cruzada a Cry1Aa do que as toxinas Cry1Ab ou Cry1Ac. Como relatado anteriormente, as toxinas Cry1A competiu com a ligação da Cry1Fa de BBMV de insetos da SfLab, explicando resistência cruzada a toxinas Cry1A. Em contrapartida, toxinas Cry2A não competiu com a ligação da Cry1Fa com BBMV de SfLab - e não foi observada resistência cruzada a Cry2A, embora toxinas Cry2A mostrem baixa toxicidade para *S. frugiperda*. Os dados de bioensaios aqui relatados mostram que os insetos coletados de milho Cry1Fa na região do Cerrado eram resistentes a Cry1Fa sugerindo que a resistência contribuiu para falhas no campo de milho para controlar *S. frugiperda*. O estudo da detecção da atividade dos receptores Aminopeptidase (APN) e fosfatase alcalina (ALP) indicaram que os níveis de ALP de detecção de receptores e o APN de algumas das populações resistentes apresentaram níveis baixos de ALP em todas as análises, indicando ser esta a razão da resistência. Bioensaios com Cry1AbMod e Cry1AcMod demonstraram que estas proteínas são altamente ativas tanto para susceptível, quanto para população resistente. Estas toxinas são candidatas a serem introduzidas em novos eventos de milho para o controle de *S. frugiperda*. Testes utilizando biopesticidas de *B. thuringiensis* não mostrou diferenças entre a susceptibilidade da população resistente e susceptível, indicando que existe uma diferença no modo de ação entre a protoxina e a toxina além de uma ação sinérgica. Portanto, os produtos biológicos são uma alternativa para serem utilizados no controle de populações resistentes no campo.

**Palavras chaves:** resistência cruzada, ensaio de ligação, toxina Cry, Cry1Amod, ALP e APN.

## Abstract

In 2015, Brazil was the country with the second largest area planted with genetically modified crops getting behind the United States. In 2013, in Brazilian Cerrado region of corn producers reported that the control efficacy of Bt corn expressing the Cry1F toxin decreased significantly, forcing them to use chemicals to reduce the damage caused by *S. frugiperda*. A colony of *S. frugiperda* was established from individuals collected in 2013 from Cry1Fa corn plants (Sf1) in Brazil and shown to have at least more than ten-fold higher resistance levels compared with a susceptible colony (Sflab). The Sf1 population was maintained with out selection for eight generations and shown to maintain high levels of resistance to Cry1Fa toxin. Sf1 showed higher cross-resistance to Cry1Aa than to Cry1Ab or Cry1Ac toxins. New populations were collected, three in state of Bahia and one in the same GO region. All these populations showed resistance to Cry1F toxin. The Cry1A toxins competed the binding of Cry1Fa to brush border membrane vesicles (BBMV) from SfLab insects, explaining cross-resistance to Cry1A toxins. In contrast Cry2A toxins did not compete Cry1Fa binding to SfLab - BBMV and no cross-resistance to Cry2A was observed, although Cry2A toxins show low toxicity to *S. frugiperda*. The study of aminopeptidase N (APN) receptors and alkaline-phosphatases (ALPs) activity shown that resistant populations have low activity of this enzyme, indicating this is the reason for resistance. Bioassays using the modified toxins on the N-terminal portion, as Cry1AbMod and Cry1AcMod, demonstrated that these proteins are highly active both resistant and susceptible populations. These toxins are candidates to be introduced in new corn to control *S. frugiperda*. Tests using biopesticides made of *B. thuringiensis* showed no difference between the susceptibility of resistant and susceptible populations, indicating that exist a different mode of action between protoxins and toxins and a synergistic action. Therefore, these products could be used to control these resistant field populations.

**Key words:** cross-resistance, binding assays, Cry toxin, Cry1Amod, ALP e APN.



## 1. Introdução Geral

A cultura do milho é considerada uma das mais importantes no cenário mundial de produção agrícola. É o grão mais produzido no mundo, representando 38,1% do total, seguido pelo trigo (29,1%) e pelo arroz (20,8%) (CONAB, 2015).

O milho, assim como a maioria das culturas, está sujeito ao ataque de diversas pragas. O crescimento das áreas cultivadas, aliado à presença de áreas extensivas contíguas de algodão e soja, tem favorecido o ataque de insetos polípagos. Dentre eles, a lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda*, J. E. Smith (1797), é a que vem causando maiores perdas econômicas, por ser um inseto de alto potencial de dano (GALLO, 2002; PRAÇA *et al.*, 2006; CONAB, 2016a).

O aumento da conscientização da população para os efeitos negativos que os pesticidas causam na saúde pública e no meio ambiente tem aumentado a busca por novas formas de controle de pragas que sejam mais econômicas e menos danosas ao agrossistema. Uma das alternativas ao controle químico, é a utilização de plantas transgênicas que expressam toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, conhecidas como plantas Bt. Essa bactéria produz proteínas altamente tóxicas e específicas para matar os insetos, são biodegradáveis e podem ser utilizadas tanto como base para a síntese de produtos formulados, como doadora de genes para inserção em plantas (PRAÇA, 2012). As plantas Bt são capazes de expressar toxinas Cry, resultando em culturas resistentes ao ataque de insetos, inclusive pragas de difícil controle, como a *S. frugiperda*.

O primeiro país a liberar comercialmente as plantas transgênicas na América Latina foi a Argentina, em 1996, o ano em que a soja resistente ao glifosato foi amplamente cultivada pela primeira vez. A tecnologia do milho geneticamente modificado foi lançada comercialmente nos Estados Unidos, em 1996. No Brasil, a primeira liberação da planta Bt foi a do algodão expressando a toxina Cry1Ab e ocorreu em 2005, sendo uma importante ferramenta para controlar insetos praga, reduzir a utilização de produtos químicos e incrementar a produção agrícola (TABASHNIK *et al.*, 2013). A partir de 2007, diversos eventos de milho expressando toxinas Bt foram liberados para comercialização (CONAB, 2014; JAMES, 2015). Durante muitos anos a soja transgênica foi a única produzida e comercializada no Brasil, e a partir do

final de 2009, começaram a ser aprovadas pela CTNBio (SANAHUJA *et al.*, 2011; BRAVO *et al.*, 2013).

Em 2015, em todo o mundo foram cultivados mais de 179,7 milhões de hectares de plantas geneticamente modificadas (GM). No Brasil, a área plantada de culturas Bt vem aumentando mais do que em qualquer outro país, alcançando 43,7 milhões de hectares, estando em segundo lugar mundial, pelo sexto ano consecutivo (JAMES, 2015).

É importante ressaltar que o plantio extensivo e sem a adoção das recomendações técnicas necessárias as culturas Bt pode aumentar a pressão de seleção e acelerar a resistência em populações de pragas-alvo (MONNERAT *et al.*, 2006). Existem relatos na literatura de resistência de insetos em cultivos Bt de na cultura do algodão na Índia (*Pectinophora gossypiella*) (DHURUA; GUJAR, 2011), e na China (*Helicoverpa armigera*) (ZHANG *et al.*, 2011), no milho em Porto Rico (*S. frugiperda*), na Carolina do Norte (*S. frugiperda*) e no Brasil (*S. frugiperda*) (STORER *et al.*, 2012a; BERNARDI *et al.*, 2015; MONNERAT *et al.*, 2015a; OMOTO *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2016), entre outros.

Diversas estratégias podem ser estabelecidas para atrasar a seleção de insetos resistentes aos cultivos Bt. Dentre elas está a utilização de pesticidas e agrotóxicos, sendo que a mais utilizada consiste na implantação de zonas de refúgio que contenham cultivares convencionais. As zonas de refúgio permitem a sobrevivência de insetos susceptíveis. Desta maneira os poucos insetos resistentes que possam estar nos cultivos Bt podem acasalar com insetos susceptíveis presentes nos refúgios de plantas não Bt localizados em áreas próximas, onde esses insetos susceptíveis seriam mais abundantes. Se a resistência é um caráter recessivo, a progênie heterozigota deste cruzamento apresentaria susceptibilidade à toxina Cry expressa em plantas Bt. É importante ressaltar que é fundamental que a dose da toxina Bt produzida pela planta Bt, que é ingerida pelas larvas, seja suficiente para matar os insetos heterozigotos. Foi comprovado que esta estratégia é eficaz para atrasar a resistência de insetos a toxinas Cry em diferentes regiões do mundo onde se utilizam os cultivos Bt (TABASHNIK *et al.*, 2008).

No caso do Brasil, foi recomendado que para o cultivo do milho transgênico, a área de refúgio com plantas não Bt deveria ser correspondente a 10% da área cultivada com milho GM e que este refúgio deveria se localizar a uma distância inferior a 800m do cultivo Bt (GRIGOLLI

& LOURENÇÃO, 2013). Além disso, foi estabelecido o uso de um isolamento de 100 m de bordadura circundante para evitar a contaminação das culturas nativas com culturas geneticamente modificadas. Essas recomendações, no entanto, não são obrigatórias (LEITE *et al.*, 2011; GRIGOLLI *et al.*, 2013) e não estão sendo cumpridas (MONNERAT *et al.*, 2015). O principal risco da aplicação inadequada de áreas de refúgio é que se selecionem insetos resistentes às toxinas Bt, e que plantas com tecnologia Bt percam o seu impacto positivo na agricultura. Essas plantas expressam de um a três genes Bt entre os quais se encontram as proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e Cry35Ab1 (CTNBio, 2014). Em 2010/11 o milho transgênico representou 57% da área total do milho cultivado (LEITE *et al.*, 2011). As principais regiões produtoras de grãos e fibras do país onde se cultivam transgênicos são o Centro-Oeste (região do Cerrado), Sul e Sudeste.

Uma das alternativas para controlar insetos resistentes é a utilização de proteínas modificadas (CryMod) que demonstrou ser bastante efetiva em diferentes insetos resistentes à toxinas Cry pertencentes à Ordem Lepidoptera (SOBERÓN *et al.*, 2007; GARCIA-GOMEZ *et al.*, 2013). A modificação na estrutura das proteínas Cry1Ab através da remoção da extremidade N-terminal, aumenta a afinidade da toxina de se ligar aos receptores presentes na membrana do intestino médio do inseto, auxiliando na formação do poro (GARCIA-GOMEZ *et al.*, 2013; GOMEZ *et al.*, 2014a). Outra forma de controle é a utilização de bioinseticidas à base de Bt que possuem diferentes proteínas dentro de uma mesma formulação que podem agir de forma sinérgica. A eficácia de produtos a base de Bt tem ação tanto da protoxina, quanto da toxina ativada no intestino médio (modelo “dual”) (TABASHNIK *et al.*, 2015) que são capazes de causar a morte destes insetos resistentes presentes no campo.

Em 2013, foi relatado que numa região do estado de Goiás havia um grande número de lagartas de *S. frugiperda* atacando a cultura do milho GM que expressava a toxina Cry1F. O cultivo do milho está entre os maiores segmentos do agronegócio brasileiro e é uma das culturas altamente ameaçada pelo ataque de diversos insetos-praga, entre os quais *Spodoptera frugiperda*. Além de apresentar alta capacidade reprodutiva, a polifagia e seu contato com outras culturas Bt, expõe este inseto a pressão de seleção a repetidas proteínas Bt aumentando seu contato aos mesmos sítios de ligação favorecendo a seleção de insetos resistentes. Na região do Cerrado brasileiro esta praga tem sido encontrada facilmente pelos

produtores de milho, uma vez que as condições climáticas favorecem sua permanência durante todas as épocas do ano. Em seguida eventos semelhantes ocorreram em plantações de milho localizadas no estado da Bahia. Portanto, se faz necessário a procura de novas estratégias de controle no desenvolvimento de métodos eficazes e seletivos contra esta praga para solucionar a resistência que está sendo encontrada no campo e compreender o mecanismo da resistência. O objetivo do presente trabalho foi analisar a causa da sobrevivência de populações de *S. frugiperda* em cultivo de milho Bt a fim de identificar se está havendo seleção de populações deste inseto resistentes às toxinas Bt e as causas desta resistência. Além disso, determinar se toxinas modificadas, que foram relatadas como eficientes para o controle de diferentes espécies de lepidópteros resistentes às toxinas Cry1A (SOBERÓN *et al.*, 2007a), e testar bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* utilizados no controle populações de *S. frugiperda*.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 A cultura do milho no Brasil**

A cultura do milho (*Zea mays L.*) vem alcançando ganhos na produtividade nestes últimos anos, sendo o Brasil, o terceiro maior produtor mundial, tendo gerado 84,6 milhões de toneladas na safra 2015/2016 (CONAB, 2016). O milho está entre as três culturas que mais tem se beneficiado com os avanços da biotecnologia, sendo o segundo principal cultivo transgênico plantado no território brasileiro (JAMES, 2014). Esta cultura está presente em todas as regiões do país, sendo os principais produtores os estados de Mato Grosso (22,5%), Paraná (19,5%), Minas Gerais (8,6%), Goiás (10%), e Bahia (3,9%) (CONAB, 2015).

No Brasil, o milho é considerado como uma importante cultura, tanto no agronegócio como nas necessidades atuais da sociedade moderna. Em 2014, a agricultura contribuiu com 23% do PIB brasileiro, o que tornou o setor do agronegócio um campo estratégico para a economia brasileira (CEPEA, 2014). Sua importância econômica é caracterizada pelas diversas formas de utilização, desde na dieta humana e de animais, como também na indústria de alta tecnologia (CRUZ *et al.*, 2006).

Um dos fatores que limitam e encarecem a produção de milho é o ataque de insetos. Dentre eles, os principais são: a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-elasma *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), a lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* (Hunfnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae), a broca-da-cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) e a lagarta-da-espiga *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) (GALLO *et al.*, 2002). O ataque desses insetos também favorecem o aparecimento de doenças nas plantas, como a infecção por fungos e outras doenças oportunistas causando danos significativos, podendo provocar a morte da planta (CRUZ, 2012).

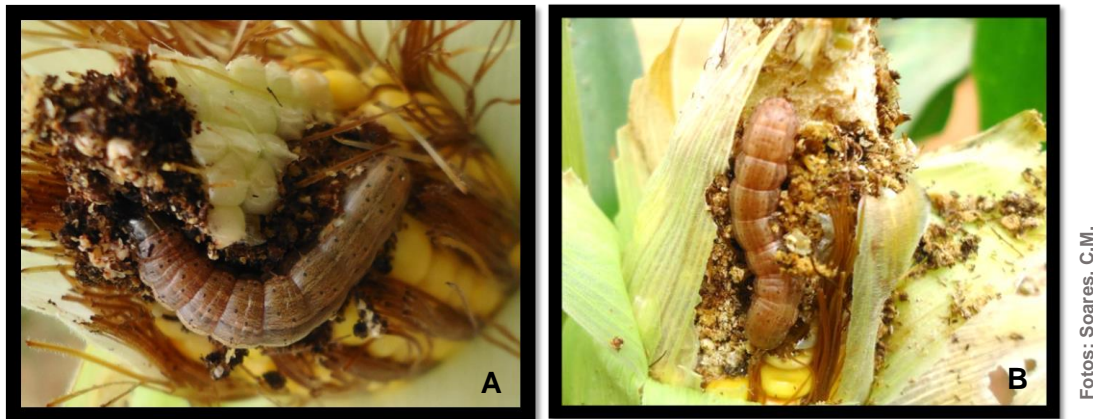
### **2.2 *Spodoptera frugiperda***

Das 30 espécies descritas do gênero *Spodoptera* spp. distribuídas em todo o mundo, metade é considerada praga de diversas culturas de importância econômica (BARROS, 2010).

*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), mais conhecida como lagarta-do-cartucho-do-milho, foi descrita há mais de dois séculos por J. E. Smith (1797), sendo considerada uma das pragas mais importantes da cultura do milho no Brasil e no mundo (CRUZ, 1983; GALLO, 2002; VALICENTE, 2008).

Devido à sua alta frequência e distribuição nas regiões tropicais das Américas, este inseto ocorre durante todas as épocas do ano, é capaz de destruir folhas e cartuchos, causando danos vasculares nos tecidos foliares, afetando a produção de grãos (SÁ *et al.*, 2009; MICHELOTTO, 2011; BREWER *et al.*, 2014). Por se tratar de uma espécie polífaga, esta praga tem a capacidade de se alimentar de mais de 80 espécies de plantas economicamente importantes, entre elas o algodoeiro, o milho e a soja (MONNERAT *et al.*, 2006; BARROS, 2010).

Este inseto apresenta desenvolvimento holometabólico, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. As mariposas possuem diferenças na coloração, quando recém-eclodidas apresentam cápsula cefálica escura e mais larga do que o corpo. A partir do primeiro estágio as lagartas alimentam-se preferencialmente do cartucho das plantas consumindo grande parte da folha antes mesmo delas se desenvolverem. Medem até 1,9 mm de comprimento, apresentando cápsula cefálica medindo 0,3 mm de largura. Após o segundo e terceiro estágios as lagartas começam a fazer buracos nas folhas, se alimentam do cartucho e perfuram toda a planta (Figura 1) (VALICENTE, 2008). No último estágio, o corpo é cilíndrico, de coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, apresentando também manchas de coloração marrom-avermelhada (GALLO *et al.*, 2002). No final do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas. Inicialmente a pupa é alaranjada, passando à coloração marrom-avermelhada e próximo à emergência se torna escura. O período no estágio de pupa é de 8 dias em dias quentes, podendo chegar a 25 dias em temperaturas amenas, após o qual ocorre a emergência dos adultos (GALLO *et al.*, 2002). O indivíduo adulto pode ser encontrado próximo ao solo ou nas folhas do cartucho do milho. O macho apresenta um par de asas castanho escuro, diferente da fêmea na qual a coloração é parda ou cor de palha. Estas chegam a ter cerca de 3,5 cm de comprimento podendo ovopositar mais de 2.000 ovos (GALLO, 2002; CRUZ, 2008).



**Figura 1** - Dano causado pela lagarta do cartucho, *S. frugiperda*, em planta de milho. A e B lagartas no 5º estágio de desenvolvimento.

As altas temperaturas na região central do Brasil durante todas as estações do ano e o plantio sequencial das culturas de milho, soja e algodão tem favorecido a ocorrência da praga e, em consequência, redução significativa da produção. Em função do seu hábito alimentar, o controle por métodos convencionais se torna limitado e o inseto, estando protegido pela própria planta, completa seu desenvolvimento larval no interior da espiga do milho, ocasionando maiores danos (MORAES *et al.*, 2015).

O método mais antigo para o controle de insetos, e ainda o mais utilizado, é baseado na utilização de grandes quantidades de agrotóxicos, cujo investimento exigem elevados custos, muitas vezes inviabilizando a produção. Além disso, o uso indiscriminado desses produtos contribuiu para a seleção de populações de insetos resistentes, trazendo para os produtores de milho uma grande preocupação (CRUZ, 1983; GALLO, 2002; TABASHNIK *et al.*, 2009; CARRIERE *et al.*, 2010; TABASHNIK *et al.*, 2013; PETZOLD-MAXWELL *et al.*, 2014). Atualmente o Brasil é o campeão mundial de utilização de agrotóxicos, consumindo 19% da produção mundial (ANVISA, 2012; PELAEZ *et al.*, 2013; MONNERAT *et al.*, 2015b).

