



DANIELE HELOÍSA PINHEIRO

**Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da
borda escovada da membrana apical (BBMVs) do
intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea
saccharalis* e avaliação do tempo de cultivo sobre a
produção de β -exotoxina em isolados de *Bacillus
thuringiensis***

**LAVRAS – MG
2013**

DANIELE HELOÍSA PINHEIRO

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY1A COM AS VESÍCULAS DA
BORDA ESCOVADA DA MEMBRANA APICAL (BBMV)s DO
INTESTINO MÉDIO DE *Spodoptera frugiperda* E *Diatraea saccharalis* E
AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE β -
EXOTOXINA EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente

Coorientador

Prof. Dr. Luciano Vilela Paiva

LAVRAS – MG

2013

Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da

Biblioteca da UFLA

Pinheiro, Daniele Heloisa.

Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana (BBMV's) do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina em isolados de *Bacillus thuringiensis* / Daniele Heloisa Pinheiro. – Lavras : UFLA, 2013.

125 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Fernando Hercos Valicente.

Bibliografia.

1. Bactérias entomopatogênicas. 2. δ -endotoxinas. 3. Lagarta-do-cartucho. 4. Broca do colmo. 5. Thuringiensina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.62

DANIELE HELOÍSA PINHEIRO

**INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS CRY1A COM AS VESÍCULAS DA
BORDA ESCOVADA DA MEMBRANA APICAL (BBMVs) DO
INTESTINO MÉDIO DE *Spodoptera frugiperda* E *Diatraea saccharalis* E
AVALIAÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE β -
EXOTOXINA EM ISOLADOS DE *Bacillus thuringiensis*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biologia Molecular, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 19 de abril de 2013.

Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes

EMBRAPA CENARGEN

Andréa Almeida Carneiro

EMBRAPA MILHO E SORGO

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
(Orientador)

LAVRAS – MG
2013

À Deus,

*por me abençoar com tantas oportunidades, por estar sempre ao meu
lado e por não me deixar desistir apesar de todas dificuldades e
momentos difíceis,*

OFEREÇO

Aos meus pais, Sandra e Tarley,

*por todo amor e por não medirem esforços para que eu pudesse
realizar mais este sonho,*

DEDICO

Ao meus queridos irmãos Douglas e Daniel

*por sempre acreditarem em mim, pelo carinho, apoio, incentivo e
palavras amigas,*

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida e por permitir que este sonho se tornasse realidade.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de estudo.

À Embrapa Milho e Sorgo e Embrapa Cenargen pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Ao Dr. Fernando Hercos Valicente pela orientação, confiança, oportunidade, apoio, paciência e pelos valiosos ensinamentos.

À Dra. Rose Monnerat por aceitar participar da banca de defesa e por disponibilizar seu laboratório para que eu realizasse este trabalho.

Ao Dr. Ubirací Gomes de Paula Lana pelas informações e por aceitar o convite para membro suplente na banca de defesa.

À Dra. Andréa Carneiro Almeida pela disponibilidade, aceitando prontamente o convite para membro da banca.

À toda equipe do NBA por se disponibilizarem a me ajudar quando precisei em especial à Meire e Bia.

Ao Dr. Márcio Roberto Silva por realizar as análises estatísticas e pela prontidão em me ajudar e sanar todas dúvidas.

À Dra. Érica Martins por me ajudar com os experimentos, pelos valiosos ensinamentos e pela paciência em esclarecer todas as dúvidas.

A todo pessoal do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas do Cenargen, Clara, Fernanda, Flávia, Lílian, Luísa, Marcelo, Elias, Zezinho, Paulo em especial à Carla, Cris e Lunalva, por me receberem

tão bem, pela disponibilidade em ajudar em tudo que precisei e por toda torcida.

À Mayara, Andréia, Valquíria, Carla e Marla pela amizade, palavras de incentivo, convívio e bons momentos de descontração.

Às minhas queridas amigas Márcia, Marlúcia, Lorena, Rosane e ao meu padrinho Márcio dos quais tenho grande admiração e são para mim um exemplo a ser seguido e mesmo estando longe sempre me incentivaram e torceram por mim. Agradeço pela amizade sincera e pelas palavras amigas nos momentos que mais precisei.

Aos colegas do Laboratório de Controle Biológico, André, Arthur, Mário, Thaís, Nate, Celso, Kátia em especial à Camila, Donald e Jéssika pela ajuda e participação direta na realização deste trabalho.

À toda minha família, em especial aos meus queridos irmãos, que sempre torceram por mim.

Aos meus pais pelo amor incondicional e por fazerem o possível e impossível para que eu realizasse mais este sonho.

Muito Obrigada!

