UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às BBMV's de diferentes
ínstares de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Ariadne Costa Sanches

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Ciências, obtido no Programa de Pós-
Graduação em Entomologia

Ribeirão Preto - SP

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às BBMV's de diferentes
ínstares de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Ariadne Costa Sanches

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Ribeirão Preto - SP

2020

ARIADNE COSTA SANCHES

Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às BBMV's de diferentes ínstares de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk

Ribeirão Preto - SP

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo

Sanches, Ariadne Costa

Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às BBMV's de diferentes instares de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) / Ariadne Costa Sanches; orientador, Dr. Ricardo Antonio Polanczyk. – 2020.

62 f. + 5 CDs

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

CDs: 5 arquivos PDF

Versão Original

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. *Chrysodeixis includens*. 3. Competição homóloga. 4. "Ligand-Blotting".

I. Polanczyk Antonio, Ricardo, de orient. II. Título.

Nome: SANCHES, Ariadne Costa

Título: Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às BBMV's de diferentes ínstares de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a).: _____

Instituição: _____

Parecer: _____

Assinatura: _____

À minha mãe Joana Clea Costa Sanches, por ser meu exemplo de
coragem, determinação, força e luta.
Com toda minha gratidão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e por me dar forças para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais Joana e Marcos, que sempre acreditaram e torceram por mim.

Agradeço pelo apoio e incentivo. Amo vocês!

Ao meu namorado Bruno, pelo apoio, companheirismo e compreensão nas horas difíceis.

À Camila e Ana Rita pela paciência e disponibilidade em me ajudar na execução do trabalho mesmo não estando presentes.

Ao técnico de laboratório do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) Rodrigo, pelo convívio, ajuda e ensinamentos.

Aos meus companheiros do LGBBA Raquel, Maria Helena, Jardel, Rodrigo, Mariana e Higor que me receberam tão bem e fizeram desses dois anos os melhores possíveis. Vocês são incríveis!

À Tamires e Fabricio pela amizade, parceria, cumplicidade, por todos os momentos que passamos juntos e por toda a ajuda desde o início. Vocês são muito especiais!

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk pela orientação, ensinamentos e confiança no meu trabalho.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

SANCHES, Ariadne Costa. **Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às BBMVs de diferentes ínstares de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)** 2020. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração Entomologia) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Chrysodeixis includens é importante praga na cultura da soja, pois causa redução drástica da área foliar e, conseqüentemente grande redução da produtividade. Devido à intensa utilização de inseticidas químicos para o seu controle, populações frequentemente tem desenvolvido resistência. Desta forma, é necessário a utilização de outras formas de controle, como o controle microbiano com o uso da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) na forma de bioinseticida ou planta Bt. Dentre as toxinas ativas para lepidópteros praga, Cry1Ac se destaca com uma das mais promissoras. No entanto, há relatos de diferenças na suscetibilidade entre diferentes ínstares larvais da mesma espécie praga. Essa variação na suscetibilidade à toxina Cry1Ac pode estar relacionada a modificações nos receptores da toxina presentes nas BBMVs ("Brush Border Membrane Vesicles"), reduzindo a capacidade de ligação da toxina Cry ou a expressão destes receptores na membrana. Desta forma, os objetivos deste projeto foram avaliar a toxicidade da toxina Cry1Ac em diferentes ínstares de *Chrysodeixis includens* e correlacionar a suscetibilidade do inseto com a capacidade de ligação da toxina às suas BBMVs. A proteína Cry1Ac foi obtida a partir da expressão heteróloga em *Escherichia coli* e utilizada em bioensaios contra lagartas de 1º a 6º ínstar para estimar a CL₅₀. A Cry1Ac foi ativada com tripsina, purificada e marcada com biotina. As BBMVs foram preparadas a partir dos intestinos de 2º a 6º ínstar de *C. includens* para realizar os ensaios de competição e ligação. As lagartas de 6º ínstar foram 370 vezes menos suscetíveis que as lagartas de 1º ínstar. Houve maior competição pelos receptores nos ínstares tardios do que nos ínstares iniciais e diminuição da expressão dos receptores em ínstares tardios. Os resultados sugerem que a diminuição na suscetibilidade de *C. includens* à Cry1Ac pode estar relacionada com a quantidade dos receptores e a capacidade de ligação da proteína aos receptores.

Palavras-chave: Bacteria entomopatogenica, lagarta falsa medideira, competição homóloga, "Ligand-Blotting".

ABSTRACT

SANCHES, Ariadne Costa. **Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin to BBMVs from different instars of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae).** 2020. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração Entomologia) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Chrysodeixis includens is an important pest in soybean crop, as it causes drastic reduction of leaf area and, consequently, great reduction of yield. Due to the intense use of chemical insecticides for their control, populations have often developed resistance. Thus, it is necessary to use other forms of control, such as microbial control with the use of *Bacillus thuringiensis* (Bt) bacteria in the form of bioinsecticide or Bt plant. Among the active toxins for pest lepidopterans, Cry1Ac stands out as one of the most promising. However, there are reports of differences in susceptibility between different larval instars of the same pest species. This variation in Cry1Ac toxin susceptibility may be related to changes in toxin receptors present in the Brush Border Membrane Vesicles (BBMVs), reducing Cry toxin binding capacity or membrane receptor expression. Thus, the objectives of this project were to evaluate the toxicity of Cry1Ac toxin in different *Chrysodeixis includens* instars and to correlate insect susceptibility with toxin binding capacity to its BBMVs. Cry1Ac protein was obtained from heterologous expression in *Escherichia coli* and used in 1st to 6th instar caterpillar bioassays to estimate the LC₅₀. Cry1Ac was trypsin activated, purified and labeled with biotin. BBMVs were prepared from the 2nd to 6th instar intestines of *C. includens* to perform the competition and binding assays. 6th instar larvae were 370 times less susceptible than 1st instar larvae. There was greater competition for receptors in late instars than in early instars and decreased receptor expression in late instars. The results suggest that the decrease in *C. includens* susceptibility to Cry1Ac may be related to the amount of receptors and the protein binding capacity to receptors.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *Chrysodeixis includens*, homologous competition, "Ligand-Blotting".

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. <i>Chrysodeixis includens</i>	14
2.1.2. Aspectos morfológicos.....	14
2.1.3. Aspectos biológicos.....	15
2.1.4. Importância econômica.....	16
2.1.5. Métodos de controle de <i>Chrysodeixis includens</i>	17
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner.....	18
2.2. Proteínas Cry.....	19
2.3. Modo de ação das proteínas Cry.....	21
2.4. Interação dos receptores com a proteína Cry1A.....	24
2.5. Resistência dos insetos as toxinas Bt.....	26
2.6. Diferença de suscetibilidade entre instares de insetos da mesma espécie as toxinas Cry.....	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Determinação dos instares larvais.....	29
3.2. Expressão e extração de Cry1Ac.....	29
3.3. Bioensaios de toxicidade.....	30
3.4. Coleta de intestino e preparo de BBMV.....	31
3.5. Ativação, purificação e marcação de Cry1Ac.....	32
3.6. Ligand-Blotting.....	33
3.7. Competição homóloga de Cry1Ac.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Determinação dos instares larvais de <i>C. includens</i>	34
4.2. Expressão da proteína Cry1Ac em gel de SDS-PAGE.....	35
4.3. Bioensaios de suscetibilidade de <i>Chrysodeixis includens</i> para a proteína Cry1Ac.....	36
4.4. Purificação, ativação e marcação de Cry1Ac.....	38
4.5. Análise das competições homóloga de Cry1Ac.....	40
4.6. Análise dos receptores por “Ligand-blotting”.....	42
5. CONCLUSÕES.....	46
6. REFERÊNCIAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

Chrysodeixis includens (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta falsa medideira, é de ocorrência restrita ao Hemisfério Ocidental, desde o norte dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (ALFORD; HAMOND, 1982). No Brasil, essa espécie pode ser encontrada em todas as regiões produtoras de soja, desde o Rio Grande do Sul até Roraima (MARSARO JUNIOR et al., 2010). No Brasil são registradas 170 plantas hospedeiras de *C. includens*. No entanto, essa espécie tem preferência e melhor adaptação às plantas de soja (RIBEIRO, 2019).

As lagartas de *C. includens* danificam folhas que estão localizadas na metade inferior das plantas, o que dificulta o efetivo controle via aplicação de inseticidas, pois nas aplicações apenas uma fração do inseticida atinge a parte inferior das plantas (ANDRADE JUNIOR; VILELA, 2009). Até o terceiro ínstar, as lagartas raspam as folhas e selecionam folhas novas. Quando atingem o quarto ínstar as lagartas se alimentam de folhas mais velhas e mais fibrosas e conseguem perfurá-las. Essa praga consome uma grande área foliar, deixando, apenas, as nervuras centrais e laterais intactas, gerando um aspecto característico de folhas rendilhadas (BUENO et al., 2007; BERNARDI, 2012).

Uma característica preocupante em relação a essa praga é sua elevada tolerância a inseticidas químicos, bem como seu histórico de desenvolvimento de resistência a esses produtos (MASCARENHAS; BOETHEL, 2000). Os primeiros relatos de resistência de *C. includens* a piretroides foram descritos por Leonard et al. (1990), após anos de utilização destes produtos na Louisiana (FELLAND et al., 1990; LEONARD et al., 1990). No Brasil, surtos populacionais de lagarta falsa medideira se tornaram frequentes em 2002/03. Há relatos de baixa eficiência de inseticidas piretróides e de inibidores da biossíntese de quitina (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012; MARTINS; TOMQUELSKI, 2015). Um estudo desenvolvido em laboratório indicou baixa suscetibilidade de populações de *C. includens* à lambda-cialotrina, teflubenzuron e novaluron (STACKE et al., 2019). Desta forma, alternativas ao uso de produtos químicos vêm sendo exploradas para o manejo de *C. includens*. Dentre essas alternativas destaca-se

o potencial de microrganismos entomopatogênicos, como a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner.

B. thuringiensis tem sido utilizada em vários países no controle de lepidópteros e coleópteros pragas de importância econômica, seja na forma de bioinseticida ou plantas transgênicas expressando toxinas Cry ou Vip (ROSAS-GARCIA, 2009; SANAHUJA et al., 2011; SANCHIS, 2011). As toxinas desta bactéria têm efeitos letais e/ou subletais na fase jovem e/ou adulta de diversas ordens de insetos de importância agrícola: Coleoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera, Lepidoptera e Orthoptera (ABOUSSAID et al., 2010; BLANCO et al., 2010; BERGAMASCO et al., 2013; PANIZI, 2013; VAN FRANKENHUYZEN, 2013; ZHANG et al., 2013).

As toxinas Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea apresentaram maior toxicidade à *C. includens* em relação à Cry1Aa. As toxinas Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea foram de 1,5 a 3,5 vezes mais tóxicas, e Cry1Ab foi de 2 a 4,5 vezes mais tóxica do que Cry1Aa, sendo que Cry1Ac e Cry1Ca provocaram mortalidade próxima de 100% (CRIALES-LEGORI, et al., 2014). Estudos realizados com uma linhagem transgênica de soja expressando altos níveis de proteína a partir do gene *cry1Ac*, relataram mortalidade total em lagartas de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidæ) e redução significativa da população de *C. includens*, em ensaios de suscetibilidade e de alimentação realizados em laboratório e campo (WALKER et al., 2000; BERNARDI et al., 2012). A soja transgênica expressando a toxina Cry1Ac foi lançada na safra de 2013/14. Essa tecnologia foi rapidamente adotada pelos produtores devido ao controle das principais pragas da soja especialmente *C. includens*, *A. gemmatilis*, *Chloridea virescens* (Lepidoptera: Noctuidæ) e *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidæ) (DOURADO et al., 2016)

Em relação a susceptibilidade de diferentes ínstares de *C. includens*, Dutton; Romeis e Bigler et al. (2005) relataram menor mortalidade em lagartas nos últimos ínstares, pois nos primeiros ínstares as lagartas apresentam uma sensibilidade maior às toxinas em razão das alterações na atividade específica das proteases presentes no suco intestinal. Para *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidæ), Keller et al. (1996) demonstraram que o suco intestinal dos últimos ínstares deste lepidóptero tem alta atividade proteolítica, sendo capaz de degradar completamente a proteína Cry1C.

A diminuição da toxicidade com o aumento da idade larval pode estar relacionada a modificações na interação das toxinas Cry aos receptores de membrana presentes nas microvilosidades das células colunares do intestino médio (BBMV) ou na quantidade desses receptores na membrana. Essas alterações podem resultar na redução da capacidade de ligação das toxinas Cry a receptores específicos, e assim, causar alterações na permeabilidade das BBMs do intestino médio do inseto e a sua morte (JURAT-FUENTES et al., 2004a; BRAVO et al., 2007; ZHANG et al., 2009).

Quatro tipos de receptores proteicos estão envolvidos no complexo processo de ligação das proteínas Cry1 às BBMV de lepidópteros. Uma aminopeptidase-N (APN) e uma fosfatase alcalina (ALP), estando ambas ligadas à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma proteína do tipo caderina (CADR) e um glicoconjugado (GCR) de 270KDa (BRAVO et al., 2007; PIGOTT, ELLAR, 2007; SOBERÓN et al., 2009). O mecanismo mais comum de resistência de populações de insetos praga às toxinas Cry é a redução da ligação da toxina as BBMV, que em diferentes espécies de lepidópteros incluem mutações nos receptores da toxina como CADR, APN ou ALP (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; HERRERO et al., 2005; JURAT-FUENTES et al., 2004a; ZHANG et al., 2009).