### **2.3 *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, que produz inclusões cristalinas (as toxinas Cry ou Cyt) que são formadas durante a fase estacionária do seu ciclo de crescimento, que provocam a morte de larvas de insetos-praga e vetores de doenças. Essas toxinas são inócuas a outros organismos, como mamíferos, invertebrados e

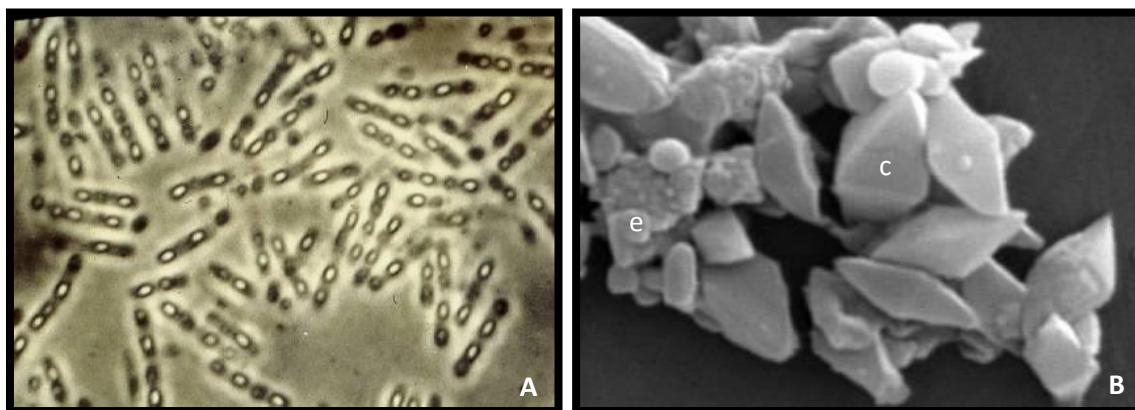
plantas (SCHNEPF *et al.*, 1998; BRAVO *et al.*, 2007; BRAVO *et al.*, 2011; GOMEZ *et al.*, 2014b).

*B. thuringiensis* produz diferentes fatores de virulência, como as  $\delta$ -endotoxinas,  $\alpha$ -exotoxinas,  $\beta$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (HOFTE & WHITELEY, 1989; HANSEN & SALAMITOU, 2000). Algumas estirpes produzem toxinas na fase de crescimento vegetativo, que são denominadas VIP. As toxinas Cry são tóxicas a diferentes insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e a nematóides, enquanto as proteínas Cyt são na maioria das vezes tóxicas aos insetos da ordem Diptera (VAN FRANKENHUYZEN, 2009; BRAVO *et al.*, 2011; SOBERÓN *et al.*, 2012).

As proteínas Cry estão classificadas em 73 grupos e diferentes subgrupos e são codificadas por mais de 700 genes *cry*, localizados em sua maioria, em grandes plasmídeos (CRICKMORE, 2016). Em 1993 foi estabelecido um Comitê de Nomenclatura de toxinas de *B. thuringiensis* (CRICKMORE, 2015). Nesse sistema, para cada nova toxina é dado um nome baseado na identidade de aminoácidos das toxinas previamente nomeadas. O agrupamento por esse critério não implica em uma proteína com estrutura similar, com a mesma gama de hospedeiros nem modo ação. Quatro subcategorias foram formadas: proteínas que compartilham identidade inferior a 45% (atribuído um número arábico), proteínas compartilhando identidade inferior a 78% (atribuído uma letra maiúscula), proteínas que compartilham identidade inferior a 95% (atribuído uma letra minúscula) e proteínas que compartilham mais de 95% de identidade (número arábico), formando assim o nome da proteína.

A massa molecular dessas proteínas pode variar entre 14 e 142 kDa., que juntas formam um cristal, que apresenta diferentes formas (bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou sem forma definida) (Figura 2) (SCHNEPF *et al.*, 1998). A maioria das estirpes de *B. thuringiensis* é capaz de sintetizar mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry, podendo haver casos em que cinco toxinas são encontradas, como por exemplo, no *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.





Fonte: (MARTINS, 2009).

**Figura 2** - *Bacillus thuringiensis*. A, Microscopia de contraste de fases de *B. thuringiensis* (1000x). B, Microscopia eletrônica de varredura de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporo.

O Bt foi descoberto pela primeira vez em 1901, no Japão, por Ishiwata, que descreveu uma bactéria esporulante responsável pela mortalidade do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, e chamou de *Bacillus sotto*. Em 1912, Ernst Berliner isolou, na Alemanha, a mesma bactéria obtida a partir de lagartas da traça da farinha, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae Zeller, 1879) e em 1915 a chamou de *Bacillus thuringiensis* em homenagem a região de onde as lagartas foram encontradas (BRAVO *et al.*, 2013).

A primeira formulação à base dessa bactéria e o reconhecimento da utilização do *B. thuringiensis* no controle biológico ocorreram na década de 30, na França, a partir da formulação chamada “Sporeína” (WEISER *et al.*, 1986). Na década de 50, iniciou-se a produção comercial em larga escala do bioinseticida “Thuricide”, e na sequência, empresas localizadas na Rússia, na Checoslováquia, na Alemanha e nos Estados Unidos iniciaram a produção de formulações similares (DE MAAGD *et al.*, 1999).

No Brasil, o uso de produtos biológicos tem sido cada vez mais priorizado. Porém, enquanto mais de 1.300 agrotóxicos de natureza química encontram-se registrados junto aos órgãos governamentais, apenas cerca de 20 produtos biológicos comerciais encontram-se na mesma situação (BETTIOL, 2011). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (AGROFIT, 2015), existem dez produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* sendo utilizados para controle de pragas agrícolas: Able, Able OF, Agree, Bac-Control WP, Bactur WP, Dipel, Dipel WP, Dipel WG, Thuricide e Xentari. Estes produtos são utilizados no controle de lagartas lepidópteras como: *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) e *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho-

do-milho) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) (Lepidoptera: Gelechiidae), *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas) (Lepidoptera: Plutellidae), entre outras espécies pertencentes à Ordem Lepidoptera (MONNERAT *et al.*, 2015b).

O bioinseticida à base de *B. thuringiensis* mais utilizado é o Dipel®, à base de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. O produto biológico Xentari está entre os três mais utilizados no manejo de resistência e contém a proteína inseticida Cry1C, tóxica a *Spodoptera*. O produto Agree WG (Certis, Columbia, MD) contém em sua formulação proteínas Cry1Ac, Cry1Aa e esporos; o DiPel ES (Valent BioSciences, Oakland, CA) em sua formulação líquida contém Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab e esporos de Bt (VALENT;BIOSCIENCES, 2007).

Pelo fato das estirpes de *B. thuringiensis* produzirem diferentes toxinas com diferentes modos de ação, haviam poucas possibilidades da seleção de insetos resistentes aos bioinseticidas. Na América Latina, os primeiros estudos de resistência a bioinseticidas Bt foram realizados em Honduras, Guatemala, Costa Rica, Nicaragua e no Brasil (PEREZ & SHELTON, 1997; PEREZ *et al.*, 1997; CASTELO BRANCO & GATEHOUSE, 2001). As CL<sub>50</sub> de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *aizawai* obtidas nas populações de campo de Guatemala, Honduras e Costa Rica sugeriram que as populações de *P. xylostella* da América Central desenvolveram resistência a *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, apresentando CL<sub>50</sub> entre 4,3 a 77,2 vezes maiores do que a obtida com a população controle (PEREZ & SHELTON, 1997; MONNERAT *et al.*, 2015). Estudos realizados com uma população resistente oriunda de Honduras sugeriram que a inclusão de uma área de refúgio poderia ser uma estratégia para manejo da resistência (PEREZ *et al.*, 1997). A resistência de *P. xylostella* a *Bacillus thuringiensis* na Costa Rica foi também reportada por Cartin *et al.* (1999). No Brasil, o primeiro caso relatado ocorreu com *P. xylostella* na Região do Distrito Federal, Região Centro-Oeste do país, nos anos de 1996 e 1997 onde foi observado que a CL<sub>50</sub> do produto comercial à base de *B. thuringiensis kurstaki* foi 36 vezes maior em relação à população susceptível (CASTELO BRANCO & GATEHOUSE, 2001; MONNERAT *et al.*, 2015).

Estudos de campo tem sido feitos através dos programas de controle de resistência para avaliar a susceptibilidade das diferentes populações encontradas no campo, no intuito de

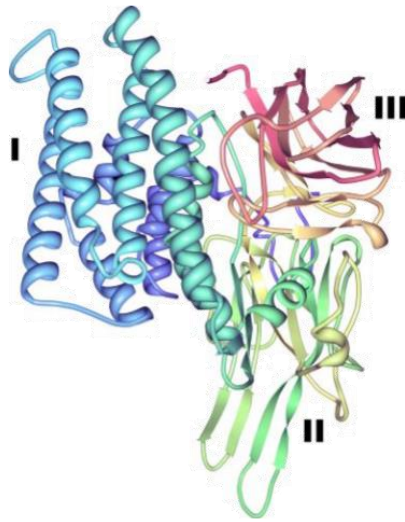
monitorar se a resistência tem aumentado após a aplicação de produtos Bt ou após a introdução da cultura-Bt (SIVASUPRAMANIAM *et al.*, 2007).

## **2.4 Mecanismo de ação das proteínas Cry**

A ação das proteínas Cry é altamente complexa e envolve múltiplos mecanismos (GOMEZ *et al.*, 2014a). Existem vários modos de ação propostos, mas o mais aceito foi descrito e revisado por BRAVO *et al.* (2011) e envolve vários passos que ocorrem no intestino médio das lagartas e vão desde a ingestão da toxina pelo inseto, solubilização e processamento do cristal, interações específicas das toxinas com vários receptores e inserção de parte delas na membrana apical das células intestinais e formação do poro que leva o inseto à morte (GILL *et al.*, 1992; AROSON & SHAI, 2001; ZHANG *et al.*, 2006; PIGOTT & ELLAR *et al.*, 2007; SOBERÓN *et al.*, 2010; BRAVO *et al.*, 2011; PARDO-LOPEZ *et al.*, 2013; ADANG *et al.*, 2014; TABASHNIK *et al.*, 2015).

As protoxinas para serem ativadas necessitam ser processadas pelas proteases intestinais contidas no suco gástrico das larvas, liberando os fragmentos tóxicos. Estes, por sua vez, se ligam a receptores específicos localizados no tecido epitelial do intestino da larva, ocasionando a quebra do equilíbrio osmótico das células, levando à formação do poro na superfície da membrana. As células se intumescem e se rompem, propiciando o extravasamento do conteúdo intestinal para hemocele do inseto (BRAVO *et al.*, 2007; SOBERÓN *et al.*, 2010).

Existem várias classes de toxinas Cry (CRICKMORE *et al.*, 2014) mas as de três domínios são as mais utilizadas para serem expressas nos diversos cultivos agrícolas. Estas toxinas matam porque são capazes de interagir especificamente com algumas proteínas presentes no intestino dos insetos e induzir a formação de poros nas membranas destas células, destruindo o tecido intestinal e matando as larvas que as ingerem (MONNERAT *et al.*, 2015). A estrutura da toxina Cry é caracterizada por possuir três domínios (Figura 3) que determinam as interações no reconhecimento da ligação na membrana conferindo que proteínas de membrana específicas atuem na inserção de oligômeros (BRAVO *et al.*, 2007; GOMEZ *et al.*, 2014b).



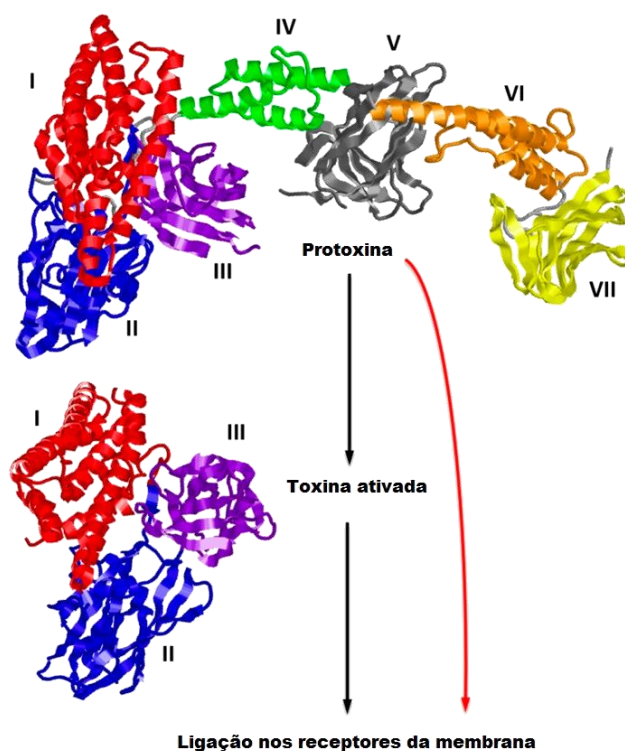
**Figura 3** - Estrutura tridimensional da toxina Cry2Aa. Os numerais romanos indicam os domínios típicos de uma proteína Cry com três domínios (PALMA *et al.*, 2014).

O domínio I é uma alfa - hélice empacotada, reconhecido como um domínio formador de poro e está envolvido na inserção da toxina na membrana e na sua oligomerização. O domínio II, é um prisma - beta com as regiões de alças expostas e estão envolvidas no reconhecimento das proteínas do intestino larval e o domínio III é um empilhamento de folhas beta (beta-sanduíche) que também está envolvido no reconhecimento das proteínas intestinais. Os domínios II e III são responsáveis pela especificidade do inseto mediada por interações específicas nos diferentes sítios de ligação das proteínas intestinais dos insetos. A característica tridimensional da estrutura das proteínas Cry contra diferentes ordens de insetos sugere que o modo de ação das toxinas tridimensionais é conservado (BRAVO *et al.*, 2007; BRAVO *et al.*, 2011; GOMEZ *et al.*, 2014b; ZUNIGA-NAVARRETE *et al.*, 2015).

Estas protoxinas têm o tamanho aproximado de 130kDa, e pela ação do pH alcalino intestinal, são proteoliticamente ativadas em peptídeos tóxicos no intestino do inseto liberando proteínas de menor massa molecular, em torno de 60 kDa (BRAVO *et al.*, 2011; SOBERÓN *et al.*, 2012).

Os receptores responsáveis pela ligação da toxina à membrana têm sido extensivamente estudados em lepidópteros para determinar especificidade, toxicidade e mecanismo de ação das toxinas Cry (BRAVO *et al.*, 2007; GOMEZ *et al.*, 2007; ARENAS *et al.*, 2010). A união aos sítios receptores é uma etapa determinante da especificidade das toxinas Cry, o que motivou diversos grupos de pesquisa a se dedicarem ao entendimento desse processo (MONNERAT & BRAVO, 2000).

O modelo “dual” proposto por Tabashnik *et al.*, (2015) sugere que tanto a protoxina quanto a toxina ativada são capazes de causar a morte dos insetos, podendo cada uma das formas exercer o seu efeito tóxico através de uma via diferente, o que contrasta com o que chamamos "modelo clássico", descrito acima, onde as protoxinas são inativas (Figura 4).



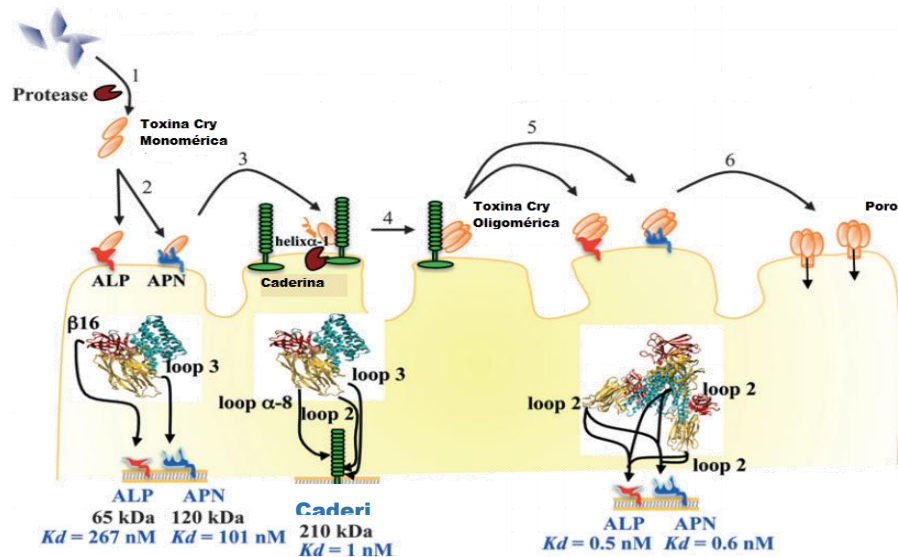
**Figura 4** - Demonstração de uma protoxina em seu modelo clássico (setas pretas) e no modelo “dual”(seta vermelha). No modelo clássico a protoxina Cry1Ac inativa (domínios I-VII) deve ser convertida em toxina ativa (domínios I-III) antes de se ligar a receptores do intestino médio do inseto para exercer toxicidade. No modelo “dual”, a conversão da protoxina em toxina ativada é uma via tóxica primária, onde qualquer pró-toxina intacta ou parte da protoxina também contribuem para a toxicidade de uma via tóxica secundária (seta vermelha) que pode ser especialmente importante no insetos resistentes com interrupções na via principal, como a redução da ligação da toxina ativada aos receptores do intestino médio. Em ambos os modelos, a ligação aos receptores do intestino médio desencadeia eventos em cadeia que, eventualmente, matam o inseto. Adaptado de Tabashnik *et al.*, (2015).

Muitos receptores de toxina Cry presentes na superfície do intestino médio tem sido relatados, dos quais o melhor caracterizado são os receptores aminopeptidase N (APN) e fosfatase alcalina (ALP) e os receptores caderina (CADR) (PIGOTT & ELLAR, 2007). Estudos

recentes revelaram que a caderina desempenha um papel fundamental sobre o modo de ação de toxinas Cry1A em lepidópteros, sendo esta o primeiro receptor da toxina Cry, que tem a função de direcionar a ligação para um segundo receptor que pode ser uma APN ou ALP que facilita a inserção da toxina na membrana (PACHECO *et al.*, 2009; BRAVO *et al.*, 2012; GOMEZ *et al.*, 2014b).

A estrutura tridimensional das toxinas Cry está diretamente ligada ao tipo de interação com os diferentes tipos de receptores presentes no intestino médio dos insetos da ordem Lepidoptera. A primeira interação da toxina Cry1A ativa acontece quando a toxinas se liga aos receptores ALP e APN. A interação da aminopeptidase acontece com a ligação do domínio II e a interação da fosfatase alcalina com a interação do domínio III. Este tipo de interação facilita com que a toxina se ligue fortemente a caderina presente na microvilosidade da membrana (Figura 5) (PACHECO *et al.*, 2009; PARDO-LOPEZ *et al.*, 2013).