... Sonhe com aquilo que você quiser.

*Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.*

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.

Dificuldades para fazê-la forte.

Tristeza para fazê-la humana.

E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes

não têm as melhores coisas.

Elas sabem fazer o melhor

das oportunidades que aparecem

em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.

Para aqueles que se machucam.

Para aqueles que buscam e tentam sempre.

E para aqueles que reconhecem

a importância das pessoas que passam por suas vidas...

Clarice Lispector

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria entomopatogênica capaz de sintetizar diferentes toxinas, tais como δ -endotoxinas com atividade tóxica específica para insetos e β -exotoxina. Esta bactéria é amplamente utilizada no controle biológico de pragas e em várias cultivares geneticamente modificadas através da expressão dos genes das δ -endotoxinas que permitem as plantas tornarem-se tolerantes ao ataque de insetos. Com isto vários eventos de milho transgênicos vêm sendo desenvolvidos, visando o controle de insetos-pragas como *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis*, consideradas importantes pragas desta cultura. Este estudo teve por objetivo analisar a interação das proteínas inseticidas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac com os sítios de ligação do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* e detectar a síntese de β -exotoxina em cepas de *B. thuringiensis* com potencial de serem utilizadas na formulação de biopestida e avaliar o efeito do tempo de cultivo sobre a produção desta toxina. Para o primeiro trabalho as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac expressas separadamente em cepas recombinantes de *B. thuringiensis* foram extraídas, solubilizadas, tripsinadas e marcadas com biotina. As preparações de BBMV's foram extraídas a partir do intestino médio retirado de lagartas do terceiro estágio. Para realizar os estudos de ligação e competição foram realizadas incubações com a toxina biotilada e preparações de BBMV's na ausência ou presença de um competidor. Os resultados demonstraram que todas proteínas testadas são capazes de se ligar aos receptores do intestino médio das lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*. Não foi verificada competição entre as proteínas pelos receptores de ambas pragas, exceto as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac que compartilham o mesmo receptor em *D. saccharalis*. Também foi observado que possivelmente haja sinergismo entre Cry1Ab e Cry1Ac em *S. frugiperda*. Para o segundo trabalho, o sobrenadante foi coletado de cepas de *B. thuringiensis* cultivadas durante 48, 72, 96, 120 e 144 horas, autoclavado, filtrado e testado contra lagartas de *S. frugiperda* através de bioensaios. A análise de 30 cepas de *B. thuringiensis* demonstrou que 4 cepas (13,3%) apresentaram sobrenadantes tóxicos para *S. frugiperda* e portando produzem β -exotoxina. Nas cepas que foram positivas para a presença de β -

exotoxina incluindo os controles positivos, foi verificado que o tempo de cultivo exerce influência sobre a produção deste metabólito além disso o tempo de cultivo no qual é detectada a síntese da toxina é dependente da cepa visto que foi observado um pico de produção de β -exotoxina a partir de 48, 96 e 144 horas de cultivo, de acordo com os valores da mortalidade e peso médio apresentados pelas lagartas de *S. frugiperda* nestes tempos de cultivo.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, proteínas Cry, β -exotoxina, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*, BBMV's.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an entomopathogenic bacterium able to produce various toxins such as insects specific δ -endotoxins and β -exotoxin. This bacterium is widely used in biological control of pest and various cultivars genetically modified through expression of δ -endotoxin genes that allow plants to become tolerant to insect attack. Many events of transgenic corn have been developed aiming to control insects such as *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis*, important pests of this crop. This study aimed to analyze the interaction of insecticidal proteins Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac with larval midgut binding sites of *S. frugiperda* and *D. saccharalis* through binding and competition assays. In addition, it sought to detect the synthesis of β -exotoxin in strains of *B. thuringiensis* with potential use in formulating biopesticide and assess the effect of culture time on production of this toxin. For the first study proteins Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac expressed separately in recombinant strains of *B. thuringiensis* were extracted, solubilized, trypsinized and labeled with biotin. The BBMVs preparations were obtained from midgut extracted third instar larvae. Binding and competition studies were performed through incubation biotinylated toxin and BBMVs preparations in the absence or presence of a competitor. The results showed that all proteins tested are able to bind to midgut receptors larvae of *S. frugiperda* and *D. saccharalis*. The heterologous competition assay didn't show competition between proteins for the binding site in both pests, except Cry1Aa and Cry1Ac proteins that share the same receptor in *D. saccharalis*. Also was observed possibly there is synergism between Cry1Ab and Cry1Ac in *S. frugiperda*. For the second study, the supernatant was collected strains of *B. thuringiensis* grown for 48, 72, 96, 120 and 144 hours, autoclaved, filtered and tested against larvae of *S. frugiperda* by bioassays. The analysis of 30 strains of *B. thuringiensis* showed that supernatants of 4 strains (13,3%) were toxic to *S. frugiperda*. Also was observed in the strains which were positive for the presence of β -exotoxin including positive controls, that cultivation time influences the production this metabolite in addition the cultivation time at which is detected the synthesis of the toxin is dependent strain wear that was observed a peak production of β -exotoxin from 48, 96 and 144 hours of culture, according with the values of mortality and weight presented by the larvae of *S. frugiperda* these times of cultivation.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, Cry proteins, β -exotoxin, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*, BBMV.s.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	<i>Zea mays</i> x <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	18
2.2	<i>Bacillus thuringiensis</i>	20
2.3	δ -endotoxinas (Cry e Cyt).....	23
2.4	Estrutura das proteínas Cry.....	25
2.5	Modo de ação das proteínas Cry.....	28
2.5.1	Solubilização.....	29
2.5.2	União aos receptores.....	32
2.6	Aplicações das toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> na agricultura.....	38
2.7	β -exotoxina.....	44
3	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO 2 Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) do intestino médio de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	66
	RESUMO	66
	ABSTRAT	68
1	INTRODUÇÃO	69
2	MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1	Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Diatraea saccharalis</i>	71
2.2	Extração, purificação e solubilização das proteínas.....	71
2.3	Ativação das proteínas com tripsina.....	73
2.4	Biotinilação das proteínas.....	74
2.5	Extração das “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMVs).....	75
2.6	Ensaio de ligação.....	76
2.7	Ensaio de competição.....	77
2.8	Bioensaio com as proteínas purificadas.....	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1	Purificação e solubilização das proteínas.....	79
3.2	Ativação das proteínas com tripsina.....	80
3.3	Biotinilação das proteínas.....	82

