



RAQUEL OLIVEIRA MOREIRA

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS
DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DO PULGÃO-
VERDE- DOS- CEREAIS (*Schizaphis graminum*)**

**LAVRAS- MG
2018**

RAQUEL OLIVEIRA MOREIRA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DO PULGÃO- VERDE- DOS- CEREAIS (*Schizaphis graminum*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

Dra. Beatriz de Almeida Barros
Co-orientadora

**LAVRAS- MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Moreira, Raquel Oliveira.

Seleção e caracterização molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* para controle do pulgão- verde- dos- cereais (*Schizaphis graminum*) / Raquel Oliveira Moreira. - 2018.
63 p. : il.

Orientador(a): Fernando Hercos Valicente.

Coorientador(a): Beatriz de Almeida Barros.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Bacillus thuringiensis*. 2. *Schizaphis graminum*. 3. Caracterização Molecular. I. Valicente, Fernando Hercos. II. Barros, Beatriz de Almeida. III. Título.

RAQUEL OLIVEIRA MOREIRA

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLE DO PULGÃO- VERDE- DOS- CEREAIS (*Schizaphis graminum*)

SELECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Bacillus thuringiensis* FOR THE CONTROL OF GREENBUG (*Schizaphis graminum*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de maio de 2018.

Dr. Fernando Hercos Valicente – UFLA / EMBRAPA

Dra. Beatriz de Almeida Barros – EMBRAPA

Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana - EMBRAPA

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

Dra. Beatriz de Almeida Barros
Co-orientadora

**LAVRAS-MG
2018**

*À minha mãe por ser meu exemplo de amor, paciência, persistência e dedicação.
Ao meu pai Adilson por ser meu exemplo de honestidade e por ser o responsável pela mulher
forte que me tornei.*

*À minha avó Maria e meu tio Lindomar por me ensinar que sempre há um motivo para não
desistir (mesmo que às vezes não o enxergue).*

*Ao nosso eterno anjo Maria Cecília (in memoriam) por ter cumprido sua missão nos
ensinando que “o segredo do amor é maior do que o segredo da morte” e que caso queira
“saber quanto custa uma saudade? Tenha amor, queira bem e viva ausente...”.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus pois é a Ele toda honra e toda glória em minha vida.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal, na pessoa do coordenador Dr. Luciano Vilela Paiva, Sra. Rossilvânia e ao corpo docente, pela oportunidade, prontidão em ajudar-me e pela formação acadêmica.

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente pela orientação, oportunidade e confiança durante o desenvolvimento do meu trabalho.

À Analista de Pesquisa e Desenvolvimento Dra. Beatriz de Almeida Barros, por todos os ensinamentos, paciência, amizade e por continuar a ser meu maior exemplo de profissionalismo (e por continuar a ser minha mãe de bancada e tentar me convencer que nunca TUDO está perdido).

Ao Dr. Ubiraci Lana pela disponibilidade para os esclarecimentos de dúvidas e as valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

À pós-doutoranda Dra. Daniele Helóisa Pinheiro pela prontidão em auxiliar-me sempre que precisei, sendo um exemplo de compromisso e dedicação, além da amizade independente da distância (são muitos áudios e risadas ao longo da convivência).

Aos meus pais Adilson e Lucia, pelo amor a mim dedicado e os princípios ensinados os quais levarei como a maior das heranças por toda minha vida. Nunca tivemos luxo, mas sempre sobrou amor entre nós. E se sigo adiante é por vocês... Por um amor eterno a vocês!

Aos meus irmãos Alesandro e Alexsandro por toda paciência, carinho, conselhos e apoio desde o início da minha carreira acadêmica e em todos os momentos de necessidade.

Agradeço aos meus caçulas amados Tobias e Ábias e à Jessica, Luan, Laís, Brayan e Arthur por terem o dom de me fazer sorrir nos momentos mais improváveis para tal.

Aos amigos do PPGVB Karine, Tatiane Nascimento, Tatiane Casarin, Fernando, André, Raquel Salgado, Victor e Nathalia pelo companheirismo durante o curso e nos momentos de descontração. Seja por todos os esclarecimentos e suporte do início ao final do mestrado (Tati, Kaká e Raquel), pelos ensinamentos em relação às atividades no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa (Fernando, Victor e André), pelo auxílio prestado quando fiquei sem apartamento em Lavras (obrigada Tati e Nath por não me deixarem dormir na beira do córrego). Todos vocês foram um sustento e tanto!

Aos colegas Laiane, André Xavier, Fernanda, Ana Carolina e Vanessa por esclarecerem várias dúvidas durante o desenvolvimento do projeto; à Amanda e ao Mateus Thomaz por cada risada que demos e demais colegas do Núcleo de Biologia Aplicada, em especial aos colegas do LBM e LCB, pela amizade e o agradável convívio no ambiente de trabalho.

Aos técnicos Celso, Osmar e Ismael pelo grande auxílio no decorrer das atividades, principalmente no que se refere ao cultivo de Bt e a criação de pulgões.

À minha amiga Vitória pelo companheirismo, paciência, conselhos e todas as colaborações na análise desse trabalho.

Ao Vicente por todo o incentivo e auxílios, principalmente no início do curso.

À minha amiga Jessika Larita e minha prima Juliana por todas as audições, conversas animadoras e por sempre estar ao meu lado (mesmo quando nem eu me encontro).

Aos meus familiares, em especial tio Lindomar, tia Tamires, Cassiano, tia Rosa e vó Maria: os momentos difíceis fortaleceram nossa cumplicidade e nossa confiança em Deus. Sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À Embrapa Milho e Sorgo pela oportunidade de desenvolver este projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Meu muito obrigada!

*“... Nada é mais real
Que aprender a maneira simples de viver;
Tudo é tão normal
Se a gente não se cansa nunca de aprender;
Sempre olhar como se fosse a primeira vez,
Se espantar como criança a perguntar por quês?
Vamos flutuar em um balão
Que sobrevoa o amanhecer.
Vamos navegar
Entre os navios no horizonte a se perder.
Nos lembrar
“Que tudo tem sua razão de ser...”*”

(Almir Sater)

RESUMO

Pulgões-verde-dos-cereais (*Schizaphis graminum*) são insetos sugadores de seiva do floema que infectam as culturas, causando danos não só pelo resultado direto da alimentação mas também pela sua importância nos vetores dos vírus das plantas. *S. graminum* é considerado uma praga secundária de milho, mas com a intensificação do manejo de pragas, especialmente para a ordem de Lepidoptera, tem sido observada uma infestação recorrente devido à redução do uso de pesticidas de amplo espectro e à falta de competição intraespecífica. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil genético e molecular de linhagens de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e seu potencial entomopatogênico para *S. graminum*. Bioensaios contra *S. graminum* foram realizados utilizando quatro linhagens elite entomopatogênicas para pragas de diferentes ordens e pertencentes à coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Além disso, a expressão dos genes *cry* e a análise do perfil de proteínas também foram realizadas para cada cepa. As linhagens 1644 e 1648 mostraram um efeito patogênico maior e mais rápido, reduzindo as taxas de sobrevivência de insetos a 20% após 48 horas e a 6% e 0% após 96 horas de exposição, respectivamente. As cepas 1636 e 1641 também foram entomopatogênicas, mas as taxas de sobrevivência diminuíram mais lentamente. Nenhuma expressão de genes *cry* foi detectada nas cepas 1644 e 1648, enquanto o gene *cry2Ab* apresentou um perfil de expressão característico dos genes *cry* dependentes de esporulação. A análise de proteína total das linhagens 1636, 1641 e 1644 mostrou diferentes perfis protéicos com pesos moleculares variando de 20 a 210 kDa. Não pudemos associar as proteínas de 1644 e 1648 com proteínas Cry. No entanto, no perfil mostrado pela estirpe 1636, duas bandas com 60 e 130 kDa são semelhantes às proteínas Cry2A (70 kDa) e Cry1Ac (120 kDa), respectivamente. Os resultados demonstram o potencial dessas linhagens como fonte de genes contra *S. graminum*, além de evidenciar a necessidade de melhor entender a regulação dos genes *cry* nestes isolados e otimizar os processos de obtenção de produtos à base de *B. thuringiensis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico. Caracterização molecular. RT-qPCR. *Schizaphis graminum*. Pulgão- verde- dos- cereais.

ABSTRACT

Greenbug is a sap-sucking insect that infects crops causing damages not only as a direct result of feeding but also by their importance as vectors of plant viruses. *S. graminum* is considered a secondary pest of maize, but with an intensification of the pest management, especially for Lepidoptera order, it has been observed a recurrent infestation due to the reduced use of the broad-spectrum pesticides and the lack of intraspecific competition. So, the present work aimed to evaluate the molecular genetic profile of *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains and its entomopathogenic potential for *S. graminum*. Bioassays against *S. graminum* were carried out using four elite strains entomopathogenic for pests of different orders and belonging to the collection of Microorganisms of Embrapa Maize and Sorghum. Furthermore, the expression of cry genes and protein profile analysis were also conducted for each strain. Strains 1644 and 1648 showed a higher and faster pathogenic effect, reducing insect survival rates to 20% after 48h and to 6% and 0% after 96h of exposure, respectively. The strains 1636 and 1641 were also entomopathogenic, but survival rates diminish more slowly. No expression of cry genes evaluated could be detected in 1644 and 1648 strains whereas the *cry2Ab* gene showed an expression profile characteristic of the sporulation-dependent cry genes. Total protein analysis from 1636, 1641 and 1644 strains showed different protein profiles with molecular weights ranging from 20 to 210 kDa. We could not associate proteins from 1644 and 1648 with Cry proteins. However, in the profile showed by 1636 strain, two bands with 60 and 130 kDa are similar to the Cry2A (70 kDa) and Cry1Ac (120 kDa) proteins, respectively. The results demonstrate the potential of these strains as a source of genes against *S. graminum*, besides evidencing the need to better understand the regulation of the cry genes in these isolates and to optimize the processes for obtaining products based on *B. thuringiensis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Biological control. Molecular characterization. RT- qPCR. *Schizaphis graminum*. Greenbug.

Sumário

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 O controle de pragas na agricultura	15
2.2 <i>Schizaphis graminum</i>	16
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) e aplicações biotecnológicas	19
2.4 δ-endotoxina Cry	22
2.4.1 Estrutura	22
2.4.2 Modo de ação	24
2.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) e sua aplicação em Hemípteros	25
2.6 Análise de expressão gênica	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	37
DINÂMICA DE EXPRESSÃO DE GENES <i>CRY</i> EM CEPAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> CAPAZES DE CONTROLAR O PULGÃO- VERDE- DOS- CEREAIS (<i>Schizaphis graminum</i>)	38

PRIMEIRA PARTE

Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

A incidência de pragas, anteriormente consideradas secundárias, intensificou-se nos últimos anos, registrando-se extensivas perdas econômicas em culturas agrícolas. A ocorrência pragas sugadoras, por exemplo o pulgão *Schizaphis graminum*, tem sido um preocupante problema para muitos agricultores, principalmente na região sul do Brasil. Nos últimos anos, a rápida proliferação desse inseto associada ao estresse hídrico, altas temperaturas e ao uso de métodos de amplo espectro de ação para controle de lepidópteros fizeram com que os danos econômicos atribuídos ao ataque de pulgão, por exemplo, alcançassem de 10% a 50% em safras passadas (KHAN et al., 2012; PALHARES, 2016).

A espécie *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae) é um afídeo que ocorre em culturas como milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar, aveia, centeio, cevada, painço e gramíneas não cultivadas (PEREIRA et al., 2010; CRUZ, 2012). Os pulgões são insetos sugadores de seiva do floema, atuando como importantes promotores de perdas diretas (causadas pela sucção de seiva e do efeito tóxico da saliva) ou indiretas (transmissão ou favorecimento do desenvolvimento de espécies de patógenos como fungos e o vírus do mosaico comum do milho) (CHACKO, 1991; BARROS, 2012).

Em lavouras de milho, o ataque desses insetos podem causar a morte ou perfilhamento de plantas, além da produção de espigas atrofiadas ou com granação deficiente (PEREIRA et al., 2006). O manejo atual de pulgões baseia-se principalmente na aplicação de inseticidas químicos que, quando utilizados de forma inadequada, podem provocar danos ao ambiente, como o desequilíbrio ecológico e alterações nas populações de inimigos naturais além da seleção de indivíduos resistentes (CHOUGULE e BONNING, 2012). Outro fator a ser ressaltado refere-se ao plantio de cultivares de milho expressando proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que apresentam uma ação tóxica a diversas ordens de insetos, principalmente os lepidópteros. Entretanto, a utilização de milho Bt no país tem favorecido um maior rendimento na produção, a ausência de competição intraespecífica, plantas vigorosas e sem resquício de inseticidas químicos, fatores que contribuem para possíveis infestações de insetos não-alvos na cultura (PEREIRA et al., 2010; CHOUGULE e BONNING, 2012)

Alguns trabalhos demonstraram que toxinas Bt causam pouco ou nenhum efeito sobre a sobrevivência e fecundidade dos afídeos (PONCET et al., 1995; ASHOURI et al., 2001; AIMANOVA et al., 2006; FARIA et al., 2007; MELLET e SCHOEMAN, 2007). No entanto, testes que avaliaram a sensibilidade do pulgão de ervilha (*Acyrtosiphon pisum*), criado em dieta artificial, as toxinas Cry demonstraram que quatro endotoxinas – Cry3A, Cry4Aa,

Cry11Aa, Cyt1Aa – apresentaram toxicidade que foi refletida nas taxas de morte e crescimento dos insetos (PORCAR et al., 2009). Sabendo-se que uso indiscriminado de inseticidas químicos podem trazer graves danos à saúde humana, aos ecossistemas e às águas subterrâneas, o estudo e a aplicação de endotoxinas *Bt* para o controle de afídeos torna-se de grande interesse frente à incessante busca por uma agricultura mais sustentável (KESWANI et al., 2013; BISEN et al., 2015).

Para que ocorra uma efetividade tóxica de isolados de *Bt* sobre os hemípteros é essencial que a toxina seja ativada proteoliticamente no intestino dos insetos. Dessa forma, as diferenças entre as enzimas proteolíticas, o pH do intestino desses insetos e a estratégia utilizada nos experimentos são fatores que devem ser considerados para uma avaliação mais adequada dos efeitos da toxina em análise. Assim, um estudo detalhado para a melhoria dos processos que visam a aplicação de *Bt* para controle de afídeos torna-se importante para o manejo sustentável dessas pragas (LI et al., 2011; SCHÜNEMANN et al., 2014).

O primeiro passo para a aplicação de *B. thuringiensis* no controle de *S. graminum* e de outros sugadores refere-se à busca por cepas que apresentem toxicidade à espécie através de ensaios de patogenicidade *in vitro*. Algumas cepas exclusivas do banco do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo se destacam devido seus altos índices de mortalidade para espécies da ordem Lepidoptera, sendo de grande interesse explicar a aplicação das mesmas para outras ordens e explorar de forma mais detalhada seu perfil molecular a nível transcricional e traducional. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a potencialidade entomopatogênica de cepas *Bacillus thuringiensis* para controle de *Schizaphis graminum*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O controle de pragas na agricultura

De acordo com dados levantados pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (SINDIVEG) (2017), o balanço oficial anual em 2016 do setor de vendas de defensivos agrícolas no Brasil totalizou US\$ 9,5 bilhões. Desse valor, os inseticidas representam 29% das comercializações, sem contabilizar a quantidade de agroquímicos comercializados ilegalmente no país.

O milho representa a segunda cultura mais produzida no país, sendo que a safra 2017/18 está estimada em 92.347 milhões de toneladas, distribuída em uma área de aproximadamente 17.085 mil hectares (CONAB, 2018). Nesse cenário, a lavoura de milho absorve 10% da receita apurada em comercialização de agroquímicos no Brasil, o que, ao longo de anos, representou o principal contribuinte para o controle de pragas e doenças por ser considerada uma estratégia viável pelo custo e eficácia (SANSINENEA, 2016; SINDIVEG, 2016). No entanto, os impactos ambientais decorrentes dessa atividade, tal como a contaminação dos solos e da água, a seleção de insetos-praga resistentes e os efeitos letais sobre organismos não-alvo fez com que agricultores e produtores em geral buscassem meios alternativos na produção agrícola que viabilizem a redução dos produtos químicos utilizados (KOGAN, 1998).

Apesar da redução de 21,56% nas vendas de defensivos no ano de 2015 (SINDIVEG, 2016), a tentativa de diminuir o emprego de agroquímicos na agricultura continua a ser um desafio constante. A prática do controle biológico e o uso de substâncias naturais podem complementar esses esforços, considerando-se que a aplicação de pesticidas sintéticos deve ser mínima e como um último recurso. O controle biológico consiste na adoção de diferentes estratégias com o propósito de induzir suficientemente a mortalidade na população da praga alvo para garantir que o dano não seja excedido ao decorrer da época de cultivo. Tais estratégias se baseiam em diferentes tipos de inimigos naturais, como agentes patogênicos (bactérias, fungos, vírus) e insetos predadores ou parasitoides (COCK et al., 2012; EYHORN et al., 2015).

Outra prática agrônômica preventiva ao uso de pesticidas sintéticos refere-se à utilização de variedade resistentes desenvolvidas por meio de engenharia genética. Em 2015, lavouras geneticamente modificadas foram cultivadas por aproximadamente 18 milhões de agricultores em 26 países, sobre uma superfície total de 185,1 milhões de hectares. Além de ganhos econômicos, os agricultores beneficiaram-se pela redução de 50% no número de aplicações de pesticidas, contribuindo assim para um ambiente mais sustentável e melhor

qualidade de vida (ISAAA, 2016).