As aminopeptidases (APN) são um conjunto de enzimas proteolíticas que removem seletivamente aminoácidos do N-terminal de proteínas. Além disso, estudos sugerem que as aminopeptidases podem também desempenhar um papel importante no intestino médio de lepidópteros devido a sua função como receptores de proteínas de *B. thuringiensis*. As aminopeptidases intestinais de insetos lepidópteros são divididas filogeneticamente em oito grupos, nomeados de APN 1 a APN 8 e suas proteínas possuem tamanho aproximado de 100 a 180 kD (WEI *et al.*, 2016; ARENAS *et al.*, 2010).



**Figura 5** - Representação esquemática do mecanismo de ação de toxinas Cry em lepidópteros a nível molecular. 1, A lagarta ingere a protoxina Cry, e no intestino do inseto devido ao alto pH são solubilizadas e em seguida ativadas pelas proteases, gerando fragmentos da toxina. 2, a toxina monomérica liga-se aos receptores ALP e APN; a interação de baixa afinidade da toxina é localizada próxima à membrana. 3, a toxina monomérica se liga fortemente ao receptor da Caderina e esta interação induz uma clivagem proteolítica da região N-terminal, incluindo a alfa-hélice-1 do domínio I. 4, a clivagem da toxina oligomeriza a toxina em uma toxina pré-poro oligomérica. 5, a estrutura da toxina Cry oligomérica liga-se a receptores de ALP e APN com elevada afinidade. 6, o pré-poro é inserido na membrana causando a formação do poro. Adaptado de Pardo-Lopez *et al.*, (2013).

Os sintomas que são observados nas larvas a partir da ingestão da bactéria pela lagarta são: perda do apetite, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia geral e por fim morte do inseto. Não há atividade de *B. thuringiensis* nas fases de pupa e de adulta dos insetos (ARONSON, 1986; MONNERAT & BRAVO, 2000).

## 2.5 Plantas Bt

Plantas geneticamente modificadas expressando proteínas tóxicas da bactéria *B. thuringiensis* (Bt) têm sido utilizadas a campo no mundo desde 1996 e são uma importante ferramenta para controlar insetos e reduzir a utilização de produtos químicos (TABASHNIK *et al.*, 2013). Estas plantas Bt tiveram seus genomas transformados pela introdução de um ou mais genes codificadores de toxinas de *B. thuringiensis*, conferindo resistência da planta a algumas espécies de lepidópteros-praga (ARMSTRONG *et al.*, 1995), e permitem reduzir o ataque de insetos em até 90%, tornando o nível de controle maior do que os obtidos por métodos convencionais (LEITE *et al.*, 2011).

Diversas culturas, tais como milho, algodão, soja e arroz têm sido modificadas geneticamente para expressar proteínas derivadas de Bt e são usadas em mais de vinte países desenvolvidos e em desenvolvimento em seis continentes, há mais de uma década (JENKINS,

1997; LYNCH *et al.*, 1999; WALKER, *et al.*, 2000; BUNTIN *et al.*, 2001; BURKNESS *et al.*, 2001; YE *et al.*, 2001; JAMES, 2015).

Na América Latina, segundo dados do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), a Argentina é o segundo país onde mais se planta transgênicos, com uma área de 24,5 milhões de hectares, seguida do Paraguai, Uruguai, Bolívia, México e Colômbia. Os transgênicos também estão presentes no Chile, Cuba, Costa Rica e Porto Rico. Na tabela 1 são apresentados os países onde os transgênicos são plantados, a área plantada e as culturas (JAMES, 2015).

A tecnologia do milho geneticamente modificado foi lançada comercialmente nos Estados Unidos, que em 2015 atingiu 70,9 hectares de área plantada. A liberação comercial nos países latino-americanos ocorreu de forma distinta, seguindo a legislação em vigor em cada um. O primeiro país a liberar comercialmente as plantas transgênicas na América latina foi a Argentina.

**Tabela 1** - Lista dos principais países que empregam cultivares transgênicas e suas respectivas áreas de produção no mundo.

País	Área (milhões de hectares)	Plantas transgênicas
Estados Unidos	70,9	Milho, soja, algodão, canola, beterrada, alfalfa, mamão, abóbora
Brasil	44,2	Soja, milho e algodão
Argentina	24,5	Soja, milho e algodão
Índia	11,6	Soja, milho e algodão
Canadá	11,6	Milho, soja, canola, beterrada
China	3,9	Algodão, mamão, tomate, pimenta doce
Bolívia	1,0	Soja
México	0,1	Algodão, soja, milho
Colômbia	<0,1	Algodão, milho
Chile	<0,1	Milho, soja e canola
Honduras	<0,1	Milho
Cuba	<0,1	Milho
Costa Rica	<0,1	Algodão e soja

Fonte: Adaptado (James, 2015).



As primeiras liberações comerciais de milho e algodão Bt ocorreram em 1998 e em 2013 foi aprovada a soja (CTNBio, 2014). No Brasil, a primeira liberação comercial de transgênicos para controle de insetos foi do algodão Bt e ocorreu em 2005. A partir de 2007, diversos eventos de milho expressando toxinas Bt foram liberados para comercialização e em 2010 foi a vez da soja (CTNBio, 2014). No Paraguai, terceiro país a iniciar o cultivo de transgênicos na América Latina, a autorização de plantio ocorreu a partir de 2012 (INBIO, 2014).

Em geral as plantas utilizadas na América Latina expressam de um a três genes de Bt como Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry2Ae, Cry3Bb1, Cry34Ab1 e Cry35Ab1 (Tabela 2) (CTNBio, 2014). Os principais alvos dos genes inseridos nos eventos transgênicos são os insetos da ordem Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), *Alabama argillacea* (curuquerê-do-algodoeiro), *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea* (lagarta- das - maçãs), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja), *Chrysodeixis includens* (lagarta falsa-medideira), *Diatraea saccharalis*, *Agrotis ipsilon*, *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera) e *Diabrotica* spp. (Coleoptera ) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Toxinas de Bt presentes nos eventos transgênicos aprovados pela CTNBio (2016).

<b>Eventos transgênicos</b>	<b>Toxinas de Bt</b>	<b>Alvos</b>
<b>Milho</b>	Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1A.105, Cry1F, VIP3Aa	Lepidoptera
	Cry3Bb, Cry34 Ab1, Cry35Ab1	Coleoptera
<b>Algodão</b>	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab2, Cry2Ae, Cry1F	Lepidoptera
<b>Soja</b>	Cry1Ac	Lepidoptera

De uma forma geral, os eventos transgênicos tem sido bem aceitos pelos agricultores latino-americanos controlando eficientemente as pragas-alvo, tanto que na safra 2013-2014 quase 100% da área agrícola foi cultivada com plantas transgênicas. No Brasil, vinte e uma plantas de milho geneticamente modificadas estão regulamentadas e disponíveis comercialmente, como pode ser observado, na Tabela 3)

**Tabela 3** - Eventos de milho GM aprovados no Brasil.

<b>Evento</b>	<b>Gene inserido</b>	<b>Característica</b>	<b>Empresa produtora</b>
Yield Gard	<i>Cry1ab</i>	Resistente a insetos	Monsanto
Liberty Link	<i>Pat</i>	Tolerante a Herbicida	Bayer
TL	<i>Cry1ab + PAT</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicidas	Syngenta
Roundup Ready 2	<i>CP4-EPSPS</i>	Tolerante a Herbicida	Monsanto
TG	<i>Mepsps</i>	Tolerante a Herbicida	Syngenta
Herculex	<i>Cry1F PAT</i>	Resistente a insetos e Tolerante a herbicidas	Du Pont & DowAgroScience
YR YieldGard/RR2	<i>CP4-EPSPS Cry1Ab</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto
TL/TG	<i>Cry1Ab PAT mEPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Syngenta
Viptera-MIR162	<i>VIP3Aa20</i>	Resistente a insetos	Syngenta
HR Herculex/RR2	<i>Cry1F PAT CP4-EPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Du Pont
Pro	<i>Cry1A.105 Cry2Ab2</i>	Resistente a insetos	Monsanto
TL TG Viptera	<i>Cry1Ab VIP3Aa20 mEPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Syngenta
Pro2	<i>Cry1A.105 Cry2Ab2 CP4-EPSP</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto
Yield Gard VT	<i>CP4-EPSPS Cry3Bb1</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto
Power Core PW/Dow	<i>Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1F PAT CP4-EPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto e Dow Agrosiences
HX YG RR2	<i>cry1Ab Cry1F PAT CP4EPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Du Pont
TC1507xMON810	<i>Cry1F Cry1Ab PAT</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Du Pont
MON89034 x MON88017	<i>Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry3Bb1 CP4-EPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Monsanto
Herculex XTRA™ maize	<i>Cry1F PAT cry34Ab1 cry35Ab1</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Du Pont & DowAgroScience
Viptera4	<i>Cry1Ab PAT VIP3Aa20 mcry3A mEPSPS</i>	Tolerante a Herbicida e Resistência a insetos	Syngenta
MIR 604	<i>mcry3A</i>	Resistente a insetos	Syngenta

Adaptada de (CTNBIO, 2016).

## 2.6 Resistência de lepidópteros a plantas geneticamente modificadas

Até o presente, a resistência dos insetos aos cultivos Bt foi notificada em Porto Rico (STORER *et al.*, 2010) e no Brasil (MONNERAT *et al.*, 2014, OMOTO *et al.*, 2014). Relatos de baixa eficácia foram comunicados em várias regiões do Brasil e da Argentina (Benintende, comunicação pessoal).

Em Porto Rico a resistência foi detectada em populações de *Spodoptera frugiperda* encontradas em cultivos de milho transgênico expressando a proteínas Cry1F (STORER *et al.*, 2010). Neste país o milho Cry1F foi cultivado experimentalmente desde 1996 e em escala comercial a partir de 2003. Observações de danos em milho relatados por agricultores em 2006 levaram a empresa detentora da tecnologia a investigar a situação. Foi constatada alta resistência de *S. frugiperda* a toxina Cry1F e verificada que a resistência é autossômica, altamente recessiva e sem efeitos maternos. Não houve indicação de que havia resistência cruzada com as toxinas Cry1Ab e Cry1Ac, sugerindo que essa resistência é devida a alterações nos receptores (STORER *et al.*, 2010). Fatores importantes a serem considerados para compreender as razões da resistência é que Porto Rico é uma ilha, *S. frugiperda* é menos susceptível a Cry1F do que as outras pragas do milho e as condições climáticas da ilha, que passou por um período de seca, encorajaram o inseto a migrar para áreas irrigadas onde estava sendo cultivado o milho Cry1F. Essa incomum combinação de fatores biológicos, geográficos e operacionais foram provavelmente as causas da evolução da resistência a Cry1F em Porto Rico (STORER *et al.*, 2010). Após a confirmação da resistência, a empresa provedora da tecnologia imediatamente interrompeu a comercialização do milho em Porto Rico e informou o fato a Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA).

Na Argentina houve um dano não esperado causado por *Diatraea saccharalis* em campos de milho Cry1F na Região Nordeste de San Luis. Nestes locais, a pressão das pragas foi excepcionalmente elevada, pois trata-se de uma área com altas temperaturas, alta luz do sol, invernos suaves, com longo período sem geada e alta umidade devido a irrigação. As áreas de plantio de milho Bt não tem refúgio, nem rotação com culturas suscetíveis, em um ambiente onde espécies de hospedeiros naturais são fatores que favorecem o desenvolvimento de mais gerações da praga do que em outras áreas (ASA BIOTECNOLOGIA). Quando a indústria tomou conhecimento da situação, iniciou um processo de coleta de informações e análise do caso. Ao mesmo tempo, foi preparado um plano de mitigação e controle e proposto a não produção de sementes de milho nesta região na safra 2013/2014.

No Brasil, nas últimas safras, foram registrados ataques severos de *S. frugiperda* nas principais culturas transgênicas na região do Cerrado (CRUZ *et al.*, 2013), uma das pragas

mais importantes do milho, algodão e hortaliças no Brasil (SOARES E VIEIRA, 1998, CRUZ *et al.*, 1999; CRUZ E MONTEIRO, 2004) e que causa danos desde a emergência até a maturação das plantas, ou seja, em todos os estágios de desenvolvimento das diversas culturas (; CRUZ *et al.*, 1997; SANTOS, 2001; FUNDAÇÃO MT, 2001; GALLO *et al.*, 2002). É importante registrar que na região do Cerrado Brasileiro, os cultivos anuais de milho, soja e algodão têm início no mês de outubro e se estendem até junho. Adicionalmente, faz-se a implantação da “ponte verde”, constituída pelo cultivo adicional de sorgo, milheto e feijão. Muitas das sementes utilizadas não são certificadas, assim não se sabe qual quantidade de toxina está sendo produzida pela planta e as áreas de refúgio, que deveriam ser de 5 a 20% da área plantada (LEITE *et al.*, 2011), estão sendo implementadas abaixo do nível recomendado ou não estão nem mesmo sendo implementadas (GRIGOLLI & LOURENÇÃO, 2013).

A adoção da tecnologia de plantas geneticamente modificadas expressando toxinas com atividade lagartícida obtidas de *B. thuringiensis* tem mostrado alta eficácia no controle de algumas das principais lagartas-praga das culturas de soja, milho e algodão (TABASHNIK *et al.*, 2013). Essa tecnologia tem trazido ganhos na produtividade, redução de utilização de produtos químicos, preservação da biodiversidade e melhoria da qualidade de vida do agricultor. No entanto, a evolução da resistência de pragas e a retomada da utilização de produtos químicos, podem anular esses benefícios. A evolução da resistência é uma realidade e poderá acontecer em qualquer sistema biológico. A diferença está na tomada de decisões que poderão retardar ou não a evolução da resistência, que já foram notificados em outros locais do mundo além da América Latina, como na Índia (DHURUA E GUJAR, 2011), na China (ZHANG *et al.*, 2011) e nos Estados Unidos (TABASHNIK *et al.*, 2009).

Por muitos anos, acreditou-se que a resistência a biopesticidas à base de Bt era improvável, pois os relatos de resistência de campo foram documentadas depois de mais de 20 anos de uso (FERRÉ *et al.*, 2009). Em 1979, foi feito o primeiro relato de variações de suscetibilidade ao biopesticida Dipel® em *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Em 1985, foi feito o primeiro relato de resistência de insetos a proteínas Bt (MACGAUGHEY, 1985). A partir daí diversas pesquisas relacionadas a resistência de toxinas Bt demonstrou que os insetos eram capazes de se adaptar às toxinas Bt (GOULD, 1998).

A resistência é definida como a capacidade adquirida pelo indivíduo por meio de um processo evolutivo, de um organismo sobreviver em resposta à pressão de seleção imposta pela contínua exposição de algum agente tóxico (MAIA, 2003). Tabashnik *et al.*, (2009) define a resistência como sendo baseada na diminuição da susceptibilidade genética de uma população por uma determinada toxina, causada pela exposição contínua da população à toxina no campo.

Entender como a resistência evolui é fundamental para o desenvolvimento de programas de manejo eficazes da resistência, necessárias para sustentar a tecnologia (TABASHNIK *et al.*, 2012; VELEZ *et al.*, 2013). Para a tecnologia Bt ser efetiva e ao mesmo tempo evitar o desenvolvimento de resistência cruzada, deve ser considerado que as toxinas possuem diferentes modos de ação em Lepidópteros (HERNÁNDEZ & FERRÉ, 2005).

A utilização do bioinseticida de Bt em spray e das plantas transgênicas proporciona benefícios econômicos e ambientais substanciais, porém esta vantagem está sendo comprometida pela a rápida evolução da resistência de pragas a proteínas Bt (TABASHINIK *et al.*, 2015).

A evolução da resistência é frequentemente baseada pela mutação, deleção ou redução da expressão dos receptores celulares presentes na membrana do intestino médio dos insetos (DOVRAT & AHARONI, 2016). Portanto, pode envolver: a não ativação da toxina, imobilização da toxina na membrana peritrófica, incapacidade de ligar-se aos receptores da membrana, como também incapacidade de criar poros na membrana do epitélio e sua baixa eficiência pelo rápido reparo dos danos causados pela toxina às células afetadas (GRIFFITTS & AROIAN, 2005; BAXTER *et al.*, 2011).

Para retardar a resistência e sustentar esta tecnologia, estratégias de implementação estão sendo desenvolvidas de maneira a reduzir a pressão de seleção dos genes que conferem resistência empregando estratégias de refúgio (SIQUEIRA *et al.*, 2006), fazendo com que o contato a toxinas envolvidas na resistência seja diminuída, onde o plantio dessas áreas é constituída com híbridos de milho convencional (não Bt) (GRIGOLLI *et al.*, 2013), conservando o genótipo de indivíduos susceptíveis no campo (GASSMANN, *et al.*, 2014).

O mecanismo mais comum de resistência a toxinas de *B. thuringiensis* é a modificação nos sítios de ligação e tem sido demonstrado ser a base da resistência cruzada entre as

toxinas Cry1A (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). A detecção e o monitoramento da resistência de lagartas *S. frugiperda* encontradas nas culturas de milho pode ser determinada através de bioensaios utilizando uma concentração diagnóstico pré-determinada, para testar a susceptibilidade destes insetos em uma concentração fixa (SIEGFRIED *et al.*, 2014).

### 3. Hipótese

- As populações de *Spodoptera frugiperda* estão resistentes a toxina Cry1F.
- A resistência está relacionada aos receptores presentes no intestino do inseto.
- Existem outras toxinas e bioinseticidas eficazes para controlar estas populações.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo Geral

Compreender o mecanismo de resistência de *S. frugiperda* a proteína Cry1F e propor alternativas para seu controle.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Determinar o nível de resistência de populações de *S. frugiperda* a toxinas Bt expressas nas variedades comerciais de milho Bt;
- Conhecer as interações entre as toxinas Bt presentes no milho e *S. frugiperda*;
- Identificar a natureza dos receptores das toxinas Cry presentes no intestino médio dos insetos de *S. frugiperda*;
- Determinar a susceptibilidade de populações resistentes e susceptível de *S. frugiperda* às toxinas modificadas (CryMod) e a bioinseticidas disponíveis no mercado Brasileiro.

## **5. Material e Métodos**

### **5.1. Origem dos insetos utilizados neste trabalho**

Os insetos foram coletados em uma fazenda no município de Cabeceiras no estado de Goiás, localizado na região de Cerrado do Centro-oeste do Brasil (Latitude: -15.7961, Longitude: -46.927 15° 47' 46" Sul, 46° 55' 37" Oeste). A propriedade tem cerca de 700 hectares, onde se cultiva milho Bt, soja convencional e tolerante a herbicida, e feijão. Na época da coleta, no ano de 2013, o milho Bt expressando Cry1F estava sendo cultivado há 4 anos (desde 2009) em uma área correspondente a 90% do total e o milho expressando Cry1A.105 e Cry2Ab2 e tolerante a herbicida, há 2 anos (desde 2011), em 10% da área.