3.4	Ensaio de ligação.....	83
3.5	Ensaio de competição.....	86
3.6	Ensaio de toxicidade com as proteínas purificadas.....	92
4	CONCLUSÕES.....	96
5	PERSPECTIVAS.....	97
6	REFERÊNCIAS.....	98
	CAPÍTULO 3 Avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β-exotoxina em isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i>.....	108
	RESUMO.....	108
	ABSTRAT.....	110
1	INTRODUÇÃO.....	111
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	113
2.1	Cepas bacterianas.....	113
2.2	Cultivo dos isolados bacterianos.....	113
2.3	Bioensaios.....	114
2.4	Análise estatística.....	115
2.5	Extração de DNA.....	115
2.6	Caracterização molecular.....	116
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
3.1	Identificação das cepas produtoras de β -exotoxina e caracterização molecular.....	118
3.2	Influência do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina.....	121
4	CONCLUSÕES.....	129
5	PERSPECTIVAS.....	130
6	REFERÊNCIAS.....	131

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva que produz durante a fase de esporulação inclusões cristalinas geralmente compostas de diferentes δ -endotoxinas conhecidas como proteínas Cry e Cyt (DE MAAGD et al., 2003). Estas toxinas são ativas contra diversas ordens de insetos como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera (VAN FRANKENHUYZEN, 2009) e também alguns nematóides (SCHNEPF et al., 1998).

Devido à alta eficiência na redução da quantidade da praga alvo, especificidade além de não possuir efeito poluente ao meio ambiente (BRAVO et al., 2007) a utilização dos inseticidas microbianos como substitutos aos produtos químicos tem se tornado uma alternativa viável para o controle de insetos-pragas das principais culturas (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

As culturas Bt que também utilizam as δ -endotoxinas como princípio ativo permitem controlar de forma efetiva vários insetos-pragas e por isso têm sido consideradas uma das mais recentes conquistas biotecnológicas de sucesso, sendo o milho e o algodão as duas principais culturas Bt plantadas em todo o mundo (SENA et al., 2009).

Considerando as culturas de grande importância para o Brasil, o milho apresenta-se em uma posição de destaque no cenário do agronegócio (DOURADO NETO & FANCELLI, 2004). Porém a produção deste cereal é altamente comprometida pelo ataque de insetos-pragas, dos quais, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:

Noctuidae) é considerada a principal praga e *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1974) (Lepidoptera: Crambidae) é tida como uma praga secundária (CRUZ et al., 2002; BUSATO et al., 2004).

Dentre as estratégias empregadas nos programas de controle destes insetos, a utilização de plantas geneticamente modificadas que expressam genes de *B. thuringiensis* é bem conhecida e amplamente utilizada. Contudo várias cepas de *B. thuringiensis* com alta patogenicidade à *S. frugiperda* ou *D. saccharalis* vêm sendo selecionadas visando a sua utilização na formulação de biopesticidas como uma forma de também controlar estas pragas (VALICENTE & FONSECA 2004; DOS SANTOS et al., 2009; VALICENTE et al., 2010; DE MACEDO et al., 2012).