Em *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera: Notodontidae) foi constatada uma diminuição da afinidade entre um dos dois receptores de Cry1Ab durante o desenvolvimento das lagartas, o que contribuiu com a redução na suscetibilidade para esta toxina com o aumento da idade das lagartas (RAUSELL, et al (2000). Um estudo realizado por Flores-Escobar et al. (2013) utilizando a técnica de “ligand blotting” nas BBMV de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) constatou que Cry1Aa e Cry1Ab se ligam preferencialmente a ALP durante os primeiros estádios, enquanto a ligação de APN foi observada após o terceiro estágio larval. Por outro lado, Cry1Ac se liga à APN em todo o desenvolvimento de *M. sexta* sem aparente ligação a ALP, o que sugere que Cry1Ac depende principalmente da interação com APN para exercer o seu papel tóxico nesta espécie, em contraste com Cry1Aa e Cry1Ab.

Pesquisas envolvendo a identificação das moléculas de ligação das proteínas Cry e seu mecanismo de ação *in vivo* ainda são escassas. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foi avaliar a toxicidade de Cry1Ac em

diferentes ínstares larvais de *C. includens* e correlacionar a susceptibilidade do inseto com a capacidade de ligação da toxina às suas BBMV's.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Chrysodeixis includens*

Chrysodeixis includens (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida popularmente como lagarta falsa medideira tem origem tropical e subtropical das Américas, com ocorrência desde o norte dos EUA até o sul da América do Sul (ALFORD; HAMOND, 1982). É uma espécie altamente polífaga, se alimentando de mais de 170 espécies de plantas pertencentes a 39 famílias, incluindo culturas de importância econômica mundial, como soja, algodão, feijão, tomate, girassol e fumo (RIBEIRO, 2019).

2.1.2. Aspectos morfológicos

Os ovos de *C. includens* são globulares, medindo cerca de 0,5 mm de diâmetro de coloração creme-clara logo após a oviposição e marrom-clara quando próximo à eclosão (Figura 1a). As lagartas são de coloração verde-clara com listras longitudinais brancas e pontuações pretas, atingindo de 40 a 45 mm de comprimento no último estágio larval (Figura 1b). Apresentam dois pares de pernas abdominais falsas, deslocando-se como se estivesse medindo palmo (SILVIE; BÉLOT; MICHEL, 2007). Depois do último ínstar, a lagarta se transforma em pupa, que ocorre sob uma teia, em geral na face abaxial das folhas (Figura 1c) (SOSA-GÓMEZ et al., 2010). A coloração da pupa é amarelo-pálida para verde-clara no início do desenvolvimento e adquirem cores mais escuras com o passar dos dias.

Os adultos são mariposas com 35 mm de envergadura de asas, dispostas em forma inclinada. As asas anteriores são de coloração escura, com duas manchas prateadas brilhantes na parte central do primeiro par de asas, e as asas posteriores são de coloração marrom (Figura 1d) (SOSA-GÓMEZ et al., 2010).

As fêmeas ovipositam em média 700 ovos isoladamente na face inferior das folhas e nos dois terços superiores do dossel das plantas (JOST; PITRE, 2002).

Figura 1: Fases do desenvolvimento de *C. includens*. A) Ovos. B) Fase larval. C) Pupa. D) Adulto. Fonte: Embrapa.

2.1.3. Aspectos biológicos

Do primeiro ao terceiro ínstar as lagartas selecionam as folhas novas, que possuem baixo teor de fibras, e posteriormente se tornam menos exigentes conforme o desenvolvimento, se alimentando de folhas mais velhas e fibrosas (BERNARDI, 2012). Elas são encontradas se alimentando do terço inferior das plantas e de folhas tenras de ramos secundários de soja e algodão (PAPA; CELOTO, 2007; SANTOS; BARBOSA, PEDROSA, 2010). Até o terceiro ínstar apenas raspam as folhas, mas, quando atingem o quarto ínstar conseguem perfurá-las, consumindo uma grande área foliar, deixando as nervuras centrais e laterais intactas, gerando um aspecto característico de folhas rendilhadas (BUENO et al., 2007), o que pode ser uma característica para distinguir das demais pragas desfolhadoras.

Um aspecto preocupante em relação a essa praga é sua elevada tolerância a inseticidas químicos, curto tempo de desenvolvimento, alta fecundidade e hábito de se localizar na parte inferior da planta, dificultando a ação dos inseticidas (MASCARENHAS; BOETHEL, 2000; RIBEIRO, 2019). Por isso é uma espécie de difícil controle pelos produtores e com alto potencial de desenvolvimento de resistência aos inseticidas químicos e biológicos existentes no mercado, quando comparada a outras espécies como a lagarta-da-soja (*A. gemmatilis*) (BUENO et al., 2012).

2.1.4. Importância econômica

A característica de polifagia da falsa medideira pode colaborar com a dinâmica populacional, uma vez que as lagartas podem apresentar desenvolvimento simultâneo em diferentes hospedeiros em uma região, podendo também, persistir no ambiente em uma densidade baixa até que a fêmea encontre um novo hospedeiro (BERNARDI, 2012). Apesar da gama de hospedeiros, esta espécie possui preferência e melhor adaptação à soja, sendo considerada a praga mais abundante desta cultura e responsável por danos econômicos tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva, afetando a mesma desde o plantio até a colheita ((BERNARDI, 2012; RIBEIRO, 2019).

No Brasil, *C. includens* foi considerada praga secundária na cultura da soja até a década de 1990, com baixo nível populacional e controlada por inimigos naturais (POLANCZYK; VAN FRANKENHUYZEN; PAULI, 2017). No entanto, a frequente aplicação de inseticidas químicos, a falta de monitoramento na lavoura e o uso de fungicidas para o controle da ferrugem asiática, contribuíram para a queda populacional dos inimigos naturais. Consequentemente houve o aumento populacional da praga, uma vez que era também era controlada naturalmente por doenças fúngicas, como a doença branca e a doença marrom (EMBRAPA, 2012). Com esse desequilíbrio, *C. includens* passou a ter mais destaque no manejo da cultura, deixando o status de praga secundária a praga-chave nas lavouras de soja (BUENO et al., 2011).

Em áreas de cultivo, os cuidados para controlar essa praga são tomados praticamente durante todo o período de desenvolvimento das plantas, devido à alta capacidade de consumo de área foliar, que pode chegar até 200 cm², e por

sua presença em altas níveis populacionais em praticamente todas as lavouras de soja das últimas safras. Além da desfolha, é comum se observar a campo vagens já formadas sendo atacadas por lagartas grandes, o que aumenta os danos causados pela praga (TOMQUELSKI et al., 2015).

2.1.5. Métodos de controle de *Chrysodeixis includens*

O controle biológico natural de *C. includens* é feito por inimigos naturais que estão presentes nas lavouras de soja, como, por exemplo, os predadores (percevejos, carabídeos, aranhas, tesourinhas e joaninhas), os parasitoides (*Copidosoma truncatellum* e *Trichogramma* spp.), doenças fúngicas como *Metarhizium rileyi* e viroses como Baculovírus (CZEPAK; ALBERNAZ, 2014).

Os primeiros relatos de resistência de *C. includens* a piretroides foram descritos por Leonard et al. (1990), após 7 a 8 anos de utilização destes produtos, na Louisiana, USA (FELLAND et al., 1990; LEONARD et al., 1990). Atualmente, há cerca de 62 produtos químicos registrados para o controle de *C. includens* na cultura da soja (RIBEIRO, 2019). A maioria desses inseticidas são de baixa seletividade e relativamente antigos, sendo eles pertencentes aos grupos químicos dos piretroides, organofosforados e carbamatos. Os inseticidas com registro mais recente pertencem às benzoilureias, espinosinas e diamidas (RIBEIRO, 2019).

Com o estabelecimento e propagação de *H. armigera* no Brasil e o aumento de *C. includens* em áreas de soja, houve um crescimento na comercialização de inseticidas à base de *B. thuringiensis* no mercado brasileiro de bioinseticidas. Na safra de 2013/2014 houve um aumento significativo do mercado de produtos para controle microbiano no Brasil. A aplicação de bioinseticidas a base de Bt atingiu mais de 4,5 milhões de litros/quilogramas, o que corresponde a uma área de aproximadamente 9 milhões de hectares. Estes números tornaram o Brasil o maior mercado mundial destes bioinseticidas (POLANCZYK; VAN FRANKENHUYZEN; PAULI, 2017). Sendo assim, é de grande interesse desenvolver alternativas a produtos químicos. Identificar o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o potencial bioinseticida de microrganismos capazes de promover o controle biológico dessas pragas, como a bactéria entomopatogênica Bt.

2.1. *Bacillus thuringiensis* Berliner

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) foi isolada em 1901 no Japão por Ishiwata como *Bacillus sotto*. Anos depois foi isolada novamente na Thuringia onde foi encontrada causando epizootia em larvas de *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (MILNER, 1994). Em 1915 foi descrita e isolada na Alemanha a partir da traça da farinha (*Ephestia kuehniella*) (Lepidoptera: Pyralidae) por Berliner. Em 1938 na França houve a comercialização do primeiro produto à base de *B. thuringiensis* chamado “Sporeine” (BRAR et al., 2006; CAPALBO; VILAS-BÔAS; ARANTES, 2004).

Essa bactéria pertence à família Bacillaceae e possui forma de bastonete com célula vegetativa de 1,0 a 1,2 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento. É gram-positiva, aeróbica não estrita com faixa de temperatura de crescimento entre 10 e 45°C. Ela está presente no solo, podendo ser encontrada em insetos em decomposição, grãos armazenados, teias de aranha e superfície de plantas (DE MAAGD et al., 2001).

Bt possui a habilidade de produzir e secretar proteínas que possuem atividade inseticida, como: α -exotoxinas, β -exotoxinas, δ -endotoxinas (proteínas Cry e Cyt), hemolisinas, exoenzimas, quitinases, fosfolipases e proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (HANSEN; SALAMITOU, 2000). As proteínas apresentam alta toxicidade para muitos insetos das ordens Lepidoptera (Bt *kurstaki* e Bt *aizawai*), Coleoptera (Bt *tenebrionis*) e Diptera (Bt *israelensis*) (Figura 2). Como também para outros grupos como Hymenoptera, Isoptera, Orthoptera e Nematoda (HABIB; ANDRADE, 1998; IBRAHIM et al., 2010).

Figura 2: Diferença entre os cristais tóxicos das subespécies de Bt. A) *Bt kurstaki*. B) *Bt aizawai*. C) *Bt israelenses*. D) *Bt tenebrionis*. Fonte: Valent BioSciences

2.2. Proteínas Cry

Em condições desfavoráveis para o crescimento bacteriano, ocorre a esporulação na qual a divisão celular é paralisada e são produzidas inclusões proteicas denominadas de cristais e constituídas de proteínas Cry ou δ -endotoxinas, sendo a produção desses cristais proteicos durante a esporulação uma característica típica dessa bactéria. Esses cristais são compostos por uma ou várias proteínas Cry que são acumuladas no compartimento da célula. Ao final da esporulação, o cristal proteico corresponde a cerca de 20 a 30% do peso seco da célula sendo liberado do momento da lise celular (ARANTES et al., 2002; GLARE; O'CALLAGHAN, 2000).

Tais proteínas são altamente tóxicas, específicas e inócuas para outros organismos vertebrados presentes na natureza e apresentam atividade entomopatogênica para várias espécies de insetos, como lepidópteros, dípteros, coleópteros, hemípteros e nematoides (PALMA et al., 2014). Por isso, essas proteínas são utilizadas para o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas e formulações inseticidas que são pulverizadas na lavoura visando ao controle de insetos-praga (HABIB; ANDRADE, 1998; VAN RIE, 2000).

Essas proteínas são codificadas pelos genes *cry* e recebem essa denominação por acumularem sua produção proteica na periferia do esporo, formando uma inclusão cristalina (YAMAMOTO; DEAN, 2000) e são classificadas de acordo com a homologia de suas sequências de aminoácidos (CRICKMORE 2017). Elas estão incluídas nas toxinas formadoras de poros que representam uma das maiores classes de toxinas bacterianas (BRAVO et al., 2011).

Entre as famílias de toxinas Cry, a mais estudada é a das toxinas 3D-Cry, que apresentam estrutura tridimensional (Figura 3). Essa estrutura é a forma ativa (funcional) da proteína que é composta por três domínios com funções e conformações diferentes. A toxicidade das proteínas está associada ao componente N-terminal, enquanto o componente C-terminal determina a formação da estrutura do cristal (LI et al., 1991). A parte N-terminal (domínio I), é responsável pela inserção da toxina na membrana alvo e, conseqüentemente, pela formação de poros. A parte C-terminal (domínios II e III) são responsáveis pela especificidade, pois estão relacionados com o reconhecimento dos receptores do intestino médio dos insetos alvo (DE MAAGD et al., 1996; SCHNEPF et al., 1998; HERRERO et al., 2004; SOBERON et al., 2010).