Uma segunda coleta, no mesmo lugar foi realizada em 2014. Outras coletas foram feitas em 2013, em três cultivos de milho expressando Cry1F, Cry1Aa.105 + Cry2Ab + Cry1F e Cry1Ab na região de Barreiras, no estado da Bahia, no município de Roda Velha, no Distrito São Desidério (Latitude: -12.979210, Longitude: -45.90895). A propriedade tem cerca de 5.000 hectares e cultiva milho Bt desde 2010. Estes insetos possuem número de autorização de coleta SISBIO/ICMBio: 39022-4.

A colônia de *S. frugiperda* suscetível está implementada desde 1988 (SCHIMDT *et al.*, 2001), cujos insetos nunca foram expostos às toxinas Bt, também foi utilizada neste trabalho.

### **5.2. Implantação da colônia de insetos sobreviventes no milho Bt**

Quatrocentas larvas de *S. frugiperda* foram coletadas em cada uma das áreas plantadas com milho Bt, levadas ao laboratório de criação de insetos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e mantidas individualmente até empuparem, em copos plásticos de 50 ml cobertos com tampas de acrílico, contendo 10 ml de dieta artificial (SCHMIDT *et al.*, 2001). As pupas foram acondicionadas em gaiolas envoltas internamente em papel para ovoposição e contendo mel a 10% para alimentação dos futuros adultos. Quando os adultos emergiram e as fêmeas começaram a ovopositar, as massas de ovos foram coletadas, esterilizadas em hipoclorito a 10% por 2 minutos e colocadas em novos copos plásticos contendo dieta artificial. Ao atingirem o terceiro estágio, as larvas foram individualizadas para evitar o canibalismo e ao atingirem a fase de pupa, o procedimento foi repetido. A temperatura



do laboratório foi de  $28^{\circ} \pm 2$ , UR: 60%, fotoperíodo de 14:10. Estas colônias estão sendo mantidas em cativeiro em dieta artificial sem adição de toxina, ou seja, sem pressão de seleção e passaram a ser chamadas Sf1, 2, 5, 6 e 7 (Tabela 4).

**Tabela 4** - Populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas durante o estudo.

Populações	Localidade	Evento	Ano
SfLab	Plataforma de Insetos- Embrapa Cenargen	-	1988
Sf1	Cabeceiras de Goiás (GO)	Milho Cry1F	2013
Sf2	Roda Velha (BA)	Milho Cry1F	2013
Sf5	Roda Velha (BA)	Milho Cry1Aa.105 + Cry2Ab + Cry1F	2013
Sf6	Roda Velha (BA)	Milho Cry1Ab	2013
Sf7	Cabeceiras de Goiás (GO)	Milho Cry1F	2014

### 5.3 Determinação da susceptibilidade da população de *S. frugiperda* coletada em Cabeceiras de Goiás (Sf1) às toxinas expressas no milho

Os bioensaios foram realizados com a toxina ativada Cry1F (purificada e enviada gentilmente por Dra. Marianne Carey da Case Western Reserve University School of Medicine Cleveland, OH) e com a mistura de esporos e cristais de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa. Os genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, obtidos a partir da estirpe padrão HD-1, que foram clonados em vetor pHT315 (ARANTES & LERECLUS, 1991) e expressos individualmente em *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* acristalífero, estirpe 4Q7 (*Bacillus* Genetic Stock Center).

As estirpes recombinantes foram cultivadas em incubador rotativo a 200 rpm por 72 horas, em meio Embrapa (para preparação de um litro foi utilizado: 8 g caldo nutriente; 1 g extrato de levedura; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 mg  $\text{CaCO}_3$ ; 1 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7.0) (MONNERAT *et al.*, 2007) suplementado de 10  $\mu\text{g/ml}$  de eritromicina. Após este período, a esporulação de 95% das bactérias foi confirmada por observações através de microscopia de contraste de fases. Os cultivos foram centrifugados a 12.000x g por 30 min a 4°C e as misturas de esporos-cristais obtidas foram congeladas por 16 horas e liofilizadas por 18 horas, em liofilizador Labconco modelo Lyphlock. Os bioensaios

foram realizados espalhando-se 35 µl de 10 diluições seriadas (Tabela 5) feitas a partir da proteína Cry1F ou da mistura de esporos cristais liofilizados das demais toxinas, em dieta artificial distribuída previamente em placas de cultivo de células com 24 poços. Após a absorção da cultura bacteriana pela dieta,

uma larva de segundo estágio foi colocada em cada poço. Uma placa foi deixada sem a bactéria, como testemunha. A primeira leitura de mortalidade foi feita 48 h após o início do ensaio, ocasião em que as lagartas foram transferidas para copos de plástico de 50 mL, contendo dieta livre do patógeno.

No sétimo dia foi feita a segunda e última leitura (MONNERAT R.G.; SILVA, 2001; PRAÇA, 2004). Os dados de mortalidade obtidos após sete dias foram analisados mediante análise de Probit (FINNEY, 1971) com o programa PoloPC (Le'Ora Software) e a CL<sub>50</sub> foi determinada. Os bioensaios foram realizados com larvas da geração F1 de Sf1 e com larvas de *S. frugiperda* oriundas da criação massal da Embrapa (SfLab).

Na sequência, foram realizados outros bioensaios com larvas das gerações F2 e F8 da colônia Sf1, utilizando a mesma metodologia, mas com a uma única concentração correspondente a 10 vezes a dose letal obtida com a toxina Cry1F, nos testes realizados com geração F1 da Sf1. Os resultados foram comparados com os obtidos com a F1 e com a população susceptível Sflab.

**Tabela 5** - Diluições e concentrações finais utilizadas no bioensaio de dose contra *S. frugiperda*

	Bactéria (mg)	Água (mL)	Concentração (µg/ mL)
Suspensão I (µL)	1	1000	1000
	Suspensão I (mL)	Água (mL)	Concentração (µg/ mL)
Suspensão II (µg)	571,4	428,6	571,4
Dose	Suspensão II (µL)	Água (mL)	Concentração (µg/ mL)
1	2000	800	2000
2	1200	880	1200
3	720	928	720
4	432	956,8	432
5	259	974,1	259
6	155	984,5	155
7	93	990,7	93
8	56	994,4	56
9	34	996,6	34
10	20	998	20

#### **5.4 Determinação da susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* coletadas na Bahia às toxinas expressas no milho**

Larvas de *S. frugiperda* coletadas na Bahia (Sf2, Sf5, Sf6) foram submetidas a bioensaios com as toxinas Cry1F, Cry1Ab e Cry1Ac, segundo procedimento descrito no item 2.3, mas numa única concentração, correspondente a 10 vezes a dose letal obtida com nos testes realizados com a toxina Cry1F e a geração F1 de larvas da população Sf1. A porcentagem de mortalidade foram comparados com os obtidos com a Sf1 e com a população susceptível SfLab.

#### **5.5. Determinação da susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* à toxinas modificadas CryMod**

Foram utilizadas neste estudo as proteínas: Cry1AbMod, Cry1AcMod, que tiveram seus genes clonados em vetor pHT315 e expressos individualmente em *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* acristalífero, estirpe 4Q7 (*Bacillus* Genetic Stock Center) (SOBERÓN *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2012). Estas proteínas foram purificadas e enviadas gentilmente por Dr. Mario Soberón e Dra. Alejandra Bravo (Instituto de Biotecnologia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México). Os bioensaios foram realizados e a CL<sub>50</sub> determinada, utilizando a metodologia descrita no item 2.3. Os resultados foram comparados com os obtidos com a Sf1.

#### **5.6 Ensaio de ligação de toxinas Cry marcadas com biotina à BBMV das populações de *S. frugiperda* susceptíveis e resistentes a Cry1F**

A mistura de esporos/cristais produzidos pelas cepas recombinantes de Bt foi lavada três vezes com tampão PBS (150 mM NaCl, 2.8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, pH 7.2) adicionado de 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF. Os cristais foram separados por centrifugação em gradiente de sacarose (CHANG *et al.*, 1993) e solubilizados em tampão alcalino (50 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2% β-mercaptoetanol, pH 10,5). As protoxinas foram ativadas com tripsina (1:50 m/m) (TPCK, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) por 2h a 37 °C, a reação foi interrompida por adição de PMSF (concentração final 1 mM). As proteínas foram quantificadas usando-se uma

curva padrão com BSA, com o reagente de Bradford da BioRad (BRADFORD, 1976). A integridade das proteínas e sua massa molecular foram determinadas por SDS-PAGE a 12% coradas com azul de Commassie.

A purificação das vesículas da membrana apical do intestino larval (BBMV – sigla em inglês de “Brush Border Membrane Vesicles”) foram purificadas a partir de tecido de intestino médio de larvas de terceiro ínstar de *S. frugiperda* das populações de Cabeceiras (Sf1) e da Colônia da Embrapa (SfLab), de acordo com WOLFERSBERGER (1987). Os intestinos das larvas foram retirados com auxílio de pinças e lavados e conservados em solução tampão (200 mM Manitol, 1 mM DTT e 1 mM HEPES-Tris pH 7,4) a -80 °C. Um grama de intestino médio de cada uma das populações foi homogeneizado em 10 mL de solução MET (300 mM Manitol, 17 mM Tris HCl, 10 mM HEPES, 5 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF – pH 7,4 ajustado com Tris), foram dados nove pulsos a 2.250 rpm em aparelho homogeneizador blender-polytron. Em seguida, foram adicionados 10 mL de 24 mM MgCl<sub>2</sub> frio, misturado delicadamente e incubado em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 5 mL de solução I e 5 mL de 24 mM MgCl<sub>2</sub>, misturado delicadamente e incubado em gelo por 15 min. A reação foi centrifugada a 2.500 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 30.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuspendido em 500 µl de MET e 500 µl de água Milli-Q® fria. Foram dados outros 3 golpes a 2.250 rpm em aparelho homogeneizador. Em seguida, a reação foi dializada uma vez contra 1L de tampão (150 mM KCl, 2 mM EGTA, 0,5 mM EDTA, 10 mM HEPES – pH 7,4 – a 4 °C) e as BBMVs foram aliqüotadas e armazenadas a -80 °C.

As proteínas recombinantes Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e a proteína Cry1F foram solubilizadas em tampão carbonato 500 mM pH 10,5 com 0,2% β-mercaptoetanol por 2h a 37 °C com agitação constante de 100 rpm. Após solubilização, as proteínas foram quantificadas usando-se reagente de Bradford (Bio-Rad®). Em seguida, foi feita uma eletroforese em SDS-PAGE a 12 % de Acrilamida para verificar a qualidade das amostras. As proteínas solubilizadas foram então biotiniladas com auxílio do kit ECL Protein Biotinylation System (GE Helthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a biotinilação,

foi feita uma detecção com streptavidina conjugada a peroxidase para confirmar a marcação das proteínas pela biotina. Primeiramente, procedeu-se uma eletroforese em SDS-PAGE a 12 % com 10 µg das amostras biotiniladas das proteínas marcadas. As proteínas presentes nos géis foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL-nitrocellulose membrane – GE Helthcare). A transferência foi realizada a corrente constante de 350 mA em sistema submarino (Hoefer) por 1 h em tampão de transferência [25 mM Tris, 192 mM glicina e 20% metanol (v/v) pH 7.2]. A membrana foi incubada por 16 h com PBS 1 X para que fosse renaturada e a visualização se deu por incubação da membrana com streptavidina-peroxidase conjugada (1:6000 - GE Helthcare) por 1 h, seguida de incubação com SuperSignal Chemiluminescence Substrate (Pierce) segundo as recomendações do fabricante.

A ligação foi realizada em 100 µL de tampão de ligação [0.1% PBS (pH 10.5), 0.1% BSA, 0.1% Tween 20]. Dez µg de BBMV's de *S. frugiperda* foram incubadas (separadamente) com as toxinas, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa e Cry1F biotiniladas (10 nM) durante 30 min a 25 °C. As toxinas não ligadas foram removidas por centrifugação (10 min a 14000 x g). As BBMV's contendo as toxinas Cry unidas, foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspendidas em 15 µL de PBS 1X e 5 µL de tampão de amostra Laemmli 4X [0,125 M Tris/HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.01% Azul de Bromofenol]. As amostras foram fervidas por 3 min e aplicadas em gel SDS-PAGE a 9%. Em seguida, após foram transferidas para membrana de nitrocelulose e visualizadas com streptavidina-peroxidase conjugada seguida de incubação com SuperSignal Chemiluminescence Substrate (Pierce) como descrito no parágrafo anterior.

#### **5.7. Ensaio de competição homóloga e heteróloga de união de Cry1FA a membranas BBMV's de *S. frugiperda* susceptíveis e resistentes**

Para os ensaios de competição homóloga e heteróloga da união da toxina Cry1Fa as BBMV de *S. frugiperda* e utilizou 10 nM da toxina Cry1Fa ativada e marcada com biotina a qual foi incubada com 10 µg de BBMV por 60 min a 25 °C em presença de 5000 nM (500 vezes maior) de toxinas Cry1Fa, Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac ou Cry2Aa não marcadas em tampão de ligação (PBS, 0,1% BSA, pH 10,5) e baixa agitação. As proteínas não ligadas as BBMV's foram removidas no processo de centrifugação (10 min a 12.000 x g). As BBMV's foram lavadas três

vezes no tampão de ligação e ressuspensas em 15 µL de PBS 1X e 5 µL de tampão de amostra Laemmli 4X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos e utilizadas em géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9% de acrilamida. As proteínas presentes nos géis foram transferidas para a membrana de nitrocelulose e renaturadas segundo descrito anteriormente. Em seguida, a toxina Cry1F marcada que permaneceu unida com as BBMV foi revelada com estreptavidina conjugada com peroxidase tal como se especificou anteriormente.

## **5.8 Detecção da atividade enzimática de receptores do intestino de *S. frugiperda* resistentes a toxina Cry1F**

A detecção da presença de receptores do intestino médio de larvas de *S. frugiperda* (BBMV) foi analisada através da determinação da atividade enzimática específica de fosfatase alcalina (ALP) e de aminopeptidase (APN), por gel SDS-PAGE utilizando substrato para detecção da atividade, e também por western-blot com anticorpos de ALP e APN de *Manduca sexta* (Lepidoptera).

### **5.8.1. Atividade de Aminopeptidase**

A atividade de APN foi realizada utilizando 100 mM de L-leucina-*p*-nitroanilida (2,88 mg (LpNA Sigma) em 1 mL de água como substrato. Em um tubo de 1,5mL foi adicionado 400 µl de água destilada estéril, 200 µl de Tris-HCl 1M pH 8.0, 250 µl de NaCl 1M, 5 µl de BBMV, 100 µl de substrato L-leucina *p*-nitroanilida (10 mM). A reação foi homogeneizada em vortex e incubada por 10 min a 25 °C. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 405 nm. E a cada dois minutos foram feitas novamente quatro leituras, até o sexto minuto. O valor da absorvância de 405 nm (Ultrospec II espectrofotômetro; GE Healthcare) foi utilizada para calcular a atividade enzimática específica. O coeficiente de absorção de *p*-nitroanilida utilizada foi de  $9.9 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1}$ . Uma unidade específica da atividade de APN foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 nmol de L-leucina-*p*-nitroanilida  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de proteína a 25 °C.

### **5.8.2. Atividade de Fosfatase-Alcalina**

A atividade de ALP foi observada utilizando *p*-nitrofenil fosfato como substrato. Em um tubo ésteril de 1,5 mL foi adicionado 2,5 µl de BBMV, 250 µl de substrato *p*-nitrofenil fosfato. A reação foi homogeneizada em vortex e incubada por 15 min a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 250 µl de EDTA, 250 mM pH 8.0. E por último foi feita a leitura em espectrofotômetro a 405 nm. A concentração de *p*-nitrofenil foi calculada utilizando uma curva padrão de 4-nitrofenil em 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris pH 9.5. A atividade enzimática específica foi calculada considerando a quantidade de proteína necessária para transformar 1 nmol de *p*-nitrofenol-fosfato (substrato) em um minuto.

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry DC (Bio-Rad) utilizando BSA (Albumina do soro bovino) como padrão (Pierce). Em temperatura ambiente foi preparada a solução I de acordo com o fabricante. Foi adicionado 5µl da amostra (BBMV) e 125µl da solução I. A reação foi homogeneizada em vortex e incubada por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada 1mL da solução B (kit), homogeneizada e incubada novamente por 15 min em temperatura ambiente. Após a incubação foi feita a leitura em espectrofotômetro a 750nm (Ultrospec II espectrofotômetro; GE Healthcare).

### **5.9. Determinação da susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* aos produtos biológicos à base de Bt disponíveis no mercado Brasileiro**

Os bioensaios foram realizados com os produtos biológicos Agree®, Dipel®, Xentari®. Esses produtos são formulados a partir de diferentes estirpes de Bt apresentam composições distintas de toxinas (Tabela 6). A metodologia de bioensaio utilizada foi a mesma descrita no item 2.3, onde 35 µL de cada diluição apresentada na Tabela 5, foram espalhados sobre a dieta. A CL<sub>50</sub> foi determinada da mesma forma descrita no item 2.3.

**Tabela 6** - Inseticidas biológicos utilizados no controle biológico de lagartas. Nome comercial, composição, princípio ativo.

Nome Comercial	Composição	Princípio ativo
Formulado 1	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab e Cry1C	<i>B. thuringiensis kurstaki</i> + <i>B. thuringiensis aizawai</i>
Formulado 2	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry2Ab	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>
Formulado 3	Cry1C	<i>B. thuringiensis aizawai</i>

SC = Suspensão Concentrada; WG = Granulado Dispersível; WP = Pó Molhável.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* às toxinas Bt

A concentração letal (CL<sub>50</sub>) da toxina Cry1Fa necessária para matar 50% das larvas da população de *S. frugiperda* oriunda de Cabeceiras de Goiás (Sf1) foi pelo menos dez vezes maior quando comparada com a população controle (SfLab) (Tabela 7). Os valores de CL<sub>50</sub> e os limites de confiança a 90% da colônia Sf1 não puderam ser calculados, uma vez que, devido a impossibilidade de utilizar uma concentração maior do que 3.500 ng de toxina Cry1Fa por cm<sup>2</sup> de dieta e nesta concentração, a mortalidade não foi suficiente para determinar os valores de CL<sub>50</sub>. Esse resultado indica que existe uma diferença importante de susceptibilidade entre as populações susceptível (Sflab) e a de Cabeceiras (Sf1), apontando para que esta esteja resistente a toxina Cry1F. Foi observado ainda que a população da colônia Sf1 apresentou valores de CL<sub>50</sub> 30 vezes maiores para a toxina Cry1Aa que os da colônia susceptível SfLab. Os valores de LC<sub>50</sub> de Cry1Ab e Cry1Ac foram 4 e cerca de 2.5 vezes maiores, respectivamente, quando comparados com os valores obtidos na colônia SfLab. Os valores dos limites de confiança a 90% destes bioensaios não se sobrepõem, indicando que estas diferenças são significativas (Tabela 7) (MONNERAT *et al.*, 2015).