Entretanto a evolução da resistência dos insetos é a maior ameaça para o sucesso contínuo das δ -endotoxinas usadas nas plantas transgênicas ou nas formulações convencionais (FERRÉ & VAN RIE, 2002; HIGUCHI et al., 2007). Uma alternativa para retardar este processo envolvendo as culturas Bt pode ser conseguido utilizando combinações de diferentes tipos de genes de *B. thuringiensis* juntos na mesma planta ou em plantas diferentes em rotação (FERRÉ, 2003).

Para que a piramidação de genes seja eficaz um requisito chave é que as proteínas inseticidas difiram nos seus mecanismos de ação, em particular no reconhecimento dos locais de ligação específicos do inseto-alvo, de modo que as proteínas Cry a serem expressas na planta não devam compartilhar os mesmos receptores (FERRÉ et al., 2008).

Algumas cepas de *B. thuringiensis* produzem β -exotoxina que é altamente tóxica para várias ordens de insetos, ácaros, nematóides e também vertebrados (LECADET & BARJAC, 1981; HANSEN &

SALAMITOL, 2000). Assim a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda que não se utilize cepas de *B. thuringiensis* que produzam β -exotoxina na formulação de biopesticidas (WHO, 1999) fazendo-se necessário realizar a detecção das cepas de *B. thuringiensis* que sintetizem esta toxina.

O tempo de cultivo do *B. thuringiensis* utilizado nas metodologias dos trabalhos para a detecção de β -exotoxina é muito variável, assim sendo é importante avaliar o efeito do tempo de cultivo sobre a produção da β -exotoxina para que o sobrenadante seja coletado somente após a síntese e secreção da toxina pela bactéria.

Neste contexto, o presente trabalho, teve como objetivo avaliar a interação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac de *B. thuringiensis* com os receptores presentes nas células das microvilosidades intestinais de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*, além de avaliar a capacidade de produção de β -exotoxina por cepas de *B. thuringiensis* e o efeito do tempo de cultivo sobre a síntese deste metabólito.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Zea mays x Spodoptera frugiperda e Diatraea saccharalis*

Dentro da classificação botânica, o milho (*Zea mays* L.) pertencente à família Poacea (Gramineae), é uma espécie monocotiledônea, diplóide e alógama. Tem como ancestral *Zea mays* spp. *parviglumis* denominado também como teosinte e foi domesticado no México e América Central num período entre 7.000 e 10.000 mil anos atrás (DOEBLEY, 2004).

O milho ocupa a terceira posição dentre os cereais mais cultivados no mundo, sendo superado apenas pelo trigo e o arroz. No Brasil este grão é o mais cultivado com cerca de 72.979,8 milhões de toneladas produzidos, em uma área de aproximadamente 15.178,1 milhões de hectares (safra 2011/2012), tornando o país o terceiro maior produtor mundial do grão, atrás apenas dos Estados Unidos e China (CONAB, 2012).

Em torno de 70% da produção nacional de milho destina-se ao consumo animal na forma de ração e silagem. Os outros 30% são destinados à alimentação humana e atualmente também tem sido destinado à produção do biocombustível etanol (CONAB, 2011).

Devido à suas inúmeras aplicações tanto na alimentação humana quanto animal, o milho desempenha importante papel sócio-econômico, sendo matéria-prima impulsionadora de diversificados complexos agroindustriais (DOURADO NETO & FANCELLI, 2004). Além disso graças à sua capacidade produtiva, à composição química e

ao valor nutricional, constitui um dos mais importantes cereais do mundo (HUANG & WEI, 2004).

A ocorrência de pragas é um dos fatores que comprometem a qualidade e o rendimento da produção do milho causando danos à lavoura com importante impacto econômico. Dentre as pragas que atacam o milho, a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) também conhecida como lagarta militar ou lagarta-do-cartucho é considerada a mais importante, provocando prejuízos irreparáveis ao produtor (BUSATO et al., 2004).

As perdas de produtividade no Brasil pelo ataque desta praga à cultura do milho podem variar de 17,7% a 55,6%, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta e do genótipo (CRUZ, 2008). As lagartas em seus estádios iniciais de desenvolvimento ao se alimentarem raspam as folhas de um lado, deixando a epiderme oposta intacta, a partir do segundo ou terceiro ínstar começam a fazer perfurações nas folhas deixando uma fileira de buracos característicos, se alimentando em seguida do cartucho das plantas de milho (VALICENTE, 2008). Assim as lagartas ao alimentarem-se das folhas, reduzem a área foliar afetando a capacidade fotossintética da planta, e conseqüentemente a produção.