Figura 3: Representação da estrutura tridimensional da proteína Cry1Aa de *B. thuringiensis*. O domínio I (vermelho) é o domínio formador de poros e os domínios II e III (rosa e azul) são importantes para a interação da toxina com o receptor. Adaptado de Grochulski et al. (1995).

2.3. Modo de ação das proteínas Cry

O modo de ação das proteínas foi estudado principalmente em insetos da ordem Lepidoptera, Diptera e Coleoptera (BRAVO et al., 2007; ABOUSSAID et al., 2010; BRAVO et al., 2015). O primeiro passo da intoxicação dessa bactéria após a ingestão por um hospedeiro é a solubilização do cristal para que as protoxinas sejam liberadas, o que ocorre em pH alcalino (ANGUS, 1954; JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017). A protoxina é suscetível à clivagem proteolítica pelas enzimas digestivas presentes no intestino do hospedeiro resultando em toxina Cry ativa.

Toxinas Cry expressas em plantas Bt, com região C terminal clivada, não possuem a região N terminal clivada, portanto, não podem ser consideradas como forma totalmente ativa (JURAT-FUENTES; CRICKMORE, 2017). Após a ativação, a toxina ativa se liga aos receptores nas células do intestino médio e formam poros que matam a célula. Essa ruptura do intestino permite o acesso das bactérias à hemolinfa rica em nutrientes, elas proliferam e causa a morte do hospedeiro por septicemia (DE BORTOLI; JURAT-FUENTES, 2019).

Para explicar o modo de ação das toxinas são apresentados três modelos (BRAVO et al., 2015). O modelo de formação de poros que envolve a inserção da toxina Cry na membrana após a interação com apenas um único receptor através de uma ligação irreversível da toxina ativada (Figura 4). A proteína Cry é ativada pelas enzimas digestivas e se insere na membrana do intestino do inseto após ligação a um único receptor (aminopeptidase-N (APN), fosfatase alcalina (ALP) ou caderina). A ligação resulta na interação de moléculas monoméricas que formam poros causando a morte das lagartas (VACHON et al., 2012).

Figura 4: Modelo de formação de poros onde há ligação da proteína Cry a um único receptor. Fonte Soberón et al. (2007).

Outro modelo do modo de ação é o de formação de poros na membrana epitelial do intestino do inseto envolvendo a formação de pré-poros após a interação com diferentes receptores presentes nas células do intestino médio do inseto, não apenas um único receptor (Figura 5). Um desses receptores é a proteína caderina, que permite a oligomerização da toxina aumentando a afinidade para o segundo receptor, tanto pela APN quanto pela ALP, ambos são ancorados na membrana por um glicosilfosfatidilinositol (GPI). Assim, o oligômero se insere na camada lipídica para formar poros que vão afetar a permeabilidade das células e causar a morte das larvas por lise celular (BRAVO et al., 2004; PARDO-LÓPEZ et al., 2013; GÓMEZ et al., 2014; BRAVO et al., 2015).

Figura 5: Modelo de ligação sequencial onde há interação com mais de um receptor. Fonte: Soberón et al. (2007).

O modelo proposto por Zhang et al. (2006) descreve a transdução de sinal no qual a interação da toxina Cry com o receptor da caderina induzirá a ativação de uma via de transdução de sinal de morte intracelular (Figura 6). Essa ligação desencadeia uma via intracelular na qual uma proteína G é ativada após a toxina

Cry se ligar à caderina. Com isso, a proteína G ativa a adenilato ciclase (AC) o que resulta no aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que ativam a proteína quinase A (PKA), e esta induz a necrose da célula. A necrose celular se dá por uma série de alterações citológicas como formação de bolhas na membrana e inchaço celular. Esse modelo não envolve formação de oligômeros ou poros.

Figura 6: Modelo de transdução de sinal. Adaptado de Zhang et al. (2006).

As informações disponíveis atualmente ainda apoiam a teoria que as toxinas de Bt atuam formando poros. Entretanto, permanecem pouco compreendidos os mecanismos que levam a formação desses poros após a ligação das toxinas Cry ativadas aos seus receptores (VACHON et al., 2012).

Os três modelos descritos seguem o paradigma atualmente aceito, de que as protoxinas não se ligarão aos receptores presentes na membrana no intestino médio do inseto a não ser que sejam convertidas em toxinas ativas para exercer seus efeitos tóxicos. Porém, Tabashnik et al. (2015) desenvolveram experiências *in vitro* em *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae) que foram contrárias a esse paradigma. Nesse estudo, tanto a forma ativa como inativa de Cry1Ac se ligaram a fragmentos de caderina presentes na membrana epitelial do intestino do inseto, levando a possibilidade de que as protoxinas podem matar os insetos se ligando aos receptores do seu

intestino através de uma via tóxica, diferente da via primária que é iniciada por toxinas ativadas. Foi relatado que a protoxina geralmente era mais eficiente que a correspondente toxina ativada, além de apresentar uma menor resistência dos insetos quando não ativadas. Outro experimento *in vitro* também desenvolvido por eles com *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) mostraram que tanto a toxina ativa como a toxina inativa de Cry1Ab se ligaram ao mesmo receptor de caderina com uma afinidade levemente menor para a toxina inativa e ambas sofreram oligomerização e formação de poros (TABASHNIK et al., 2015).

Com base nos modelos acima, foi realizado experimentos com *M. sexta* e Cry1Ab e um novo modo de ação foi proposto, referido como “modelo duplo”. Neste modelo, ambas as formas da proteína, seja ativada ou protoxina, podem matar o inseto alvo exercendo seu efeito tóxico utilizando vias diferentes contrastando com o que eles se referem como “modelo clássico” em que as protoxinas estão inativadas (GÓMEZ et al., 2015).

2.4. Interação dos receptores com a proteína Cry1A

Trabalhos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação das proteínas Cry em diferentes grupos de insetos, já que vários aspectos da toxicidade dessas proteínas ainda não foram esclarecidos. Principalmente em relação aos receptores dessas toxinas e qual o papel dos mesmos na intoxicação dos insetos (CHAKROUN et al., 2017; MUSHTAQ; SHAKOORI; JURAT-FUENTES, 2018; SILVA et al., 2019). Porém, estudos que avaliam a diferença de toxicidade e receptores em diferentes ínstares larvais são escassos.

As caderinas constituem uma grande família de proteínas transmembrana que desempenham papéis fundamentais, tanto em vertebrados como invertebrados e em desenvolvimento, morfogênese, classificação e migração celular, entre outros (HULPIAU; VAN ROY, 2011). Lepidópteros, coleópteros e dípteros possuem caderinas filogeneticamente únicas que não se alinham bem com as caderinas de vertebrados, chamadas também de "proteína do tipo caderina", CADR e Cad (FABRICK; WU, 2015).

Essas proteínas são conhecidas pela alta ligação as toxinas Cry na forma monomérica e servem como importante receptor das mesmas (GÓMEZ et al.,

2003; BRAVO et al., 2004). Como no modelo de formação de poros onde ela facilita a remoção proteolítica da hélice α -1 do domínio I da toxina, promovendo a formação de estruturas oligoméricas de toxinas, conhecidas como pré-poros que irão se ligar aos receptores (APN e ALP) se inserindo na membrana e formando poros (PARDO-LÓPEZ et al., 2006; ATSUMI et al., 2008). No modelo de transdução de sinal onde é a caderina que induz a ativação de uma via intracelular que leva a morte da célula (ZHANG et al., 2006)

A família das aminopeptidases estão distribuídas em larga escala em organismos procariotos e eucariotos tendo um papel importante na degradação de proteínas durante a digestão, atuando na catalisação da clivagem de aminoácidos localizados na extremidade amino terminal dos peptídeos e proteínas (ANTONOV et al., 1984; PIGOTT; ELLAR, 2007).

As aminopeptidases N nos insetos foram os primeiros receptores do intestino médio identificados para as toxinas Cry, sendo uma família multigênica de proteínas ancoradas por GPI (KNIGHT et al., 1994; GILL et al., 1995; ADANG, 2013) e estão presentes em abundância nas BBMs do intestino (WANG; ZHANG, 2005). Sua função como receptor de Cry1Ac foi demonstrada em uma transformação de *Drosophila melanogaster* (Diptera; Drosophilidae) não suscetível a Cry1Ac, com um gene de APN de *Manduca sexta*. A *D. melanogaster* com o gene APN tornou-se suscetível a Cry1Ac, indicando o papel funcional do APN na toxicidade do *B. thuringiensis* (GILL; ELLAR, 2002).

Outro grupo de receptores considerado importante, mas que ainda é pouco estudo são as fosfatases alcalinas (ALP). São proteínas do tipo hidrolase, se encontram na maioria dos animais e nos insetos estão principalmente nas células do epitélio intestinal. Sua função não é totalmente conhecida mas foi identificada como uma proteína de ligação à toxina Cry no intestino médio de insetos pertencentes a três ordens diferentes de insetos, como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera com um papel importante na ação da toxina (ZÚÑIGA-NAVARRETE et al., 2013; JIN et al., 2015)

Sangadala et al. (1994), Knight et al. (1994) e McNall; Adang (2003), identificaram um ALP como receptor de Cry1Ac para *M. sexta* e demonstraram que ALP provavelmente está envolvida no modo de ação desta toxina. Foi demonstrado para *M. sexta* e *H. armigera* que a ALP que se liga à Cry1A é preferencialmente expressa em larvas de ínstares jovens que são mais

suscetíveis às toxinas Cry1A em comparação com larvas de ínstares tardios. Esta é uma informação importante, uma vez que as larvas de ínstares mais jovens são mais suscetíveis à ação das toxinas Cry, sustentando a ideia de que a ALP é importante no mecanismo de ação das toxinas Cry (ARENAS et al., 2010; NING et al., 2010).

2.5. Resistência dos insetos as toxinas Bt

A evolução da resistência às toxinas Bt é uma realidade das culturas transgênicas (AMARAL, et al., 2019; CARRIERE et al., 2019). O mecanismo mais comum de resistente envolve mudanças nos sítios de ligação presentes no intestino médio das lagartas que, provavelmente reduzem a ligação às toxinas Bt (FABRICK; WU, 2015).

A resistência às toxinas Bt em lepidópteros-praga está associada a alterações nas etapas do modo de ação da proteína (DE BORTOLI; JURAT-FUENTES, 2019). O primeiro registro de resistência foi descrito em laboratório para uma população da traça indiana *Plodia interpunctella* (Lepidoptera; Pyralidae) (McGAUGHEY, 1986). Essa resistência foi associada à redução da ligação da toxina Cry1Ab (VAN RIE et al., 1990).

A ligação da proteína Cry as caderinas presentes no intestino médio representam um passo importante na intoxicação por Bt para muitos insetos e mutações no gene da caderina pode resultar em resistência às toxinas Bt, como algumas já foram identificadas para Cry1Ab e Cry1Ac (GAHAN et al., 2001; YANG et al., 2007; ZHANG et al., 2012). Em *C. virescens* resistente ao Bt mantidas em laboratório foi constatada resistência associado à ruptura do gene da caderina pela inserção de um retrotransposon. Mutações semelhantes na caderina foram identificadas em *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera, gelechiidae) e *H. armigera* resistentes a Cry1Ac (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; XU et al., 2005).

Segundo Pardo-López et al. (2018), a resistência às toxinas Cry1A está associada a alterações na caderina, pois ela atua como receptor primário das toxinas Cry no intestino dos insetos. A resistência causada por mutações no gene da caderina é chamada de resistência “Tipo 1” por esses autores, sendo apresentada com maior frequência em diferentes espécies e em altos níveis a

pelo menos uma toxina Cry1A. Ela reduz a ligação de pelo menos uma toxina Cry1A às membranas dos insetos resistentes. Isso ocorre, pois, o gene da caderina codifica o receptor primário das toxinas Cry1A. Em insetos resistentes, este receptor é truncado ou ausente; portanto, a ligação das toxinas Cry às membranas é reduzida ou ausente.

Foi verificado que a formação de poros induzidas por Cry1 nas BBMVs de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) eram dependentes da atividade da APN (LORENCE et al., 1997). Em *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a Cry1C foi relatado que a expressão de um APN estava completamente ausente, podendo supor que a alteração dos APNs é um mecanismo de resistência à Bt em insetos (HERRERO et al., 2005). Rajagopal et al. (2002) silenciaram o gene APN em *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) e observaram que as lagartas se tornaram menos suscetíveis a Cry1Ca. Yang et al. (2010) silenciaram três isoformas de APN e observaram que as lagartas tiveram uma diminuição significativa na suscetibilidade à proteína Cry1Ab.