Ao contrário, a análise da CL<sub>50</sub> obtida com as toxinas Cry2Aa e Cry2Ab de ambas as populações mostrou que não existem diferenças significativas à susceptibilidade a esta toxina a qual apresenta toxicidade relativamente baixa para ambas as populações de insetos SfLab e Sf1 (Tabela 7). Estes dados mostram que a população Sf1 resistente a Cry1Fa apresenta



resistência cruzada às toxinas Cry1Ab e Cry1Ac. Não foi observada resistência cruzada a toxinas Cry2A, embora toxinas Cry2A não seria uma alternativa para o controle de larvas de *S. frugiperda* na região do Cerrado do Brasil, devido à sua baixa toxicidade.

**Tabela 7** - Toxicidade das diferentes toxinas Cry para larvas de *S. frugiperda* da população SfLab e Sf1.

<sup>a</sup> CL<sub>50</sub> analisada com Probit pelo programa PoloPC da Le'Ora Software (limite de confiança a

Proteína	SfLab			Sf1			RR
	LC50 <sup>a</sup> ng/cm <sup>2</sup>	Slope	Erro Padrão	LC50 <sup>a</sup> ng/cm <sup>2</sup>	Slope	Erro Padrão	
<b>Cry1Fa</b>	342 (192–609)	1.3	1.0	> 3.500	-	-	> 10
<b>Cry1Aa</b>	73.0 (26–120)	0.0061	0.0020	2514 (1283-3745)	0.00048	0.00017	34
<b>Cry1Ab</b>	403 (251-647)	1.8	1.1	1636 (843-2429)	0.0010	0.00030	4.0
<b>Cry1Ac</b>	545 (318-771)	0.0010	0.00030	1415(789-2040)	0.00090	0.00030	2.5
<b>Cry2Aa</b>	668 (424-912)	0.0020	0.00050	827 (562-1093)	0.0020	0.0010	1.2
<b>Cry2Ab</b>	> 3.500	-	-	> 3.500	-	-	1.0

90%). RR. Razão de resistência. LC<sub>50</sub> Sf1/ LC<sub>50</sub> SfLab.

A colônia Sf1 foi mantida em laboratório na ausência de pressão de seleção por oito gerações. Cada uma destas gerações foi utilizada para determinar a susceptibilidade a uma concentração diagnóstica de Cry1Fa 10 vezes superior a CL<sub>50</sub> obtida com Cry1F das larvas da colônia SfLab (3.500 ng/cm<sup>2</sup>). A mortalidade obtida com insetos das gerações F2 e F8 de Sf1 foram inferiores a 5% e não apresentaram diferenças significativas quanto a susceptibilidade da ação desta toxina, sugerindo que nesta população o caráter de resistência é hereditário (Tabela 8).

**Tabela 8** - Porcentagem de mortalidade de diferentes gerações (F2 e F8) de larvas de *S. frugiperda* oriundas da Colônia Cabeceiras (Sf1).

Proteínas	Sf1 (F2) (%)	Sf1 (F8) (%)
<b>Cry1Aa</b>	16,6	13,8
<b>Cry1Ab</b>	9,7	11,1
<b>Cry1Ac</b>	22,2	19,4
<b>Cry2Aa</b>	22,2	18
<b>Cry1F</b>	2,6	1,4

## 6.2. Determinação da susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* coletadas na Bahia às toxinas Bt

Os ensaios realizados com as 3 populações coletadas na Bahia e com a população coletada em Cabeceiras de Goiás na safra de 2014 com a toxina Cry1F na concentração 10 vezes superior que a CL<sub>50</sub> obtida com a população susceptível, mostrou que todas apresentavam resistência a esta toxina e também resistência cruzada a toxina Cry1Ab e Cry1Ac (Tabela 9). É importante observar que a população coletada em Cabeceiras no ano de 2014 (Sf7) apresentou 0% de mortalidade, da mesma forma que a população coletada em 2013 no mesmo local. Resultado semelhante foi obtido com as toxinas Cry1Ab e Cry1Ac, que em ambas populações apresentaram 20% de mortalidade. As populações coletadas na Bahia, ainda que não apresentaram mortalidade abaixo de 20%, também não tem a susceptibilidade comparável a colônia de laboratório, que foi de 100%. Uma planta de milho que contém a proteína Cry1F é capaz de expressar de 1,52 a 2,63 pg/mg de tecido seco (UEPA, 2005). Sendo importante enfatizar que a dose diagnóstico de >3500 ng/cm<sup>2</sup> é muito elevada e uma planta transgênica não será capaz de expressar as toxinas nesta dose tão elevada, ou seja, a tecnologia Bt nestas populações não é mais eficiente.

**Tabela 9** - Porcentagem de mortalidade de *S. frugiperda* em populações brasileiras.

População	Isolado	% Mortalidade (>3.500ng/cm <sup>2</sup> )		
		Cry1Fa	Cry1Ab	Cry1Ac
<b>SfLab</b>		100	100	100
<b>Sf1</b>	Milho- Cry1F Cabeceiras – GO 2013	0	20	29
<b>Sf2</b>	Milho- Cry1F Bahia 2013	52	66	79
<b>Sf5</b>	Milho Cry1A.105 e Cry2Ab 2013	29	50	56
<b>Sf6</b>	Milho- Cry1Ab Bahia 2013	37	ND	ND
<b>Sf7</b>	Milho Cry1Fa Cabeceiras 2014	0	20	18

ND – Não determinado

Esses resultados indicam que as populações coletadas na Bahia também apresentam resistência as toxinas Cry1F, Cry1Ab e Cry1Ac. Tendo em vista, que a dose diagnóstico é >3500 ng/cm<sup>2</sup> a toxicidade da protoxina Cry1Ab nativa variou de 2 a 5 vezes menos nas populações resistentes de *S. frugiperda*, e na população susceptível foi altamente tóxica. No

entanto, a protoxina Cry1Abmod demonstrou alta toxicidade nas populações resistentes, com mortalidade variando de 75% a 100%. A protoxina Cry1Abmod teve uma toxicidade de até 20 vezes mais tóxica, em *Plutella xylostella* (MUÑOZ-GARAY *et al.*, 2009; TABASHNIK *et al.*, 2011; GOMEZ *et al.*, 2014b).

Um estudo paralelo demonstrou também altos níveis de resistência em populações de *S. frugiperda* oriundas de outras regiões do Brasil, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Paraná (FARIAS *et al.*, 2014). Foi demonstrado que este fenótipo de resistência é devido a um único locus recessivo e que a frequência desse alelo de resistência aumentou significativamente no campo nos últimos anos (FARIAS *et al.*, 2014). Um plano bem elaborado, incluindo monitoramento e utilização de refúgios é uma das estratégias para preservar a eficácia da tecnologia e retardar a seleção de insetos resistentes às toxinas de Bt (TABASHNIK *et al.*, 2013b).

A pressão de seleção a que este inseto está sendo exposto tem sido muito grande, pois além de ter alimento durante todo o ano, está exposto a eventos transgênicos que expressam as mesmas toxinas. Além disso, o clima favorece ciclos de vida curtos e contínuos.

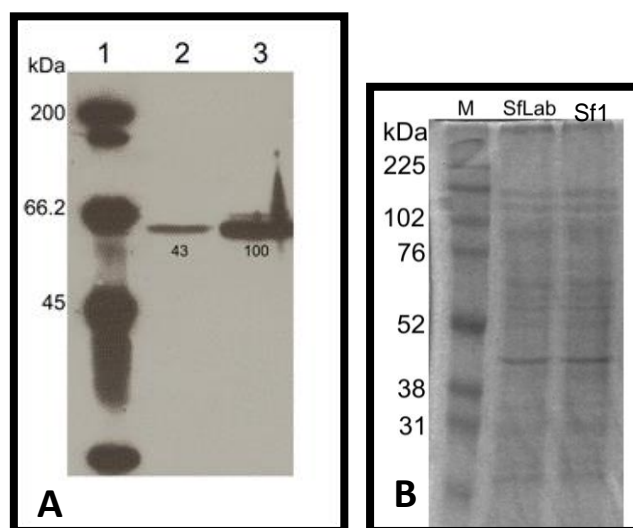
Existe evidência na literatura de que os esporos de Bt produzem fatores de virulência que poderiam ser importantes para a toxicidade (SLAMTI *et al.*, 2014). Foram feitos também bioensaios com outras proteínas Cry com esporos/cristais. Em todos os casos, a mesma estirpe de Bt acristalíferos 4Q7 foi transformada com o vector pHT315 contendo os diferentes genes cry como relatado na seção de Materiais e Métodos. No entanto, uma vez que os mesmos esporos de Bt estão presentes nestes bioensaios e não foi observada toxicidade nos bioensaios realizados com a estirpe Cry2Ab transformada, podemos concluir que o efeito de esporos em toxicidade para estas populações não é relevante.

No Brasil, segundo país com a maior área de cultivo de transgênicos e maior consumidor mundial de agrotóxicos, diversos eventos Bt têm sido plantados sequencialmente expressando as mesmas toxinas Cry, tais como Cry1Ab, Cry1Ac e Cry1Fa. A pressão de seleção a que insetos polívoros como a *S. frugiperda* está sendo exposta pode ser considerada muito grande. É importante que a expressão de toxinas Cry em plantas seja elevada afim de garantir que larvas susceptíveis heterozigotas sejam controladas eficazmente.

Por outro lado, as práticas de uso de refúgios devem ser aplicadas de maneira estrita com a finalidade de prover insetos susceptíveis com os quais os poucos insetos resistentes possam copular. Caso os refúgios não sejam utilizados de maneira adequada não existirão insetos susceptíveis que permitam gerar insetos heterozigotos e se corre o risco de que se selecionem e se estabeleçam populações de insetos resistentes as toxinas Cry. No caso da utilização de cultivos-Bt no Brasil os agricultores não tem seguido esta regulamentação já que os refúgios estão sendo implementadas abaixo do nível recomendado ou não estão nem mesmo sendo implementados (LEITE *et al.*, 2011; GRIGOLLI & LOURENÇÃO, 2013).

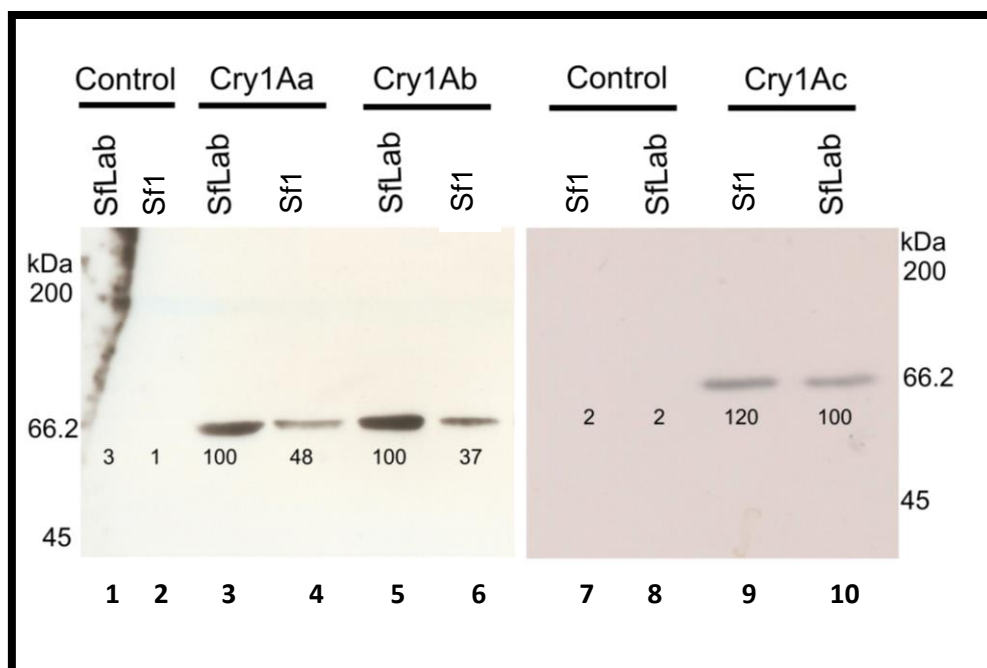
### 6.3 Ensaio de ligação de toxinas Cry a membranas da microvilosidade apical das células do intestino de larvas de *S. frugiperda*.

Foi analisado se diferentes toxinas Cry nativas eram capazes de se unir a vesículas de membranas das microvilosidades apicais (BBMV) purificadas do intestino médio de larvas de *S. frugiperda*. Em primeiro lugar se utilizou a toxina Cry1Fa marcada com biotina. A figura 6A mostra que esta toxina é capaz de se unir as membranas de BBMV de ambas as populações de insetos Sf1 e SfLab, e, apresenta uma maior interação com as membranas isoladas da colônia controle SfLab quando se compara com as membranas da colônia Sf1 proveniente de cultivos de milho Bt.



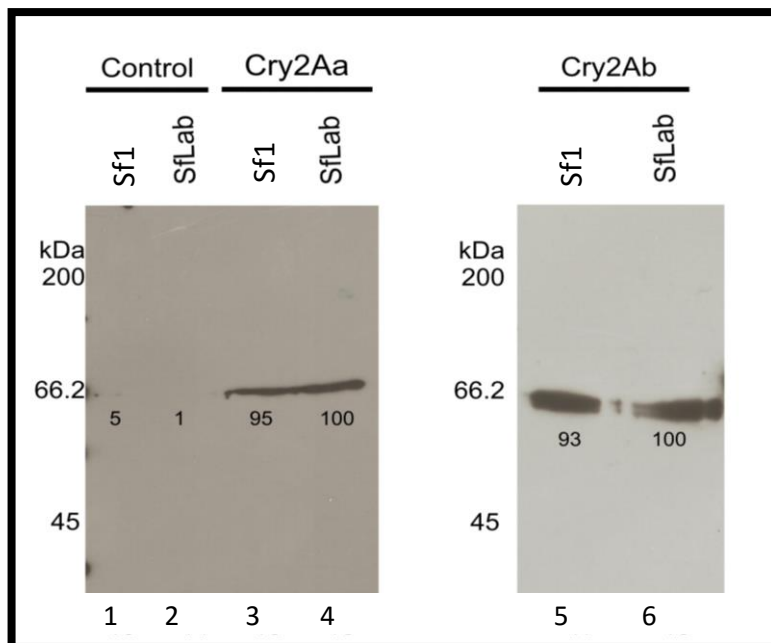
**Figura 6** -Ensaio de ligação da toxina Cry1Fa. **Figura A**, Ligação da Cry1Fa: Linha 1, ligação da Cry1Fa a Sf1; Linha 2, ligação da Cry1Fa com SfLab: **figura B**, BBMV's coradas com comassie blue. Os números nas bandas representam a porcentagem calculada pelo programa de cálculo da densitometria (Image J program) Gel 12% SDS PAGE com BBMVs das populações SfLab e Sf1. Linha 1, marcador Rainbow.

A união das toxinas Cry1A e Cry2A às BBMV's destas duas populações de insetos também foi analisada. A figura 7 mostra que todas as toxinas utilizadas, tanto as Cry1A (Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac) foram capazes de se ligar às membranas de ambos insetos Sf1 e SfLab.



**Figura 7** -Ensaio de competição das toxinas Cry1A: Linha 1 e 8, controle das BBMV da população SfLab utilizadas na incubação com as toxinas; Linha 2 e 7 controle das BBMV da população Sf1 utilizadas na incubação com as toxinas; Linha 3, ligação da Cry1Aa com SfLab; Linha 4, ligação da Cry1Aa com Sf1; Linha 5, ligação da Cry1Ab com SfLab; Linha 6, ligação da Cry1Ab com Sf1; Linha 9, ligação da Cry1Ac com Sf1; Linha 10, ligação da Cry1Ac com SfLab. Os números nas bandas representam a porcentagem calculada pelo programa de cálculo da densitometria (Image J program). Gel 12% SDS PAGE com BBMV's das populações SfLab e Sf1. Linha 1, marcador Rainbow.

A figura 8 mostra que a Cry2A foram capazes de se ligar às membranas de ambos insetos Sf1 e SfLab. Assim como a susceptibilidade a toxina Cry2Aa é relativamente baixa, nos ensaios de ligação demonstrou que não tem diferença significativa, por isso seria necessário que os níveis de expressão desta toxina sejam mais elevados dentro da planta geneticamente modificada para assegurar que esta toxina tenha algum efeito nas populações de *S. frugiperda*.



**Figura 8** – Ensaio de ligação das toxinas Cry2A: Linha 1, controle das BMVs da população Sf1 utilizadas na incubação com as toxinas; Linha 2, controle das BMVs da população SfLab utilizadas na incubação com as toxinas; Linha 3 ligação das toxinas Cry2Aa com Sf1; Linha 4 ligação das toxinas Cry2Aa com SfLab; Linha 5, ligação da Cry2Ab to Sf1; Linha 6, ligação da Cry2Ab com SfLab. Ligação das toxinas biotinizadas (10 nM) das BMVs das populações de *S. frugiperda* SfLab e Sf1 descrita em material e métodos. Os números nas bandas representam a porcentagem calculada pelo programa de cálculo da densiometria (Image J program) Gel 12% SDS PAGE com BMVs das populações SfLab e Sf1. Linha 1, marcador Rainbow.

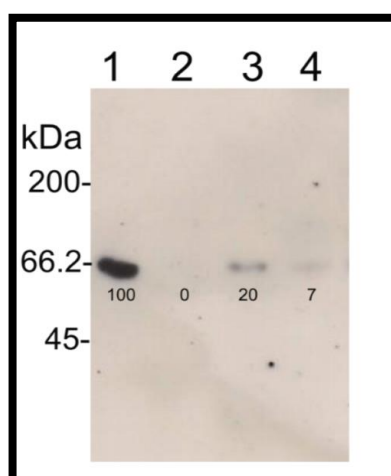
Os ensaios de competição mostraram que Cry1As e Cry1Fa diferem os locais de ligação de diferente insetos da ordem Lepidoptera, como *H. virescens* (JURAT-FUENTES *et al.*, 2004), *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exíqua* (HERNÁNDEZ ;FERRE, 2005), *Nubilalis ostrinia* e também em *S. frugiperda* (LUO *et al.*, 1999; HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013). A resistência cruzada para as toxinas Cry1Fa e Cry1A pode ser relacionada ao compartilhamento dos sítios de ligação entre estas toxinas.

Este trabalho mostrou a identificação de indivíduos com uma significativa tolerância a toxina Cry1F em uma população de *S. frugiperda* numa região onde se cultivou milho Bt expressando a toxina Cry1F por quatro anos. A população resistente a Cry1F apresentou resistência cruzada às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, presentes em outros eventos

transgênicos utilizados no Brasil, mas não apresentou resistência cruzada com a toxina Cry2A.