Diatraea saccharalis (Fabr. 1974) (Lepidoptera: Crambidae) popularmente conhecida como broca-da-cana é considerada a principal praga da cana-de-açúcar e uma praga secundária do milho. Em alguns lugares como no Brasil Central tem constituído um problema sério para a cultura do milho. Em altas infestações, o ataque desse inseto pode causar perdas de até 21% na produção. Essa praga ocasiona no milho danos semelhantes aos vistos na cana-de-açúcar, como morte da

gema apical, decréscimo no desenvolvimento da planta, número de colmos, tamanho das espigas e enchimento dos grãos. A broca ao formar galerias na haste quando se alimenta do tecido da planta pode levar ao quebramento dos colmos. (CRUZ et al., 2002). Os danos provocados pela lagarta de *D. saccharalis* podem ser também indiretos, quando os orifícios por ela formados favorecem a penetração de microrganismos fitopatogênicos no interior do colmo. Quando o ataque é intenso, a planta pode secar precocemente e se tornar improdutiva (CRUZ et al., 2002).

2.2 *Bacillus thuringiensis*

As bactérias devido especialmente à sua especificidade e modo de ação, são os microorganismos mais relevantes do ponto de vista industrial e científico (FEITELSON et al., 1992). As famílias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Streptococaceae e Achromobacteriaceae contêm as principais bactérias entomopatogênicas (ARONSON et al., 1986).

O agente entomopatogênico *Bacillus thuringiensis* destaca-se dentre os organismos empregados no controle biológico, por apresentar atividade tóxica contra diversas ordens de insetos dentre elas Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Homoptera e Orthoptera (VAN FRANKENHUYZEN, 2009). Estando nelas inclusas importantes pragas agrícolas como *S. frugiperda*, *D. saccharalis*, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e vetores de doenças de importância mundial pertencente aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* (Diptera: Culicidae) (LERECLUS et al., 1993).

Atinge ainda organismos como nematóides (SCHNEPF et al., 1998), demonstrando então ser uma boa opção para o controle de pragas na agricultura e vetores de doenças (CRICKMORE et al., 2011; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

A bactéria *B. thuringiensis* é classificada como pertencente à Classe: Firmibacteria, Ordem: Eubacteriales, Família: Bacillaceae, Gênero: *Bacillus* (WHITELEY & SCHNEPF, 1986). Dentro do Gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* juntamente com *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis* e *B. wihenstephanensis* formam o grupo *B. cereus*. Neste grupo, a maior semelhança de sequência de DNA ocorre entre *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. thuringiensis* (HELGASON et al., 2000; GUINEBRETIERE et al., 2008; KOLSTO et al., 2009). *B. thuringiensis* e *B. cereus* apresentam características fenotípicas e bioquímicas comuns, mas por definição pode ser diferenciado pela presença de cristais (LUTHY & WOLFERSBERGER, 2000) visíveis em microscopia de contraste de fases (LYSENKO, 1983).

Berliner em 1911 foi o pesquisador que descreveu pela primeira vez o *B. thuringiensis* quando ele isolou o bacilo a partir de amostras de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) um inseto que se desenvolve na farinha de trigo. Posteriormente, ele o nomeou de *Bacillus thuringiensis* em homenagem à província Thuringia (Alemanha) onde foi encontrado o primeiro inseto infectado.

Embora esta seja a primeira descrição utilizando o nome *B. thuringiensis* não foi o primeiro isolamento deste patógeno. O biólogo S. Ishiwata em 1901 isolou uma bactéria esporulante que causava mortalidade no bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Lepidoptera: Bombycidae) sendo esta denominada “sotto disease”. Em 1908,

Iwabuchi a denominou como *Bacillus sotto* Ishiwata, que posteriormente foi considerado nome inválido, e o nome mais recente *B. thuringiensis* foi mantido (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

O *B. thuringiensis* é uma bactéria Gram-positiva, catalase positiva, aeróbia, podendo também crescer em anaerobiose (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). O formato apresentado por suas células vegetativas é o de bastonete, são encontradas isoladas, aos pares ou formando cadeias e geralmente apresentam as medidas de 0,5 a 2,5 µm de largura por 3,0 a 5,0 µm de comprimento (MIRALLES & PEREZ, 2004) além de possuírem flagelos peritríquios que permitem sua locomoção (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Estas bactérias são de ocorrência ubíqua (KRYWUNCZYK & FAST, 1980) sendo encontradas no solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e resíduos de grãos (BRAVO et al., 1998). São capazes de produzir durante a fase de esporulação inclusões cristalinas formadas por proteínas Cry e/ou Cyt denominadas δ-endotoxinas (DE MAAGD et al., 2003). Estas toxinas se acumulam no compartimento da célula-mãe, podendo corresponder à 1/3 do total de proteínas encontradas na célula e são liberadas juntamente com o esporo após a lise celular (LERECLUS et al., 1989; ARANTES et al., 2002).