Portanto, a alteração dos APNs poderia ser potencialmente um mecanismo de resistência à Bt em insetos, pois análises *in vivo* tem demonstrado que o aumento da resistência as Cry1 estão associadas com a diminuição na expressão de APN ou mutações em seus genes (ZHANG et al., 2009)

Em relação aos outros receptores, os ALPs são os que se tem menos informações sobre sua participação na resistência de insetos as toxinas Bt. Os trabalhos referentes ao seu papel funcional são limitados. Em *C. virescens*, *H. armigera* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foi demonstrado uma correlação entre a baixa expressão de ALP com o desenvolvimento de resistência a toxinas Cry1 (JURAT-FUENTES et al., 2011). Níveis reduzidos de ALP no intestino médio foram associados à resistência a Cry1Ac em *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) (CACCIA et al., 2012) e em *S. frugiperda* resistente a Cry1F em campo (JAKKA et al., 2016). Em uma análise da atividade da ALP nas BBMVs de *T. ni* suscetíveis e resistentes a Cry1Ac e não observaram diferença significativa na quantidade de ALP entre as duas linhagens (TIEWSIRI; WANG, 2011)

2.6. Diferença de suscetibilidade entre instares de insetos da mesma espécie as toxinas Cry

Há muito tempo é estudado os efeitos causados pela idade de diferentes espécies de lepidópteros praga na suscetibilidade a *B. thuringiensis* e, na maioria dos casos, os instares iniciais foram mais suscetíveis do que os instares posteriores (McGAUGHEY, 1978; FAST; RÉGNIÉRE, 1984; HORNBY; GARDNER, 1987; LIU et al. 1995). Examinaram a suscetibilidade de diferentes instares de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) ao Dipel incorporado em dieta artificial e observaram que os instares tardios foram muito mais tolerantes ao Bt do que os instares iniciais, o que indica também que os instares tardios podem ser mais tolerante às toxinas Bt expressas em plantas transgênicas (HUANG; BUSCHMAN; HIGGINS, 1999).

Testes de suscetibilidade, sobrevivência e desenvolvimento foram realizados com primeiro, terceiro e quinto ínstar de *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) para Vip3A. As diferenças apresentadas entre os instares sugerem que o primeiro ínstar de *S. albicosta* talvez seja exposto a uma alta dose de Vip3A em condições de campo; entretanto, a expressão de Vip3A no milho pode não ser de alta dose contra os instares tardios, o que aumenta o risco de desenvolver resistência. (FARHAN; SMITH; SCHAAFSMA, 2019).

Bioensaios de toxicidade foram realizados com todos os instares de *H. armigera* para Cry1Ac e foi mostrada mudanças significativas de suscetibilidade dos diferentes instares a essa toxina (SILVA et al., 2018). Silva et al., 2018 também realizaram testes comparativos da degradação da Cry1Ac usando suco intestinal de instares iniciais e tardios. Os resultados mostraram que o suco intestinal de instares tardios foi mais eficiente para degradar a proteína do que os instares iniciais, sugerindo que o aumento da atividade proteolítica da toxina poderia ser uma das razões para a baixa toxicidade de Cry1Ac em instares tardios.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Determinação dos ínstaes larvais

Para determinar a duração e número de ínstaes larvais foi utilizada a metodologia proposta por Parra e Haddad (1989). Medições das cápsulas cefálicas de 20 lagartas do primeiro ínstar até a fase de pré-pupa de *C. includens* foram realizadas diariamente no mesmo horário em estereomicroscópio equipado com uma ocular micrométrica (Zeiss, Stemi 508). As lagartas usadas foram provenientes do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga (LCMAP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Jaboticabal-SP. Os insetos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotoperíodo de 12 h. A criação dos insetos foi realizada segundo a metodologia apresentada por Pinóia (2012) em dieta artificial descrita por Greene et al. (1976).

3.2. Expressão e extração de Cry1Ac

Os genes de *cry1Ac* (número de acesso AAA22331) estão presentes no vetor recombinante pB03 clonados em linhagens de *E. coli* XL-1 Blue e foram gentilmente fornecidos pelo Dr. Ruud de Maagd (Plant Research International, Wageningen, Holanda). As linhagens recombinantes foram mantidas a -80°C no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA).

A expressão das proteínas Cry1Ac foi realizada utilizando o protocolo descrito por Herrero et al. (2004). Para isso, foram inoculados 10 μL do clone em placa de Petri (90 x 15 mm) em meio de cultura Terrific Broth TB (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 2,31 g de KH_2PO_4 , 12,54 g de K_2HPO_4 , 4 mL de glicerol, 15 g/L de ágar, q.s.p. 1000 mL), glicose 2% (v/v) e ampicilina (100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), e incubada por 24 h a 37°C . Após o período de crescimento, uma colônia isolada foi coletada e transferida para um pré-inóculo em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 20 mL de meio TB, glicose 2% (v/v) e ampicilina (10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) e incubadas a 37°C , sob agitação constante de 200 rpm por 16 h. Após a agitação, 2,5 mL desse cultivo foi transferido para um inóculo

em Erlenmeyer com capacidade de 1 L em 250 mL de meio TB e ampicilina ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e incubado durante 60 h, a 28°C sob agitação constante de 200 rpm.

As células cultivadas foram coletadas por centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) durante 8 min a $5.930 \times g$. Para o início da lise celular foram adicionados 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM de EDTA e 100 mM de NaCl pH 8) para cada grama de “pellet” e submetido a agitação em aparelho tipo ‘vortex’. Em seguida, foi adicionado $800 \mu\text{g}$ de lisozima para cada grama de “pellet” e incubadas a temperatura ambiente por 20 min. Após, adicionou-se 4 mg de desoxicolato de sódio para cada grama de “pellet” e incubado por 10 min a 37°C . Logo após, adicionou-se $40 \mu\text{L}$ para cada grama de “pellet” de uma solução $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de DNase I seguida de incubação por 30 min a 37°C sob agitação.

O material foi centrifugado a $39.200 \times g$ por 10 min a 4°C (Beckman®, Maryland, Estados Unidos). Após a lise celular, o material foi lavado com tampão de lavagem (20 mM Tris/HCl pH 7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X 100), misturado por agitação em aparelho do tipo ‘vortex’ e centrifugado três vezes a $39.200 \times g$ por 10 min a 4°C . Uma solução de PBS (salina tamponada com fosfato - 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl) foi utilizada como passo final nesta etapa para lavagem, seguido de agitação em vortex e centrifugado três vezes a $39.200 \times g$ por 10 min a 4°C .

Para solubilização da proteína, foi adicionado 10 mL por grama de “pellet” de tampão de solubilização (50 mM NaHCO_3 , pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT) seguida de incubação por 2 h a 37°C a 200 rpm em posição horizontal. Depois foi realizada a centrifugação por 15 min a $39.200 \times g$ a 4°C . O sobrenadante contendo a protoxina solubilizada foi transferido para tubos de 2 mL e estocado a -20°C até sua utilização. A expressão das proteínas foi verificada em SDS-PAGE 12%, segundo Laemmli (1970). Foram quantificadas com o *software* ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Suécia).

3.3. Bioensaios de toxicidade

Para os bioensaios foram utilizadas lagartas de primeiro a sexto ínstar de *C. includens* provenientes do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes

Praga (LCMAP) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Jaboticabal-SP. Os bioensaios foram mantidos sob condições climáticas controladas: temperatura $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar 70%, $\pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 h.

As proteínas foram diluídas em seis concentrações em tampão de solubilização e aplicadas sobre dieta artificial previamente preparada segundo Greene (1976) e dispensadas em recipientes plásticos (2,5 cm Ø). Uma alíquota (75 µL) das seis concentrações da protoxina foi aplicada com micropipeta na superfície de dieta artificial, quando totalmente secas foi transferida uma lagarta de cada ínstar. No total foram utilizadas 48 lagartas distribuídas em três repetições por tratamento de acordo com Lemes (2016). A avaliação da mortalidade foi feita no sétimo dia após a aplicação. A CL_{50} foi estimada pela análise *Probit* (Finney, 1971), utilizando o *software* POLO-PC (software LeOra, Berkeley, CA).

3.4. Coleta de intestino e preparo de BBMV

Os intestinos médios de lagartas de segundo a sexto ínstar de *C. includens* foram dissecados com auxílio de pinças e tesouras, lavados em solução tampão MET gelado [250 mM Manitol, 17 mM Tris-HCl e 5 mM ácido etileno glicol-tetra-acético (EGTA), pH 7,5] e estocados a -80°C até o momento de preparo das vesículas (BBMVs) (HERNÁNDEZ et al., 2004). Não foram utilizadas lagartas de primeiro ínstar devido ao tamanho reduzido que impossibilitava a dissecação dos intestinos.

A preparação das vesículas seguiu o método de precipitação diferencial de magnésio descrito por Wolfersberger et al. (1987). Para isso, 1 g de intestino foi transferido para tubo falcon com 10 mL de tampão de homogeneização (300 mM de Manitol, 17 mM de Tris-HCl, 10 mM de Hepes, 5 mM de EGTA, 2 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 1 mM de PMSF, pH 7.4) e foram submetidas por 9 vezes a homogeneização com duração de 30 s de homogeneização e pausa de 30 s a 3000 rpm em um aparelho homogeneizador Turrax. Em seguida, foi adicionado 10 mL de solução gelada de MgCl_2 a 24 mM e a mistura foi incubada em gelo por 15 min. Passado o tempo de espera, as amostras foram centrifugadas a 2.500 xg por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi coletado e transferido para outro

tubo e centrifugado novamente a 30.000 xg por 1 h e 30 min a 4°C. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2,5 mL de tampão de homogeneização e 5 mL de MgCl₂ e incubados em gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 2.500 xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 20.000 xg por 40 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 500 µL de tampão de homogeneização. A concentração da BBMV foi determinada utilizando o reagente “Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit” (BRADFORD, 1976) usando soro albumina bovina (BSA) como padrão, em seguida armazenadas a -80 °C.

3.5. Ativação, purificação e marcação de Cry1Ac

Para ativação da proteína foi utilizada tripsina bovina em concentração final de 10% a 37°C por 2h, com agitação a 200 rpm e, em seguida, a enzima foi inativada por centrifugação a 17.000 xg, 4°C por 10 min.

A purificação foi feita em coluna HiTrap HP (Amersham) por troca iônica. Para purificação a coluna foi preparada adicionando 5 mL de tampão A (20 mM Tris pH 8,6), 5 mL de tampão B (tampão A e 1 M NaCl) e 5 mL de tampão A. Em seguida, adicionou-se 5 mL da proteína à coluna, 5 mL de tampão A e para a eluição da proteína adicionou-se 5 mL de tampão C (tampão A com 0,5 M NaCl) onde foram coletadas frações de 500 µL. Por fim, a coluna foi submetida às lavagens com 5 mL de tampão B, 5 mL de tampão A, 5 mL de água e 5 mL de etanol 20% para sua regeneração. As frações foram quantificadas por Bradford.

A marcação foi feita com biotina utilizando o “Kit ECL Biotinylation Module” (GE Healthcare) segundo instruções do fabricante. A reação constitui de 1 mg de proteína, 40 µL do reativo de biotinilação, 100 µL de tampão bicarbonato e o volume da solução foi completado para 2 mL de água, incubada por 2h sob leve agitação em temperatura ambiente. A coluna G-25 (P10 Desalting) (GE Healthcare) foi preparada para a eluição da proteína. Para tanto, a coluna foi lavada com 5 mL de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄) + 0,1% BSA e em seguida com 20 mL de PBS puro. Posteriormente o volume da reação foi aplicado na coluna. 5 mL de PBS puro foi aplicado na coluna e amostras de 500 µL foram coletadas em tubos de 1,5 mL.

Para a verificação das proteínas de interesse marcadas com biotina, alíquotas de 1,5 µL das frações coletadas foram aplicadas em membrana ECL (GE Healthcare) para análise por “Dot Blot”. A membrana foi submetida ao bloqueio com 10 mL de PBS-T (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 0,1% de Tween-20) acrescido de 3% de leite em pó, sob agitação suave durante 5 min. A membrana foi então, lavada por 3 vezes com PBS-T e, em seguida, foi incubada por 10 min sob agitação suave em uma solução contendo o conjugado estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina numa diluição de 1:2000 (HRP) (GE Healthcare), para ligação específica à biotina. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com PBST e a revelação foi feita com 10 mL da solução NBT/BCIP (Sigma) conforme instruções do fabricante. A reação foi interrompida com adição de água destilada.

3.6. Ligand-Blotting

Para a realização do Ligand-Blotting foi utilizado o método descrito por Abdelkefi-Mesrati et al. (2011). Foram separadas 20 µg das proteínas que compõem a BBMV de *C. includens* do segundo ao sexto ínstar por corrida eletroforética em gel de SDS-PAGE (9%). Após a corrida foi feita a transferência para uma a membrana “Amersham Hybond-P PVDF” (GE Healthcare) por um sistema de eletrotransferência (Biorad). Em seguida, a membrana foi submetida ao bloqueio de ligações inespecíficas com 10 mL de TBS-T (50 mM Tris-HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20) acrescido de 5% de leite em pó sob agitação suave por 1 h. A membrana foi lavada com TBS-T por 5 min e, em seguida, foi incubada por 2 h com 40 nM de Cry1Ac ativada e biotinilada diluída em TBS-T. A membrana foi então lavada novamente com TBS-T 3 vezes por 5 min em agitação suave. Posteriormente a membrana foi incubada por 1 h em uma solução contendo estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluída em TBS-T em diluição na proporção 1:2000 (v/v) para ligação específica à biotina. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBS-T e a revelação foi feita com 10 mL da solução “BCIP/NBT Liquid Substrat System” (Sigma-Aldrich), parando posteriormente a reação adicionando água destilada.