Os ensaios de competição heteróloga entre Cry1F e toxinas Cry1A mostraram que estas toxinas compartilham sítios de união em *S. frugiperda* (Fig. 9) e, portanto não é recomendável utilizar plantas piramidadas com estas toxinas para o controle de *S. frugiperda* nem utilizar outros cultivos geneticamente modificados que contenham algumas destas proteínas na mesma região, já que isto só incrementaria o nível de pressão de seleção para estes organismos tolerantes a Cry1F.

Finalmente, analisamos se estas toxinas eram capazes de competir pela união da toxina Cry1F a membranas de SfLab. A competição homóloga da união de toxinas Cry1F marcada com biotina com um excesso de 500 vezes de toxina Cry1F não marcada mostrou que esta união é específica. A competição heteróloga da união de Cry1F marcada com biotina utilizando um excesso de 500 vezes das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac não marcadas mostrou que estas toxinas compartilham sítios de união com a toxina Cry1F e são capazes de competir por esta união. O mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolve vários passos: solubilização do cristal, processamento das toxinas, união ao receptor, inserção da membrana, agregação, formação do poro e citólise (GOMEZ *et al.*, 2007; PARDO-LOPEZ *et al.*, 2013).



**Figura 9** - Ensaio de competição heteróloga entre Cry1F e toxinas Cry1A, demonstrando que compartilham dos mesmos sítios de união em *S. frugiperda*. Linha 1, Cry1F; Linha 2, Cry1Aa; Linha 3, Cry1Ab e Linha 4, Cry1Ac.

Quando uma planta é piramidada, ou seja, possui dois tipos de proteínas Cry em uma mesma planta, o mecanismo de ação dos insetos para tornar-se resistentes é baseada na mutação dos receptores. Pode acontecer uma única mutação, o qual as duas proteínas partilham do mesmo sitio de ligação, conferindo resistência a ambas as proteínas (HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013), podendo gerar resistência-cruzada (XIAO *et al.*, 2016).

Os eventos que tem denominação de proteínas piramidadas, como a Cry1A.105, são plantas com combinações de proteínas Cry ativas contra Lepidópteros que possuem regiões quiméricas com domínios I e II sendo a metade da região C-terminal da Cry1Ac e o domínio III quase idêntica a Cry1Fa (HERNANDEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013). Finalmente o fato de que as diferentes gerações da colônia Sf1 mantiveram a baixa susceptibilidade a toxinas Cry1F indica que no campo esta colônia já está posicionada como uma praga estável com fenótipo de tolerância a toxina Cry1F.

Este trabalho mostrou avaliações da susceptibilidade de diferentes populações de *S. frugiperda* oriundas de outras regiões do Brasil que estão resistentes às plantas Bt e deve servir de alerta para que os agricultores, o governo, as empresas detentoras da tecnologia Bt avaliem a situação e proponham medidas para resolver o problema antes que a tecnologia seja perdida.

#### **6.4 Susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* à protoxinas Cry1Amod**

As toxinas Cry1AbMod e Cry1AcMod apresentaram toxicidade superior às mesmas toxinas selvagens, tanto em todas as populações de *S. frugiperda* resistentes, quanto na população susceptível (tabela 10). Interessante salientar que na população susceptível a toxicidade das duas Cry1Amod foi semelhante à Cry1Aa, que foi a toxina mais letal a população de *S. frugiperda* susceptível. As toxinas Cry1AbMod e Cry1AcMod mostraram uma importante atividade inseticida contra todas as populações testadas, e muito mais tóxicas do que as mesmas toxinas selvagens. É importante ressaltar que a CL<sub>50</sub> da população Sf5 foi semelhante a da população susceptível para a toxina Cry1AbMod e Cry1AcMod (tabela 10).



**Tabela 10** – Toxicidade das diferentes toxinas Cry1Amod para larvas de *S. frugiperda* população SfLab e Sf1.

Populaçã o	LC50 <sup>a</sup> ng/cm <sup>2</sup>				
	Cry1Aa	Cry1Ab	Cry1Ac	Cry1Abmod	Cry1Acmmod
<b>SfLab</b>	73.0 (26–120)	403 (251-647)	545 (318-771)	60 (42-86)	44 (29-68)
<b>Sf1</b>	2514 (1283-3745)	1636 (843-2429)	1415(789-2040)	191 (112-326)	249 (134-462)
<b>Sf2</b>	NA	>2000	>2000	403 (231-783)	146 (72 – 264)
<b>Sf5</b>	NA	>2000	>2000	88 (34 – 167)	202 (46 – 723)
<b>Sf6</b>	NA	>2000	>2000	335 (208– 551)	441 (217 – 1165)
<b>Sf7</b>	NA	>2000	>2000	198 (116 – 338)	203 (107 – 363)

<sup>a</sup> CL<sub>50</sub> analisada com Probit pelo programa PoloPC da Le'Ora Software (limite de confiança a 90%). RR. Razão de resistência. LC<sub>50</sub> Sf1/ LC<sub>50</sub> SfLab. \*Não se aplica.

Ainda que nas populações resistentes, a toxicidade das proteínas Cry1Abmod e Cry1Acmmod tenham apresentado os resultados de CL<sub>50</sub> mais altos (88 e 441 ng/cm<sup>2</sup>), todas as proteínas apresentaram resultados de toxicidade significativamente semelhantes, pois os valores do intervalo de confiança se sobrepõem. Os dados de bioensaios das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac das populações Sf2, Sf5, Sf6 e Sf7 apresentaram mortalidade >2000 ng/cm<sup>2</sup> demonstrando que estas proteínas quando modificadas são mais eficientes nestas populações resistentes.

Essas diferenças podem ser ainda devidas às diferenças de susceptibilidade entre as populações, o que já foi demonstrado com outras populações de *S. frugiperda* originárias de diferentes regiões geográficas em que a resposta às proteínas Cry1A é variável (MONNERAT *et al.*, 2006) e também com *P. xylostella* (GONZÁLEZ-CABRERA *et al.*, 2001).

Neste estudo os valores de toxicidade de Cry1Abmod e Cry1Acmmod não apresentaram diferenças significativas na população susceptível, porém o valor de CL<sub>50</sub> da protoxina Cry1Acmmod foi menor, demonstrando maior eficiência. Em outros estudos contra *Trichoplusia ni* e *P. gossypiella*, foi demonstrado que a protoxina Cry1Acmmod tem maior eficiência quando comparada a Cry1AbMod (FRANKLIN *et al.*, 2009; TABASHNIK *et al.*, 2011).

Mudanças na conformação dos receptores são capazes de interferir na ligação da toxina tanto através da perda de aminoácidos como na substituição e este fato representa um

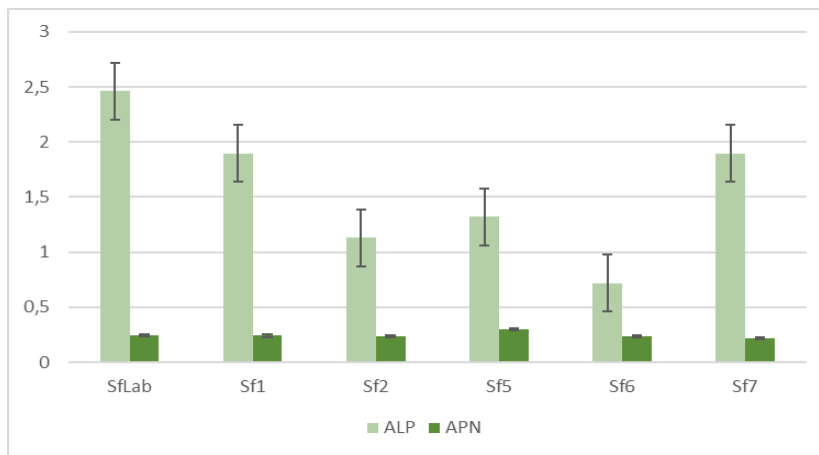
dos mecanismos mais provável na resistência a toxinas Bt. Para retardar a seleção da resistência são utilizadas algumas estratégias baseadas na utilização de mais de uma toxina Cry ou combinados em uma mesma planta (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

A construção de proteínas modificadas é uma estratégia promissora no controle de *S. frugiperda*, uma vez que a mudança na sequência de aminoácidos permite a ligação nos sítios dos receptores presentes na membrana do intestino médio deste inseto (SOBERÓN *et al.*, 2007; GARCIA-GOMEZ *et al.*, 2013). Entretanto, em populações de insetos resistentes este fato pode ser modificado por algum tipo de alteração na conformação do receptor ou até mesmo uma mutação. As mutações no gene da caderina estão associadas a um dos mais comuns mecanismos de resistência em diferentes espécies de insetos lepidópteros (GAHAN *et al.*, 2001; GARCIA-GOMEZ *et al.*, 2013).

#### **6.5 Detecção da atividade enzimática de receptores do intestino de *S. frugiperda* resistentes a toxina Cry1F**

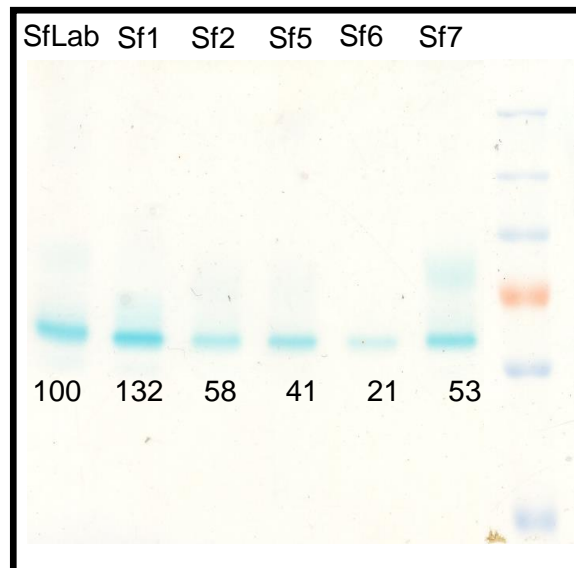
O uso de plantas geneticamente modificadas aumenta a pressão de seleção de insetos provocando a resistência a plantas Bt quando utilizada de forma indevida e sem aplicação de manejo integrado. Neste trabalho foi feita a análise da determinação da atividade de ALP e APN de diferentes populações de insetos de diferentes estados brasileiros para detectar quais os prováveis receptores responsáveis pela resistência.

Na primeira análise de detecção da presença de receptores do intestino médio de larvas de *S. frugiperda* (BBMV) foi feita através da determinação da atividade específica de ALP e APN. Os valores obtidos foram comparados e está representado na figura 8. A análise estatística das diferentes populações da atividade específica de APN não apresentaram diferenças significativas (ANOVA).



**Figura 10** - Atividade específica de Aminopeptidase (APN) e Fosfatase Alcalina (ALP) em diferentes populações de *S. frugiperda*.

Pode-se observar que existem diferenças quanto aos níveis de atividade de cada uma das enzimas nas diferentes populações. A atividade enzimática diminui de acordo com a susceptibilidade de cada população, e que a atividade de fosfatase alcalina (ALP) é maior que a de aminopeptidase (APN). No caso da fosfatase alcalina é na SFLab que se encontra maior atividade enzimática. Portanto, pode-se observar a atividade em todas as populações, mas em níveis diferentes. As populações Sf1, Sf2, Sf5 e Sf6 apresentaram diferenças estatísticas significativas, sendo a Sf6 a que obteve maior diferença quando comparada com a população susceptível, demonstrando que o mecanismo de ação envolvido nestes insetos pode ser diferente em comparação com a população susceptível. Este fato sugere que a presença de receptores ALP em alta concentração na população susceptível, pode ser um fator importante para inserção da proteína na membrana, o que pode interferir na susceptibilidade de determinadas populações existentes no campo.



**Figura 11** – Gel SDS-PAGE 9% da atividade específica de ALP das diferentes populações de *S. frugiperda*.

No gel de SDS-PAGE podemos observar que os níveis de detecção de atividade enzimática de algumas populações resistentes apresentou baixos níveis de ALP, o que representa baixa atividade deste receptor quando comparada com a população susceptível. Demonstrando que a resistência dos insetos pode estar envolvida com os receptores de ALP, mas não com APN, nestas populações brasileiras.

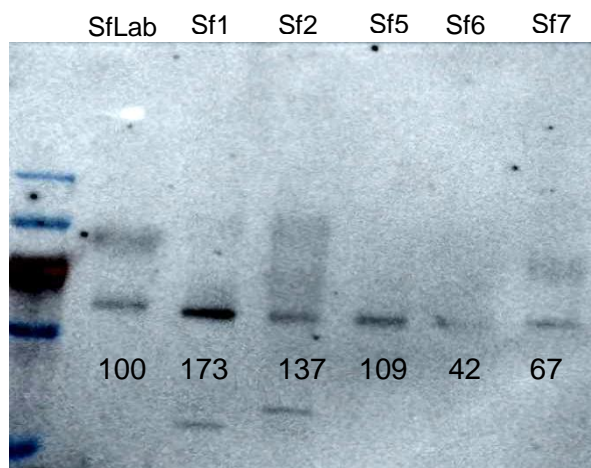
Alteração na expressão dos receptores de membrana de toxinas Cry1A são comumente descritos no mecanismo de resistência (CACCIA *et al.*, 2012). Estudo feito por Jakka *et al.*, (2014) o qual descreveu o mecanismo de resistência em plantas Bt segere que a associação entre a resistência e a ligação das toxinas Cry1F e Cry1Ac a receptores ALP em lagartas de *S. frugiperda* e *H. zea*, respectivamente, se apresentaram em níveis reduzidos (CACCIA *et al.*, 2012; JAKKA *et al.*, 2014).

Um estudo feito por Jurat- Fuentes (2011) relatou que populações de insetos resistentes a toxinas Cry demonstrou baixos níveis de atividade de ALP como também na sua expressão no intestino médio dos insetos estudados, demonstrando papel importante da ligação das toxinas Cry no modo de ação destas proteínas (JURAT-FUENTES *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2012).

Dentre os receptores já caracterizados, alguns já foram descritos como possíveis receptores de insetos da ordem Lepidoptera. O receptor do tipo aminopeptidase (APN) já foi

bem descrito para *Manduca sexta* (PACHECO *et al.*, 2009; SINGH & SIVAPRASAD, 2009; FLORES-ESCOBAR *et al.*, 2013), *Helicoverpa zea* (WEI *et al.*, 2016), *Lymantria díspar* (VALAITIS, 2011), *Helicoverpa armigera* (RAJAGOPAL *et al.* 2003; UPADHYAY *et al.*, 2011). Outros possíveis receptores incluem a caderina (VALAITIS, 2001; HARA *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ *et al.*, 2004), e fosfatase alcalina (ALP) para *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera* e *Spodoptera frugiperda* (JURAT-FUENTES *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2012; GOMEZ *et al.*, 2015).

Para confirmar que se tratava de atividade da fosfatase alcalina nestas populações foi feita a análise de Western-Blot com anticorpos de ALP de *Manduca sexta* (Lepidoptera) (Figura 10) e foi possível observar que a população Sf6 apresentou a menor detecção de ALP quando comparada com a população susceptível, assim como Sf2 e Sf5, o qual demonstrou níveis equivalentes com a detecção do substrato de ALP, corroborando com os mesmos resultados anteriores de detecção pelo substrato e por gel de SDS-PAGE.



**Figura 12** – Western blot de anti-ALP de *Manduca sexta* das populações Sf1, Sf2, Sf5, Sf6 e Sf7.

A interação dos receptores ALP e APN no modo de ação das toxinas Cry é essencial na formação da estrutura oligomérica para facilitar a formação do pré-poro o qual será responsável por intermediar a inserção da toxina na membrana (BRAVO *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2012; GOMEZ *et al.*, 2015), em alguns casos esta ligação é reduzida por estar associada à alteração da expressão dos genes que codificam os principais

receptores como a caderina, aminopeptidase e fosfatase alcalina (GAHAN *et al.*, 2004; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2010). Em um estudo feito na Índia, foi constatado que a aminopeptidases N (APN) e a fosfatase alcalina (ALP) desempenham papéis importantes no mecanismo de ação contra larvas de *H. armigera*, e observaram que os níveis de expressão de ALP foi 10 vezes maior do que APN sugerindo que ALP pode desempenhar um papel importante na toxicidade em relação a APN em *H. armigera* (UPADHYAY *et al.*, 2011). Em *Trichoplusia ni*, foi possível observar alterações diferenciadas na expressão de duas aminopeptidases associadas com a resistência à toxina Cry1Ac, APN 1 e APN 6, constataram através de análises bioquímicas e moleculares a baixa expressão de APN 1, enquanto a expressão de APN 6 foi significativamente elevada (TIEWSIRI *et al.*, 2011).

Arenas *et al.*, (2010) demonstrou a detecção destas proteínas por ligand-blot em *Manduca sexta* e observaram que os receptores ALP são expressos primeiramente durante os estágios de desenvolvimento do inseto, e a APN no terceiro ínstar. A presença destes receptores nas microvilosidades da membrana permite que a toxina seja capaz de se ligar a outros receptores presentes na membrana com alta afinidade, como a caderina (PARDO-LOPEZ *et al.*, 2013).

Diferentes toxinas Cry podem compartilhar o mesmo receptor, ou podem se ligar a diferentes receptores presentes na membrana intestinal do inseto. A união ao receptor está ligada na determinação da especificidade do inseto, toxicidade, e resistência (GOMEZ *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2009). Tendo em vista de que a presença dos receptores é essencial no modo de ação das toxinas, a expressão destes receptores na parede do intestino do inseto se torna um fator limitante para que a toxina tenha efeito letal, afetando na mortalidade e na eficiência de plantas Bt e biopesticidas.

## **6.6 Susceptibilidade das populações de *S. frugiperda* à bioinseticidas**

Os resultados das CL50 obtidos nos bioensaios realizados com a população de *S. frugiperda* resistente a Cry1F proveniente de Cabeceiras (Sf1) e da colônia da Embrapa (SfLab), indicaram que o produto mais eficaz é o Formulado 1, que apresentou CL50 de 15,97 e 31,74 ng de produto por cm<sup>2</sup> de dieta para as respectivas populações (Tabela 12). A

segunda formulação mais eficaz foi o Formulado 2, à base de *B. thuringiensis kurstaki*, que apresentou CL<sub>50</sub> de 395,16 ng/cm<sup>2</sup> para a população suscetível, e 335,42 ng/cm<sup>2</sup> para a população resistente. O formulado 3, desenvolvido à base de uma estirpe pertencente ao sorotipo *aizaiwai* causou mortalidade (CL<sub>50</sub>) de 2175,21 ng/cm<sup>2</sup> e de 2283,02 ng/cm<sup>2</sup> para as populações susceptível e resistente, respectivamente.

A análise dos valores e seus respectivos intervalos de confiança mostrou que a susceptibilidade das populações susceptível e resistente a cada um dos produtos é semelhante (Tabela 12).