A atividade entomopatogênica desta bactéria está associada com a síntese destas proteínas que são altamente tóxicas e específicas para insetos de várias ordens e outros invertebrados (HÖFTE & WITELEY, 1989; GLARE & O' CALLANGHAM, 2000). Além das proteínas Cry e Cyt, *B. thuringiensis* pode produzir uma série de outras toxinas, incluindo proteínas com atividade inseticida como α-

exotoxinas, β -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases (HANSEN & SALAMITOU, 2000) e as VIPs (proteínas inseticidas vegetativas) (ESTRUCH et al., 1996). Os esporos também podem contribuir com a patogenicidade através da ação sinérgica realizada juntamente com as δ -endotoxinas (JOHNSON & McGAUGHEY, 1996).

2.3 δ -endotoxinas (Cry e Cyt)

As δ -endotoxinas também conhecidas como proteínas formadoras de poros (TFP) produzidas pelo *B. thuringiensis* são solúveis em água e sofrem alterações conformacionais que levam à sua inserção ou translocamento na membrana celular do hospedeiro formando poros que causam a morte do inseto (PARKER & FEIL, 2005).

As δ -endotoxinas compreendem duas famílias multigênicas, Cry e Cyt, atualmente mais de 400 genes *cry* e 37 genes *cyt* já foram identificados. As proteínas Cry estão classificadas em 72 grupos organizados em diferentes subgrupos, além de existirem 3 grupos de toxinas Cyt (CRICKMORE et al., 2012).

Esta classificação baseada na identidade de sequência de aminoácidos foi proposta por Crickmore e colaboradores (1998) sendo utilizada até hoje. Ela é composta por quatro estágios hierárquicos em função do local que essas sequências ocupam em uma árvore filogenética (CRICKMORE, 1998; DE MAAGD et al., 2001).

No primeiro estágio de classificação as sequências recebem um número e quando essas apresentam menos de 45% de similaridade

genética esse número se difere (*cry1, cry2, cry3... cry72*), classificando as sequências em 72 diferentes grupos de proteínas Cry. Esse número é seguido por uma letra maiúscula que separa as sequências que possuem até 78% de homologia (*cry1A, cry1B, cry1C...*). Nesta etapa, as sequências são divididas em classes, e quando a homologia entre as sequências passa a ser maior que 95% elas são divididas em um terceiro estágio no qual recebem letras minúsculas (*cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac...*), sendo então, classificadas em subclasses. No quarto estágio de classificação as sequências voltam a receber números que representam a ordem de deposição (publicação) das mesmas no banco de dados (*cry1Aa1, cry1Aa2 ... cry1Aa22*) (CRICKMORE et al., 1998).

A maior parte das cepas de *B. thuringiensis* são capazes de produzir mais de um tipo de cristal. Os cristais podem ser formados por diferentes proteínas Cry e/ou Cyt, como ocorre por exemplo em *B. thuringiensis* subesp. *israelenses*, que apresenta 5 genes codificadores de proteínas Cry e um outro gene que codifica uma citolisina, todos localizados em um mesmo plasmídeo de 72MDa (GONZALEZ & CARLTON, 1984; LERECLUS et al., 1989).

A massa molecular das toxinas Cry varia geralmente de 40 a 140 KDa (BRAVO et al., 2007). As longas protoxinas Cry com massa molecular de 130 KDa são divididas em duas regiões distintas, a N-terminal contendo a porção ativa e a C-terminal. A extremidade C-terminal determina a forma da estrutura do cristal, já a porção N-terminal está associada com a toxicidade da proteína (LI et al., 1991).

A composição da inclusão cristalina e as estruturas das toxinas determinam a forma do cristal, podendo ser bipiramidal, cubóide, rombóide, ovóide, esférico, retangular ou ainda sem forma definida

(HABID & ANDRADE, 1998). Interações complexas como pontes de hidrogênio, pontes dissulfeto, hidrofobicidade mantêm as proteínas associadas e estáveis na inclusão parasporal (GILL et al., 1992). Acredita-se que esta capacidade de formar cristais das δ -endotoxinas pode diminuir sua susceptibilidade à degradação por proteases do hospedeiro (SCHNEPF et al., 1998).