Em relação a lavoura de milho, as sementes utilizadas na maioria das áreas cultivadas são transgênicas, resistentes à ação de herbicidas e/ou ao ataque de lagartas. A área de produção do milho utilizando sementes transgênicas é estimada atualmente em 15,7 milhões de hectares. Entretanto, deve-se ressaltar que a utilização correta dessas tecnologias visando evitar a seleção de indivíduos resistentes na cultura, como a adoção da área de refúgio, expressão de alta dose da toxina Bt no híbrido transgênico e a rotação de métodos de controle de pragas é essencial para o sucesso no uso do Bt (CÉLERES, 2016).

2.2 *Schizaphis graminum*

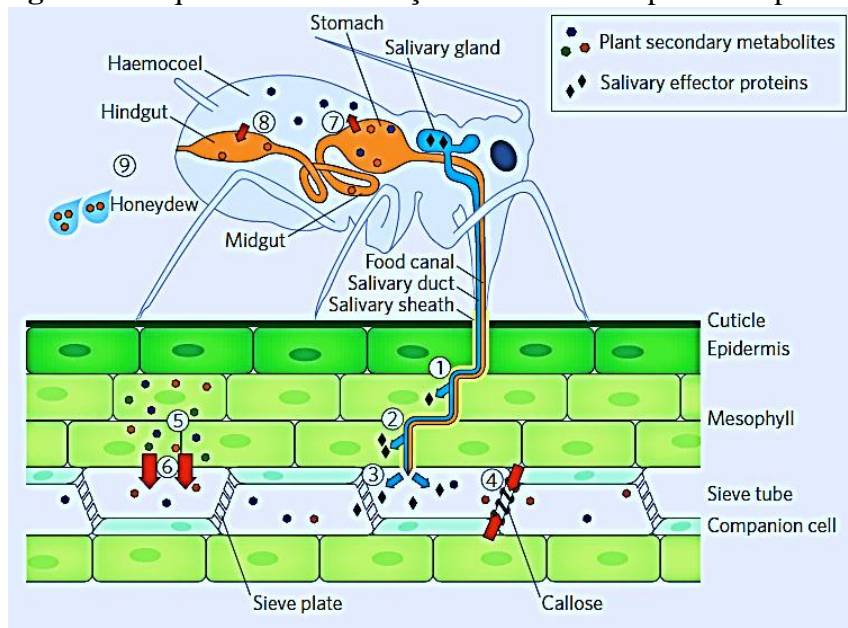
Desde a safra 2005/2006 vem ocorrendo um aumento das populações de pragas que anteriormente eram consideradas secundárias e de pouca importância. O controle de algumas espécies sugadoras era realizado na ocasião do plantio direto e/ou na segunda safra. Entretanto, a adoção do plantio de milho safrinha permite o cultivo durante quase todo o ano, o que exige maior atenção quanto às técnicas de manejo. Aliado a esses fatores, deve-se considerar as modificações climáticas e os programas voltados ao controle de lepidópteros nos últimos anos como importantes contribuintes no remanejamento dos insetos infestantes (CRUZ, 2012; PIONEER, 2016).

Pulgões (Hemiptera, Sternorrhyncha, Aphidoidea) são pragas agrícolas ocorrentes em praticamente todas as culturas, especialmente aquelas localizadas nas regiões temperadas do mundo. Uma espécie que vem sendo identificada em culturas de milho, com registro de altas infestações, é *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852) (Hemiptera: Aphididae) - também conhecido pulgão-verde-dos-cereais. Esse inseto se alimenta de seiva do floema de plantas superiores e, além de privar as plantas de nutrição, também podem atuar como potentes vetores de fitopatogênicos (BLACKMAN e EASTOP, 1984; WILL e VILCINSKAS, 2015).

O aparelho bucal de um pulgão é altamente adaptado, apresentando dois pares de estiletes flexíveis que são introduzidos na epiderme e movidos na camada cortical da planta. Durante a penetração, o inseto secreta uma saliva gelatinosa no espaço intercelular que se endurece para formar uma superfície vedativa e uma bainha tubular contínua encerra o comprimento total do estilete dentro o apoplasto. As células do mesófilo são perfuradas e o pulgão injeta pequenas quantidades de saliva contendo proteínas efectoras, que funcionam como “provas exploratórias” para avaliar a qualidade da planta. Uma vez que o floema é alcançado, o inseto alterna entre a ingestão da seiva e a secreção da saliva aquosa contendo

enzimas digestivas. Durante a retirada do estilete do floema há a secreção da saliva viscosa isolando qualquer vazamento causado pelo processo de inserção e causando uma injúria mínima no tecido. Metabólitos secundários são ingeridos durante a alimentação e podem ser absorvidos e acumulados no hemocele ou são excretados no intestino posterior como um melado juntamente com todos os seus metabólitos restantes (INOUE-NAGATA e NAGATA, 2002; ZÜST e AGRAWAL, 2016).

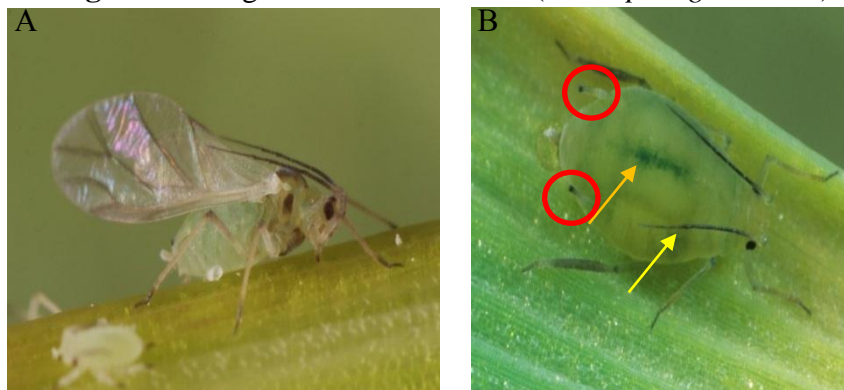
Figura 1- Esquema da alimentação do afídeo e resposta das plantas



(1) Penetração do estilete do afídeo no apoplasto; (2) Produção de proteínas efectoras na saliva; (3 e 4) Contato com o floema e alternância entre a sucção de seiva e produção de enzimas digestivas na saliva para evitar a formação de calose; (5 e 6) Síntese e transporte de metabólitos secundários de defesa pela planta; (7) Absorção de metabólitos secundários na hemocele; (8 e 9) Excreção da seiva ingerida no intestino posterior em forma de melado. Fonte: Züst† e Agrawal , 2016.

O pulgão-verde-dos-cereais (Figura 2) possui corpo oval, alongado com tamanho variando entre 1,3 a 2,1 mm. Na sua forma alada apresenta cabeça e a primeira parte do tórax de cor marrom-claro e o abdômen amarelo esverdeado (Figura 2A). No último instar de ninfa e em adultos o inseto apresenta coloração verde amarelada e dorso com linha média longitudinal verde-escura, antenas são uniformemente escura e possui seis segmentos. Os sífúnculos são da mesma cor do restante do corpo, com as pontas ligeiramente dilatadas e escurecidas (Figura 2B) (NUESSLY e NAGATA, 2005; PEREIRA et al., 2010).

Figura 2 - Pulgão-verde-dos-cereais (*Schizaphis graminum*)



A) *Schizaphis graminum* em sua forma alada. B) *Schizaphis graminum* em sua forma áptera, com detalhe em suas antenas de coloração mais escura que o corpo (seta em amarelo), linha média longitudinal verde-escura (seta em laranja) e os sífúnculos (círculo em vermelho). Fonte: Arquivo INRA (França), 2010.

S. graminum possui reprodução assexuada, por partenogênese telítica e desenvolve-se em temperaturas que variam de 18° a 26°C. Não apresentam estágio de pupa, sendo que o ciclo de vida dura em média 25 dias. As características biológicas dependem das condições do ambiente, sendo favorecidas por altas temperaturas e condições normais de umidade relativa. O período reprodutivo perdura por cerca de 10 dias, com média de 5 a 7 ninfas/fêmea (GASSEN, 1996; MAIA et al., 2004; NUESSELY e NAGATA, 2005; BARROS, 2012).

De um modo geral, os pulgões são conhecidos por serem potentes transmissores de doença em plantas. Em milho, são disseminadores do *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), identificado como o agente causal do mosaico comum em milho, doença caracterizada pela formação de pequenas áreas verde-claro entremeadas com áreas verde-escuro nas folhas da planta e que acarreta grandes perdas de produção (Figura 3) (NAULT E BRADLEY, 1969; FERNANDES e OLIVEIRA, 1997; BARROS, 2012).

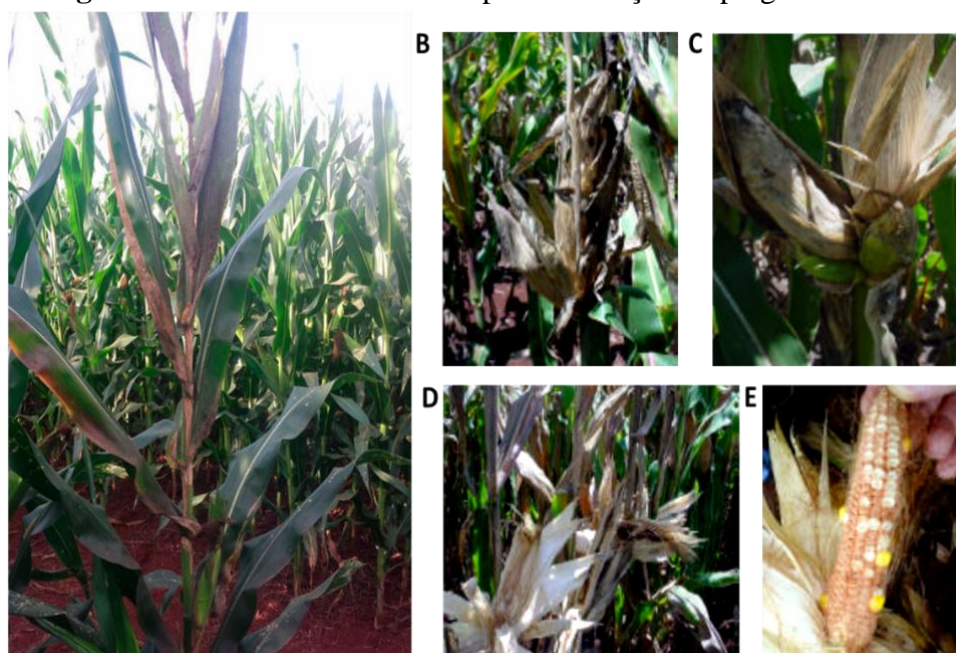
Figura 3 - Folhas de milho com sintomas de SCMV.



Fonte: Elizabeth de Oliveira - Arquivo CNPMS.

O ataque dos afídeos é dado em colônias, concentrando-se nos pendões, nas folhas, nas espigas ou no interior do cartucho. No caso de ataques de *S. graminum*, o local mais atacado são as folhas e caules, com preferência para a região do lado adaxial foliar. A resposta fisiológica da planta à infestação e os danos diretos gerados pela mesma estão associados a diversos fatores. Entre eles, pode-se citar estresse abiótico (seca principalmente), altas populações do pulgão (resultado de desequilíbrios biológicos, sobretudo desencadeados pelo alto uso de agroquímicos e a deficiência na rotatividade de técnicas de controle), efeito da saliva do inseto que possui atividade enzimática que quebra a parede celular e cloroplastos em plantas suscetíveis e o acúmulo da substância açucarada excretada pelos pulgões que pode impedir a fecundação e a dispersão do pólen. No milho, isso pode ser observado através da morte da planta, perfilhamento, atrofiamento e granação deficiente nas espigas (Figura 4) (NUESSLY e NAGATA, 2005; et al., 2006; BARROS, 2012).

Figura 4 - Sintomas ocasionados pela infestação de pulgão em milho



Fonte: Tiago Hauagge –
Arquivo Dupont Pioneer, 2016

Fonte: PEREIRA e SALVADORI, 2006.

A) Clorose nas folhas, B) Morte da planta, C) Perfilhamento de espigas, D) Atrofiamento de espigas e E) Granação deficiente.

2.3 *Bacillus thuringiensis* (Bt) e aplicações biotecnológicas

Algumas espécies de entomopatógenos foram identificadas e são amplamente utilizadas em programas de manejo integrado de pragas e agricultura sustentável. Tais agentes patogênicos correspondem a vírus, bactérias, fungos e nematóides, sendo a bactéria *Bacillus*

thuringiensis o principal microrganismo produzido comercialmente (GLARE et al., 2012).

Bacillus thuringiensis (Berliner) (Bacillaceae: Bacillales) foi originalmente isolado por Ishiwatta a partir de lepidópteros *Bombyx mori* mortos em uma infestação ocorrida no Japão, em 1902. Posteriormente, a bactéria foi isolada novamente na Alemanha a partir da lagarta *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera, Pyralidae) (DE BARJAC; BONNEFOI, 1968). Trata-se de uma bactéria aeróbica ou anaeróbica facultativa, gram-positiva, podendo ser encontrada no solo, em insetos e seus habitats, produtos armazenados, plantas, florestas e ambientes aquáticos, com o potencial de permanecer em latência no ambiente mesmo em condições desfavoráveis à sua sobrevivência (HERRNSTADT et al., 1986; HÖFTE e WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998).

Desde sua descoberta, *B. thuringiensis* tornou-se um microrganismo extremamente interessante para a agricultura devido sua potencialidade em produzir inclusões cristalinas parasporais que se formam durante a esporulação, característica esta que a diferencia de outras espécies do gênero *Bacillus ssp.* Essas inclusões são constituídas de uma ou mais proteínas de 27 a 140 kDa e apresentam atividade entomopatogênica para gama de insetos, principalmente aos pertencentes à ordem lepidóptera (DIDELOT et al., 2009).

Outras toxinas também são produzidas pelo *Bt*, como as α -exotoxina, β -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, fosfolipases, quitinases (fase de esporulação) e as VIPs (*Vegetative Insecticidal Proteins*) (fase vegetativa) (ESTRUCH et al., 1996; HANSEN e SALAMITOU, 2000). Entretanto, a inclusão proteica contida na bactéria é formada por proteínas Cry e/ou Cyt denominadas δ -endotoxinas, sendo que a composição e as estruturas das toxinas são responsáveis pela conformação do cristal, que pode ser bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico, retangular ou ainda sem forma definida. Essas proteínas se associam por meio de ligações de hidrogênio, pontes dissulfeto, hidrofobicidade e outras interações, garantindo sua estabilidade estrutural (GILL et al., 1992; HABIB e ANDRADE, 1998).

O alto grau de especificidade entre *Bt* e seus hospedeiros foi inicialmente reconhecida pela toxicidade de uma subespécie ou estirpe restrita a uma ordem específica de insetos, em particular Lepidoptera (subsp. *kurstaki*, *aizawai*), Coleoptera (*tenebrionis*) ou Diptera (*israelensis*) (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Entretanto, através da avaliação de uma infinidade de isolados em diferentes organismos e a utilização de ferramentas moleculares como sequenciamento e a clonagem de genes individuais para a expressão de proteínas heterólogas tornou possível associar uma alta afinidade entre o espectro de ação das famílias de toxinas e as ordens às quais pertencem insetos-praga e vetores de doenças (HÖFTE;

WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998; IBRAHIM et al., 2010).

Com base nas semelhanças da sequência de aminoácidos foram classificadas 75 famílias *cry* (801 genes), três famílias do gene *cyt* (40 genes) e quatro famílias do gene *vip* (140 genes) já testadas e descritas no banco de dados *online* http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ para toxinas Bt com links para informações sobre insetos hospedeiros (HÖFTE; WHITELEY, 1989; CRICKMORE et al., 2018). De uma forma geral, verifica-se que algumas famílias de genes Bt possuem maior espectro de ação para determinadas ordens, tal como Lepidoptera (*cry1*, *cry9*, *cry15*, *cry20*, *cry51*, *cry54*, *cry59* e os genes VIP), Diptera (*cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry16*, *cry17*, *cry19*, *cry24*, *cry25*, *cry27*, *cry29*, *cry30*, *cry32*, *cry39*, *cry40*, *cry44*, *cry47*, *cry48*, *cry49*, *cry52* e genes CYT) e Coleoptera (*cry3*, *cry7*, *cry8*, *cry14*, *cry18*, *cry22*, *cry23*, *cry26*, *cry28*, *cry34*, *cry35*, *cry366*, *cry37*, *cry38*, *cry43* e *cry55*). Em adição, constatou-se que genes como *cry5*, *cry6*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry21* e *cry55* apresentam toxicidade contra nematóides de plantas e animais (SALEHI JOUZANI et al., 2008; JOUZANI; VALIJANIAN; SHARAFI, 2017; RUAN et al., 2018).

A potencialidade da bactéria Bt no controle de pragas a torna o mais importante princípio ativo de pesticidas microbianos utilizados no mundo, produtos que representam uma parte importante da indústria de biopesticidas (DUNHAM, 2015). Além da sua propriedade inseticida, os formulados a base de Bt são relatados para o controle de espécies de nematóides parasitas de planta e animais, ácaros vetores de doenças (YU et al., 2014; DUNSTAND-GUZMÁN et al., 2015). Produtos deste segmento são altamente recomendados por apresentarem risco reduzido devido seu perfil toxicológico e menos requisitos de registro em comparação com pesticidas químicos, sendo o segmento de produtos de crescimento mais rápido da indústria global de biocontrole (LEAHY et al., 2014). Segundo o banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins registrados no Ministério da Agricultura, existem atualmente 19 produtos formulados à base de *B. thuringiensis* disponíveis comercialmente no país (AGROFIT, 2018). O estabelecimento de tais produtos no mercado relaciona-se estritamente com a qualidade de produção das formulações que propicia, por exemplo, uma alta eficiência, segurança e facilidade de manuseio (CERÓN, 2001).