**Tabela 11** - Toxicidade das diferentes produtos biológicos para larvas de *S. frugiperda* das populações SfLab e Sf1.

Produto	LC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ng/cm <sup>2</sup>	
	SfLab	Sf1
Formulado 1	31,74 (26,26 - 62,29)	15,97 (9,4 – 53,88)
Formulado 2	395,16 (206,57 - 632)	335,42 (145,97 – 889,48)
Formulado 3	2175,21 (1518,01-2923,03)	2283,02 (1172,84 - 3486,7)

<sup>a</sup>CL<sub>50</sub> analisada com Probit pelo programa PoloPC da Le'Ora Software (limite de confiança a 90%). LC<sub>50</sub> Sf6/ LC<sub>50</sub> SfLab.

A variação de valores de CL<sub>50</sub> obtidas com cada produto deve estar relacionada a composição de toxinas presentes nas estirpes utilizadas como base dos mesmos. O produto que causou maior mortalidade é formulado à base de uma estirpe recombinante que produz toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A e Cry1C. É possível que haja uma ação sinérgica entre as toxinas de algumas estirpes, ou seja, a ação se torne potencializada quando duas ou mais proteínas Cry agem em conjunto (SCHNEPF *et al.*, 1998, PRAÇA *et al.*, 2004).

Por outro lado, a semelhança de resultados da atuação dos produtos nas populações susceptível e resistente deve estar relacionada a ação da protoxina, presente nas estirpes. É importante mencionar que a planta transgênica está expressando a toxina ativada Bt e no

produto é a protoxina que está presente. Um trabalho publicado em 2015 demonstrou que o modo de ação da protoxina e da toxina são diferentes (Tabashnik *et al.*, 2015), assim, como a população de *S. frugiperda* (Sf1) estava resistente às toxinas Cry1F, Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, provavelmente continuam susceptíveis às protoxinas Cry1F, Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac.

*B. thuringiensis* é o principal princípio ativo biológico produzido e utilizado ocupando 2% do total de inseticidas vendidos no mundo (ESTRUCH *et al.*, 1996; RAYMOND *et al.*, 2010) e conferindo níveis adequados e consistentes de controle no campo (PRAÇA *et al.*, 2010; MONNERAT *et al.*, 2015b).

A susceptibilidade de distintos insetos é diferente em relação aos produtos comerciais disponíveis no mercado, pois as estirpes de Bt, utilizadas em muitos inseticidas biológicos, que produzem diferentes toxinas Cry, que tem especificidades diferentes e atuam de formas diferentes entre gêneros, espécies, populações e insetos (MONNERAT *et al.*, 2006; HERNANDEZ *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos neste ensaio são semelhantes aos apresentados por Jakka *et al.*, (2014) que avaliaram a susceptibilidade de *S. frugiperda* resistente à Cry1Fa, relataram a resistência cruzada em toxinas Cry1Ab e Cry1Ac, e não encontraram diferenças na susceptibilidade dessa população aos bioinseticidas Xentari WG e Dipel ES. Os autores consideram que a utilização de pesticidas Bt pode ser uma alternativa viável a ser empregada no manejo de *S. frugiperda* resistente no campo.



## 7. CONCLUSÕES

- As populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas nos estados de Goiás e Bahia estão resistentes a toxina Cry1F e apresentaram resistência cruzada às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac.
- A resistência está relacionada aos receptores de fosfatase alcalina (ALP) presentes no intestino do inseto e é um carácter hereditário.
- As toxinas Cry1AbMod e Cry1AcMod são candidatas a serem introduzidas em plantas para a nova geração de plantas Bt para controle de *S. frugiperda*.
- Os bioinseticidas à base de diferentes estirpes Bt disponíveis no mercado também são uma alternativa viável para controle desta praga.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, M. A. F.; MOUSSA, S.; TAYLOR, M. D.; ADANG, M. J. *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) cadherin fragments function as synergists for Cry1A and Cry1C *Bacillus thuringiensis* toxins against noctuid moths *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. *Pest Management Science*, v. 65, n. 10. p. 1097-1103. 2009.
- ADANG, M. J.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L., Diversity of *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxins and Mechanism of Action. *Insect Midgut and Insecticidal Proteins*, v. 47, n. p. 39-87. 2014.
- AGROFIT, Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: maio/2015.
- ANVISA, Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. 2012.
- ARANTES, O.; LERECLUS, D., Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene*, v. 108, n. 1. p. 115-119. 1991.
- ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 17. p. 12497-12503. 2010.
- ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. GÓMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 17. p. 12497-12503. 2010.
- ARMSTRONG, C.L.; PARKER, G.B.; PERSHING, J.C.; BROWN, S.M.; SANDERS, P.R.; DUNCAN, D.R.; STONE, T.; DEAN, D.A.; De BOER, D.L.; HART, J.; HOWE, A.R.; MORRISH, F.M.; PAJEAU, M.E.; PETERSEN, W.L.; REICH, B.J.; RODRIGUEZ, R.; SANTINO, C.G.; SATO, S.J.; SCHULER, W.; SIMS, S.R.; TEHLING, S.; TAROCHIONE, L.J.; FROMM, M.E. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Crop Science*, Madison, v.35, p.550- 557, 1995.
- ARONSON, A. I. B., W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiology Review*, v. 50, n. p. 1-24. 1986.
- ASA BIOTECNOLOGIA. Preguntas y respuestas sobre cultivos Bt y manejo de resistência de insectos. Programa MRI-ASA. 1º edición. Disponível em: <https://indd.adobe.com/view/publications/cabf3386-bc30-4dcb-8b4e-ab3cef19c858/dzxf/publication-web-resources/pdf/Q&A.pdf>. Acesso em 01.06.2016.
- BARROS, E. M. T., J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, Desenvolvimento e Reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em Diferentes Hospedeiros de Importância Econômica. *Neotropical Entomology*, v. 39, p. 996-1001. 2010.
- BAXTER, S. W.; BADENES-PÉREZ, F. R.; MORRISON, A.; VOGEL, H.; CRICKMORE, N.; KAIN, W.; WANG, P.; HECKEL, D. G.; JIGGINS, C. D.; BEGUN, D. Parallel Evolution of *Bacillus thuringiensis* Toxin Resistance in Lepidoptera. *Genetics*, v. 189, n. 2. p. 675-U814. 2011.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. p. 248-254. 1976.
- BERNARDI, O., BERNARDI, D., HORIKOSHI, R. J.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; FATORETTO, J.; MEDEIROS, F. C. L.; BURD, T.; OMOTO, C. Cross-Resistance between Cry1 Proteins in Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) May Affect the Durability of Current Pyramided Bt Maize Hybrids in Brazil. *Plos One*, v. 10, n. 10. p. 1-15. 2015.

- BETTIOL, W. Biopesticides use and research in Brazil. *Outlooks on Pest Management*. p. 280-283. 2011.
- BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, v. 49, n. 4. p. 423-435. 2007.
- BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ-GARAYA, C.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim Biophys Acta*, v. 1667, n. 1. p. 38-46. 2004.
- BRAVO, A., GÓMEZ, I., PORTA, H., GARCÍA-GÓMEZ, B. I., RODRIGUEZ-ALMAZAN, C., PARDO, L., & SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, v. 6, n. 1. p. 17-26. 2013.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., & SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 41, n. 7. p. 423-431. 2011.
- BRAVO, A. G., I; HELENA PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B.I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M., Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology*, v. 6, p. 17–26. 2012.
- BRAVO, A. M. D. C., D. L.; SÁNCHEZ, J.; CANTÓN, P. E.; MENDOZA, G.; GÓMEZ, I.; PACHECO, S.; GARCÍA-GÓMEZ, B. I.; ONOFRE, J.; OCELOTL, J.; SOBERÓN, M., Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins and their use in the control of insect pests *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)*, p. 858–873. 2015.
- BREWER, M.J.; ODVODY, G.N.; ANDERSON, D.J.; REMMERS, J.C. A comparison of bt transgene, hybrid background, water stress, and insect stress effects on corn leaf and ear injury and subsequent yield. *Environmental Entomology*, v. 43, n. 3. p. 828-839. 2014.
- BUNTIN, G. D.; LEE, R. D.; WILSON, D. M. Evaluation of yieldgard transgenic resistance for control of fall armyworm and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) on corn. *Florida Entomologist*, v. 84, p. 37-42. 2001.
- BURKNESS, E. C.; HUTCHISON, W.D.; BOLIN, P.C.; BARTELS, D.W.; WARNOCK, D.F.; DAVIS, D.W. Field efficacy of sweet corn hybrids expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin for management of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 94, n. 1. p. 197-203. 2001.
- CACCIA, S.; MOAR, W. J.; CHANDRASHEKHAR, J.; OPPERT, C.; ANILKUMAR, K. J.; JURAT-FUENTES, J. L.; FERRÉ, J. Association of Cry1Ac Toxin Resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with Increased Alkaline Phosphatase Levels in the Midgut Lumen. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 16. p. 5690-5698. 2012.
- CARRIERE, Y.; CROWDER, D. W.; TABASHNIK, B. E., Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. *Evolutionary Applications*, v. 3, n. 5-6. p. 561-573. 2010.
- CEPEA, PERSPECTIVAS PARA O AGRONEGÓCIO EM 2015. Disponível em : [http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea\\_Perspectivas%20Agroneg2015\\_relatorio.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/comunicacao/Cepea_Perspectivas%20Agroneg2015_relatorio.pdf). Acesso em maio de 2014.
- CHANG, C.; YU, Y. M.; DAI, S. M, LAW, S. K.; GILL, S. S. High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 3. p. 815-821. 1993.

- CONAB, Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 1, p. 106. 2015.
- CONAB. Companhia nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira Observatório Agrícola. Grãos - Safra 2015/16. Oitavo levantamento, Brasília, v. 8, p. 1-178. 2016a.
- CONAB, Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Acompanhamento da Safra Brasileira, v. 4, Safra 2015/16. p. 1-154. 2016b.
- CONAB, C. N. D. A., Perspectivas para a agropecuária / Companhia Nacional de Abastecimento. v. 1, n. 2318-3241. p. 1-154. 2013.
- CRESPO, A. L.; RODRIGO-SIMÓN, A.; SIQUEIRA, H. A. A.; PEREIRA, E. J. G.; FERRÉ, J.; SIEGFRIED, B. D. Cross-resistance and mechanism of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 107, n. 3. p. 185-192. 2011.
- CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M. AND ZEIGLER, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature". Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 10 de junho de 2014.
- CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M. AND ZEIGLER, D.R. "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature". Disponível em: <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 21 de abril de 2016.
- CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned CryIIA delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, v. 6, n. 11, p. 1533-7. 1992.
- CRICKMORE, N.; NICHOLLS, C.; EARP, D. J.; HODGMAN, T. C.; ELLAR, D. J. The construction of *Bacillus thuringiensis* strains expressing novel entomocidal delta-endotoxin combinations.. *Biochemical Journal*. v. 15, n. 270(1), p. 133-136. 1990.
- CRUZ, I. A cultura do milho. Manejo de Pragas da Cultura do Milho. Capítulo 12. p. 303-362. 2012.
- CRUZ, I. Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico. Brasília: EMBRAPA. v. 1, p. 192. 2008.
- CRUZ, I. W., J. M.; SANTOS, J. P.; VIANA, P. A.; SALGADO, L. O. , Pragas da cultura do milho em condições de campo: métodos de controle e manuseio de defensivos. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, (Circular técnica, 10). 1983.
- CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M. de L. C.; MATOSO, M. J. Controle biológico de *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos Trichogramma. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 40 p. 1999.
- CRUZ, J. C.; KONZEN, E. A.; PEREIRA FILHO, I. A.; DUARTE, J.O.; OLIVEIRA, M. F.; ALVARENGA, R. C. Produção de milho orgânico na agricultura familiar. Circular Técnica. 2006.
- CTNBIO, Resumo Geral de Plantas Geneticamente modificadas aprovadas para Comercialização. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. 2016.
- DE MAAGD, R. A., BAKKER, P., STAYKOV, N., DUKIANDJIEV, S., STIEKEMA, W., & BOSCH, D. Identification of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin Cry1C Domain III Amino Acid Residues Involved in Insect Specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4369–4374. 1999.

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

DOVRAT, D.; AHARONI, A. Bioengineering: Evolved to overcome Bt-toxin resistance. *Nature*, v. 533, p. 39-40. 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ações emergenciais propostas pela embrapa para o manejo integrado de *Helicoverpa* spp. em áreas agrícolas/2013. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/Manejo-Helicoverpa%20\(2\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Manejo-Helicoverpa%20(2).pdf). Acesso em 12.12.2013.

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

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

FERRÉ, J.; VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C., *Insecticidal Genetically Modified Crops and Insect Resistance Management (IRM)*. Springer Science. Business Media, Chapter 3, p. 41- 85. 2009.

FINNEY, D. J. *Probit analysis*. 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge. *Rechenbeispiele*, XV, 333 S., 41, 20 *Diagr.*, 8 *Tab.*, 231 *Lit.*, L 5.80. 1971.

FIUZA, L. M., *et al.*, Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera:Pyralidae): Evidence of shared binding sites *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 8. p. 3073-3073. 1996.

FRANKLIN, M. T., *et al.*, Modified *Bacillus thuringiensis* Toxins and a Hybrid *B. thuringiensis* Strain Counter Greenhouse-Selected Resistance in *Trichoplusia ni*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 17. p. 5739-5741. 2009.

FUNDAÇÃO MT. Boletim de Pesquisa de Algodão. Bolteim 4, Fundação MT (Mato Grosso de Apoio à pesquisa Agropecuária do Mato Grosso, Romdonopolis, Brazil. 2001.

GAHAN, L. J.; GOULD, F.; HECKEL, D. G., Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, v. 293, n. 5531. p. 857-860. 2001.

GALLO, D. N., O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. DE; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B. , *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ. p. 919. 2002.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. *Revista Ceres*, v. 61, Suplemento. p. 819-828. 2014.

GARCIA-GOMEZ, B. I.; SÁNCHEZ, J.; CASTRO, D. L. M.; IBARRA, J. E.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficient Production of *Bacillus thuringiensis* Cry1AMod Toxins under Regulation of cry3Aa Promoter and Single Cysteine Mutations in the Protoxin Region. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 22. p. 6969-6973. 2013.

GASSMANN, A. J.; CARRIERE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, v. 54, n. p. 147-163. 2009.

GASSMANN, A. J. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm: predictions from the laboratory and effects in the field. *Journal Invertebrate Pathology*, v. 110, n. 3, p. 287-293. 2012.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; CLIFTON, E. H.; DUNBAR M. W.; HOFFMAN, A. M.; INGBER, D. A.; KEWESHAN, R. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 14, p. 5141-5146. 2014.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, v. 28, n. 1, p. 169-173. 2007.

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

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, R.; ALMAGRO, J. C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 45, p. 34032-34039. 2006.

GÓMEZ, I.; FLORES, B.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod toxin counters tolerance associated with low cadherin expression but not that associated with low alkaline phosphatase expression in *Manduca sexta*. *Peptides*, v. 68, n. p. 130-133. 2014a.

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

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L. E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, v. 28, n. 1, p. 169-173. 2007.

GONZÁLEZ-CABRERA, J.; HERRERO, S.; SAYYED, A. H.; ESCRICHE, B.; LIU, Y. B.; MEYER, S. K.; FERRÉ, J. Variation in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Toxins among Unselected Strains of *Plutella xylostella*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4610-4613. 2001.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annual Review of Entomology*, v. 43, n. p. 701-726. 1998.

GRIFFITTS, J. S.; AROIAN, R. V. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, v. 27, p. 614-624. 2005.

GRIGOLLI, J. F. J.; LOURENÇÃO, A. L. F. Alta Infestação de lagartas na cultura do milho GM. *Resultados da Pesquisa, Fundação MS*, v. 2, p. 1-8. 2013.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis* In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. Chapter (Ed.). *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.41-64. 2000.

HARA, H., ATSUMI, S., YAOI, K., NAKANISHI, K., HIGURASHI, S., MIURA, N., TABUNOKI, H., SATO, R. A cadherin-like protein functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa and

Cry1Ac toxins on midgut epithelial cells of *Bombyx mori* larvae. FEBS Letters. v. 538, p. 29–34. 2003.

HECKEL, D. G.; GAHAN, L. J.; BAXTER, S. W.; ZHAO, J. Z.; SHELTON, A. M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B. E. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. Journal of Invertebrate Pathology, v. 95, n. 3. p. 192-197. 2007.

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

HERNÁNDEZ, S. C.; FERRE, J. Common Receptor for *Bacillus thuringiensis* Toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. Applied and Environmental Microbiology, v. 71, n. 9 p. 5627-9. 2005.

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

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P.; CERRILLO, G. N.; CACCIA, S.; DE MAAGD, R. A.; MOAR, W. J.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; HERRERO, S. Constitutive activation of the midgut response to *Bacillus thuringiensis* in Bt-Resistant *Spodoptera exigua*. Plos One, v. 5, n. 9. p. 2010.

IBARGUTXI, M. A.; ESTELA, A.; FERRÉ, J.; CABALLERO, P. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera : noctuidae). Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 1. p. 437-442. 2006.

INBIO. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA, INBIO, Ciancio, Asuncion, Paraguay, Available at: [http://www.inbio.org.py/cultivos\\_aplicaciones/eventos\\_aprobados](http://www.inbio.org.py/cultivos_aplicaciones/eventos_aprobados). Acesso em maio/2014.

JAKKAA, S. R. K.; GONGA, L.; HASLERB, J.; BANERJEE, R.; SHEETS, J. J.; NARVAB, K.; BLANCO, C. A.; FUENTES, J. L. Field-Evolved Mode 1 Resistance of the Fall Armyworm to Transgenic Cry1Fa-Expressing Corn Associated with Reduced Cry1Fa Toxin Binding and Midgut Alkaline Phosphatase Expression. Applied And Environmental Microbiology, v. 82, n. 4. p. 1023-1034. 2015.

JAKKA, S. R. K.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. Journal of Invertebrate Pathology, v. 122, p. 52–54. 2014.

JAKKA, S. R.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L., Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, v. 107, n. 1. p. 342-351. 2014.

JANMAAT, A. F.; MYERS, J. H.; Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in green house populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proceedings of the Royal Society of London. 270:2263–2270. 2003

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013. Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY., ISAAA Brief n. 46. 2013.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA): Ithaca, NY. ISAAA Brief n. 52. 2014.

JAMES, C. 2015. 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

JENKINS, J. N.; MCCARTY, J. C.; BUEHLER, R. E.; KISER, J.; WILLIAMS, C.; WOFFORD, T. Resistance of cotton with  $\delta$ -endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* on selected lepidopteran insects. *Agronomy Journal*, v. 89, n. p. 768-780. 1997.

JIMÉNEZ, A. I.; REYES, E. Z.; CANCINO-RODEZNO, A.; BEDOYA-PÉREZ, L. P.; CABALLERO-FLORES, G. G.; MURIEL-MILLAN, L. F.; SOBERÓN, M. *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 42, n. 9, p. 683–689. 2012.