3.7. Competição homóloga de Cry1Ac

Os ensaios de competição homóloga foram realizados segundo Abdelkefi-Mesrati et al (2011) com modificações. Para tanto, as reações foram preparadas utilizando 100 ng da proteína ativada e marcada com biotina, excesso da proteína competidora (ativada e purificada e não marcada com biotina) na proporção de 100, 500 e 1000 vezes com 10 µg das proteínas que compõem as BBMV's do segundo ao sexto ínstar de *C. includens* e PBS para completar 200 µL. As reações foram incubadas por 1:30 h a 28°C a 120 rpm. Em seguida, o material foi centrifugado a 13000 rpm em microcentrífuga a 4°C por 10 min. O *pellet* foi ressuspensionado duas vezes em 500 µL de PBS e centrifugadas a 13000 rpm em microcentrífuga e recuperado em 20 µL de PBS e então visualizadas em gel SDS-PAGE (9%). Após o término da eletroforese, foram eletrotransferidas para uma membrana "Amersham Hybond-P PVDF" (GE Healthcare). A membrana foi submetida ao bloqueio de ligações inespecíficas com 10 mL de TBS-T acrescido de 5% de leite em pó sob agitação suave por 1 h. As proteínas biotiniladas que se ligaram as BBMV's foram detectadas estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluída em TBS-T (1:2000) mantidas em agitação suave por 1h. A membrana foi lavada três vezes com TBS-T e reveladas com 10 mL da solução "BCIP/NBT Liquid Substrat System" (Sigma-Aldrich), parando posteriormente a reação adicionando água destilada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação dos ínstares larvais de *C. includens*

Seis ínstares larvais foram determinados para *C. includens* (Tabela 1). Esse é um resultado de extrema importância para o início dos experimentos pois com essa informação foi determinada a idade correta das lagartas a serem utilizadas em bioensaios e na dissecação dos intestinos e para as avaliações relacionadas às BBMV's como o "Ligand Blotting" e os ensaios de competição.

Tabela 1: Determinação dos ínstaes larvais de *C. includens* através da cápsula cefálica.

Ínstar	CC $\pm$ IC 95% ¹	n ²
1 ^o	0,086 $\pm$ 0,00981	20
2 ^o	1,299 $\pm$ 0,04464	20
3 ^o	2,294 $\pm$ 0,08060	20
4 ^o	3,609 $\pm$ 0,08523	20
5 ^o	5,061 $\pm$ 0,16948	20
6 ^o	6,395 $\pm$ 0,11104	20

¹Média da largura da cápsula cefálica (CC) (mm) e $\pm$ intervalo de confiança de 95%;

²Número de larvas (n).

Esse aspecto é ressaltado por DALY, 1985 e AMBROGI et al., 2016 que afirmaram que com a determinação da distribuição dos ínstaes é possível identificar a idade larval ao realizar pesquisas ecológicas, biológicas e comportamentais em insetos. Além de fornecer bases que podem ser básicas para o desenvolvimento de estratégias eficazes no manejo de pragas.

A distribuição de frequência da largura da cápsula cefálica tem sido comumente usada para identificar e estimar o número de ínstaes larvais (WEITZNER; WHALON, 1987; CALVO; MOLINA, 2008; CASTAÑEDA-VILDÓZOLA et al., 2016; AMBROGI et al., 2016). O aumento dos ínstaes ocorre em progressão geométrica em uma taxa constante (BORROR et al. 1989). Sendo assim, o número de ínstaes larvais é correspondente a quantidade de picos apresentada pelos grupos homogêneos em uma distribuição multimodal da largura da cápsula cefálica, durante o desenvolvimento pós-embrionário (PARRA; HADDAD, 1989; CALVO; MOLINA, 2008).

4.2. Expressão da proteína Cry1Ac em gel de SDS-PAGE

A confirmação de que a proteína Cry1Ac foi expressa se deu por visualização em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), que possibilitou a visualização da banda de expressão da proteína, com tamanho entre 130 e 135kDa (Figura 7). Este perfil de expressão proteica corrobora com o apresentado na literatura que diz que a massa molecular de 130 a 135 kDa diz respeito às proteínas Cry1 (LIGHTWOOD et al., 2000, BRAVO et al., 2007).

Figura 7: 1- Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2- Cry1Ac.

4.3. Bioensaios de suscetibilidade de *Chrysodeixis includens* para a proteína Cry1Ac

No presente trabalho foi testada a toxicidade da proteína Cry1Ac em lagartas de primeiro até sexto ínstar. Se obteve as concentrações letais médias capazes de matar 50% dos insetos (CL₅₀) por meio de bioensaios, uma importante estratégia para testar a eficiência inseticida das toxinas (Tabela 2).

Tabela 2: Estimativa da concentração letal (CL₅₀) de Cry1Ac para os ínstares larvais de *Chrysodeixis includens*.

Ínstar	CL ₅₀ (IC min-max) ¹	<i>b</i> ± SE ²	X ³
1 ^o	18,71 (15,35-22,72)	2,096±0,208	1,35
2 ^o	166,90 (120,12-253,64)	1,098±0,161	3,71
3 ^o	1836,76 (1168,11-2933,96)	1,699±0,184	7,12
4 ^o	2696,04 (1705,91-3506,98)	1,143±0,161	4,04
5 ^o	5921,98 (4162,61-8837,91)	0,999±0,157	1,51
6 ^o	6975,98 (5090,32-9770,93)	1,139±0,161	2,18

Os valores representam 48 lagartas, que é a média de três replicatas de 16 lagartas cada;

¹ Valores expressos em ng/cm² com intervalo de confiança (IC 95%);

² Coeficiente angular da reta e Erro padrão;

³ Qui-quadrado (P < 0,05).

A CL_{50} aumentou 9 vezes do primeiro ínstar (18,71 ng.cm⁻²) para o segundo (166,90 ng.cm⁻²) e 11 vezes de o segundo para o terceiro ínstar (1836,76 ng.cm⁻²). Houve uma sobreposição dos intervalos de confiança (IC) entre o terceiro (1836,76 ng.cm⁻²) e quarto ínstar (2696,04 ng.cm⁻²), sem diferença significativa entre as concentrações. Do quarto (2696,04 ng.cm⁻²) para o quinto ínstar (5921,98 ng.cm⁻²) houve um aumento de mais de 2 vezes na concentração. Do quinto para o sexto ínstar (6975,98 ng.cm⁻²) não houve diferença estatística em razão da sobreposição de intervalos.

Estes resultados demonstram mudanças significativas na susceptibilidade entre os diferentes ínstares de *C. includens* à Cry1Ac, sendo que as lagartas de sexto ínstar foram 370 vezes menos suscetíveis a toxina que as lagartas de primeiro ínstar, número extremamente significativo. Este fator de redução da susceptibilidade à ação da proteína Cry1Ac em lagartas de ínstares tardios tem sido demonstrada em outros trabalhos (UPADHYAY; SINGH, 2011; LI; BOUWER, 2012; SILVA et al., 2018).

Os danos ocasionados pela falsa-medideira se tornam maiores quando atingem o quarto ínstar. Ficam mais agressivas e conseguem perfurar e consumir grande área foliar (82 a 207 cm²), sendo que os três últimos ínstares são responsáveis por cerca de 97% do consumo total (REID; GREENE, 1973; KOGAN; COPE, 1974; BUENO, 2007). Sendo comum se observar a campo o ataque de lagartas, geralmente grandes, em vagens já formadas de soja, potencializando os danos causados pela praga (MARTINS; TOMQUELSKI, 2015). Os dados do presente estudo demonstram uma redução acentuada na suscetibilidade a Cry1Ac a partir do quarto ínstar, o que reforça a necessidade de aliar o monitoramento das pragas com o uso do controle microbiano. Os presentes dados corroboram com as afirmações de Glare et al., (2012) e Lacey et al. (2015) que enfatizaram a maior suscetibilidade dos primeiros ínstares larvais a esses agentes de controle.

Dentro de um contexto envolvendo plantas transgênicas que expressam proteínas Bt, o manejo mais recomendado é a “alta-dose” associado ao refúgio. “Alta-dose” é uma estratégia baseada em plantas transgênicas que expressam quantidades muito altas de toxina, que são capazes de atingir todos os insetos heterozigotos da área, partindo do pressuposto que a resistência é recessiva

(CARNEIRO et al., 2009). O refúgio são áreas de plantas não transgênicas com função de produzir insetos suscetíveis que migram e acasalam com possíveis insetos resistentes presentes na área Bt, com isso produzam mais insetos susceptíveis (MATTEN et al. 2008; TABASHNIK et al., 2009; JIN, 2015; SILVA, 2017). Porém, devido a diferença na suscetibilidade entre os ínstaes, o conceito de “alta-dose” deve levar em consideração a idade do inseto, pois estratégias válidas para os ínstaes iniciais podem não funcionar em ínstaes tardios (HUANG et al., 1999). Os dados apresentados corroboram com essa informação e comprovam a importância do manejo de resistência para retardar a evolução de insetos resistentes no campo.

4.4. Purificação, ativação e marcação de Cry1Ac

A ativação da Cry1Ac foi verificada por gel de SDS-PAGE 12% e, posteriormente purificada. A ativação da Cry1Ac corrobora com Bravo et al. (2007) onde foi relatado que no momento em que os cristais proteicos são solubilizados e clivados por proteases, esses perdem metade da porção C-terminal e N-terminal, gerando um fragmento ativo de aproximadamente 65 kDa (Figura 8).

A ativação da proteína Cry é um passo essencial para a determinação da sua toxicidade *in vitro*. Esse procedimento reproduz o evento *in vivo* de proteólise da protoxina em toxina que ocorre no lúmen do intestino médio das lagartas. O processo de proteólise é fundamental para a atividade das proteínas Cry e Vip pois são incapazes de se ligarem aos receptores presentes no intestino médio dos insetos-praga se não estiverem ativadas, passo essencial para a toxicidade (CANDAS et al., 2002; MARUCCI, 2015).

Figura 8: Produção, ativação e purificação da proteína Cry1Ac. 1 – Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2 – Produção da proteína Cry1Ac; 3 – Ativação da proteína Cry1Ac; 4 – Purificação da proteína Cry1Ac ativada.

Para detecção da marcação foi utilizada a análise por “Dot Blot” (Figura 9), técnica que permite a visualização das frações mais fortemente marcadas com a biotina. As melhores frações foram selecionadas para a realização das etapas posteriores nos ensaios de união com BBMV de *C. includens*.

Figura 9: Análise por “Dot Blot” das frações da proteína Cry1Ac biotiniladas.

4.5. Análise das competições homóloga de Cry1Ac

Para realizar os ensaios de competição a proteína ativada e biotinilada foi incubada com as BBMV de *C. includens* de segundo a sexto ínstar de juntamente com diferentes concentrações da mesma proteína ativada, porém não marcada com biotina (competidora). Nesse ensaio, o aparecimento de banda indica que a proteína marcada conseguiu se ligar aos receptores da BBMV, ou seja, não houve competição. Enquanto que, a ausência de banda indica que a proteína marcada não conseguiu se ligar, isto é, houve competição visto que a proteína não marcada se ligou aos receptores impedindo a ligação da proteína marcada.

O ensaio de competição homóloga comprovou a ligação específica da toxina aos receptores, pois houve redução na ligação das proteínas marcadas a qual foi evidenciada pela redução na intensidade da banda (Figura 10). Isso ocorreu devido ao fato de que os receptores são imediatamente ocupados pelas proteínas não marcadas que estão em excesso, impedindo a ligação da proteína marcada, a qual é eliminada pelas lavagens (MARUCCI, 2015).

Figura 10: Competição homóloga com Cry1Ac marcada com biotina, excesso da mesma proteína competidora não marcado e com 10 ug de BBMV de *C. includens*.

Segundo Chakroun e Ferré (2014), a redução na ligação da proteína marcada incubada com proteína não marcada em excesso é a confirmação de

que há um número limitado de receptores. Esses receptores podem ser saturados conforme adiciona-se um excesso de proteína não marcada. Com base nessa informação, os resultados apresentados no presente trabalho, indicam que existe um número alto de receptores ou uma baixa especificidade para Cry1Ac presentes nas BBMV's de *C. includens* de segundo ínstar. Devido a necessidade de uma concentração muito alta de proteína homóloga não marcada (1000x) para saturar os sítios de ligação e reduzir a ligação da proteína marcada (CHAKROUN; FERRÉ, 2014).

No terceiro ínstar, a redução na ligação da proteína marcada no excesso de 1000x foi maior comparado ao segundo ínstar, observada pela redução mais evidente na intensidade da banda. O quarto, quinto e sexto ínstar apresentaram redução na intensidade da banda a partir do excesso de 500x da proteína competidora não marcada. Podendo, assim, inferir que a quantidade de receptores está diminuindo nos ínstaes tardios, justificando o aumento da competição.

Resultados semelhantes foram apresentados por Figueiredo (2017), com Cry1Ac e Cry1Ab para *A. gemmatilis* que também apresentou redução da banda na concentração de 1000x da proteína competidora e para *C. includens* apresentou competição a partir da concentração de 200x da proteína competidora, indicando uma maior especificidade. Lemes et al. (2017) observaram competição de Cry1Ac pelos receptores na concentração de 1000x de proteína competidora para *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) e competição a partir de excesso de 50x da proteína competidora para *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae) demonstrando uma alta especificidade para esta espécie.