A bactéria Bt representa uma rica fonte doadora de genes na produção de organismos geneticamente modificados. Dos 76 eventos de plantas GM aprovados no Brasil, 43 apresentam genes Bt / genes herbicidas ou somente genes Bt distribuídos nas culturas de soja (quatro eventos), milho (34 eventos), algodão (nove eventos) e cana-de-açúcar (um evento) (CTNBIO, 2017). Entretanto, principalmente pela possível evolução da resistência nas

populações de pragas alvo, torna-se cada vez mais interessante a identificação e caracterização de potentes genes a serem estaqueados em eventos GMs (CRAIG et al., 2008; JOUZANI, 2012).

Outra aplicação biotecnológica do Bt se refere à sua utilização como bactéria promotora de crescimento vegetal, uma vez que algumas estirpes podem colonizar raízes ou metabolizar substâncias que melhoram o crescimento em condições desfavoráveis de nutrientes (metabólitos como enzimas ACC deaminase, indol-3-acético, prolina e enzimas de solubilização de fosfato) (ARMADA et al., 2016).

Bacillus thuringiensis também pode ser empregado no biocontrole de fungos pela potencialidade de algumas cepas produzirem metabólitos antifúngicos, como enzimas degradantes da parede celular, lipopéptido fengicina, compostos voláteis (COV) e moléculas de sinalização indutoras de resistência sistêmica da planta ao fungo (SHRESTHA et al., 2015). Além disso, foi possível isolar e purificar a partir de diferentes subespécies de Bt em seu período de crescimento vegetativo, substâncias denominadas bacteriocinas, que podem ter potencial efeito sobre bactérias patogênicas humanas, vegetais e que estão envolvidas no processo de degradação de alimentos (DE LA FUENTE-SALCIDO; CASADOS-VÁZQUEZ; BARBOZA-CORONA, 2013).

2.4 δ -endotoxina Cry

As δ -endotoxinas possuem alta especificidade, podendo ser encontradas na forma de α -hélice e β -barril. No grupo α -hélice se inclui a toxina Cry, que possui três domínios e é codificada pelo gene *cry*. O grupo β -barril é característico da toxina Cyt e codificada pelo gene *cyt*. Ambas as toxinas, Cry e Cyt, são formadas e cristalizadas *in vivo* em pH básico e transformadas em toxinas ativas pela remoção das regiões N-terminal dos peptídeos e aproximadamente metade da proteína restante da porção C-terminal (no caso de protoxinas longas). Entretanto, as proteínas Cry e Cyt não possuem nenhuma homologia e suas respectivas toxinas interagem com receptores distintos, sendo a primeira com receptores proteína- específicos e a segunda com fosfolipídios insaturados (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomelina) (AL-YAHYAEE e ELLAR, 1995; HABIB e ANDRADE, 1998; HANSEN e SALAMITOU, 2000; PARKER e FEIL, 2005; BRAVO *et al.*, 2007).

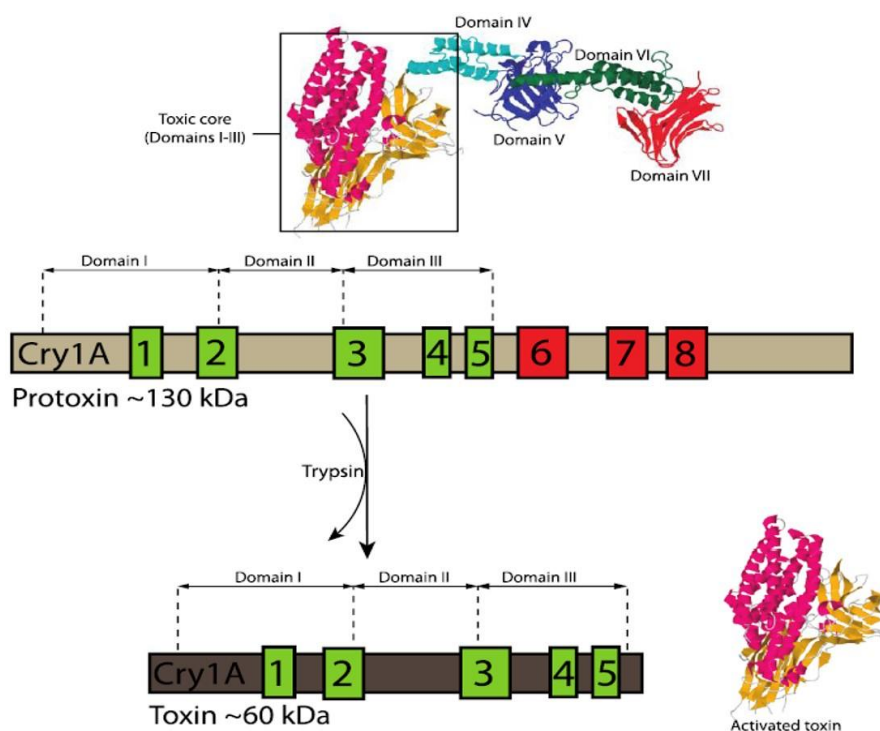
2.4.1 Estrutura

Apesar da atividade inseticida ser específica para as diferentes toxinas Cry, a estrutura 3D é a mesma entre elas e formada por três domínios. O domínio I é composto de α -hélices e está associado à oligomerização da toxina, inserção da membrana e formação de poros no

intestino do inseto. O domínio II, formado por um prisma de folhas β , está envolvido na interação entre a toxina e os receptores da borda da escova do intestino médio, uma vez que seus loops medeiam a interação entre a toxina e diferentes proteínas do hospedeiro. O domínio III é composto por um sanduíche de folhas β e tem sido implicado na estabilidade da toxina e na especificidade de ligação em alguns insetos (LI; CARROLL; ELLAR, 1991; RAJAMOCHAN et al., 1996; DE MAAGD et al., 1996; PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013; PALMA et al., 2014).

O alinhamento de sequências múltiplas de aminoácidos pertencentes a distintas proteínas Cry indicou que a maioria das sequências apresentavam cinco blocos conservados na região N-terminal, mais especificamente na região responsável pela codificação da toxina ativa (domínios I, II e III) (DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; HÖFTE; WHITELEY, 1989; KNOWLES, 1994; PALMA et al., 2014). Posteriormente foram descritos adicionalmente três blocos de aminoácidos situados fora do núcleo ativo, na extremidade C-terminal da protoxina, assim também como a descrição de quatro domínios que podem estar envolvidos no empacotamento do cristal (Figura 5). Várias protoxinas de três domínios não possuem a região C-terminal prolongada e são, em vez disso, sintetizadas como protoxinas mais curtas de aproximadamente 70 kDa (PALMA et al., 2014; SCHNEPF et al., 1998).

Figura 5: Representação da clivagem dos blocos conservados da toxina Cry.



(PALMA et al., 2014)

Representação dos blocos conservados em diferentes proteínas Cry. Em verde estão representados os blocos descritos por Höfte e Whiteley (1989). Os blocos em vermelho foram acrescentados posteriormente (SCHNEPF et al., 1998).

2.4.2 Modo de ação

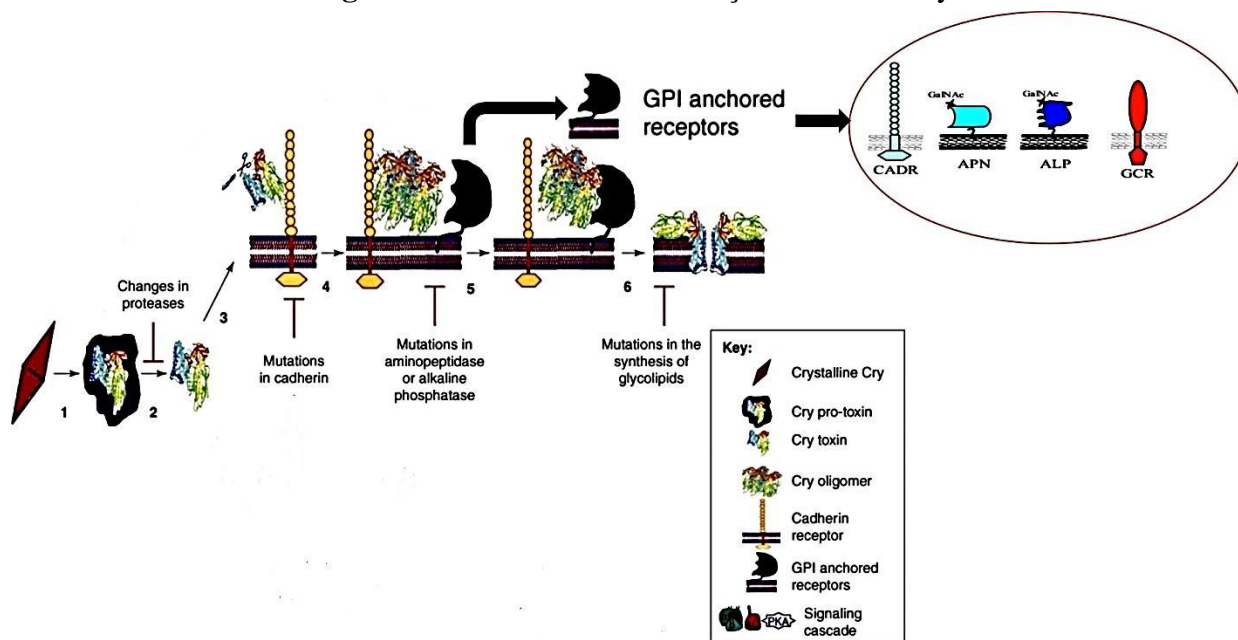
As proteínas Cry apresentam-se como protoxinas e para desencadear toxicidade no organismo alvo elas precisam ser ativadas por proteases. O conhecimento acumulado sobre a ligação da toxina com os receptores da praga foram obtidos por vários experimentos envolvendo lepidópteros. Várias etapas englobam o modo de ação dessas proteínas, iniciadas a partir do momento que o cristal e o esporo são ingeridos pelo inseto. O modelo mais completo do modo de ação propõe que as toxinas Cry passam por uma sequência de ligações com diferentes proteínas intestinais do inseto levando a oligomerização da toxina, a inserção na membrana e a formação de poros (Figura 6) (SCHNEPF et al., 1998; BRAVO et al., 2004).

Após a ingestão (passo 1), as inclusões cristalinas sofrem dissociação no intestino alcalino do inseto (pH ~9,5) através da remoção de aminoácidos nas extremidades N-terminal e C-terminal (passo 2) (BRAVO et al., 2007) e uma vez solubilizadas as protoxinas (130-140 kDa) são ativadas por proteases intestinais para obter a toxina ativa (60-70 kDa). Os segmentos proteicos tóxicos ativos são liberados no lúmen. Os receptores específicos estão localizados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino médio e entre eles estão aminopeptidase-N (APN), fosfatase alcalina (ALP), caderina, ATP membro da Subfamília de proteínas transportadoras (ABCC2) e um glicoconjugado (GCR) (ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986; KNOWLES, 1994; DE MAAGD; BRAVO; CRICKMORE, 2001; BRAVO et al., 2004; PIGOTT; ELLAR, 2007; PARDO-LOPEZ; SOBERON; BRAVO, 2013).

Propõe-se que a ligação entre a toxina e o receptor primário tipo-caderina do intestino sejam mediadas pelos domínios II e III. A ligação com a caderina causa alterações da conformação da toxina que permitem, ainda, a clivagem N-terminal da α -hélice 1 no D-I, o que faz com que a toxina perca a afinidade com a caderina e consequente dissociação entre ambas (passo 3) (GÓMEZ et al., 2002).

Em seguida a dissociação da toxina, a caderina forma um tetrâmero (também chamado de pré-poro) (passo 4). Este tetrâmero, se ligará a receptores secundários chamados de aminopeptidase (APN) ancorada ao glicosilfosfatidil-inositol (GPI), fosfatase alcalina (ALP) ancorada também a GPI e um glicoconjugado de 270 kDa, ambos localizados dentro de jangadas lipídicas. A ligação aos receptores permite a inserção do tetrâmero na membrana (passo 5). A inserção da estrutura forma um poro seletivo à íons positivos, desencadeando um desequilíbrio iônico que resulta na lise celular (passo 6) (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; GRIFFITTS et al., 2005; MARTINS et al., 2010; PACHECO et al., 2009).

Figura 6: Modelo de modo de ação da toxina Cry.



(Adaptado de BRAVO et al., 2007; BRAVO e SOBERÓN, M., 2008)

Modo de ação da toxina Cry segundo o modelo de formação de poros, destacando na parte superior os receptores secundários localizados no interior da jangada lipídica, cruciais na ligação da toxina à membrana.

Os sintomas apresentados pelo inseto após a ingestão dos cristais e esporos são: perda de apetite, rejeição ao alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente morte (ARONSON; BECKMAN; DUNN, 1986; BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007). Uma vez que as células colunares e caliciformes são destruídas, os esporos de *B. thuringiensis* e outros agentes patogênicos intestinais têm acesso a hemolinfa, desencadeando uma infecção generalizada (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007; DU; NICKERSON, 1996).

Para a efetividade do modo de ação das proteínas Bt, deve-se considerar as diferenças significativas na fisiologia do intestino e conseqüentemente uma variação na atividade proteolítica.

2.5 *Bacillus thuringiensis* (Bt) e sua aplicação em Hemípteros

Para o sucesso da utilização da toxina Cry no controle de pragas é crucial que se compreenda e caracterize as várias etapas envolvidas no processo de intoxicação, incluindo-se desde a ingestão, ligação aos receptores, solubilização até a ativação da toxina. A especificidade das toxinas está intimamente relacionada com a fisiologia intestinal e a ação das proteases da praga alvo, o que se diferencia entre as diversas ordens de insetos existentes (DE MAAGD et al., 2001). Em Lepidoptera, o aparelho bucal na sua fase larval é do tipo mastigador, e, depois de ingerida, a protoxina é solubilizada em pH alcalino (acima de 9,5)

(KNOWLES, 1994). Diferentemente, os pulgões possuem aparelho bucal sugador, o que reduz a exposição do inseto à toxina quando aplicada como um produto biológico, uma vez que pulverizadas elas permanecem na superfície foliar da planta. Além disso, sugere-se que a digestão do floema é extra-oral, com secreção de saliva contendo proteases que realizam a pré-digestão dos nutrientes antes de seguirem para o intestino (GUEDES et al., 2007; CHOUGULE e BONNING, 2012).

Outro fato a se considerar no uso do *Bt* em pulgões refere-se às especificidades das clivagens proteolíticas que ocorrem em seu intestino, o que aumenta a solubilização e a consequente ativação da toxina. De forma semelhante aos coleópteros, que apresentaram susceptibilidade à toxina Cry, o pH intestinal dos hemípteros varia de levemente ácido à neutro e apresentam cisteino-proteases da catepsina tipo L e K -cuja ativação é favorecida em pH ácido - em comparação aos lepidópteros, que apresentam serino-proteases que são acionadas em intestinos de pH alcalino (CRISTOFOLETTI et al., 2003; CRICKMORE, 2005; HERNÁNDEZ et al., 2005).

Diversos estudos foram realizados buscando o desenvolvimento de alternativas para o manejo de pragas hemípteras, empregando-se toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Em muito deles, pouco ou nenhum efeito foi observado, como no caso dos pulgões de batata (*Macrosiphum euphorbiae*) submetidos a ingestão de toxinas Cry2, Cry3 e Cry4 e *Acyrtosiphon pisum* (Harris) quando expostos às toxinas Cry1Ac e Cry3Aa (WALTERS e ENGLISH, 1995; LI et al., 2011). Entretanto, Porcar et al. (2009) obtiveram resultados que demonstraram efeito de baixa a média mortalidade das toxinas Cry3A, Cry11Aa e Cyt1Aa em afídeos *Acyrtosiphon pisum*. Neste mesmo trabalho, as proteínas foram pré-ativadas com tripsina, protease tipicamente estudada em lepidópteros. No entanto, testes utilizando a cisteino- protease para a mesma espécie de pulgão apresentaram atividade proteolítica eficiente. Nota-se, portanto, que a metodologia e todos os materiais nela utilizados são importantes fatores a serem considerados nos testes *in vivo* envolvendo pulgões (CRISTOFOLETTI et al., 2003; LI et al., 2011; CHOUGULE e BONNING, 2012).

2.6 Análise de expressão gênica

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é um dos métodos mais empregados em estudos de diversidade genética de cepas de *Bt*. Um dos limitantes na aplicação da técnica refere-se à especificidade das sequências a serem amplificadas. Iniciadores desenhados com a alteração de uma ou duas bases na extremidade 3' pode fazer com que genes fortemente relacionados não sejam detectados. Em contraste, uma substituição na extremidade 5' poderá gerar uma amplificação cruzada entre genes de uma mesma família. (PORCAR; JUÁREZ-

PÉREZ, 2003).

A detecção de expressão gênica foi, por anos, baseada em métodos como o ensaio de proteção contra RNAase (RPA), hibridização *in situ*, northern blot. Entretanto, a amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT- qPCR) surgiu como a melhor opção frente aos métodos anteriores devido sua detecção rápida, menos trabalhosa, altamente reprodutível e, principalmente, quantitativa e sensível à baixos níveis de expressão de transcritos (BUSTIN, 2010; BUSTIN et al., 2009; ESPY et al., 2006).

Os ensaios de RT-qPCR foram desenvolvidos para quantificar o mRNA alvo durante o fase exponencial da PCR. O alvo é duplicado em cada ciclo durante esta fase e a amplificação do produto é detectada pelo acúmulo do sinal fluorescente. O ciclo no qual o sinal fluorescente excede os limiares de referência é estabelecido com ciclo limite (Ct - Cycle threshold) ou ciclo de quantificação (Cq). Quanto mais rápido o limiar for atingido maior será o nível de expressão do gene alvo avaliado (ARYA et al., 2005; KHEIRELSEID et al., 2010).