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*, v. 43, n. 44. p. 14299-14305. 2004.

JURAT-FUENTES, J. L.; KARUMBIAIAH, L.; JAKKA, S. R. K.; NING, C.; LIU, C.; WU, K. Reduced Levels of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase Are Common to Lepidopteran Strains Resistant to Cry Toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Plos One*, v. 6, n. 3. p. 2011.

KRUGER, M.; RENSBURG, J. V.; BERG, J. V. D. Resistance to Bt maize in *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae) from Vaalharts, South Africa. *Environmental Entomology*, v. 40, p. 477–83. 2011.

LEITE, N. A.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; PEREIRA, E. J. G. O Milho GM no Brasil: a Situação e a Evolução da Resistência de Insetos. Embrapa Milho e Sorgo, Série documentos 133. p. 47. 2011.

LI, G.; REISIG, D.; MIAO, J.; GOULD, F.; HUANG, F.; FENG, H. Frequency of Cry1F Non-Recessive Resistance Alleles in North Carolina Field Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Plos one*. v. 11, n. 4, p. 1-14 e0154492. 2016.

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

LYNCH, R. E.; WISEMAN, B. R.; PLAISTED, D.; WARNICK, D. Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing CryIA(b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 92, n. 1. p. 246-252. 1999.

MACEDO, C. L.; MARTINS, E. S.; MACEDO, L. L. P.; SANTOS, A. C.; PRAÇA, L. B.; GÓIS, L. A. B.; MONNERAT, R. G. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* efficient strains against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 47, n. 12. p. 1759-1765. 2012.

MACGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, v. 229, n. p. 193-195 1985.

MAHON, R.J.; OLSEN, K. M.; GARSIA, K. A.; YOUNG, S. R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab in a strain of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Journal Economic Entomology*, v. 100, p. 894–902. 2007.

MAIA, A. H. N. Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxina Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análises de incertezas. Tese de doutorado. ESALQ/USP, v., n. p. 108. 2003.

MAPA. Plano Agrícola e Pecuário 2013 / 2014. p. 126. 2013.

MARTÍNEZ, W.; D., U.; J., C., Efeito tóxico de proteínas Cry1 de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, v. 29 n. p. 89-93. 2003.



MARTINS, E. Estudo da atividade de proteínas Cry, derivadas de *Bacillus thuringiensis* ativas para insetos-praga do algodoeiro. Tese de doutorado, UNB. p. 1-158. 2009.

MELO, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. *Bacillus thuringiensis*: mechanism of action, resistance, and new applications: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 36, n. 2. p. 317-326. 2014.

MICHELOTTO, M. D. F. E. L.; MARTINS, A.L.M.; DUARTE, A.P. Interação entre transgênicos (Bt) e inseticidas no controle de pragas-chave em híbridos de milho-safrinha. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 1. p. 71-79. 2011.

MONTESBRAVO, E. P. Control biológico de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en maíz. Disponível em: <<http://codagea.edoags.gob.mx/~produce/SPODOPTTE.htm>>. Acesso em: 26 abr. 2001.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA, L. B. SOARES, M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. *Plos One*, v. 10, n. 4. p. e0119544. 2015a.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M.D.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; RAUSELL, C.; CERÓN, J.; IBARRA, J.E.; DEL RINCON-CASTRO, M.C.; 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 and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 11, p. 7029-7035. 2006.

MONNERAT, R. G.; SANTOS, C. R.; LIMA, L. M.; PINHEIRO, M. P. N.; SILVA, C. R. C.; SOARES, C. M. Controle biológico de pragas e doenças. Algodão no cerrado do Brasil, v. 1, Capítulo 11, p. 409-444. 2015b.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência . *Controle Biológico*, eds. Melo, I.S. e Azevedo, J.L. Jaguariúna, SP, Embrapa Meio Ambiente, v. 3, p. 163-200. 2000.

MONNERAT R.G.; SILVA, S. F. S. W., J., Catálogo do Banco de germoplasma de bactérias entomo-patogênicas do gênero *Bacillus*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, v., n. p. 65. 2001.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; SILVAWERNERCK, J. O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control*, v. 41, n. 3. p. 291-295. 2007.

MONNERAT, R. G.; SANTOS, C. R.; LIMA, L. M.; PINHEIRO, M. P. N.; SILVA, C. R. C.; SOARES, C. M. Controle biológico de pragas e doenças. Algodão no cerrado do Brasil, v. 1, Capítulo 11, p. 409-444. 2015b.

MORAES, A. R. A. D.; LOURENÇÃO, A. L.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z., Resistência de híbridos de milho convencionais e isogênicos transgênicos a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bragantia*, v. 74, p. 50-57. 2015.

MUÑOZ-GARAY C1, PORTUGAL L, PARDO-LÓPEZ L, JIMÉNEZ-JUÁREZ N, ARENAS I, GÓMEZ I, SÁNCHEZ-LÓPEZ R, ARROYO R, HOLZENBURG A, SAVVA CG, SOBERÓN M, BRAVO A. Characterization of the mechanism of action of the genetically modified Cry1AbMod toxin that is active against Cry1Ab-resistant insects. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, v. 1788, n. 10. p. 2229-2237. 2009.

- NAIR, R.; KAMATH, S. P.; MOHAN, K. S.; HEAD, G.; SUMERFORD, D. V. Inheritance of field-relevant resistance to the *Bacillus thuringiensis* protein Cry1Ac in *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) collected from India. *Pest Management Science*, v. 72, n. 3. p. 558-565. 2016.
- OMOTO, C. BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R.; DOURADO, P.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. *Pest Management Science*. 2015.
- PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 47. p. 32750-32757. 2009.
- PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*. v. 6, n. 12. p. 3296-3325. 2014.
- PANDIAN, G. N.; ISHIKAWA, T.; TOGASHI, M.; SHITOMI, Y.; HAGINOYA, K.; YAMAMOTO, S.; NISHIUMI, T.; HORI, H. *Bombyx mori* midgut membrane protein P252, which binds to *Bacillus thuringiensis* Cry1A, is a chlorophyllide-binding protein, and the resulting complex has antimicrobial activity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 5. p. 1324-1331. 2008.
- PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A., *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *Fems Microbiology Reviews*, v. 37, n. 1. p. 3-22. 2013.
- PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A., *B. thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *Fems Microbiology Reviews*, v. 37, n. 1. p. 3-22. 2013.
- PELAEZ, V.; SILVA, L. R.; ARAÚJO, E. B., Regulation of pesticides: A comparative analysis. *Science and Public Policy*, v. 40, n. 5. p. 644-656. 2013.
- PÉREZ, C. J.; SHELTON, A. M. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. *Journal of Economic Entomology* 90 (1): 87-93. 1997
- PETZOLD-MAXWELL, J. L.; SIEGFRIED, B.D.; HELLMICH, R. L.; ABEL, C. A.; COATES, B.S.; SPENCER, T. A.; GASSMANN, A. J. Effect of Maize Lines on Larval Fitness Costs of Cry1F Resistance in the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 107, n. 2. p. 764-772. 2014.
- PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J., Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 71, n. 2. p. 255. 2007.
- PRAÇA, L. B.; MARTINS, E.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G, Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Díptera. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* v. 39, p. 11-16. 2004.
- PRAÇA, L. B.; MONNERAT, R. G.; SILVA NETO, S. P., *Spodoptera frugiperda* J. Smith 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) BIOLOGIA, AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE CONTROLE. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. p. 1-23. 2006.
- PRAÇA, L. B. Interações entre estirpes de *Bacillus thuringiensis* e híbridos de repolho visando o controle de *Plutella xylostella* e a promoção do crescimento vegetal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. TESE DE DOUTORADO. p. 141. 2012.

- RAJAGOPAL, R.; AGRAWAL, N.; SELVAPANDIYAN, A.; SIVAKUMAR, S.; AHMAD, S.; BHATNAGAR, R. K. Recombinantly expressed isozymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* midgut display differential interaction with closely related Cry proteins. *Biochemical. J.* 370, 971–978 2003.
- RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN, L. RUX C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N.; *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiology*, v. 18, p. 189–194. 2010.
- RAUSELL, C.; MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. C.; GARCÍA-ROBLES, I.; REAL, M. D. A binding site for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is lost during larval development in two forest pests. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 4. p. 1553-1558. 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. A. *Laboratory Manual. Molecular Cloning.* Third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- SANTOS-AMAYA, O. F.; RODRIGUES, J. V.; SOUZA, T. C.; TAVARES, C. S.; CAMPOS, S. O.; GUEDES, R. N.; PEREIRA E. J. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. *Scientific Reports*, v. 5, n. p. 18243. 2015.
- SÁ, V. G. M. D., FONSECA, B. V. C.; BOREGAS, K. G. B.; WAQUIL, J. M. Sobrevivência e desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. *Neotropical Entomology*, v. 38, n. p. 108-115. 2009.
- SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, v. 9, n. 3. p. 283-300. 2011.
- SCHMIDT, F, M. R.; BORGES M; CARVALHO R. Metodologia de criação de Insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. v., n. p. 35. 2001.
- 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* v. 62, n. 3. p. 775-806. 1998.
- SHARMA, P.; NAIN, V.; LAKHANPAULA, S.; P.A. KUMAR, P. A. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with brush border membrane vesicles of maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 106, n. 2. p. 333-335. 2011.
- SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; WANG, H.; SPENCER, T.; HARIDAS, C. V.; TENHUMBERG, B.; SUMERFORD, D. V.; STORER, N. P. Estimating the frequency of Cry1F resistance in field populations of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Pest Management Science*, v. 70, n. 5. p. 725-733. 2014.
- SINGH, A.; SIVAPRASAD, C. V. Functional interpretation of APN receptor from *M.sexta* using a molecular model. *Bioinformatics*, v. 3, n. 8. p. 321-325. 2009.
- SIQUEIRA, H. A. A.; GONZÁLEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; FLANNAGAN, R.; SIEGFRIED B. D. Analyses of Cry1Ab binding in resistant and susceptible strains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera : Crambidae). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 8. p. 5318-5324. 2006.
- SLAMTI, L.; PERCHAT, S.; HUILLET, E.; LERECLUS, D. Quorum Sensing in *Bacillus thuringiensis* Is Required for Completion of a Full Infectious Cycle in the Insect. *Toxins*, v. 6, n. 8. p. 2239-2255. 2014.
- SIVASUPRAMANIAM, S.; HEAD, G. P.; ENGLISH, L.; LI, Y. J.; VAUGHN, T. T. A global approach to resistance monitoring. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 95, n. 3. p. 224-226. 2007.

- SOARES, J. J.; VIEIRA, R. M. *Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1998.
- SOBERON, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; GOMEZ, I.; PORTA, H.; BRAVO, A. Pore Formation by Cry Toxins. *Proteins: Membrane Binding and Pore Formation*, v. 677, n. p. 127-142. 2010.
- SOBERON, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B. E.; BRAVO, A. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science*, v. 318, n. 5856. p. 1640-1642. 2007.
- SOBERÓN, M.; RODRIGUEZ-ALMAZÁN, C.; MUÑOZ-GARAY, C.; PARDO-LÓPEZ, L.; PORTA, H.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 194, n. p. 111 - 117. 2012.
- SOBERON, M. PARDO, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; SÁNCHEZ, J.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; BRAVO, A. Pore Formation by Cry Toxins. *Proteins: Membrane Binding and Pore Formation. Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 677, n. p. 127-142. 2010.
- STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *Journal of Economic Entomology*, v. 103, n. 4. p. 1031-1038. 2010.
- STORER, N. P.; KUBISZAK, M. E.; KING, J. E.; THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 110, n. 3. p. 294-300. 2012a.
- STORER, N. P.; THOMPSON, G. D.; HEAD, G. P. Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. *GM Crops Food*, v. 3, n. 3. p. 154-162. 2012b.
- TABASHNIK, B. E., CARRIERE, Y.; DENNEHY, T. J.; MORIN, S.; SISTERTSON, M. S.; ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M.; ZHAO, J. Z. Insect resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *Journal of Economic Entomology*, v. 96, n. 4. p. 1031-1038. 2003.
- TABASHNIK, B. E.; FABRICK, J. A.; UNNITHAN, G. C.; YELICH, A. J.; MASSON, L.; ZHANG, J.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins alone and in combinations against pink bollworm resistant to Cry1Ac and Cry2Ab. *Plos One*, v. 8, n. 11. p. e80496. 2013.
- TABASHNIK, B. E.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W.; HECKEL, D. G. Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIF in the *Diamondback Moth* (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 12. p. 4627-4629. 1994.
- TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 2. p. 199-202. 2008.
- TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIERE, Y., Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: Definition, Theory, and Data. *Journal of Economic Entomology*, v. 102, n. 6. p. 2011-2025. 2009.
- TABASHNIK, B. E.; WU, K. M.; WU, Y. D., Early detection of field-evolved resistance to Bt cotton in China: Cotton bollworm and pink bollworm. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 110, n. 3. p. 301-306. 2012.
- TABASHNIK, B. E.; ZHANG, M.; FABRICK, J. A.; WU, Y.; GAO, M.; HUANG, F.; WEI, J.; ZHANG, J.; YELICH, A.; UNNITHAN, G. C.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; CARRIERE, Y.; LI, X.

- Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Science Reports*, v. 5, p. 15107. 2015.
- TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANGASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L. J.; HECKEL, D. G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology*, v. 29, n. 12. p. 1128-1131. 2011.
- TABASHNIK, B. E.; VAN RENSBURG, J. B. J.; CARRIERE, Y., Field-Evolved Insect Resistance to Bt Crops: Definition, Theory, and Data. *Journal of Economic Entomology*, v. 102, n. 6. p. 2011-2025. 2009.
- TIEWSIRI, K.; WANG, P. Differential alteration of two aminopeptidases N associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in cabbage looper. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108 n. 34, p. 14037-42. 2011.
- UEPA. US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs Biopesticide Registration action document. *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn. p. 58. 2005.
- UPADHYAY, S. K.; SINGH, P. K. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnology Letters*, v. 33, n. 10, p. 2027-36. 2011.
- VALAITIS, A. P. Localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding molecules in gypsy moth larval gut sections using fluorescence microscopy. *Journal Invertebrate Pathology*. 2, 69–75 (2011).
- VALENT-BIOSCIENCES, Dipel. Libertyville, IL. Disponível em: [http://microbials.valentbiosciences.com/docs/ag-microbials-resources\\_library/dipel\\_brochureag-5376](http://microbials.valentbiosciences.com/docs/ag-microbials-resources_library/dipel_brochureag-5376). 2007.
- VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. Circular Técnica, v., n. p. 2008.
- VALICENTE, F. H. Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho. Comunicado Técnico - Embrapa, v. 208, n. p. 1-13. 2015.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 101, n. 1. p. 1-16. 2009.
- VELEZ, A. M.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; CRESPO, A. L. B.; SIEGFRIED, B. D. Fitness costs of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Applied Entomology*, v. 138, n. 5. p. 315-325. 2014.
- VELEZ, A. M.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; MOELLENBECK, D.; MEAGHER, R. L.; CHIRAKKAL, H.; SIEGFRIED, B. D. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bull Entomol Res*, v. 103, n. 6. p. 700-713. 2013.
- WALKER, D. R.; ALL, J. N.; MCPHERSON, R. M. Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, soybean looper, velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 93, n. 3. p. 613-622. 2000.
- WARD, E. S.; ELLAR, D. J. Assignment of the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis to a specific plasmid by curing analysis. *Febs Letters*, v. 158, n. 1, p. 45-49. 1983.
- WARD, E. S.; ELLAR, D. J.; TODD, J. A., Cloning and expression in *Escherichia coli* of the insecticidal delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis. *Febs Letters*, v. 175, n. 2. p. 377-382. 1984.

- WEI, J. Z.; ZHANG, M.; LIANG, G.; WU, K.; GUO, Y.; NI, X.; LI, X. APN1 is a functional receptor of Cry1Ac but not Cry2Ab in *Helicoverpa zea*. *Scientific Reports*, v. 6, n. p. 2016.
- WEISER, J.; KRIEG, A.; HUGER, A. M., Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. *Biologischen Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem Heft.*, v., n. *Mitteilungen aus der Berlin: Paul Parey.* p. 37-50. 1986.
- WOLFERSBERGER, M. G. L., P.; MAURER, P.; PARENTI, P.; SACCHI, V.F.; GIORDANA, B.; HANOZET, G.M. , Preparation and partial characterization of amino-acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 301-308. 1987.
- YE, G. Y.; SHU, Q. Y.; YAO, H. W. E. A. Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic cryAb gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *Journal of Economic Entomology*, v. 94, n. 1. p. 271-276. 2001.
- YI, D., YANG, W.; TANG, J.; WANG, L.; FANG, Z.; LIU, Y.; ZHUANG, M.; ZHANG, Y.; YANG, L. High resistance of transgenic cabbage plants with a synthetic cry1la8 gene from *Bacillus thuringiensis* against two lepidopteran species under field conditions. *Pest Management Science*, v. 72, n. 2. p. 315-321. 2016.
- XIAO, Y.; LIU, K.; ZHANG, D.; GONG, L.; HE, F.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A.; TABASHNIK, B. E.; WU, K. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Mediated by an ABC Transporter Mutation Increases Susceptibility to Toxins from Other Bacteria in an Invasive Insect. *Plos Pathogens*, v. 12, n. 2. p. e1005450. 2016.
- ZAGO, H. B.; SIQUEIRA H. Á.; PEREIRA, E. J.; PICANÇO, M. C.; BARROS, R. Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. *Pest Management Science*, v. 70, n. 3, p. 488-95. 2013.
- ZHANG, H.; YIN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, Y.; WU, S.; TABASHNIK, B. E.; WU, Y. Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. *Plos One*, v. 6, n. 8. p. e22874. 2011.
- ZHANG, X.; TIEWSIRI, K.; KAIN, W.; HUANG, L.; WANG, P. Resistance of *Trichoplusia ni* to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac is independent of alteration of the cadherin-like receptor for Cry toxins. *Plos One*, v. 7, n. 5, p. e35991. 2012.
- ZHANG, F.; SHU, C.; CRICKMORE, N.; LI, Y.; SONG, F.; LIU, C.; CHEN, Z.; ZHANG, J. Use of Redundant Exclusion PCR to identify a novel *Bacillus thuringiensis* Cry8 toxin gene from pooled genomic DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 2016.
- ZHANG, X. B., CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; TAUSSIG, R.; BULLA, L. A. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 26. p. 9897-9902. 2006.
- ZUNIGA-NAVARRETE, F.; GOMEZ, I.; PENA, G.; AMARO, I.; ORTIZ, E.; BECERRIL, B.; IBARRA, J. E.; BRAVO, A.; SOBERON, M. Identification of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin domain II loop 1 as the binding site of *Tenebrio molitor* cadherin repeat CR12. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , v. 59, n. p. 50-57. 2015.