Foi proposto um modelo matemático que poderia explicar a diminuição da suscetibilidade, considerando o aumento do intestino médio com aumento simultâneo do volume do lúmen e aumento dos receptores, com a conclusão de que é necessária uma relação crítica entre proteína-receptor para uma atividade inseticida ideal (GRIKO et al., 2008). Porém, esse modelo pode ser questionado, pois na maioria dos casos, baixas toxicidades têm relação com a diminuição dos locais de ligação aos receptores no intestino médio do inseto (JURAT-FUENTES et al., 2004b; HERRERO et al., 2005; ZHANG et al., 2009). O presente trabalho corrobora com essas informações pois houve mais competição pelos receptores

presentes nas BBMV's do sexto ínstar do que no segundo ínstar. Podendo inferir que a quantidade de receptores diminui nos ínstaes mais tardios, por essa razão, há mais competição.

É sabido que o mecanismo mais comum de resistência de insetos ao Bt é a ligação reduzida das toxinas aos locais-alvo presentes nas células do intestino médio (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Esse pode ser um fator de resistência e uma explicação para *C. includens* ser menos suscetíveis a toxina nos ínstaes tardios, por apresentarem uma menor quantidade de receptores. Demonstra, também, que apenas a ligação da toxina aos receptores não é o suficiente para conferir toxicidade da Cry1ac, pois nos últimos ínstaes foi onde teve mais ligação com menor toxicidade. O mesmo fato foi relatado em ensaios com Vip3Ad onde apesar desta toxina não ter apresentado toxicidade para *S. frugiperda* houve a ligação aos receptores (CHAKROUN; FERRÉ, 2014), e com Vip3Aa que não apresentou toxicidade para *C. virescens* mas também se ligou aos receptores (MARUCCI et al., 2015).

4.6. Análise dos receptores por “Ligand-blotting”

O “ligand-blotting” foi realizado com BBMV's de *C. includens* de 2º a 6º ínstar. Os ensaios para identificação dos receptores são de extrema importância devido a interação das proteínas com os receptores presentes no intestino médio dos insetos, primeiro passo para toxicidade. É uma forma de investigar o modo de ação da toxina e os mecanismos moleculares da resistência dos insetos às mesmas. O método tem sido utilizado em vários estudos de detecção de receptores de membrana presentes em insetos alvos (XU; YU, 2008; YAMAGUCHI, 2010; CHAKROUN et al., 2017; ONOFRE et al., 2017).

Foram identificadas várias proteínas de ligação à toxina Cry1 em lepidópteros, contudo, nem todas essas proteínas de ligação funcionam como receptores reais envolvidos na intoxicação (XU; YU, 2008). A técnica “ligand blotting” abordada neste trabalho não permite isoladamente a identificação dos receptores para as proteínas Cry, mas aponta um perfil de ligação às proteínas presentes na BBMV. Esse perfil pode indicar as proteínas a serem identificadas devido a sua presença ou ausência em uma dada amostra.

A análise permitiu demonstrar a união da proteína Cry1Ac a receptores putativos em diferentes ínstaes de *C. includens*, onde foram detectadas bandas com tamanho de aproximadamente 110 kDa, 42 kDa no segundo ínstar. No terceiro, quarto e quinto ínstar houve bandas de aproximadamente 110 kDa, 62 kDa e 42 kDa. No sexto ínstar foi evidenciada apenas uma banda de aproximadamente 42 kDa (Figura 11).

Figura 11: Detecção de receptores putativos para Cry1Ac em BBMV de *C. includens* de 2º (A), 3º (B), 4º (C), 5º (D) e 6º (E) ínstar.

Dentre as proteínas presentes nas BBMVs de lepidópteros que interagem com as proteínas Cry estão a Actina (42-47 kDa), classe aminopeptidase-N (APN) (100-170 kDa), classe fosfatase alcalina (ALP) (62-68 kDa), Subunidades V-ATPase (50 kDa), e caderina (210 kDa) (LUO et al., 1997; SANGADALA et al., 2001; JURAT- FUENTES et al., 2004b; JURAT- FUENTES; ADANG, 2006;

ZHOU et al., 2016). Portanto, os receptores putativos encontrados para Cry1Ac podem constituir em APN, ALP e Actina.

Uma proteína de 120 kDa que se liga à Cry1Ac em *H. armigera* foi isolada e proposta como uma aminopeptidase-N (APN), baseado em sua atividade semelhante a uma APN e em sua sequência N-terminal (INGLE et al., 2001). Dois APNs (haapn1 e haapn2) de *H. armigera* foram expressos de forma recombinante. Mostraram que Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac podem se ligar ao HaAPN1 (111 kDa), enquanto apenas Cry1Ac se liga ao HaAPN2 (113 kDa) (RAJAGOPAL et al., 2003). Em *M. sexta*, Cry1Ac interagiu com dois APNs, um de 120 kDa e um de 115 kDa (KNIGHT et al., 1994; SANGADALA et al., 2001). Masson et al. (1995) também determinaram um APN de 115 kDa para *M. sexta*. Com base nesses resultados, sugere-se que a banda de 110 kDa corresponda a classe APN.

Uma fosfatase alcalina (ALP) de aproximadamente 72 kDa foi identificada pela primeira vez como um receptor para Cry1Ac em *C. virescens* (ENGLISH; READDY, 1989). Dois receptores de ALP de 68 e 65 kDa também foram detectados em *C. virescens* (SANGADALA et al., 1994) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (JURAT-FUENTES et al., 2004b) e Cry1Ac com três ALPs de 80, 65 e 62 kDa (McNALL; ADANG, 2003; CHAKROUN et al., 2017). Portanto, sugere-se que a banda de 62 kDa corresponda a classe ALP.

Em um estudo realizado com citoesqueleto de *M. sexta*, foram identificadas manchas de 43 kDa através de imunoprecipitação utilizando um anticorpo de actina, (BONFANTI et al., 1992). A actina também foi identificada através de espectrometria de massas como uma proteína de ligação para Cry1Ac em *M. sexta* com aproximadamente 42 kDa (McNALL; ADANG, 2003). O que sugere que a banda de 42 kDa apresentada no presente trabalho possa ser uma actina. As BBMV's utilizadas nos ensaios contêm uma quantidade bem baixa de "contaminantes" como mitocôndrias, microssomas, membranas basolaterais e elementos citoesqueléticos (CAPELLA et al., 1997). Provavelmente a actina não sirva como um receptor para as toxinas de Bt. Devido a sua organização em uma estrutura do citoesqueleto semelhante as microvilosidades intestinais de vertebrados e por servir de apoio a superfície apical das células do intestino médio (MOOSEKER, 1985; BONFANTI et al., 1992).

Semelhante ao presente trabalho, em BBMV's de *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae), a proteína Cry1Ac reconheceu sítios de aproximadamente 15, 75, 115, e 200 kDa e em *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae) as bandas foram de 15, 42, 100, e 140 kDa (HAN et al., 2014). Em *E. lignosellus* e *D. flavipennis* foram reconhecidos sítios de aproximadamente 70 e 100 kDa para Cry1Ac (LEMES, 2016). Para *A. gemmatilis* e *S. frugiperda* Cry1Ac reconheceu sítios de aproximadamente 45, 90 e 140 kDa (FIGUEIREDO, 2017).

No segundo ínstar, a expressão da banda de 110kDa que pode ser um APN, foi mais evidente que nos ínstar's posteriores, sendo que no sexto ínstar a banda desaparece por completo. A banda de 62 kDa foi expressa em todos os ínstar's, mas também desaparece no sexto ínstar. A banda de 42 kDa foi expressa em todos os ínstar's.

Há relatos de que a interação da toxina na forma de oligômero com os receptores de APN e ALP causa uma alteração conformacional necessária para que a toxina se insira na membrana e forme um poro que eventualmente mate as larvas dos insetos-praga (PARDO-LOPEZ et al., 2006; GÓMEZ et al., 2015). A baixa toxicidade de Cry1Aa para *E. kuehniella* foi justificada pela deficiência de ligação desta proteína a um receptor chave, como as proteínas de 65 e 80 kDa (classe das ALPs), durante o processo de ligação sequencial. Também foi relatado que a resistência de *C. virescens* a Cry1Ac estava relacionada aos baixos níveis de expressão de uma proteína de ligação específica que posteriormente foi identificada como ALP (SCHWARTZ et al., 1997).

A liberação de APN pelo tratamento com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol diminuiu substancialmente os níveis do oligômero Cry1Ab em membranas insolúveis o que reduziu significativamente sua atividade de formação de poros, o que demonstra a importância de APN na inserção da toxina na membrana (LORENCE et al., 1997; BRAVO et al., 2004). Além disso, a incorporação de APN na bicamada lipídica melhorou a atividade de formação de poros de Cry1Aa. A interação do oligômero de toxinas Cry1A com APN pode ser importante para a inserção eficiente do oligômero na membrana (SCHWARTZ et al., 1997).

No sexto ínstar não há ligação da toxina ao APN e ALP, podendo estar relacionado com a diferença extremamente alta de suscetibilidade do primeiro

ínstar para o último. A banda de APN é bem expressiva no segundo ínstar e vai diminuindo gradativamente até desaparecer no último ínstar. O que pode indicar uma diminuição na quantidade desses receptores, sendo assim, menos sítios para Cry1Ac se ligar, e consequentemente menor atividade tóxica. Portanto, a diminuição na suscetibilidade de *C. includens* à Cry1Ac pode estar relacionada com a capacidade de ligação da proteína aos seus receptores e na quantidade desses receptores. Todavia, para que haja comprovação dessa hipótese são necessários mais testes. Caracterizar esses receptores putativos por meio de sequenciamento ou atividade enzimática para melhor compreender o mecanismo de união da Cry1Ac aos receptores de *C. includens*.

5. CONCLUSÕES

Os dados apresentados comprovam a mudança na susceptibilidade dos diferentes ínstar de *C. includens* à proteína Cry1Ac, sendo que o último ínstar foi menos sensível à proteína em comparação com primeiro ínstar. Os ensaios de competição homóloga apresentaram maior competição nos ínstar tardios. Foram constatados possíveis receptores para APN, ALP e actina nos ensaios de ligação.

6. REFERÊNCIAS

ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; CHAKROUN, M.; KAMOUN, F.; AZZOUZ, H.; TOUNSI, S.; ROUIS, S.; JAOUA, S. Investigation of the steps involved in the difference of susceptibility of *Ephestia kuehniella* and *Spodoptera littoralis* to the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, p. 198-201, 2011.

ABOUSSAID, H.; EL-AOUAME, L.; EL-MESSOUSSI, S.; OUFDU, K. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) strains on larvae and adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Environmental Protection**, v.1, p.337-345, 2010.

ADANG, M.J. Insect aminopeptidase N. In: Rawlings, N.D. and Salvesen, G. (eds) Handbook of Proteolytic Enzymes. **Academic Press**, San Diego, California, p. 405–409, 2013.

ALFORD, A.R.; HAMMOND JUNIOR, A.M. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplurebaited traps. **Journal of Economic Entomology**, v. 75, p. 647-650, 1982.

AMARAL, F. S. A.; GUIDOLIN, A. S.; SALMERON, E.; KANNO, R. H.; PADOVEZ, F. E. O.; FATORETTO, J. C.; OMOTO, C. Geographical distribution of Vip3Aa20 resistance allele frequencies in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Pest Management Science**, v. 76, p. 169-178, 2019.

AMBROGI, B. G.; PINTO-ZEYALLOS, D. M.; LEITE, J. C.; SOUSA-SOUTO, L.; QUEIROZ, A. F. O.; MOREIRA, S. M. Trail-following behaviour and biological aspects of the gregarious caterpillar *Brassolis sophorae* (Lepidoptera: Nymphalidae) **Austral Entomology**, v. 55, p. 366-370, 2016.

ANDRADE JUNIOR, E. R.; VILELA, P. A. Avaliação de inseticidas no controle de lagarta falsa-medideira no algodoeiro em Campo Verde-MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7, 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura brasileira e expansão dos mercados. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009.

ANGUS, T.A. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. **Nature**, v. 173, p. 545-546, 1954.

ANTONOV, V. K.; BESSMERTNAYA, L. Y.; MIKHAILOVA, A. G.; ZILBERMAN M. I. Role of intestinal brush border membrane aminopeptidase N in dipeptide transport. **FEBS Letters**, v. 171, p. 227-232, 1984.

ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILASBÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: estratégias no controle biológico. In: SERAFINE, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: Agropecuária, p. 269-293, 2002.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 12497–12503, 2010.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. 1986 *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens; In Microbiol. Rev. (ed) J L Ingraham (Washington D C: American Society for Microbiology) pp 1–24 Bechtel D B and Bulla L A Jr 1976 Electron microscopic study of sporulation and parasporal Crystal formation in *Bacillus thuringiensis*; **Journal of Bacteriology**, v.121, p. 1472–1481.

ATSUMI, S.; INOUE, Y.; ISHIZAKA, T.; MIZUNO, E.; YOSHIZAWA, Y. Location of the *Bombyx mori* 175kDa cadherin-like proteinbinding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **The FEBS Journal**, v. 275, p. 4913–4926, 2008.

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

BERNARDI, O. **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 x MON 89788 no Brasil**. 2012. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BERNARDI, O.; MALVESTITI, G. S.; DOURADO, P. M.; OLIVEIRA, W. S.; MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, v. 68, p. 1083-1091, 2012.