O princípio de integração de PCR com fluorescência é dado pelo uso de reagentes como SYBR-Green ou sondas marcadas com fluoróforos. O SYBR-Green é altamente sensível, entretanto detecta o acúmulo de qualquer produto de ácido nucleico de dupla fita, ou seja, o SYBR- Green não é alvo-específico. A utilização de uma curva para determinar a temperatura de fusão (melting curve) baseada na porcentagem das bases citosina e guanina do alvo permite a análise de diferentes produtos amplificados e a obtenção de um pico de melting único denota que há apenas um produto amplificado e, conseqüentemente, especificidade na reação (ARIKAWA et al., 2008; ESPY et al., 2006). O ensaio conhecido como TaqMan baseia-se na utilização de uma sonda fluorescente que hibridiza na região-alvo e que, posteriormente é clivada durante a amplificação com o *primer sense*. Essa sonda é um oligonucleotídeo curto que apresenta a um fluoróforo ligado na extremidade 5' chamado de *repórter* e um composto que inibe a emissão de fluorescência do repórter e está ligado no terminal 3', conhecido como *quencher*. Para a detecção do sinal de fluorescência, a sonda deve reconhecer e se ligar primeiramente a um fragmento de DNA do interior da sequência alvo. Em seguida, ocorre a clivagem da sonda hibridizada pela enzima Taq polimerase e os fragmentos ligados ao corante repórter são deslocados do alvo. Uma vez separado do *quencher*, o *repórter* emite fluorescência característica que será detectada pelo sistema do equipamento. Esse processo se repete em todos os ciclos e a intensidade da fluorescência é aumentada na medida em que mais *amplicons* vão sendo produzidos. Ensaio utilizando sondas possuem maior especificidade quando comparado ao SYBR-Green pois, além dos *primers*, o uso da sonda permite a detecção de uma sequência pré-determinada no material

analisado (ESPY et al., 2006; BIOSYSTEMS, 2010).

Independente do ensaio utilizado, fatores como qualidade do RNA, a concentração e a qualidade do cDNA e a eficiência da reação de PCR podem influenciar valores do ciclo de quantificação (Cq ou Ct). Para reduzir erros durante a qPCR, genes de referência (*housekeeping genes*) são utilizados para a normalização de todas as amostras em análises de quantificação comparativa (VANDESOMPELE et al., 2002; BUSTIN et al., 2005). Um gene de referência deve apresentar uma expressão constitutiva e estável em diferentes amostras independentemente das condições fisiológicas em que o tratamento está submetido (LING et al., 2014; VANDESOMPELE et al., 2002).

No geral, são utilizados como genes de referência aqueles envolvidos na codificação de proteínas essenciais no metabolismo e na estrutura da célula do organismo estudado (VANDESOMPELE et al., 2002). Em caso de bactérias, o gene de referência mais utilizado é o *16s rRNA*, envolvido na estruturação dos ribossomos, estando presente em todos os procariontes e integra parte da subunidade 30S do ribossomo, sendo utilizado como ferramenta filogenética pelo fato de ser uma região conservada com algumas regiões hipervariáveis específicos à espécie (EVGUENIEVA-HACKENBERG, 2005; ROCHA; SANTOS; PACHECO, 2015). Entretanto, Rocha et al. (2015) demonstraram em um trabalho de validação de genes de referência bacterianos mais comumente testados que de 21 trabalhos avaliados, onde foi usado o gene *16s rRNA* como referência, apenas quatro estudos validaram o referido gene devido sua alta expressão nas amostras (o que diminui a confiabilidade para a normalização de níveis de expressão de transcritos muito baixos). Nesse mesmo trabalho, os genes de referência indicados foram *gyrB*, *gyrA*, *era*, *secA*, *dnaG*, *adk* e *gmk*, todos envolvidos na maioria em processos metabólicos de nucleotídeos e com 90% dos estudos em que foram utilizados houve a validação. Em trabalhos envolvendo expressão gênica de *B. thuringiensis*, Reiter et al. (2011) confirmaram a estabilidade do genes *gatB_Y-qey*, *rpsU* e *udp* ao longo de 24 horas do seu ciclo, sugerindo a utilização dos mesmos a partir dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. **SISTEMAS DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento–Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/SDA. 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/agrofit>>. Acesso em: 27 fev. 2018.
- AIMANOVA, K. G.; ZHUANG, M.; GILL, S. S. Expression of Cry1Ac cadherin receptors in insect midgut and cell lines. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 92, n. 3, p. 178-187, 2006.
- AL-YAHYAE, S. A.; ELLAR, D. J. Maximal toxicity of cloned CytA δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis requires proteolytic processing from both the N- and C-termini. **Microbiology**, v. 141, n. 12, p. 3141-3148, 1995.
- ARIKAWA, E. et al. Cross-platform comparison of SYBR® Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 328, 2008.
- ARMADA, E. et al. Native plant growth promoting bacteria *Bacillus thuringiensis* and mixed or individual mycorrhizal species improved drought tolerance and oxidative metabolism in *Lavandula dentata* plants. **Journal of plant physiology**, v. 192, p. 1–12, mar. 2016.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological reviews**, v. 50, n. 1, p. 1, 1986.
- ARYA, M. et al. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209–219, 2005.
- ASHOURI, A.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. Unexpected Effects of Different Potato Resistance Factors to the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the Potato Aphid (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology**, v. 30, n. 3, p. 524, 2001.
- BARROS, R. Quatorze Pragas do milho. Tecnologia e produção: soja e milho 2011/2012. FUNDACAO MS. Maracaju: **FUNDACAO MS**: 275-296 p. 2012.
- BIOSYSTEMS, A. Introduction to TaqMan® and SYBR® Green Chemistries for Real-Time PCR. 2010.
- BISEN, K. et al. Unrealized Potential of Seed Biopriming for Versatile Agriculture. In: RAKSHIT, A.; SINGH, H. B., et al (Ed.). Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances. New Delhi: **Springer** India, 2015. p.193-206
- BLACKMAN, R. L.; EASTOP, V. F. Aphids on the world's crops. An identification and information guide. John Wiley, 1984.
- BRAVO, A. et al. 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 (BBA) - Biomembranes**, v. 1667, n. 1, p. 38–46, 2004.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BRAVO, Alejandra; SOBERÓN, Mario. How to cope with insect resistance to Bt toxins. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573-579, 2008.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611 LP-622, 1 abr. 2009.

BUSTIN, S. A. Developments in real-time PCR research and molecular diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 6, p. 713-715, 1 set. 2010.

CÉLERES. Informativo Biotecnologia : 1º levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, safra 2016/17. 2016. Disponível em: < <http://www.celeres.com.br/1o-levantamento-de-adoacao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/> >. Acesso em: 28 fev. 2017.

CERÓN, J. A. Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis*. Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de “*Bacillus thuringiensis*” en el control integrado de plagas. **Anais**. Phytoma- España: Servicio de Publicaciones de la Universidad Pública de Navarra, 2001.

CHACKO, M. J. Book Review Aphids: Their Biology, Natural Enemies and Control Edited by A. K. Minks and P. Harrewijin. p. 312. In *World Crop Pests*, vol. 2C. W. Helle. 312 pp. Amsterdam: Elsevier, 1989. **Insect Science and Its Application**, vol.12, n.4, p493-495, 1995.

CHOUGULE, N. P.; BONNING, B. C. Toxins for Transgenic Resistance to Hemipteran Pests. **Toxins**, v. 4, n. 6, p. 405-429, 2012.

COCK, M. J. et al. The positive contribution of invertebrates to sustainable agriculture and food security. **CAB Reviews Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 7, n. 43, 2012.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira : grãos. Safra 2017/18 - Quarto levantamento. **Companhia Nacional de Abastecimento, Brasília**, v. 5, 2018.

CRAIG, W. et al. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. **Euphytica**, v. 164, n. 3, p. 853-880, 2008.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 347-350, 2005.

CRICKMORE, N. et al. ***Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature**. Disponível em: <http://www.lifescisussex.ac.uk/Home/Neil_%0ACrickmore/Bt/>. Acesso em: 28 fev. 2018.

CRISTOFOLETTI, P. T. et al. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Physiology**, v.

49, n. 1, p. 11-24, 2003.

CRUZ, I. Insetos sugadores na cultura do milho. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas-RS, v. 156, p. 20-22, 2012.

CTNBIO. COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. Tabela de Plantas - Uso Comercial). Tabela de Plantas - Uso Comercial. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial/>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 11, n. 3, p. 335–347, 1968.

DE LA FUENTE-SALCIDO, N. M.; CASADOS-VÁZQUEZ, L. E.; BARBOZA-CORONA, J. E. Bacteriocins of *Bacillus thuringiensis* can expand the potential of this bacterium to other areas rather than limit its use only as microbial insecticide. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 515–522, 20 jun. 2013.

DE MAAGD, R. A. et al. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA (b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. **Applied and Environmental 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, n. 4, p. 193–199, 2001.

DIDELOT, X. et al. Evolution of pathogenicity in the *Bacillus cereus* group. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, n. 2, p. 81–90, abr. 2009.

DU, C.; NICKERSON, K. W. *Bacillus thuringiensis* HD-73 spores have surface-localized Cry1Ac toxin: physiological and pathogenic consequences. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3722–3726, 1996.

DUNHAM, B. Microbial biopesticides: A key role in the multinational portfolio. **PRODUCTS & TRENDS**, n. Set/Out, p. 31–36, 2015.

DUNSTAND-GUZMÁN, E. et al. Acaricidal effect and histological damage induced by *Bacillus thuringiensis* protein extracts on the mite *Psoroptes cuniculi*. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 285, 2015.

ESPY, M. J. et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165–256, 1 jan. 2006.

ESTRUCH, J. J. et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

EVGUENIEVA-HACKENBERG, E. Bacterial ribosomal RNA in pieces. **Molecular**

Microbiology, v. 57, n. 2, p. 318–325, 2005.

EYHORN, F.; RONER, T.; SPECKING, H. Reducing pesticide use and risks-What action is needed? **HELVETAS Swiss Intercooperation**, 2015.

FARIA, C. A. et al. High Susceptibility of Bt Maize to Aphids Enhances the Performance of Parasitoids of Lepidopteran Pests. **PLoS ONE**, San Francisco, USA, v. 2, n. 7, 2007.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. D. **Principais doenças na cultura do milho**. EMBRAPA-CNPMS Sete Lagoas, 1997.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Aldeia Norte Passo Fundo, 1996.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 615-634, 1992.

GLARE, T. et al. Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 250–258, 19 fev. 2012.

GÓMEZ, I. et al. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS letters**, v. 513, n. 2–3, p. 242–246, 2002.

GRIFFITTS, J. S. et al. Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. **Science**, v. 307, n. 5711, p. 922–925, 2005.

GUEDES, B. A. M. et al. Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pan-Pacific Entomologist**, v. 83, n. 1, p. 66-74, 2007.

HABIB, M.; ANDRADE, C. Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba, FEALQ, 1163p. 1998.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: (Ed.). **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**: Springer, 2000. p.41-64.

HERNÁNDEZ, C. S. et al. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 88, n. 1, p. 8-16, 2005.

HERRNSTADT, C. et al. A New Strain of *Bacillus thuringiensis* with Activity Against Coleopteran Insects. **Nat Biotech**, v. 4, n. 4, p. 305-308, 1986.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242–255, 1989.

IBRAHIM, M. A. et al. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. **Bioengineered bugs**, v. 1, n. 1, p. 31–50, 2010.

INOUE-NAGATA, A. K.; NAGATA, T. Pulgões: Distribuidor de vírus. **Revista Cultivar**

HF, v. 16, p. 26-29, 2002.

ISAAA. Status Global das Cultivares Biotecnológicas Comercializadas: 2016. n. 52, p. 1–24, 2016.

JOUZANI, G. S. Risk assessment of GM crops; challenges in regulations and science. **BioSafety**, v. 1, p. e113, 2012.

JOUZANI, G. S.; VALIJANIAN, E.; SHARAFI, R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2691–2711, 2017.

KESWANI, C.; SINGH, S. P.; SINGH, H. A superstar in biocontrol enterprise: *Trichoderma* spp. **Biotech Today**, v. 3, n. 2, p. 27-30, 2013.

KHAN, A. M. et al. Wheat crop yield losses caused by the aphids infestation. **Journal of Biofertilizers & Biopesticides.**, v. 3, n. 122, 2012.

KHEIRELSEID, E. A. H. et al. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. **BMC molecular biology**, v. 11, n. 1, p. 12, 2010.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. **Advances in insect physiology**, v. 24, p. 275–308, 1994.

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 243–270, 1998.

LEAHY, J. et al. Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency. In: **Biopesticides: state of the art and future opportunities**. [s.l.] ACS Publications, 2014. p. 3–18.

LI, J.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 815, 1991.

LI, H.; CHOUGULE, N. P.; BONNING, B. C. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). **Journal of invertebrate pathology**, v. 107, n. 1, p. 69-78, 2011

LING, H. et al. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

MARTINS, É. S. et al. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 2, p. 138–145, 2010.

MELLET, M. A.; SCHOEMAN, A. S. Effect of Bt-cotton on chrysopids, ladybird beetles and their prey: aphids and whiteflies. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 6, p.554-562, 2007.

NUESSLY, G. S.; NAGATA, R. T. Greenbug, *Schizaphis graminum* (Rondani)(Insecta: Hemiptera: Aphididae). **Gainesville: University of Florida**, 2005.

NAULT, L.; BRADLEY, R. Acquisition of maize dwarf mosaic virus by the greenbug, *Schizaphis graminum*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, n. 2, p. 403-406, 1969.

PACHECO, S. et al. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 47, p. 32750–32757, 2009.

PALHARES, M. **Manejo de pragas e doenças nas culturas de milho e soja**. Simpósio Coopercitrus, 2016. Disponível em: <<http://www.coopercitrus.com.br/inscricao/>>.

PALMA, L. et al. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296, 2014.

PARDO-LOPEZ, L.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 1, p. 3–22, jan. 2013.

PARKER, M. W.; FEIL, S. C. Pore-forming protein toxins: from structure to function. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, 2005.

PEREIRA, P. R. V. D. S.; LAU, D.; SALVADORI, J. R. Pulgões em trigo. v. 132, p. 18- 21, 2010. Disponível em: http://www.grupocultivar.com.br/ativemanager/uploads/arquivos/artigos/cultivar_grandes_culturas_no_1321.pdf.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 255–281, 2007.

Pinheiro, Daniele Heloísa. Identificação do mecanismo celular de absorção de dsRNA em *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) e seleção de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas contra *Helicoverpa armigera* (Hübner) / Daniele Heloísa Pinheiro. – Lavras: UFLA, 2017. 136p.

PONCET, S. et al. Evaluation of Synergistic Interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD Toxic Components of *B. thuringiensis* subsp. israelensis Crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, n. 2, p. 131-135, 1995.

PORCAR, M.; JUÁREZ-PÉREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 5, p. 419–432, 2003.

PORCAR, M. et al. Effects of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins on the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4897-4900, 2009.

RAJAMOHAN, F. et al. Mutations at domain II, loop 3, of *Bacillus thuringiensis* CryIAa and CryIAb δ -endotoxins suggest loop 3 is involved in initial binding to lepidopteran midguts.

Journal of Biological Chemistry, v. 271, n. 41, p. 25220–25226, 1996.

REITER, L.; KOLSTØ, A.; PIEHLER, A. P. Reference genes for quantitative , reverse-transcription PCR in *Bacillus cereus* group strains throughout the bacterial life cycle. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 210–217, 2011.

ROCHA, D. J. P.; SANTOS, C. S.; PACHECO, L. G. C. Bacterial reference genes for gene expression studies by RT-qPCR: survey and analysis. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 685–693, 2015.

RUAN, L. et al. Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 341–346, 28 fev. 2018.

SALEHI JOUZANI, G. et al. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 812–822, 17 set. 2008.

SANSINENEA, E. Regulatory Issues in Commercialization of *Bacillus thuringiensis*-Based Biopesticides. In: SINGH, H. B.; SARMA, B. K., *et al* (Ed.). **Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia**. Singapore: Springer Singapore, 2016. p.69-80.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775–806, 1998.

SHRESTHA, A. et al. *Bacillus thuringiensis* C25 which is rich in cell wall degrading enzymes efficiently controls lettuce drop caused by *Sclerotinia minor*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 142, n. 3, p. 577–589, 2015.

SCHÜNEMANN, R.; KNAAK, 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**, v. 2014, 2014.

SINDIVEG. Setor de agroquímicos confirma queda de vendas em 2016. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. São Paulo. **2017**. Disponível em <http://sindiveg.org.br/wp-content/uploads/2017/06/Release-03abr2017-FINAL.pdf>. Acesso em 08 dez. 2017.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 711, p. 34–1, 2002.

WALTERS, F. S.; ENGLISH, L. H. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ - endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 77, n. 2, p. 211-216, 1995.

WILL, T.; VILCINSKAS, A. The structural sheath protein of aphids is required for phloem feeding. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 57, p. 34-40, 2015.

YAMADA, S.; OHASHI, E.; AGATA, N. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus* , Application to the Detection of *B . cereus* in Rice. v. 65, n. 4, p. 1483–1490, 1999.

YU, Z. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry6A exhibits nematocidal activity to *Caenorhabditis elegans* bre mutants and synergistic activity with Cry5B to *C. elegans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 511–519, 1 jun. 2014.