2.4 Estrutura das proteínas Cry

As δ -endotoxinas são classificadas em dois grupos de acordo com suas estruturas terciárias: as toxinas α -hélice (α -helicoidais), no qual a região da α -hélice forma um poro na membrana, e as toxinas β -barril que se inserem na membrana formando um β -barril constituído de monômeros de grampos de folhas β -pregueadas. As toxinas α -hélice incluem as proteínas Cry que são formadas por três domínios, já as toxinas β -barril incluem as proteínas Cyt (PARKER & FEIL, 2005).

As proteínas Cry apresentam uma estrutura terciária característica apesar da diferença entre as sequências dos genes que as codificam (DE MAAGD et al., 2001). Através da técnica de cristalografia de raios X foi determinada a primeira estrutura de uma proteína Cry (Cry3A) por Li e colaboradores (1991).

A forma ativa de uma proteína cristal apresenta três domínios, o domínio N-terminal (domínio I) é composto de sete α -hélices, no qual a hélice central α -5 é hidrofóbica e cercada por outras seis hélices anfipáticas, este domínio helicoidal é o responsável pela inserção da proteína na membrana e formação dos poros (HOWLADER et al., 2009). O domínio II é composto por três folhas- β antiparalelas ligadas

através de regiões loop expostas, com alto grau de variação entre as proteínas Cry, ao redor de um centro hidrofóbico (MORSE et al., 2001; GALITSK et al., 2001; BOONSERM et al., 2006).

O domínio III C-terminal (β -prisma) é um sanduíche de folhas- β . As regiões dos domínios II e III que ficam expostas estão relacionadas com a ligação ao receptor (BRAVO et al., 2005). Acredita-se que o domínio III esteja fortemente relacionado com a estabilidade da estrutura proteica (DE MAAGD et al., 2001) impedindo que a proteína seja degradada durante o processamento proteolítico, regulando as interações toxina-toxina e ainda pode estar atuando junto com o domínio I na formação do poro (RUKIMINI et al., 2000).

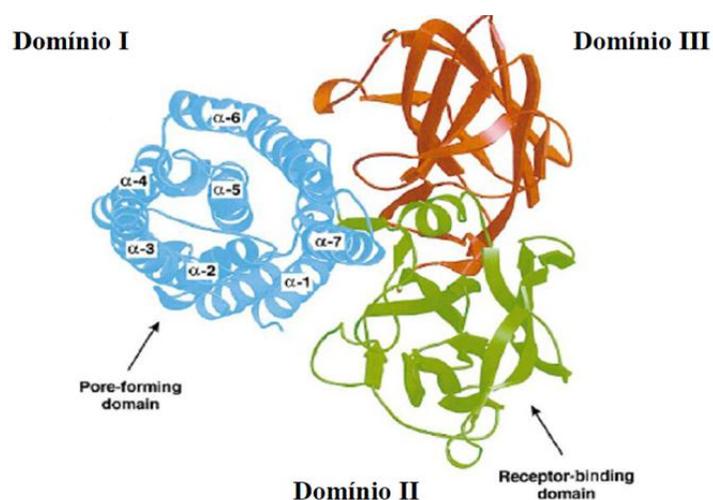
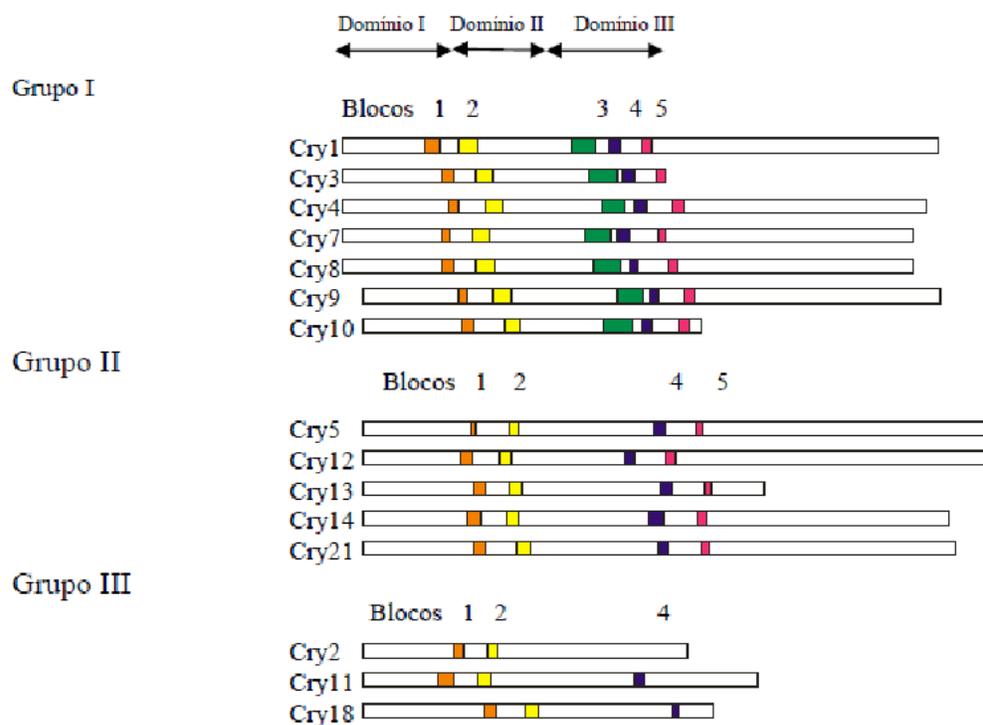