BLANCO, C. A.; GOULD, F.; GROOT, A. T.; ABEL, C. A.; HERNANDEZ, G.; PERERA, O. P.; TERAN-VARGAS, A. P. Offspring from sequential matings between *Bacillus thuringiensis*-resistant and *Bacillus thuringiensis*-susceptible *Heliothis virescens* Moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v.103, p. 861-868, 2010.

BONFANTI, P.; COLOMBO, A.; HEINTZELMAN, M. B.; MOOSEKER, M. S.; CAMATINI, M. The molecular architecture of an insect gut brush border cytoskeleton **European Journal of Cell Biology**, v. 57, p. 298 – 307, 1992.

BORROR, D. J.; TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. An Introduction to the Study of Insects. Saunders College Publishing, New York, 1989.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Anal Biochemical**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. **Process Biochemistry**, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

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

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

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.; GÓMEZ, I.; MENDONZA, G.; GAYTÁN, M.; SOBERÓN, M. Different Models of the Mode of Action of Bt 3d-Cry Toxins. In: SOBERÓN, M.; GAO, Y.; BRAVO, A. Bt Resistance-Characterization and Strategies for GM Crops Producing *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, 55-68, 2015.

BUENO, R. C. O. F. et al. Sem barreira. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 93, p. 12-15, 2007.

BUENO, R. C. O. F.; BUENO, A. F.; MOSCARDI, F.; PARRA, J. R. P.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing multiple species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**, v. 67, p. 170-174, 2011.

BUENO, A. F. Inimigos naturais das pragas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Londrina: Editores Técnicos, 2012. Cap. 8. p. 494-629.

CACCIA, S.; MOAR, W. J.; CHANDRASHEKHAR, J.; OPPERT, C.; ANILKUMAR, K. J.; JURAT-FUENTES, J. L.; FERRE, J. Association of Cry1Ac toxin resistance in *Helicoverpa zea* (Boddie) with increased alkaline phosphatase levels in midgut lumen. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, p. 5690 – 5698, 2012.

CALVO, D; MOLINA J. M. Head capsule width and instar determination for larvae of *Streblote panda* (Lepidoptera: Lasiocampidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, p. 881– 886, 2008.

CANDAS, M.; FRANCIS, B. R; GRIKO, N. B.; MIDBOE, E. G.; BULLA, L. A. Proteolytic Cleavage of the Developmentally Important Cadherin BT-R1 in the Midgut Epithelium of *Manduca sexta*. **Biochemistry**, v. 41, p. 13717-13724, 2002.

CAPALBO, D. M. F.; VILAS-BÔAS, G. T.; ARANTES, O. M. N. *Bacillus thuringiensis*: formulações e plantas transgênicas. In: BORÉM, A. (Ed.). **Biotecnologia e meio ambiente**. Viçosa: Folha de Viçosa, p. 309-350, 2004.

CAPELLA, A. N.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. Cytoskeleton removal and characterization of microvillary membranes isolated from two intestinal regions of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** v. 27, p. 793 – 801, 1997.

CARRIERE, Y; BROWN, Z. S.; DOWNES, S J.; GUJAR, G.; EPSTEIN, C; OMOTO, C.; STORER, N. P.; MOTA-SANCHEZ, D.; JORGENSEN, P. S.; CARROLL, S. P. Governing evolution: A socioecological comparison of resistance management for insecticidal transgenic Bt crops among four countries. **AMBIO**, v. 49, p. 1-16, 2019.

CASTAÑEDA-VILDÓZOLA, A.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H.; EQUIHUA-MARTÍNEZ, A.; VALDEZ-CARRASCO, J.; PEÑA, J. E.; CAZADO, E.; FRANCO-MORA, O. Head capsule width is useful for determining larval instar in *Heilipus lauri* (Coleoptera: Curculionidae). **The Florida Entomologist**, v. 99, p. 822-825, 2016.

CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. In vivo and in vitro binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by 125I Radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 6258-6265, 2014.

CHAKROUN, M.; SELLAMI, S.; FERRE, J.; TOUNSI, S.; ROUIS, S. *Ephestia kuehniella* tolerance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa is associated with reduced oligomer formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, p. 808-813, 2017.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C. Manejo Avançado. **Revista Cultivar**, v 178, p. 20-24, 2014.

CRIALESI-LEGORI, P. C. B.; DAVALOS, C. C.; LEMES, A. R. N.; MARUCCI, S. C.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDERIO, J. A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.49, n.2, p.79-87, 2014.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* Toxin Classification. In: FIUZA, L.; POLANCZYK, R.A.; CRICKMORE, N. (Org.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol**. Berlim: Springer International Publishing, 2017, v. 1, p. 41-52.

DALY, H. V. Insect morphometrics. **Annual Review of Entomology**, v. 30, p. 415– 438, 1985.

DE BORTOLI, C. P.; JURAT-FUENTES, L. Mechanisms of resistance to commercially relevant entomopathogenic bacteria. **Current Opinion in Insect Science**, v. 33, p. 56-62, 2019.

DE MAAGD, R.; KWA, M.; VAN DER KLEI, H.; YAMAMOTO, T.; SCHIPPER, B.; VLAK, J.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Applied and Environment Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1537–1543, 1996.

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

DOURADO, P. M.; BACALHAU, F. B.; AMADO, D.; CARVALHO, R. A.; GRAHAM, S. M.; OMOTO, C. High Susceptibility to Cry1Ac and Low Resistance Allele Frequency Reduce the Risk of Resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt Soybean in Brazil. **Plos one** 2016

DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. **Entomologia Experimentalis Applicata**, v. 114, n. 3, p. 161-169, 2005.

EMBRAPA. **Lagarta falsa-medideira traz preocupação para soja**. 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/soja/busca-de-noticias/-/noticia/1462162/lagarta-falsa-medideira-traz-preocupacao-para-soja>>. Acesso em: 23 jul. 2019.

ENGLISH, L.H.; READDY, T.L. Delta endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 19, p. 145-152, 1989.

FABRICK, J. A.; WU, Y. Roles of insect midgut cadherin in Bt intoxication and resistance. In: SOBERÓN, M.; GAO, Y.; BRAVO, A. **Bt Resistance: Characterization and strategies for GM crops producing Bacillus thuringiensis toxins**, 2015.

FARHAN, Y.; SMITH, J. L.; SCHAAFSMA, A. W. Susceptibility of Different Instars of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A, a *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae: Bacillales) Protein. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, p. 2335–2344, 2019.

FAST, P. G., RÉGNIÉRE, J. Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, v. 116, p.123-130, 1984.

FELLAND, C.M.; PITRE, H.N.; LUTTRELL, R.C.; HAMER, J.L. Resistance to pyrethroid insecticides in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 35-40, 1990.

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

FIGUEIREDO, C. S. **Interação das proteínas Cry1, Cry2 e Vip3 de Bacillus thuringiensis no controle de Anticarsia gemmatilis, Chrysodeixis includens e Spodoptera frugiperda**. 2017. 109f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, 2017.

FLORES-ESCOBAR, B.; RODRIGUEZ-MAGADAN, H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; GÓMEZ, I. Differential role of *Manduca sexta* Aminopeptidase-N and Alkaline Phosphatase in the mode of action of Cry1Aa, Cry1Ab, and Cry1Ac Toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 4543–4550, 2013.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.;

VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia Agricola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

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

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; FRANCIS, A. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 27277–27282, 1995.

GILL, M.; ELLAR, D. Transgenic *Drosophila* reveals a functional in vivo receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. **Insect Molecular Biology**, v. 11, p. 619–625, 2002.

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

GLARE, T. R.; CARANDUS, J.; GELERNTER, W.; JACKSON, T.; KEYHANI, N.; KOHL, J.; MARRONE, P.; MORIN, L.; STEWART, A. Have biopesticides come of age? **Trends Biotechnol**, v. 30, p. 250–258, 2012.

GÓMEZ, I.; DEAN D. H.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity; two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cry1Ab toxin. **Biochemistry**, v. 42, p. 10482–10489, 2003.

GÓMEZ, I., SANCHEZ, J., MUNÓZ-GARAY, C., MATUS, V., GILL, S.S. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile-proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**.383–396, 2014.

GÓMEZ, I.; FLORES, B.; BRAVO, A.; SOBERON, 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, p. 130-133, 2015.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvet bean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, p. 487-488, 1976.

GRIKO, N.; ZHANG, X.; IBRAHIM, M.; MIDBOE, E. G.; BULLA, L. A. Susceptibility of *Manduca sexta* to Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* correlates directly to developmental expression of the cadherin receptor BT-R1. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, p. 59-63, 2008.

GROCHULSKI P, M. L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J. L.; BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation." **Journal of Molecular Biology**, v. 254, p. 447-464, 1995.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: **Controle microbiano de insetos**. Editado por ALVES S. B. 2 Ed FEALQ, Piracicaba, 383-446, 1998.

HAN, L.; HAN, C.; LIU, Z.; CHEN, F.; JURAT-FUENTES, J. L.; HOU, M.; PENG, Y. Binding Site Concentration Explains the Differential Susceptibility of *Chilo suppressalis* and *Sesamia inferens* to Cry1A-Producing Rice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5134–5140, 2014.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J. F.; DELECLUSE, ARMELLE; NIELSEN-LE ROUX, C. (Eds). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**. Netherland: Kluwer Academic Plubishers, p. 41- 64, 2000.

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.

HERZOG, D.C.; TODD, J.H. Sampling velvetbean carterpillar on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D.C. (Ed.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, 1980. p. 107-140.

HERRERO, S.; GONZALEZ-CABRERA, J.; FERRÉ, J.; BAKKER, P. L.; DE MAAGD, R. Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domain II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **Biochemical Journal**, v. 384, n. 3, p. 507–513, 2004.

HERRERO, S.; GECHEV, T.; BAKKER, P. L.; MOAR, W. J.; DE MAAGD, R. A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. **BMC Genomics**, v. 24, p. 6-96, 2005.

HORNBY, J. A.; GARDNER, W. A. Dosage/mortality of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and other noctuid larvae to beta-extoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 80: p. 925-929, 1987.

HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A. Susceptibility of Different Instars of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Diet Containing *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, n. 3, 1999.

HULPIAU, P. VAN ROY, F. New insights into the evolution of metazoan cadherins. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 647–657, 2011.

IBRAHIM, M. A.; UNKER, M.; BULLA, L. A. *Bacillus thuringiensis* A genomic and proteomics perspective. **Bioengineered Bugs**, v. 1, p. 31-50, 2010.

INGLE, S. S.; TRIVEDI, N.; PRASAD, R.; KURUVILLA, J.; RAO, K. K.; CHHATPAR, H. S. *Helicoverpa armigera* (Hübner) N-aminopeptidase brush edge membrane vesicles as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. **Current Microbiology**, v. 43, p. 255 – 259, 2001.

JAKKA, S. R. K.; GONG, L.; HASLER, J.; BANERIEE, R.; SHEETS, J. J.; NARVA, K.; BLANCO, C. A.; JURAT-FUENTES, J. L. Field-evolved field resistance of army fall worm to transgenic maize expressing Cry1Fa associated with Cry1Fa toxin reduced binding and expression of alkaline phosphatase in the midgut. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, p. 1023 – 1034, 2016.

JIN, L. Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. **Nature Biotechnology**, v. 33, p. 169–174, 2015.

JOST, D. J.; PITRE, H. N. Soybean looper and cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) populations in cotton and soybean cropping systems in Mississippi. **Journal of Entomological Science**, Georgia, v. 37, p. 227-235, 2002.

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

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, p. 14299-14305, 2004b.

JURAT-FUENTES, J. L.; JAKKA, S. R.; NING, C.; LIU, C.; WU, K.; JACKSON, J.; GOULD, F.; BLANCO, C.; PORTILLA, M.; PERERA, O.; ADANG, M. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **PLoS One**, v. 6, p. 7606, 2011.

JURAT-FUENTES, J. L.; CRIKMORE, N. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 142, p. 5-10, 2017.

KELLER, M.; SNEH, B.; STRIZHOV, N.; PRUDOVSKY, E.; REGEV, A.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 365-373, 1996.

KNIGHT, P. J.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. **Mol. Microbiol**, v. 11, p. 429-436, 1994.

KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crysal δ - endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanisms of action on the insect gut. *BioEssays*, Cambridge, v. 15, n. 7, p. 469-476, 1993.

LACEY, L. A.; GRZWACZ, D.; SHAPIRO-LLAN, D. I. FRUTOS, R., BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M.S. Insect pathogens as biological control

agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1-41, 2015.

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

LEMES, A. R. N. **Interações moleculares das proteínas Cry1 e Vip3 no controle de lepidópteros em cana-de-açúcar**. 2016. 62f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, 2016.

LEMES, A. R. N.; FIGUEIREDO, C. S.; SEBASTIÃO, I.; SILVA, M. L.; ALVES, R. C.; SIQUEIRA, H. A. A.; LEMOS, M. V. F.; FERNANDES, O. A.; DESIDERIO, J. A. Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ**, v. 5, p. 2866, 2017.

LEONARD, B.R.; BOETHEL, D.J.; SPARKS, A.N.J.R.; LAYTON, M.B.; MINK, J.S.; PAVLOFF, A.M.; BURRIS, E.; GRAVES, J.B. Variations in response of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 27-34, 1990.