ZÜST, T.; AGRAWAL, A. A. Mechanisms and evolution of plant resistance to aphids. **Nature Plants**, v. 2, p. 15206, 2016.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

**Normas de formatação da Revista *Journal of Invertebrate Pathology*
(Versão Preliminar)**

DINÂMICA DE EXPRESSÃO DE GENES *CRY* EM CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* CAPAZES DE CONTROLAR O PULGÃO- VERDE- DOS- CEREAIS (*Schizaphis graminum*)

Raquel Oliveira Moreira ^a, Beatriz de Almeida Barros^b, Ubiraci Gome de Paula Lana^b,
Daniele Heloísa Pinheiro^c, Fernando H. Valicente ^{b*}

^a Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

^b Embrapa Milho e Sorgo, Rodovia MG 424, Sete Lagoas, MG, Brasil

^c University of Florida, Gainesville, Flórida 32611, EUA

*Autor Correspondente – fernando.valicente@embrapa.br

RESUMO

A frequência de infestação de sugadores pragas em culturas tornou-se recorrente devido aos inúmeros programas de manejo pragas, levando à redução do uso de pesticidas de amplo espectro e à falta de competição intraespecífica. Pulgões-verde-dos-cereais (*Schizaphis graminum*) são insetos que causam danos às culturas devido às respostas fisiológicas da planta à sucção do floema pelo afídeo além da potencialidade de serem vetores de vírus em plantas. Torna-se importante a busca por métodos de baixo impacto ambiental e eficientes para o controle dessa praga. *Bacillus thuringiensis* torna-se uma opção interessante devido os efeitos tóxicos que suas proteínas podem exercer sobre os insetos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil genético e molecular de linhagens de *Bacillus thuringiensis* (Bt) e seu potencial entomopatogênico para *S. graminum*. Bioensaios contra *S. graminum* foram realizados utilizando quatro linhagens elite de alta toxicidade para pragas de diferentes ordens e pertencentes à coleção de Microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo. Foram também realizadas as análises de expressão dos genes *cry* e do perfil de proteínas para cada cepa. As linhagens 1644 e 1648 apresentaram maior efeito patogênico sobre ninfas de *S. graminum* nos ensaios, com reduções da taxa de sobrevivência para 6% e 0% após 96 horas de exposição, respectivamente. nos insetos analisados. As cepas 1636 e 1641 também apresentaram toxicidade, com diminuição da taxa de sobrevivência mais lentamente. Dentre os genes *cry* analisados, nenhum gene foi expresso nas cepas 1644 e 1648, enquanto que o gene *cry2Ab* apresentou um perfil de expressão característico dos genes *cry* dependentes de esporulação na cepa 1636. A análise de proteína total das linhagens 1636, 1641 e 1644 mostrou diferentes perfis protéicos com pesos moleculares variando de 20 a 210 kDa. Não foi possível associar as proteínas de 1644 e 1648 com proteínas Cry. No entanto, no perfil mostrado pela estirpe 1636, duas bandas com 60 e 130 kDa são semelhantes às proteínas Cry2A (70 kDa) e Cry1Ac (120 kDa), respectivamente. Os resultados demonstram a

potencialidade dessas cepas como fonte de genes contra *S. graminum* além evidenciar necessidade de explorar os mecanismos de regulação para a alta expressão de proteínas Cry nesses isolados e otimizar os processos de formulação de produtos à base de *B. thuringiensis* para a agricultura.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Controle biológico. Caracterização molecular. *Schizaphis graminum*. Pulgão- verde- dos- cereais.

1. Introdução

Nos últimos anos, a intensificação de estratégias para o controle de insetos da ordem Lepidoptera na cultura do milho de forma eficiente e de baixo impacto para o meio ambiente contribuiu para a incidência de elevadas populações de pragas secundárias nas lavouras. A adoção de cultivares de milho transgênicas expressando proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) gerou como principal consequência a redução da aplicação de agroquímicos de amplo espectro de ação, o que afeta diretamente as espécies existentes no agrossistema (Catarino et al., 2015). Aliado a essa condição, apesar de alguns estudos reportarem que a tecnologia Bt não possui nenhum efeito sobre insetos não-alvo (Andow and Zwahlen, 2006; Lima et al., 2011; Pellegrino et al., 2018), alguns estudos têm demonstrado que as populações de inimigos naturais (predadores, parasitoides e patógenos) em lavouras Bts são menores quando comparadas a cultivares convencionais (Marvier et al., 2007; Naranjo, 2009). Portanto, fatores como um ambiente com baixa aplicação de inseticidas químicos, com grande número de plantas saudáveis, ausência ou diminuição de inimigos naturais e a redução na competição interespecífica com pragas-alvo são elementos chave para a proliferação de pragas secundárias que, apesar de não serem frequentes, podem desencadear altos prejuízos na rentabilidade da lavoura (Catarino et al., 2015).

Neste contexto, o ataque de sugadores a diferentes culturas em algumas regiões do Brasil tem causado grandes prejuízos aos agricultores (CRUZ, 2012; PIONEER, 2016). Dentre eles está o pulgão-verde-dos-cereais (*Schizaphis graminum*) que alimenta-se do floema de gramíneas e cereais, principalmente espécies pertencentes a família Poaceae (mais especificamente os gêneros *Agropyron*, *Avena*, *Bromus*, *Dactylis*, *Eleusina*, *Festuca*, *Hordeum*, *Lolium*, *Oryza*, *Panicum*, *Poa*, *Sorgo*, *Triticum*, e *Zea*) causando muitas vezes amarelamento e outros efeitos fitotóxicos, além de ser vetor de vírus importantes como *Sugar Cane Mosaic Virus* (SCMV) e *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) (Emden and Harrington, 2007).

Apesar de alguns trabalhos sugerirem a utilização de inimigos naturais e cultivares resistentes como estratégias que visam evitar possíveis infestações de pulgões, o manejo de *S. graminum* e outros sugadores é realizado principalmente através da utilização de inseticidas químicos, no entanto, ao longo do tempo, a seleção de indivíduos resistentes devido a pressão de seleção decorrente do intensivo uso dos inseticidas diminui sua eficácia no controle destes insetos pragas (Chougule and Bonning, 2012). Torna-se, portanto, de grande importância o desenvolvimento de métodos alternativos para o manejo dessas pragas.

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é amplamente utilizada como base para a formulação de biopesticidas devido a eficiência e especificidade das proteínas inseticidas o qual esta bactéria produz, além do custo de produção dos biopesticidas ser relativamente baixo (Dunham, 2015).

Durante a fase de esporulação o *B. thuringiensis* produz proteínas Cry e/ou Cyt que formam um corpo de inclusão na forma de cristal (Schnepf et al., 1998; de Maagd et al., 2001). Estas proteínas apresentam atividade tóxica para os insetos, geralmente sendo espécie específicas. O modo de ação das proteínas Cry é amplamente estudado e compreende uma série de eventos sequenciais que culminam na morte do inseto. Em lepidópteras, após a ingestão do cristal ocorre sua solubilização no intestino médio do inseto, posteriormente a atividade das proteases intestinais promove a clivagem da protoxina tornando-a uma toxina ativa. Uma vez ativada, a toxina torna-se apta para ligar-se aos receptores presentes na membrana das células epiteliais do intestino levando a formação de poros que causam um desequilíbrio osmótico da célula e morte do inseto (Pardo-Lopez et al., 2013; Jurat-Fuentes and Crickmore, 2016). Inúmeras proteínas Cry e Cyt têm sido descritas e classificadas em diferentes grupos baseado na homologia de suas sequências (Crickmore et al., 2018). O *B. thuringiensis* também produz durante a fase vegetativa de crescimento proteínas na matriz extracelular com atividade inseticida, denominadas proteínas Vip (Proteína Inseticida Vegetativa). Atualmente quatro grupos de proteínas Vip têm sido descritos e estas proteínas também têm sido exploradas no controle de insetos pragas pela eficiência, e por serem toxinas produzidas nas primeiras etapas do processo de crescimento das bactérias em cultura, permitindo sua obtenção antecipada. Além disso, permita-se não somente aproveitar a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de Bt, mas também o sobrenadante da cultura (de Maagd et al., 2001; Estruch et al., 1996; Jurat-fuentes and Crickmore, 2016; Pardo-López et al., 2013; Ruan et al., 2018; Schnepf et al., 1998).

A pulverização foliar do produto biológico a base do *B. thuringiensis* não apresenta nenhum efeito sobre pulgões, considerando-se que são organismos com peças bucais

perfuradoras e de sucção, que se alimentam do floema (Chougule and Bonning, 2012). Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado a mobilidade sistemática do *B. thuringiensis* no interior da planta (Monnerat et al., 2009; García-Suárez et al., 2017) . Estes estudos levantam a possibilidade de utilizar o *B. thuringiensis* no controle de insetos sugadores, portanto esta estratégia poderia potencialmente ser explorada em *S. graminum*. Além disso, o *B. thuringiensis* constitui uma fonte de genes que podem ser empregados na transformação de plantas visando o manejo desta praga, conforme apresentado em estudos em algodão e trigo geneticamente modificados onde foi possível obter efeitos deletérios para o desenvolvimento e sobrevivência de duas espécies de hemípteras (Baum et. al., 2012; Yu and Way, 2008).

No entanto, percebe-se a necessidade de melhorias nos processos que envolvem a utilização de *B. thuringiensis* no controle de afídeos, visto que os estudos de mecanismo de ação das toxinas do *B. thuringiensis* foram amplamente avaliados em lepidópteros e devem ser consideradas as peculiaridades existentes desde a ingestão da toxina até a ativação da mesma no intestino das diferentes ordens de insetos (Chougule and Bonning, 2012; Cristofolletti et al., 2003; Li et al., 2011).

Assim sendo, o estabelecimento de ensaios de patogenicidade *in vivo* de cepas de *B. thuringiensis* sobre ninfas de *S. graminum* é de suma importância como o primeiro passo em estudos visando identificar cepas e genes de *B. thuringiensis* para a possível utilização desta bactéria de forma sistêmica ou o desenvolvimento de plantas transgênicas, constituindo estratégias de manejo alternativa contra este inseto.

Utilizando-se de cepas elites do banco do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo com o intuito de explorar a aplicação das mesmas para ordens além da Lepidoptera e entender de forma mais detalhada seu perfil molecular a nível transcricional e traducional, presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil genético e molecular de linhagens de *B. thuringiensis* (Bt) e seu potencial entomopatogênico para *S. graminum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas de *B. thuringiensis*

Para a presente pesquisa foram utilizadas cepas de *B. thuringiensis* pertencentes a coleção do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo denominadas 1636, 1641, 1644, 1648, isoladas de distintas amostras de solo coletadas em várias regiões

brasileiras (Valicente and Barreto, 2003; Valicente et. al., 2010), além da cepa comercial HD1, utilizada como cepa controle. A seleção dos isolados foi baseada nos dados de alta toxicidade obtidos em pragas da ordem Lepidoptera (Valicente et. al., 2010; Pinheiro, 2017), visando ampliar sua utilização para outras ordens de insetos.

2.2 Bioensaios

2.2.1 Criação dos insetos

Pulgões da espécie *S. graminum*, em vários estágios de desenvolvimento, foram coletados em lavouras de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Vasos de milho mantidos em casa de vegetação ($28^{\circ}\text{C}\pm 2$ e fotoperíodo 12:12) foram infestados com os pulgões para manutenção da criação mantida no Laboratório de Controle Biológico a $25^{\circ}\text{C}\pm 2$ e umidade relativa de $47\pm 10\%$. Foram mantidos 10 recipientes de vidro contendo de cinco a oito folhas de milho convencional com 12 cm seccionadas a partir do ápice foliar, com a base imersa em água para conservação da turgidez das folhas. A abertura na parte superior do recipiente de vidro foi forrada com tecido tipo voil e as folhas trocadas a cada três dias (NAZARET, 2012). Para os bioensaios, trinta fêmeas adultas foram isoladas em uma gaiola com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento das ninfas após sua emergência e utilizá-las no subsequente ensaio. Isso se faz necessário porque, como o pulgão tem um ciclo de vida curto, é preciso garantir que todos os indivíduos analisados tenham a mesma idade, para que esse fator não interfira na taxa de mortalidade.

2.2.2 Suspensões de *B. thuringiensis* e sistema de alimentação *in vitro*

Alíquotas de 10 μL de cada cepa selecionada foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB acrescido dos sais MgSO_4 , FeSO_4 , ZnSO_4 e MnSO_4 (Valicente e Mourão, 2009), sendo incubadas por 16 horas a 28°C . Colônias isoladas foram então estriadas no mesmo meio e incubadas em estufa por 72 horas a 30°C . Após este período, foi confirmada a ausência de contaminação e a formação do complexo esporo-cristal através da visualização em microscópio de contraste de fases (1000x). As culturas foram coletadas e transferidas para tubos de polietileno de 15 mL contendo 10 mL de água deionizada estéril e agitadas em vórtex até homogeneização da solução.

Posteriormente, foi feita a contagem de esporos presentes nas suspensões através de Câmara de Neubauer utilizando microscopia de contraste de fases para estimar a concentração

de esporos de cada isolado no volume concentrado (Alves and Moraes, 1998). As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo alíquotas de 1 mL cada e armazenadas a -20°C para serem utilizadas nos ensaios de toxicidade.

2.2.3 Ensaios de toxicidade com *S. graminum*

Para o teste de toxicidade contra *S. graminum* foram utilizados ninfas de terceiro a quarto ínstar, isoladas conforme descrito no item 2.2.1. Foram testadas as cepas 1636, 1641, 1644, 1648 e HD1 em concentração única de 10^9 esporos/mL e o tratamento controle consistiu em solução de sacarose a 30% estéril contendo 15% de corante alimentício líquido vermelho sem a presença de bactéria.

As suspensões de esporos e cristais foram centrifugadas a $12000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de solução de sacarose a 30% estéril contendo 15% de corante alimentício líquido vermelho através de vigorosa agitação em vórtex. Câmaras de alimentação foram construídas em placas de bioensaio (2.9x1.5 cm). Ao fundo da placa foi colocado um papel filtro umedecido com gotículas de água a fim de manter a umidade na câmara montada. Na abertura da placa foram esticadas (cerca de 8x o seu tamanho original) duas membrana de Parafilm® de tamanho 2 x 2 cm, contendo 50 µL do da solução de sacarose contendo os esporos e cristais entre as mesmas, compondo uma espécie de sachê (WILLE e HARTMAN, 2008; VERDOLIN *et al.*, 2016).

A porcentagem de sobrevivência foi acompanhada ao longo dos tempos de 48h, 72h e 96h de alimentação contínua. Foram realizadas cinco repetições biológicas de 10 pulgões/repetição. A cepa com maior efeito tóxico no ensaio e as porcentagens de sobrevivência ao longo do tempo de exposição do inseto às mesmas foram analisadas submetendo os dados obtidos à análise de variâncias (ANOVA) e as médias comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott ($p > 0,05$) (Scott and Knott, 1974), com o software SISVAR® (Ferreira, 2011).

2.3 Screening de genes por PCR

Para extração do DNA genômico, as cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB por 16 h a 30°C. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL do mesmo meio e incubadas a 30°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. O DNA genômico foi extraído utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) conforme

recomendação do fabricante. As amostras de DNA genômico foram quantificadas por meio de espectrofotometria utilizando-se o equipamento Nanodrop (ND-1000 V3.1.2 - Spectrophotometer) e a integridade visualizada em gel de agarose 1%.

O conjunto de cepas utilizado já foi previamente caracterizado em um *screening* baseado em PCR feito por Pinheiro (2017) e a identidade dos fragmentos obtidos foi confirmada por sequenciamento neste trabalho. Além disso, uma caracterização adicional foi realizada utilizando-se genes descritos na literatura como eficientes para o controle de espécies de outros afídeos (Melatti et al., 2010; Porcar et al., 2009; Walters and English, 1995), como *cry4A*, *cry11A*, *cry51* e *vip3A*. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 1 e as condições de amplificação podem ser consultadas na tabela S1.

Os *amplicons* obtidos foram purificados com o kit ExoSap It PCR Product Cleanup (Affymetrix) e submetidos à reação de sequenciamento preparadas utilizando-se o BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) conforme as recomendações do fabricante. As amostras foram precipitadas e injetadas em equipamento ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). As sequências foram editadas com auxílio do programa *Sequencher 4.1.4* (Gene Codes,) e a identidade das sequências foi confirmada utilizando-se o algoritmo *blastn* e *blastp* contra banco de dados público *GenBank*.

Tabela 1- *Primers* utilizados para detecção de genes *cry* em cepas de *B. thuringiensis*

	Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referências
vip3Af	F-TATGCCATTAGGTGTCATCAGTG R-TTCCATTCACTCCGCCTGTATG	284	Pinheiro*
cry4Aa	F-TATCTTCTCCAGATGGATACGCATC R-ATTCATACCTGGAACATCTGACAAC	311	Pinheiro*
cry11a	F-TGAGGTTAGTGATGTATTTGATGCG R-GAGACACCAACATAATCCCATAAATG	471	Pinheiro*
cry51	F-AATAATAATGGCATACAGGGTGGTG R-GTAGTTGAAGTTGAAGTTGTTGTCG	236	Pinheiro*
cry51.1	F-AATAATAATGGCATACAGGGTGGTG R-CCACCTTCTGTCCAACCATTTGTAG	257	Pinheiro*
cry51.2	F-ATGATTTTTTTGCAATTTTAGATTTA R-TTAATTTGTTTTTTGGACTTGTTGG	930	Lana*
cry1B	F-CTTCATCACGATGGAGTAA R-CATAATTTGGTCGTTCTGTT	367	Ceron et al., (1994)
cry1C	F-AAAGATCTGGAACACCTTT R-CAAACCTCTAAATCCTTTCAC	130	

cry1D	F-CTGCAGCAAGCTATCCAA R-ATTTGAATTGTCAAGGCCTG	290	
cry2Ab	F-GTTATTCTTAATGCAGATGAATGGG R-TGGCGTTAACAATGGGGGGAGAAAT	201	Fagundes*

*Dados não publicados. Iniciadores desenhados para uso no Laboratório de Controle Biológico (LCB) da Embrapa Milho e Sorgo.

2.4 Análise de expressão de genes *cry* e de proteínas totais em diferentes fases de crescimento do *B. thuringiensis*

2.4.1 Culturas de *B. thuringiensis*

Com o objetivo de avaliar a expressão de genes *cry* em diferentes fases de crescimento do *B. thuringiensis*, foram selecionadas três cepas de acordo com a mortalidade verificada nos ensaios com *S. graminum*. Incluindo duas cepas com efeito de alta atividade tóxica contra *S. graminum* (1644 e 1648) e uma de menor efeito tóxico (1636).

As bactérias foram esgotadas em meio de cultura LB + Sais (Valicente et al., 2010). Uma colônia isolada de cada cepa foi pré-inoculada em 25 mL de LB + Sais e crescidas por 24 horas a 250 rpm e 30°C. Um segundo pré-inóculo foi realizado a partir de fase logarítmica, transferindo-se 25 µL da primeira cultura para *erlenmeyers* contendo 50 mL de LB + Sais e mantendo-o a 120 rpm em uma temperatura de 30°C até o alcance de uma OD₆₀₀= 1.

Foram preparadas triplicatas para cada cepa contendo 625 mL de meio LB + Sais. Cada repetição biológica recebeu 625 µL do pré-inóculo (OD₆₀₀=1). Alíquotas da cultura bacteriana foram coletadas ao longo da curva de crescimento (t= 2; 2,5; 3, 3,5; 4; 5; 6; 7; 8; 24; 48 e 72 horas).

2.4.2 Isolamento do RNA e síntese de cDNA

O isolamento de RNA das células de *B. thuringiensis* foi realizado imediatamente após a coleta das alíquotas, sendo que amostras das repetições biológicas de cada cepa foram agrupadas em cada tempo de coleta. A extração do RNA total foi realizada utilizando-se *TRIzol Reagent* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram submetidas ao tratamento com *Ambion® TURBO DNA-free™* conforme orientado pelo fabricante visando eliminar possíveis contaminações com DNA genômico. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (ND-1000 V3.1.2 - Spectrophotometer) e a integridade visualizada em gel de agarose 1,5%.

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit de transcrição *reversa High Capacity cDNA*

reverse transcriptase kit (Applied Biosystems) a partir de 1,5 µg de RNA total conforme as instruções do fabricante.

2.4.3 Análise de RT-qPCR

Para a análise de expressão, os *primers* e sondas específicos para os genes *cry1Da*, *cry2Ab* e *cry9A* foram desenhados a partir das sequências consenso de cada gene obtidas através do sequenciamento dos produtos de PCR, utilizando a ferramenta Primer Quest Tool (IDT), disponível em <https://www.idtdna.com/PrimerQuest/>. A especificidade de cada ensaio foi verificada com o Primer Blast (NCBI) e somente ensaios específicos para os genes de interesse foram sintetizados (Tabela 2).

Tabela 2- *Primers* utilizados para análise de expressão de genes *cry* nas cepas de *B. thuringiensis*

Nome do oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')
cry1Da_4F	TGCATAACGTGCCAGACTATC
cry1Da_4R	GCAGCAAGCTATCCAACCT
cry1Da_Probe	AGCTGCTGAAAGTGCTATAATTAGAAGTCC
cry2Ab_5F	CAAGGGTTAATTACAGTGGAGGA
cry2Ab_5R	TGTCAAATGGCGTTAACAATGG
cry2Ab_Probe	TCGTCTGGTGATATAGGTGCATCTCCG
cry9A_1F	TATGGAGTGAATAGGGCGGTA
cry9A_1R	GGGTTATCTATCCCAGTTGTTTCG
cry9A_Probe	ACGGATCTTTGAGAACCTTCACTCGC
gatB_Yqey_F	AGCTGGTCGTGAAGACCTTG
gatB_Yqey_R	CGGCATAACAGCAGTCATCA
gatB_Yqey_Probe	AAGCGCATATTTGCCGGAGCAATT
rpsU_F	AAGATCGGTTTCTAAAAGTGGTACA
rpsU_R	TTTCTTGCCGCTTCAGATTT
rpsU_Probe	AAACTCGCGCTTTCTTGCTTCAGC
udp_F	ACTAGAGAACTTGGAAATGATCG
udp_R	GACGCTTAATTGCACGGAAC
udp_Probe	ACTTATGACAGCTCACCGTCGTGA

Os ensaios desenhados foram validados, a partir de DNA genômico e cDNA, em uma curva padrão de quatro pontos com fator de diluição de 1:10 e três réplicas técnicas. As eficiências das reações foram calculadas utilizando-se o valor de *slope* e R^2 obtidas da reta ajustada a partir da curva padrão para cada gene testado.

As reações de qPCR, tanto para validação quanto para análise de expressão, foram preparadas em um volume final de 10 μ L utilizando-se *TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems), e ensaio contendo primers (1 nmol cada) e sonda (0,5 nmol) e cDNA ou DNA genômico. As reações foram conduzidas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) nas condições *standard* indicadas pelo fabricante do equipamento. Para a validação dos ensaios, as curvas padrão foram feitas a partir de um pool de DNA genômico (30 ng) ou de cDNA (150 ng) das três cepas analisadas. Para as análises de expressão, foram utilizados 150 ng de cDNA de cada cepa isoladamente.

O gene *rpsU* foi utilizado como gene de referência (Reiter et al., 2011) e os primers descritos foram convertidos em ensaio TaqMan utilizando os mesmos softwares descritos anteriormente. A expressão relativa dos genes *cry* nas amostras biológicas foi estimada usando o método $\Delta\Delta C_t$ (Schmittgen and Livak, 2001).

2.5 Análise de proteínas totais

Alíquotas de 10 mL das culturas bacterianas foram utilizadas na extração de proteínas utilizando o reagente *BugBuster*[®] *Master Mix* (Novagen), seguindo as recomendações do fabricante para extrações em pequenas escalas (utilização de 1,5mL de cultura). As proteínas obtidas a partir do sobrenadante e dos corpos de inclusão solubilizados foram quantificadas com Protein Assay (Bio Rad) pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A integridade e massa molecular das proteínas foi visualizada em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE). Alíquotas contendo 20 μ g diluídos em um volume final de 20 μ L das proteínas foram misturadas com tampão *Bolt*TM *LDS Sample Buffer* 1X (Invitrogen) e *Bolt Samples Reducing Agent* (Invitrogen), aquecidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas em gel Bolt 4-12%[®] Bis-Tris Plus BoltTM utilizando tampão de eletroforese MES SDS (Invitrogen), conforme as orientações do fabricante. A massa molecular das proteínas foi determinada utilizando-se o marcador de massa molecular Pre-Stained SeeBlue[®] Plus2 Standard (Invitrogen).

4. Resultados

4.1 Ensaios de toxicidade com *S. graminum*

A toxicidade das diferentes cepas de *B. thuringiensis* foi avaliada por meio de ensaios *in vivo* contra *S. graminum*. A sucção da solução de sacarose contendo corante alimentício e esporos/cristais das cepas bacterianas foi constatada através da visualização do tubo digestivo com a tonalidade avermelhada devido a adição do corante alimentício (Fig. 1).

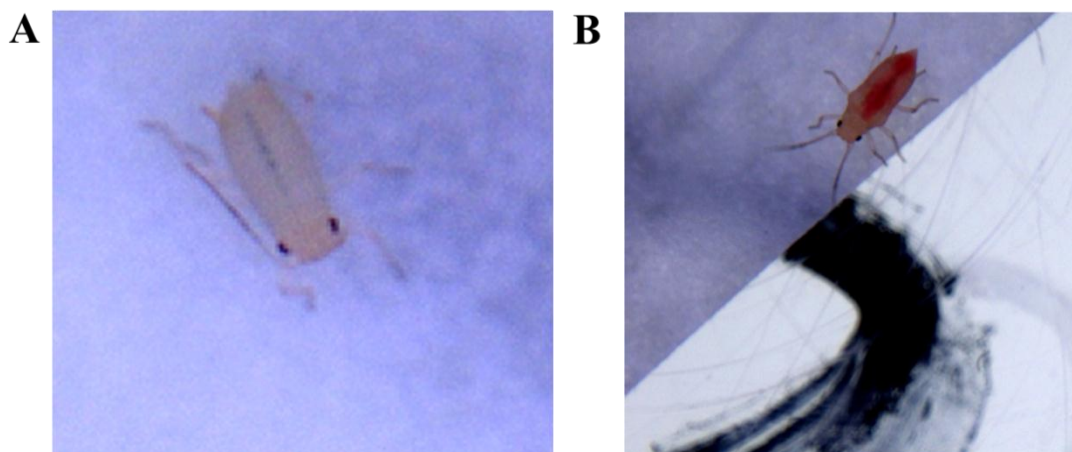


Fig. 1. *S. graminum* testado em bioensaio para avaliação da toxicidade de *B. thuringiensis*. Pulgão no t=0h de exposição à dieta artificial de solução de sacarose a 30% + corante alimentício a 15%. (A) e após 48h de exposição à dieta (B). A sucção foi confirmada pela coloração avermelhada do trato digestivo devido à adição do corante à solução de sacarose.

Ao final dos ensaios foram calculadas as médias das porcentagens de sobrevivência dos pulgões de todos os tratamentos. As cepas 1644 e 1648 apresentaram as maiores toxicidades contra os pulgões, reduzindo significativamente as porcentagens de sobrevivência para valores de 6% e 0%, respectivamente. As cepas 1636 e 1641 também foram efetivas para o controle do *S. graminum*, apresentando uma taxa de sobrevivência maior que as anteriores (18% e 28%, respectivamente), mas com diferenças significativas em relação ao controle. Somente a cepa HD1 apresentou porcentagem de sobrevivência estatisticamente igual ao controle (Fig. 2).

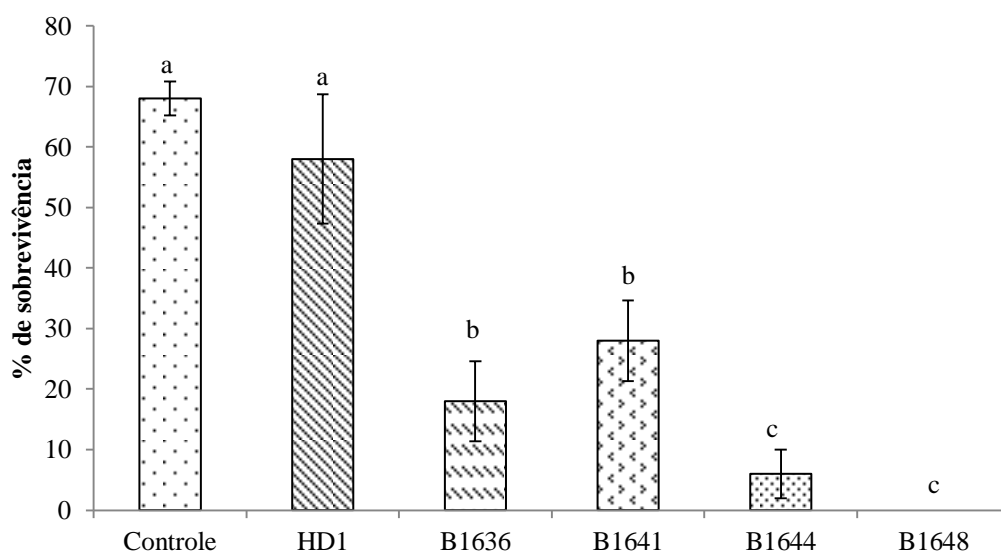


Fig. 2. Valores médio da porcentagem de sobrevivência de ninfas de *S. graminum* após exposição a diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Os tratamentos correspondem às concentrações de 10^9 esporos/mL das cepas 1636, 1641, 1644, 1648 e HD1. Solução de sacarose a 30% + corante

alimentício a 15% foi utilizado como controle negativo. Os valores representados se referem à porcentagem média dos pulgões vivos em cada tratamento obtidos ao final do bioensaio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$) e as barras sobre as colunas representam o erro padrão médio.

A porcentagem de sobrevivência dos pulgões também foi analisada ao longo do tempo (48h, 72h e 96h) após a exposição dos mesmos aos tratamentos (Fig. 3). As cepas 1636 e 1641 apresentaram porcentagem de sobrevivência semelhante ao controle na avaliação de 48h com valores entre 68% a 86%. Entretanto, nos demais tempos, as porcentagens de sobrevivência foram diferencialmente significativas, aproximando aos 20% para a cepa 1636 no tempo de 96h (Fig. 3A e 3B). As cepas 1644 e 1648 mostraram reduções na porcentagem de sobrevivência significativas em relação ao controle nos três tempos avaliados. A porcentagem de sobrevivência dos pulgões tratados com a cepa 1644 foram 18%, 6% e 6% nos tempos de 48h, 72h e 96h, respectivamente (Fig. 3C). Enquanto que os pulgões tratados com cepa 1648 apresentaram 18,5%, 4% e 0% de sobrevivência nos tempos de 48h, 72h e 96 h, respectivamente (Fig. 3D). A cepa HD1 não apresentou diferenças significativas em relação ao controle nos três tempos (sobrevivência de 86%, 72% e 58%) (Fig. 3E).

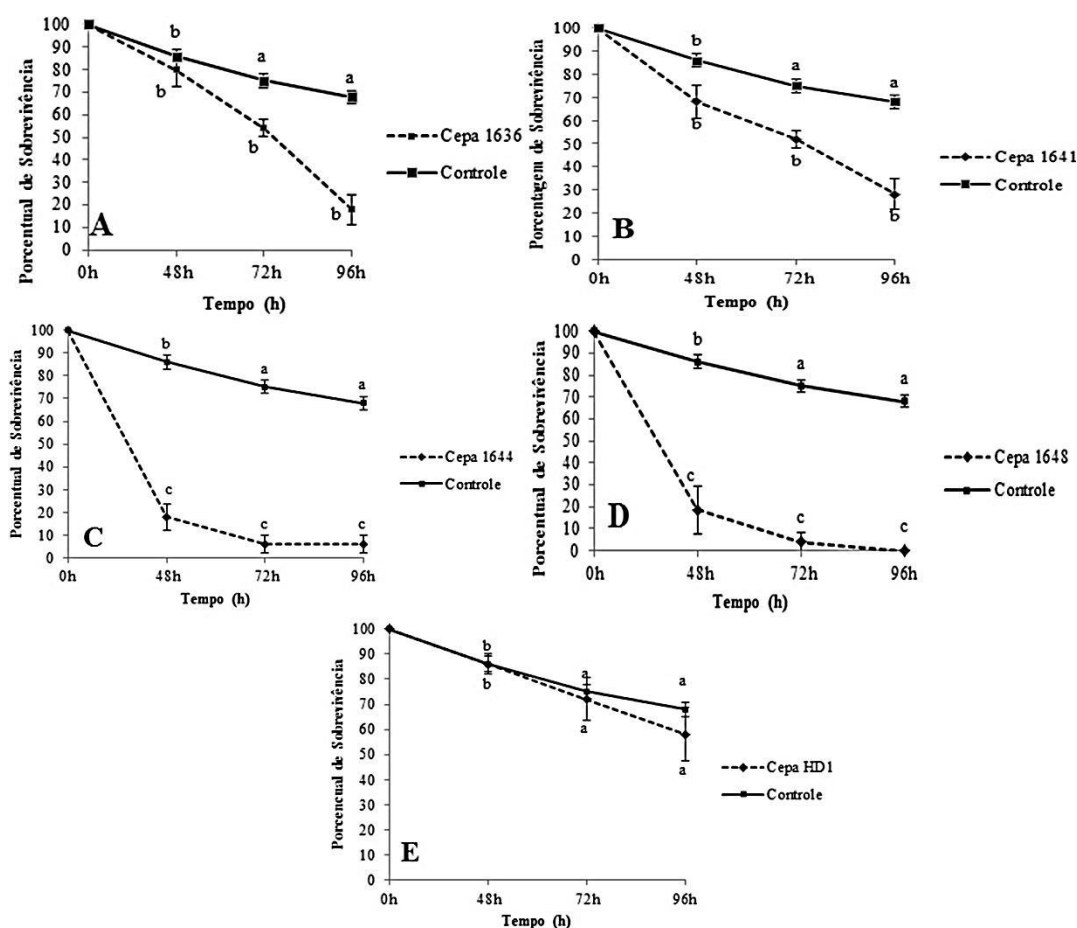


Fig. 3. Valores do percentual de sobrevivência de *S. graminum* após quatro dias de exposição às diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Os tratamentos correspondem às concentrações de 10^9 esporos/mL das cepas 1636 (A), 1641 (B), 1644 (C), 1648 (D), HD1 (E). Solução de sacarose a 30% + corante alimentício a 15% foram utilizadas como controle negativo. A sobrevivência foi avaliada nos tempos de 48h, 72h e 96h após submeter os insetos ao sistema de alimentação *in vitro*. Os pontos de dados representam a sobrevivência média de todas as réplicas e as barras representam o erro padrão médio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

4.2 Screening de genes *cry* e *vip* por PCR

A presença de genes *cry* e *vip* nas cepas 1636, 1641, 1644, 1648 e HD1 testadas contra *S. graminum* foi avaliada por PCR. Na caracterização molecular utilizando *primers* para os genes *cry4A*, *cry11A*, *cry51* e *vip3A*, apenas o gene *vip3A* foi amplificado em todas as cepas (Fig. 4) e confirmado por sequenciamento apresentando 100% de similaridade com sequências de genes *vip3A* depositadas no *GenBank* (NCBI). Embora tenha sido observado amplificação de um fragmento no tamanho esperado nas reações de PCR com os *primers* para o gene *cry11A* em todas as cepas avaliadas e para o gene *cry4Aa* nas cepas 1636 e 1641, os resultados do sequenciamento demonstraram que os fragmentos amplificados não correspondem aos genes em questão. Não foi observado produto de amplificação nas reações realizadas com o *primer cry51.2* em nenhuma das cepas avaliadas. Embora tenha sido observada amplificação nas reações utilizando o *primer cry51*, os fragmentos não apresentaram o tamanho esperado e os resultados de sequenciamento confirmaram que os fragmentos amplificados não correspondem ao gene *cry51*.