LI, J.; CARROL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal d-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, p. 815–821, 1991.

LI, H.; BOUWER, G. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins to *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South Africa. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, p. 110-116, 2012.

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

LIU, Y.; TABASHNIK, B. E.; JOHNSON, M. W. Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* diamondback moth (Lepidoptera: plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 788-792 1995.

LORENCE, A.; DARSZON, A.; BRAVO, A. Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* CryIAc toxin on *Trichoplusia ni* membranes. **FEBS Letters**, v. 414, p. 303–307, 1997.

LUO, S.; SANGADALA, L.; MASSON, A.; MAZZA, A.; BROUSSEAU, R.; ADANG, M. J. The *Heliothis virescens* 170 kDa aminopeptidase functions as “receptor A” by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin binding and pore formation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, p. 735-743, 1997.

MARUCCI, S. C. **Interação de proteínas Vip3A e Cry1IA10 de *Bacillus thuringiensis* com atividade inseticida a lepidópteros-praga**. 2015. 81f. Tese

(Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, 2015.

MARUCCI, S. C.; FIGUEIREDO, C. S.; TEZZA, R. I. D. CUNHA, E. C.; LEMOS, M. V.; DESIDÉRIO, J. A. Relationship between toxicity of Vip3Aa proteins and their binding capacity to intestine receptors of lepidopteran pests. **PAB**, v. 50, 2015.

MARSARO JUNIOR, A.L.; PEREIRA, P.R.V. da S.; SILVA, W.R. da; GRIFFEL, S.C.P. Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no estado de Roraima. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 8, p. 71-76, 2010.

MARTINS, G.L.M.; TOMQUELSKI, G.V. Efficiency of insecticides on *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean crop. *Rev. Agric. Neotropical*, v. 2, p. 25-30, 2015.

MASCARENHAS, R.N.; BOETHEL, D.J. Development of diagnostic concentrations for insecticide resistance monitoring in soybean looper (Lepidoptera:Noctuidae) larvae using an artificial diet overlay bioassay. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 897-904, 2000.

MASSON L., L. Y.-J., MAZZA A., BROUSSEAU R., ADANG M. J. The CryIA(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities, *Journal of Biological Chemistry*, v. 31, p. 20309-20315, 1995.

MATTEN, S. R.; HEAD, G. P.; QUEMADA, H. D. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. In J. Romeis, A. M. Shelton, and G. G. Kennedy, eds. **Integration of Insect-resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs**, p. 27–39. Springer, New York, 2008.

McGAUGHEY, W. H. Effects of larval age on the susceptibility of almond moths and Indianmeal moths to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 71, p. 923-925, 1978.

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

MCNALL, R. J.; ADANG, M. J. Identification of new *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in intestinal *Manduca sexta* by protein analysis. **Insect Biochem. Mol. Biol**, v. 33, p 999 – 1010, 2003.

MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 49, p. 9-13, 1994.

MOOSEKER, M. S. Organization, chemistry and assembly of the intestinal brush edge cytoskeletal apparatus. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 1, p. 209 – 241, 1985.

MORIN, S.; BIGGS, R. W.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHANHECKEL, D. G.; CARRIERE, Y.; DENNEHY, T. J.; BROWN, J. K.; TABASHNIK, B. E. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in Pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 5004-5009, 2003.

MOSCARDI, F.; BUENO, A. F.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROGGIA, S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; POMARI, A. F.; CORSO, I. C.; YANO, S. A. C. Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja – Manejo Integrado de Pragas e outros Artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. Cap. 4, p. 213-309.

MUSHTAQ, R.; SHAKOORI, A. R.; JURAT-FUENTES, J. L. Domain III of Cry1Ac Is Critical to Binding and Toxicity against Soybean Looper (*Chrysodeixis includens*) but Not to Velvetbean Caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*). **Toxins**, v. 10, 2018

NING, C.; WU, K.; CHENXI, W.; YULIN, L.; GAO, Y.; JURAT-FUENTES, J. L.; GAO, X. Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 666-672, 2010.

ONOFRE, J.; GAYTÁN, M. O.; PENA-CARDENA, A.; PACHECO, B. I.; GÓMEZ, I.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Identification of Aminopeptidase-N2 as a Cry2Ab binding protein in *Manduca sexta*. **Peptides**, v. 98, p. 93-98, 2017.

PAPA, G.; CELOTO, F.J. **Lagartas na soja**. 2007. Disponível em <<http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1189090532>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABELLERO, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**, p. 3296-3325, v. 6, 2014.

PANIZZI, A. R. History and contemporary perspectives of the Integrated Pest Management of soybean in Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 42, p. 119–127, 2013.

PARDO-LÓPEZ, L.; GÓMEZ, I.; MUÑOZ-GARAY, C.; JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; SOBERÓN, M. Structural and functional analysis of the prepore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, p. 172–177, 2006.

PARRA, R. P. P.; HADDAD, M. L. Determinação do número de ínstares de insetos. Piracicaba: **FEALQ**, 1989, 49p.

PINÓIA, S. S. F. **Eficácia de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) e spinosade no combate a *Helicoverpa armigera* (Hbn) (Lepidoptera: Noctuidae) em tomateiro**. Dissertação de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa, 2012. 89p.

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

POLANCZYK, R. A.; VAN FRANKENHUYZEN, K.; PAULI, G. The American *Bacillus thuringiensis* Based Biopesticides Market. FIUZA, L. M.; POLANCZYK R. A.; CRICKMORE, N. ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol**. Springer, p. 173-184, 2017.

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 Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1553–1558, 2000.

RAJAGOPAL, R.; AGRAWAL, N.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R. K. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor." **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 46849–46851, 2002.

RAJAGOPAL, R.; AGRAWAL, N.; SELVAPANDIYAN, A.; SIVAKUMAR, S.; AHMAD, S. Recombinantly expressed isoenzymic aminopeptidases from *Helicoverpa armigera* (American cotton bollworm) midgut display differential interaction with closely related *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. **Biochemical Journal**, v. 370, p. 971-978, 2003

ROSAS-GARCIA, N. M. Biopesticide Production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 3, p. 28-36, 2009.

RIBEIRO, R. Lagarta falsa-medideira na cultura da soja, 2019. < <https://promip.agr.br/lagarta-falsa-medideira-cultura-soja/>>. Acesso em: 29 ago. 2019.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*, a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 31, p. 217-231, 2011.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, 2011, v. 9, p. 283–300, 2011.

SANGADALA, F. S.; WALTERS, L. H.; ENGLISH, L. H.; ADANG, M. J. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+)-K⁺ efflux in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 10088-10092, 1994.

SANGADALA, S.; AZADI, P.; CARLSON, R.; ADANG, M.J. Carbohydrate analyses of *Manduca sexta* aminopeptidase N, co-purifying neutral lipids and

their functional interactions with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 97-107, 2001.

SANTOS, W.J.; BARBOSA, C.A.S.; PEDROSA, M.B. Estudo do comportamento da falsa-medideira e ou mede-palmo na cultura do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no Oeste da Bahia, 2010.

SCHÜNEMANN, R.; KNAACK, N.; FIUZA, L. M. Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology**, p. 1-12, 2014.

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

SCHWARTZ, J. L.; LU, Y. L.; SOHNLEIN, P. BROUSSEAU, R.; LAPRADE, R. Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. **FEBS Letters**, v. 412, p. 270–276, 1997.

SILVA, I. H. S. **Interação da toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* às microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio de *Helicoverpa armigera* Hubner, 1805 (Lepidoptera: Noctuide) em diferentes instares larvais**. 2017. 65f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Jaboticabal, 2017.

SILVA, I. H. S.; GÓMEZ, I.; SANCHEZ, J.; DIANA, L.; CASTRO, M.; VALICENTE, F. H.; SOBERÓN, M.; POLANCZYK, R. A.; BRAVO, A. Identification of midgut membrane proteins from different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. *Plos One*, 13, 2018.

SILVIE, P.; BÉLOT, J. L.; MICHEL, B. **Manual de identificação das pragas e seus danos no cultivo de algodão**. Cascavel: COODETEC/CIRAD-CA, 2007. 120 p. (Boletim Técnico 34).

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. **Science**, v. 318, p. 1640–1642, 2007.

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

SOBERÓN, M.; PARDO, L.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; GOMEZ, I.; PORTA, H.; BRAVO, A. Pore formation by Cry toxins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 677, p. 127–142, 2010.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; HIROSE, E. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSO, 2010. 90 p. (Embrapa – CNPSO. Documentos, 269).

SOSA-GÓMEZ, D.R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. C.B. Hoffmann-Campo, B.S. Corrêa Ferreira, F. Moscardi (Eds.), *Soja: Manejo Integrado de Insetos e Outros Artrópodes-Praga*, Embrapa, Brasília, DF (2012), pp. 675-723.

STACKE, R. F.; GIACOMELLI, T.; R.F.; BRONZATTO, E.S.; HALBERSADT, S.A.; GARLET, C.G.; MURARO, D.S. Muraro; GUEDES, J.V.C.; BERNARDI, O. Susceptibility of Brazilian populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides

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, p. 2011–2025, 2009.

TABASHNIK, B. E.; ZHANG, M.; FABRICK, J. A.; WU, Y.; GAO, M.; HUANG, F.; WEI, J.; ZHANG, J. YELICH, A.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; CARRIÈRE, Y.; LI, X. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, v. 5:15107, 2015.

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 of the United States of America, v. 108, p.14037–14042, 2011.

TINGTING, J.; XIAOLI, D.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; ZHENYING W.; KANGLAI, H. Identification of an alkaline phosphatase as a putative Cry1Ac binding protein in *Ostrinia furnacalis* (Guenée). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 80-86, 2016.

TOMQUELSKI, G.V.; MARTINS, G. L. M.; DIAS, T. S. Características e manejo de pragas da cultura da soja. **Pesquisa, Tecnologia e Produtividade**, Chapadão do Sul MS, v. 2, n. 9, p. 61-82, 2015.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, P. Role of Alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera*. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 2027-2036, 2011.

VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J. L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 111, p. 1–12, 2012.

VAN RIE, J.; MCGAUGHEY, W.H.; JOHNSON, D.E.; BARNETT, B.D.; MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 247, p. 72-74, 1990.

VAN RIE, J. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, p. 463–469, 2000.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 114, p. 76-85, 2013.

WALKER, D. R.; ALL, J. N.; MCPHERSON, R. M.; BOERMA, H. R.; PARROTT, W. A. 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, p.613-622, 2000.

WANG, P.; ZHANG, J. Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 611-620, 2005.

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

WEITZNER; WHALON. Weitzner and Whalon: Head Capsule Widths as an Indicator of the Larval Instar of Codli. **The Great Lakes Entomologist**, v. 20, 1987

WOLFERSBERGER, M. G.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, V. F.; GIORDANA, B.; HANOZETA, 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.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 948–954, 2005.

XU, X.; WU, Y. Disruption of Ha_BtR alters binding of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin Cry1Ac to midgut BBMV of *Helicoverpa armigera*, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 27–32, 2008.

YAMAMOTO, T.; DEAN, D. H. Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agriculturas pests. IN: CHARLES, J. F.; DELÉCLUSE, A.; NIELSEN-LE ROUX, C. (Edit.). **Etmopathogenic Bacteria: from laboratory to field application**. Netherlands: Kluwer Academic Publisher, 2000. p. 81-100.

YAMAGUCHI, T.; SAHARA, K.; BANDO, H.; ASANO, S. Intramolecular proteolytic nicking and binding of *Bacillus thuringiensis* Cry8Da toxin in BBMV

of Japanese beetle, **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 105, p. 243–247, 2010.

YANG, Y., CHEN, H., WU, Y., YANG, Y. & WU, S. Alelos de caderina mutados de uma população de campo de *Helicoverpa armigera* conferem resistência à toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 6939- 6944, 2007.

YANG, Y.; OTTEA, J.; HUSSENER, C.; LEONARD, B. R.; ABEL, C.; HUANG, F. Molecular characterization and RNA interference of three midgut aminopeptidase N isozymes from *Bacillus thuringiensis*-susceptible and -resistant strains of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 8, 2010.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRINKO, N. B.; TAUSSING, 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** 103, 9897–9902, 2006.

ZHANG, S.; CHENG, H.; GAO, Y.; WANG, G.; LIANG, G.; WU, K. Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 39, p. 421-429. 2009.

ZHANG, H.; TIAN, W.; ZHAO, J.; JIN, L.; YANG, J.; LIU, C.; YANG, Y.; WU, S.; WU, K.; CUI, J.; TABASHNIK, WU. Diverse genetic basis of field-evolved resistance to Bt cotton in cotton bollworm from China. **PNAS**, v. 109, p. 10275-10280, 2012.

ZHANG, Y.; M. A, Y.; WAN, P. J.; MU, L. L.; LI, G. Q. *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins affect lifespan and reproductive performance of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* adults. **Journal of Economic Entomology**, v. 106, p. 614-621, 2013.

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

ZÚÑIGA-NAVARRETE, F.; GÓMEZ, I.; PEÑA, G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. A *Tenebrio molitor* GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa to brush border membrane vesicles. **Peptides**, v. 41, p. 81-86, 2013.