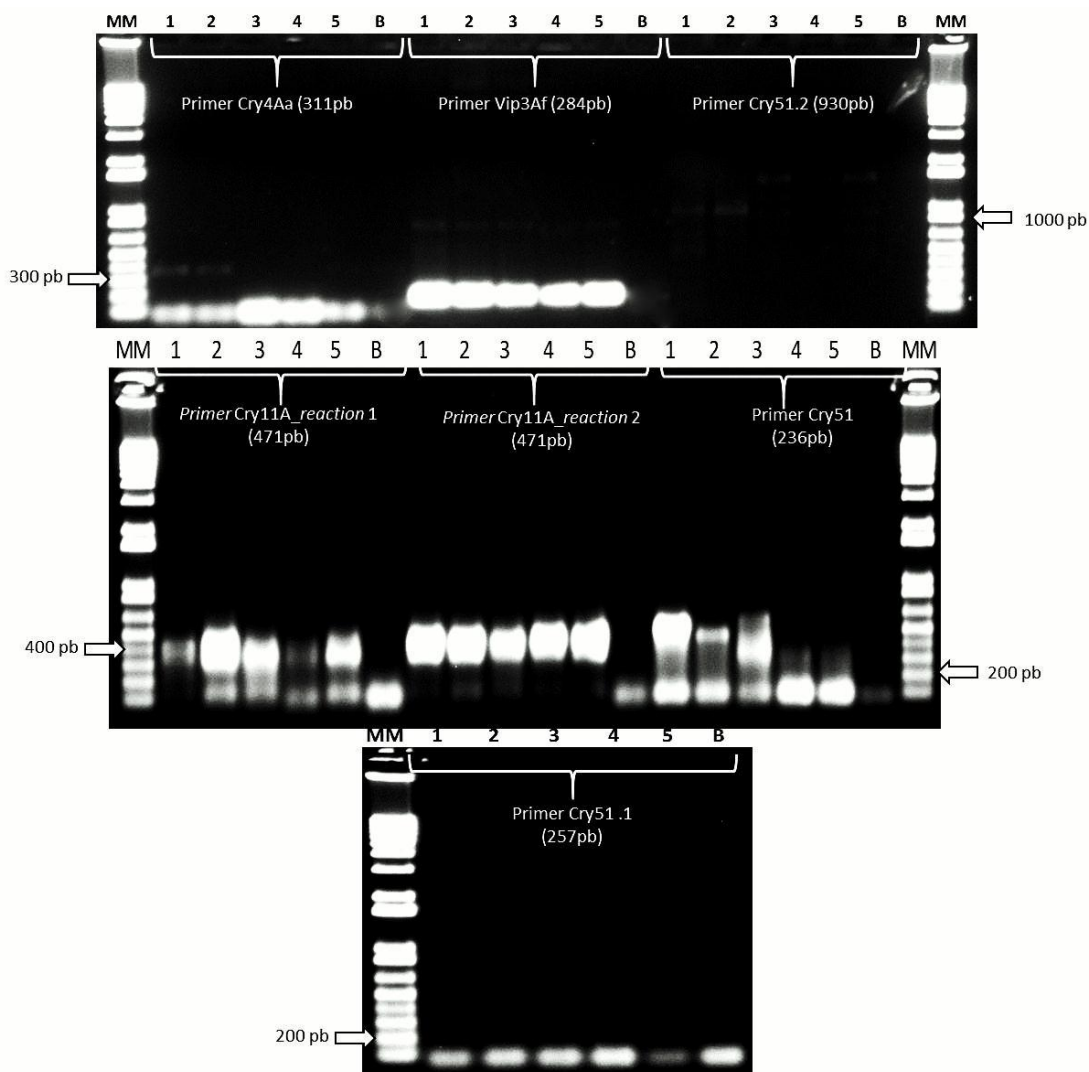


Fig. 4. Produtos de PCR obtidos com o DNA extraídos das cepas de *B. thuringiensis*. As cepas denominadas 1636, 1641, 1644, 1648 e HD1 estão enumeradas de 1 a 5, respectivamente. Reação em *touchdown* para os genes *cry11A*, *cry51* e *cry51.1* e perfil único de ciclagem para os genes *cry4A* e *vip3A* (especificações na tabela S1). MM refere-se ao marcador molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen) e B corresponde ao controle negativo da reação. Eletroferese em gel de agarose 1,2%.

Para confirmação por sequenciamento, os DNAs das cepas que apresentaram maior toxicidade para *S. graminum*, 1644 e 1648, foram reamplificados com os *primers* referentes aos genes *cry1B*, *cry1C*, *cry1D* e *cry2Ab*, todos comuns às duas cepas conforme caracterização inicial feita por Pinheiro (2011). Foi possível obter os produtos de PCR com os fragmentos de tamanhos esperados para os genes *cry1C*, *cry1D* e *cry2Ab* e suas identidades foram confirmadas. Para o gene *cry1B*, foi obtido um amplicon do tamanho esperado para a cepa 1648 e um menor (367 pb) para a cepa 1644 (Fig. 5). O sequenciamento da amostra da cepa 1648 revelou inespecificidade enquanto que o da cepa 1644 apontou 97% de similaridade com

o gene *cry9A*.

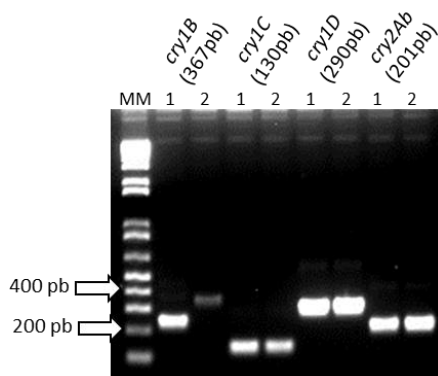


Fig. 5. Amplificação com *primers* *cry*-específicos. Purificação de gel a partir da PCR com genes *cry1B*, *cry1C*, *cry1D* e *cry1Ab* nas amostras 1644 (1) e 1648 (2). Os produtos de amplificação apresentaram fragmentos de tamanhos esperados em quase todas as reações, com exceção para os *primers*-específicos do gene *cry1B* que apresentou produto menor que 367pb para a cepa 1644. MM= Marcador 1Kb Plus (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100V.

4.3 Análise de expressão de genes *cry* e de proteínas totais em diferentes fases de crescimento do *B. thuringiensis*

As cepas 1636, 1644 e 1648 foram cultivadas em meio de cultura e o crescimento bacteriano foi monitorado através da medição da densidade óptica a 600nm. As transições entre as fases foram muito semelhantes entre as três cepas, com a fase logarítma iniciada entre 3,5h e 4h após a inoculação e o alcance da OD₆₀₀ máxima em 8h. Os tempos de cultivo das amostras para a análise de expressão foram selecionados de acordo com a OD₆₀₀ correspondente às fases inicial, logarítma e estacionária do crescimento de cada cepa. Para a cepa 1636 foram utilizados os tempos 3,5h (OD₆₀₀=0,08), 5h (OD₆₀₀=0,5), 6h (OD₆₀₀=0,9), 7h (OD₆₀₀= 1,25), 8h (OD₆₀₀=1,43), 48h (OD₆₀₀=1,36); para a cepa 1644 foram analisados os transcritos referentes aos pontos 3,5h (OD₆₀₀=0,09), 6h (OD₆₀₀=0,87), 8h (OD₆₀₀=1,47) e 48h (OD₆₀₀=1,32) e a na cepa 1648 selecionou-se os tempos 2,5h (OD₆₀₀=0,041), 5h (OD₆₀₀=0,9), 8h (OD₆₀₀=1,4), 48h (OD₆₀₀=1,32) (Fig. 6).

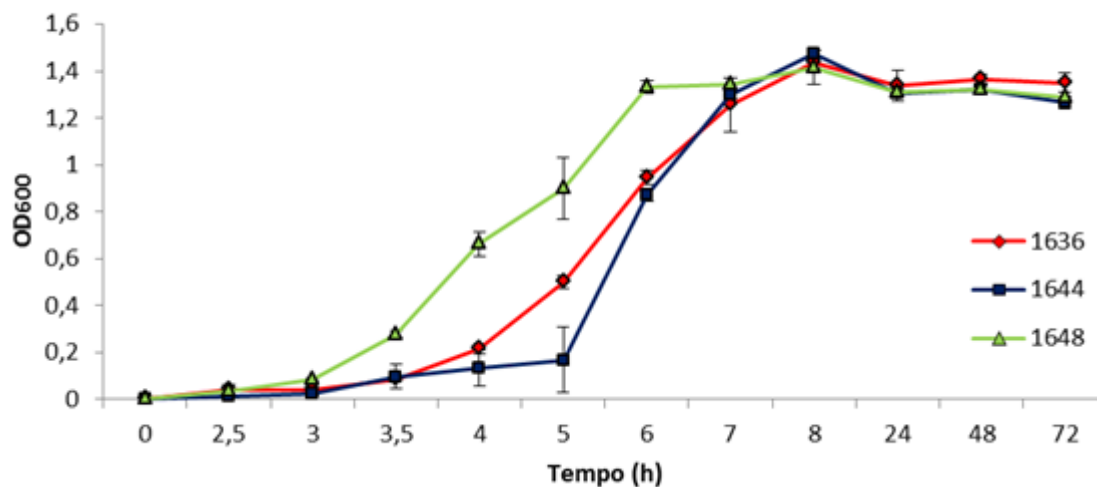


Fig. 6. Densidade óptica das cepas 1636, 1644 e 1648 de *B. thuringiensis* em diferentes fases de crescimento. Barras de erro representam o desvio padrão das médias entre as repetições biológicas.

Para avaliar a dinâmica de expressão de genes *cry* ao longo do crescimento da cultura, foram selecionados o gene *cry2Ab*, comum às três cepas; *cry1Da* presentes nas cepas 1644 e 1648; e *cry9A* específico da cepa 1644. Com base na curva de crescimento determinada através da medição da densidade óptica, foram selecionados diferentes tempos de coleta da cultura bacteriana para análises da expressão gênica que correspondem à fase inicial, exponencial e estacionária de crescimento das cepas de *B. thuringiensis*.

Inicialmente, os ensaios realizados foram validados utilizando-se DNA genômico em uma curva padrão e as eficiências obtidas para cada ensaio foram 86% ($R^2 = 0,990$) para *rpsU*, 91% ($R^2 = 0,994$) para *udp*, 91% ($R^2 = 0,996$) para *cry2Ab* e 87% ($R^2 = 0,997$) para *cry1Da*. O ensaio desenhado para o gene *cry9A*, apesar de amplificar no DNA genômico da cepa 1644, apresentou baixa eficiência de reação e não foi utilizado para as análises de expressão gênica.

O RNA total das três cepas foi submetido a análises de RT-qPCR para a quantificação de mRNAs correspondentes aos genes *cry2Ab* e *cry1Da* nos tempos descritos anteriormente para cada cepa. Não foi possível detectar expressão de nenhum dos genes avaliados nas cepas 1644 e 1648. No entanto, foi possível observar a expressão do gene *cry2Ab* na cepa 1636 em todos tempos avaliados (3,5h, 5h, 6h, 7h, 8h e 48h), sendo que a expressão apresentou um aumento gradativo ao longo do tempo, com uma expressão bem discreta nas fases iniciais e alcançando níveis substancialmente maiores em 48h (Figura 7). Como já previsto, a expressão do gene *cry1Da* não foi detectada na cepa 1636 já que esse gene não está presente no DNA genômico dessa cepa.

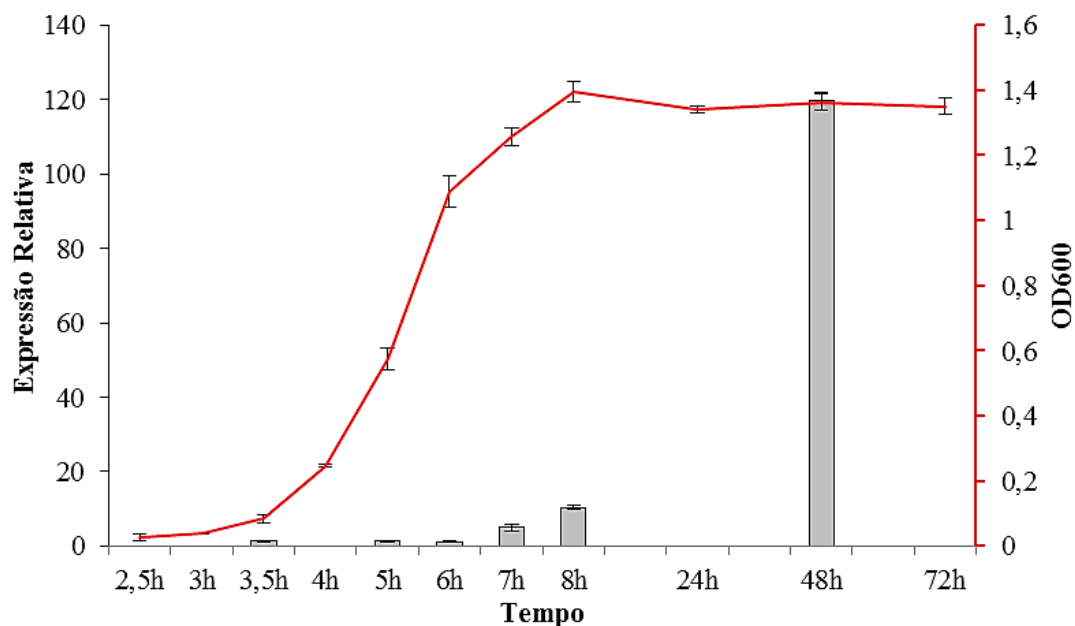


Fig. 7. Análise de expressão do gene *cry2Ab* ao longo do crescimento da cepa 1636. A cepa apresenta um baixo número de cópias para o gene *cry2Ab* no início do seu ciclo celular, alcançando uma expressão substancialmente maiores na fase estacionária (48h). Barras de erro representam o desvio padrão das médias da quantificação relativa entre as repetições técnicas.

A análise de proteínas totais evidenciou que as cepas 1636, 1641 e 1644 apresentaram perfis proteicos diferentes, com massas moleculares variando de 20 a 210 kDa aproximadamente (dados não mostrados). O perfil apresentado pelas cepas 1644 e 1648 não mostrou variação ao longo do tempo nem um padrão que pudesse ser associado a proteínas Cry. No entanto, no perfil apresentado pela cepa 1636, duas bandas de aproximadamente, 60 e 130 kDa apresentaram intensidade aumentada no final da fase estacionária e, embora uma confirmação seja necessária, têm pesos moleculares compatíveis com proteínas Cry (Fig. 8).

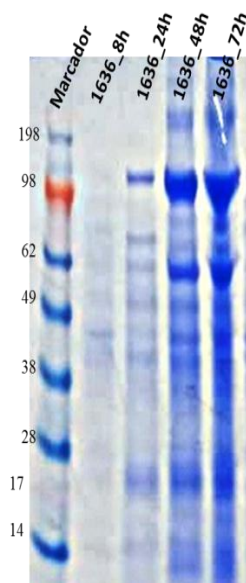


Fig. 8: Perfil proteico da cepa 1636 de *B. thuringiensis*. SDS-PAGE das proteínas totais insolúveis obtidas após 8h, 24h, 48h e 72h de cultivo. Marcador: SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (Invitrogen).

5 Discussão

S. graminum é considerado um importante inseto praga de várias culturas incluindo milho, sorgo e trigo causando importantes perdas econômicas. O controle desse inseto tem sido realizado principalmente através da aplicação de inseticidas sintéticos, contudo, a seleção de indivíduos resistentes decorrentes do uso dos inseticidas e seus efeitos nocivos aos organismos não alvos e ao ambiente impulsionam o desenvolvimento de estratégias alternativas para o controle desta praga.

Neste estudo, nós avaliamos a toxicidade de cepas de *B. thuringiensis* capazes de controlar *S. graminum* e analisamos a expressão de genes *cry* presentes nessas cepas. Nossos dados demonstram que as cepas avaliadas - 1636, 1641, 1644 e 1648 causaram, embora em diferentes níveis, significativas reduções na sobrevivência das ninfas de *S. graminum*, evidenciando seu alto potencial para o sua utilização no manejo dos pulgões. Como era esperado, a cepa comercial HD1, utilizada como controle negativo, não apresentou toxicidade para *S. graminum* visto que esta cepa possui genes que expressam proteínas conhecidas por serem efetivas contra lepidópteros. Como as proteínas do *B. thuringiensis* normalmente apresentam especificidade à nível de ordem e até mesmo de espécie seria pouco provável que a cepa HD1 fosse eficiente contra este pulgão (Dulmage, 1970; Palma, 2014).

Embora tenha sido observado 32% de mortalidade dos pulgões do tratamento controle (dieta sem adição de Bt), este valor foi baixo quando comparado a outros trabalhos envolvendo sugadores (Li et al., 2011; Pietri and Liang, 2017; Walters and English, 1995; Zhao et al., 2016). De maneira geral, essa taxa de mortalidade pode ser explicada pela sensibilidade das ninfas à manipulação e exposição à dieta artificial durante os ensaios. Ainda assim, os dados obtidos após 72 h apontam que as cepas 1636, 1641, 1644 e 1648 apresentaram um efeito negativo sobre a sobrevivência das ninfas, já que as porcentagens de sobrevivência dos pulgões tratados com estas cepas foram significativamente inferiores àquela observada no controle. Além disso, o comportamento e fenótipo dos insetos após os ensaios foram semelhantes aos observados em outra espécie de afídeo, *Myzus persicae*, após serem alimentados com *B. thuringiensis* (Torres-Quintero et al., 2015). E, finalmente, insetos dos tratamentos contendo suspensões de cristais e esporos, em geral, apresentaram sinais típicos da intoxicação proveniente da ingestão de toxinas Bt como menor locomoção e a alteração da cor verde para marrom enquanto que ninfas do tratamento controle, com a alimentação confirmada pela presença do corante, permaneceram em constante movimento e não apresentaram qualquer mudança de sua coloração natural durante as primeiras 48 h.

Balbione (2011) testando a patogenicidade de cepas de *B. thuringiensis* para espécie *Diaphorina citri* Kuwayama em sistema de alimentação *in vitro*, obteve 82% de mortalidade após 96h de avaliação. Em um estudo com *M. persicae*, a toxicidade do complexo de esporos e cristais provenientes de 40 cepas de *B. thuringiensis* foi testada e 15 cepas foram patogênicas nas concentrações testadas de 10 ng/ μ l e 100 ng/ μ l, com porcentagem de mortalidade $\geq 60\%$ (Torres-quintero et al., 2016). As CL_{50} das cinco cepas mais tóxicas foram avaliadas e mostraram valores entre 10.63 a 6.88 ng/ μ l. A determinação da CL_{50} a partir do complexo esporos-cristais, como foi realizado por Torres-quintero et al. (2016) permite indicar com mais confiabilidade a eficiência de uma cepa em relação à outra. Assim, a determinação da CL_{50} das cepas 1636, 1641, 1644 e 1648 para *S. graminum* se faz necessária.

Vários estudos visando avaliar a toxicidade de diferentes concentrações de proteínas Cry e Vip recombinantes têm sido realizados em pulgões. Baixa a moderada toxicidade foram identificadas oferecendo-se proteínas Cry3A, Cry4Aa e Cry11Aa para o pulgão *Acyrtosiphon pisum* (Porcar et al., 2009) e alta toxicidade para Cry41Aa1, Cry41Ab1 (parasporinas), Vip1A e Vip2A (proteínas binárias) contra e *Aphis gossypii* (Sattar and Maiti, 2011). Ainda assim, a caracterização de novas cepas e genes representa uma ferramenta importante no desenvolvimento de estratégias de manejo desses insetos. Para isso, a determinação de quais genes *cry* e/ou *vip* a cepa de *B. thuringiensis* apresenta, além da

caracterização da expressão gênica e proteica é essencial para compreender a toxicidade do isolado contra o inseto alvo. A presença dos genes *cry4A*, *cry11A*, *cry5I* e *vip3A*, que têm demonstrado ser efetivos contra algumas espécies de hemípteras ou que sua aplicação ainda necessita ser explorada, foram avaliados neste estudo. Contudo, obteve-se amplificação apenas do gene *vip3A* em todas as cepas testadas, inclusive nas de menor patogenicidade. Para confirmação por sequenciamento, os DNAs das cepas 1644 e 1648 foram reavaliados com relação aos genes *cry1B*, *cry1C*, *cry1D* e *cry2Ab*, todos comuns às duas cepas conforme caracterização inicial feita por Pinheiro (2011). A presença dos genes *cry1C*, *cry1D* e *cry2Ab* foram confirmadas, mas os primers para o gene *cry1B* se revelaram inespecíficos para as duas cepas, embora o fragmento amplificado a partir da cepa 1644 apontou 97% de similaridade com o gene *cry9A*. Essa inespecificidade demonstra a imprecisão de caracterizações moleculares baseadas apenas em PCR. Como o advento das ferramentas de sequenciamento de segunda geração, o sequenciamento de todo o genoma bacteriano tem-se mostrado uma ferramenta poderosa para uma caracterização molecular mais robusta e precisa de cepas de *B. thuringiensis*.

A análise de expressão foi realizada para os genes *cry1Da* e *cry2Ab* ao longo do crescimento das três cepas. Nenhuma expressão foi detectada nas cepas 1644 e 1648, enquanto o gene *cry2Ab* foi induzido no final da fase exponencial (7 h) na cepa 1636, alcançando os níveis substancialmente maiores no final da fase estacionária e durante o período de esporulação. O perfil de proteínas totais foi correlacionado com o de expressão gênica, sendo que somente a cepa 1636 apresentou bandas que podem ser correlacionadas com proteínas Cry. A banda de 60 kDa tem peso semelhante a da proteína Cry2A (70 kDa) enquanto que a proteína de pouco mais de 100 kDa é compatível com a proteína codificada pelo gene *cry1Ac*. Embora a expressão desse último gene não tenha sido avaliada nesse trabalho, ele foi detectado nessa cepa de acordo com a caracterização realizada por Pinheiro (2011). No entanto, essa associação precisa ser confirmada por meio de técnicas de hibridização, como Western Blotting.

Analisados em conjunto esses resultados sugerem que a transcrição desses genes se inicia algumas horas antes da produção dos cristais proteicos e estão de acordo com o encontrado por Porcar et al. (2014) em um trabalho que analisou a expressão de genes *cry1* e *cry2* em diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Esse perfil de expressão é característico de várias toxinas inseticidas que são sintetizadas durante a fase estacionária e se acumulam na célula mãe como um cristal que pode representar até 25% do peso seco das células esporuladas (Agaisse e Lereclus, 1995). Em *B. thuringiensis*, dois diferentes mecanismos

regulam a expressão dos genes *cry*. O primeiro envolve a transcrição dependente de fatores σ esporulação-específicos enquanto o segundo mecanismo é independente de esporulação e os genes são expressos durante a fase estacionária, mas em menor extensão durante o crescimento vegetativo (Agaisse e Lereclus, 1995; Porcar et al., 2014). Os genes *cry2A* (Agaisse e Lereclus, 1995) e *cryIAc* (Bravo et al., 1996) são classificados como dependentes de esporulação, no entanto uma menor expressão do gene *cry2Ab* pode ser detectada no final da fase exponencial (7H) (Poncet et al., 1997; Yang et al., 2012; Porcar et al., 2014). Estudos prévios encontraram resultados semelhantes e isso sugere que o início da transcrição no fim da fase exponencial dos chamados genes *cry* dependentes de esporulação é um evento comum entre cepas de *B. thuringiensis* (Porcar et al., 2014). Ainda assim, os picos máximos de expressão ocorrem nos tempos de 48 e 72h quando se dá início ao processo de esporulação. Além disso, essa produção massiva de proteínas ocupa, presumivelmente, uma grande parte da maquinaria celular (Agaisse e Lereclus, 1995) o que faz com que poucos genes *cry* possam ser transcritos simultaneamente.

Embora as cepas 1636, 1641, 1644 e 1648 tenham se mostrado efetivas para controlar *S. graminum*, uma abordagem interessante que poderá futuramente ser avaliada é a capacidade de translocação destas bactérias no interior das principais espécies de plantas atacadas por este pulgão e sua capacidade de controlá-lo usando este sistema. Outro ponto importante é que estudos mais aprofundados serão necessários para investigar quais proteínas especificamente são responsáveis por causar a mortalidade dos insetos. O fato de não ter sido possível detectar expressão dos genes *cry* avaliados nas cepas de maior toxicidade destaca a importância da análise de expressão como ferramenta para caracterização molecular e levanta a possibilidade de que outras proteínas, e não apenas Cry, possam estar envolvidas em processos capazes de controlar insetos. Analisados juntos, esses resultados são importantes para a avaliação da efetividade e aplicabilidade *Bacillus thuringiensis* no desenvolvimento de uma estratégia de manejo sustentável de *S. graminum* no campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, S.B., Moraes, S.A., 1998. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos, in: Controle Microbiano de Insetos PP - Piracicaba. FEALQ.

Andow, D.A., Zwahlen, C., 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. Ecol. Lett. 9, 196–214. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00846>.

Baum, J.A.; Sukuru, U.R.; Penn, S.R.; Meyer, S.E.; Subbarao, S.; Shi, X.; Flasiniski, S.; Heck, G.R.; Brown, R.S.; Clark, T.L., 2012. Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus*

thuringiensis crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *J. Econ. Entomol.*, 105, 616–624. <https://doi.org/10.1603/EC11207>.

Bravo, A., Agaisse, H., Salamiou, S., & Lereclus, D. 1996 Analysis of *cryIAa* expression in sigE and sigK mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 250, 734–741.

Catarino, R., Ceddia, G., Areal, F.J., Park, J., 2015. The impact of secondary pests on *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. *Plant Biotechnol. J.* 13, 601–612. <https://doi.org/10.1111/pbi.12363>.

Ceron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., Bravo, A., 1994. PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 353–356.

Chougule, N.P., Bonning, B.C., 2012. Toxins for Transgenic Resistance to Hemipteran Pests. *Toxins (Basel)*. 4, 405.

Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., Zeigler, D.R., 2018. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature [WWW Document]. URL http://www.lifescisussex.ac.uk/Home/Neil_%0ACrickmore/Bt/ (accessed 2.28.18).

Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y., Terra, W.R., 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* 49, 11–24. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00222-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00222-6)

CRUZ, I., 2012. Insetos sugadores na cultura do milho. *Cultiv. Gd. Cult.* 156, 20–22.

de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17, 193–199. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02237-5)

Dunham, B., 2015. Microbial biopesticides: A key role in the multinational portfolio. *P R O D U C T S T R E N D S* 31–36.

Dulmage HT. 1970. Insecticidal activity of HD1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesi. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 232–239. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(70\)90240-5](https://doi.org/10.1016/0022-2011(70)90240-5).

Emden, H.F. van, Harrington, R., 2007. *Aphids as Crop Pests*. London, UK, London, UK.

Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G., 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5389–5394.

Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

García-Suárez, R., Verduzco-Rosas, L.A., Rincón-Castro, D., Délano-Frier, J.P., Ibarra, J.E.,

2017. Translocation of *Bacillus thuringiensis* in Phaseolus vulgaris tissues and vertical transmission in Arabidopsis thaliana. J. Appl. Microbiol. 122, 1092–1100.

Jurat-fuentes, J.L., Crickmore, N., 2016. Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: insights from their mode of action. J. Invertebr. Pathol. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.018>.

Li, H., Chougule, N.P., Bonning, B.C., 2011. Interaction of the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins Cry1Ac and Cry3Aa with the gut of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). J. Invertebr. Pathol. 107, 69–78. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.001>.

Lima, M.A.P., Pires, C.S.S., Guedes, R.N.C., Nakasu, E.Y.T., Lara, M.S., Fontes, E.M.G., Sujii, E.R., Dias, S.C., Campos, L.A.O., 2011. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee J. Appl. Entomol. 135, 415–422. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01573>.

Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C., Comi, G., 2003. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. Int. J. Food Microbiol. 81, 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00222-2).

Marvier, M., McCreedy, C., Regetz, J., Kareiva, P., 2007. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. Science (80-.). 316, 1475–1477. <https://doi.org/10.1126/science.1139208>.

Melatti, V.M., Praça, L.B., Martins, E.S., Sujii, E., Berry, C., Monnerat, R.G., 2010. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Bacillus thuringiensis* 5, 1–4.

Monnerat, R.G., Soares, C.M., Capdeville, G., Jones, G., Martins, É.S., Praça, L., Cordeiro, B.A., Braz, S.V., Dos Santos, R.C., Berry, C., 2009. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. Microb. Biotechnol. 2, 512–520. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00116>.

Naranjo, S., 2009. Impacts of Bt crops on non-target invertebrates and insecticide use patterns. CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour. 4. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20094011>.

NAZARET, A.M., 2012. Aspectos biológicos de *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856) (Hemiptera: Aphididae) em diferentes hospedeiros. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Águas de Lindóia. Diversidade e inovações na era dos transgênicos: resumos expandidos. Campinas: Instituto Agrônômico; Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2012.

Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A., 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol. Rev. 37, 3–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00341>.

Pellegrino, E., Bedini, S., Nuti, M., Ercoli, L., 2018. Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: A meta-analysis of 21 years of field data. Sci. Rep. 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21284-2>

Pietri, J.E., Liang, D., 2017. Virulence of entomopathogenic bacteria in the bed bug, *Cimex lectularius*. *J. Invertebr. Pathol.* 151, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.10.004>

Pinheiro, D.H., 2017. Identificação do mecanismo celular de absorção de dsRNA em *Diabrotica virgifera virgifera* (LeConte) e seleção de cepas de *Bacillus thuringiensis* TÓXICAS contra *Helicoverpa armigera* (Hübner).

Porcar, M., Grenier, A.-M., Federici, B., Rahbe, Y., 2009. Effects of *Bacillus thuringiensis* - Endotoxins on the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4897–4900. <https://doi.org/10.1128/AEM.00686-09>.

Porcar, M., Délecluse, A., Ibarra, J. E., & Juárez-Pérez, V. 2014. Early transcription of *Bacillus thuringiensis cry* genes in strains active on Lepidopteran species and the role of gene content on their expression. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 1007-1015. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0160-1>

Ruan, L., Crickmore, N., Peng, D., Sun, M., 2018. Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? *Trends Microbiol.* 23, 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.011>.

Sattar, S., Maiti, M.K., 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 937–946. <https://doi.org/10.4014/jmb.1105.05030>.

Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nat. Protoc.* 3, 1101. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25, 402-408.

Scott, A.J., Knott, M., 1974. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* 30, 507. <https://doi.org/10.2307/2529204>.

Torres-quintero, M.C., Arenas-sosa, I., Hernández-, V.M., 2016. Characterization of *Bacillus thuringiensis* (Bacillaceae) strains pathogenic to *Myzus persicae* (Hemiptera : Aphididae). *Florida Entomol.* 99, 639–643. <https://doi.org/10.1653/024.099.0409>.

Torres-Quintero, M.C., Peña-Chora, G., Hernández-Velázquez, V.M., Arenas-Sosa, I., 2015. Signs of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) Infection in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae): Koch's Postulates. *Florida Entomol.* 98, 799–802. <https://doi.org/10.1653/024.098.0264>.

Valicente, F.H., Barreto, M.R., 2003. *Bacillus thuringiensis* survey in Brazil: geographical distribution and insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae). *Neotrop. Entomol.* 32, 639–644.

Valicente, F.H., de Toledo Picoli, E.A., de Vasconcelos, M.J.V., Carneiro, N.P., Carneiro, A.A., Guimarães, C.T., Lana, U.G., 2010. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cry1* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm,

Spodoptera frugiperda. Biol. Control 53, 360–366.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.003>

Verdolin, A. L. M. et al., 2016. Avaliação da tecnologia do RNA interferente (RNAi) para controle de *Rhopalosiphum maidis* e *Schizaphis graminum em milho*. Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 31, Bento Gonçalves. Milho e sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar: anais. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo.

Walters, F.S., English, L.H., 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. Entomol. Exp. Appl. 77, 211–216. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb02003>.

Wille, B. D.; Hartman, G. L., 2008. Evaluation of Artificial Diets for Rearing *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae). J. of Econ. Entomology, 01, 4, 1228-1232. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[1228:EOADFR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[1228:EOADFR]2.0.CO;2).

Yang, H., Wang, P., Peng, Q., Rong, R., Liu, C., Lereclus, D., & Huang, D. 2012. Weak transcription of the *cryIAc* gene in nonsporulating *Bacillus thuringiensis* cells. Applied and environmental microbiology, 78, 6466-6474. <https://doi.org/10.1128/AEM.01229-12>.

Yu, Y.; Wei, Z.M., 2008. Increased oriental armyworm and aphid resistance in transgenic wheat stably expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoxin and *Pinellia ternate* agglutinin (PTA). Plant. Cell. Tiss. Org. , 94, 33–44. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9384-y>.

Zhao, Y., Zhang, S., Luo, J.Y., Wang, C.Y., Lv, L.M., Wang, X.P., Cui, J.J., Lei, C.L., 2016. Bt proteins Cry1Ah and Cry2Ab do not affect cotton aphid *Aphis gossypii* and ladybeetle *Propylea japonica*. Sci. Rep. 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep20368>

<i>Primers</i>	COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO (1X)	PERFIL DE CICLAGEM
vip3Af	10ng de DNA genômico 0,5 µl de cada primer (10mM) 2,0 µl Buffer A (10x) 2,0 10X Buffer A 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM) 1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems)	94°C – 5'(1x); 94°C-1', 58°C-1', 72°C-1' (35x); 72°C-10' (1x) 10°C- ∞
Cry4Aa	10 ng de DNA genômico 0,5 µl de cada primer (10mM) 2,0 µl Buffer A (10x) 2,0 10X Buffer A 1,0 µL de dNTPs 2,5 mM, 1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems)	94°C – 5'(1x); 94°C-1', 58°C-1', 72°C-1' (30x); 72°C-10' (1x) 10°C- ∞
cry11a	10ng de DNA genômico Mix 1: 0,5 µl primer(10mM) F 0,2 µl primer R (10mM) Mix 2: 0,2 µl primer F (10mM) 0,5 µl primer R (10mM) 2,0 µl Buffer A (10x) 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM) 1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems)	94°C – 2'(1x); 94°C –15'', 65 a 58°C–20'', 72°C–20'' (8x); 94°C –15'', 58°C–30'', 72°C–30'' (32x); 72°C-3'(1x) 10°C- ∞
cry51	10 ng de DNA genômico 0,5 µl de cada primer (10mM) 5 µl de cada primer (10mM) 2,0 µl Buffer A (10x) 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM) 1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems)	94°C – 2'(1x); 94°C –15'', 65 a 58°C–20'', 72°C–20'' (8x); 94°C –15'', 58°C–30'', 72°C–30'' (32x); 72°C-3'(1x) 10°C- ∞
cry51.1	10 ng de DNA genômico 0,3 µl de cada primer (10mM) 5 µl de cada primer (10mM) 2,0 µl Buffer A (10x) 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM) 1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems)	94°C – 2'(1x); 94°C –20'', 60 a 53°C–20'', 72°C–20'' (8x); 94°C –20'', 53°C–20'', 72°C–20'' (32x); 72°C-3'(1x) 10°C- ∞
cry51.2	10 ng DNA genômico 0,5 µl de cada primer (10mM) 2,0 µl Buffer A (10x) 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM) 1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems) Continua	94°C – 5'(1x); 94°C-1', 50°C-1', 72°C-1' (35x); 72°C-10' (1x) 10°C- ∞

cry1B	30 ng de DNA genômico 1,0 µl de cada primer (10mM) 5 µl de cada primer (10mM)	94°C – 5'(1x);
cry1C	2,0 µl Buffer A (10x) 1,0 µL de dNTPs (2,5 mM)	94°C-1', 50°C-1', 72°C-1' (35x); 72°C-10' (1x)
cry1D	1 U de enzima Taq polimerase (KAPA Biosystems)	10°C- ∞
cry2Ab		

Conclusão