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da toxina Cry3A. O domínio I (região azul) é formado por sete α -hélices, o domínio II (região verde) consiste de três folhas- β antiparalelas ao redor de um cerne hidrofóbico, terminando em alças no ápice da molécula. O domínio III (região vermelha) corresponde à região C-terminal que possui duas folhas- β antiparalelas, formando um β -sanduíche. LI et al., 1991.

Ao realizar o alinhamento das sequências de aminoácidos de várias proteínas Cry com diferentes especificidades foram identificados cinco blocos bem conservados na região amino-terminal que codifica a toxina ativa, entre os quais estão presentes regiões de sequências variáveis (HÖFTE & WHITELEY, 1989; LERECLUS et al., 1993; KNOWLES, 1994; DE MAAGD et al., 2001). Posteriormente foram descritos mais três blocos na região da protoxina (SCHNEPF et al., 1998).

As relações evolucionárias entre as diferentes classes de proteínas Cry podem ser visualizadas através de alinhamentos das sequências de aminoácidos. A presença destes blocos de sequências conservadas sugerem que eles sejam importantes para a função biológica dessas proteínas, principalmente por se localizarem nas regiões internas da proteína e na região de contato entre domínios, o que permite também dizer que as proteínas Cry formam uma família de blocos similares com mecanismos de ação muito semelhantes (MONNERAT & BRAVO, 2000; DE MAAGD et al., 2001).



●—●
100 aminoácidos

Figura 2: Alinhamento da estrutura primária das toxinas Cry. Comprimentos relativos das proteínas Cry e a posição dos blocos conservados. Os retângulos coloridos correspondem às sequências conservadas. Domínios I, II e III correspondem à toxina ativa. Adaptado de DE MAAGD et al., 2001.

2.5 O modo de ação das proteínas Cry

O mecanismo de ação das proteínas Cry foi determinado através de estudos realizados principalmente em insetos da ordem Lepidoptera (KNOWLES & DOW, 1993; BRAVO et al., 2007). As toxinas Cry nativas de *B. thuringiensis* que formam o corpo de inclusão

parasporal são produzidas em uma forma inativa como protoxinas (ARONSON et al., 1986). Uma vez ingeridos pelas lagartas dos insetos susceptíveis os cristais protéicos são solubilizados no intestino alcalino e as protoxinas liberadas são clivadas por proteases formando segmentos protéicos tóxicos (ARONSON et al., 1986; KNOWLES et al., 1994; BRAVO et al., 2005).

Assim as toxinas tornam-se aptas a serem reconhecidas e se ligarem aos receptores presentes na membrana das células do intestino médio do inseto, levando à formação de poros que alteram o gradiente iônico e osmótico causando a morte do inseto por septicemia ou inanição (MONNERAT & BRAVO, 2000; BRAVO et al., 2007).

Após a ingestão dos cristais e esporos o inseto manifesta uma série de sintomas como perda de apetite, rejeição ao alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e finalmente morte (ARONSON et al., 1986). As lagartas infectadas tornam-se mais lentas e também sofrem uma alteração da coloração do tegumento, ficam marrom-escuras e depois de mortas apresentam coloração preta, típica da infecção com *B. thuringiensis* (HABIB & ANDRADE, 1998; MONNERAT & BRAVO, 2000).

2.5.1 Solubilização

A partir do momento em que as larvas dos insetos se alimentam dos cristais, eles passam por um processo de solubilização, que ocorre em pH alcalino geralmente em torno de 9,5 no lúmen do intestino médio da maioria dos insetos susceptíveis, permitindo assim que as proteínas que formam o cristal sejam dissociadas (KNOWLES, 1994).

Entretanto a proteína Cry3A que é tóxica para crisomelídeos é solúvel tanto em pH em torno de 3,5 a 4,2 quanto em pH acima de 9,5, permanecendo inativa em pH neutro (KOLLER et al., 1992), sugerindo então que outros fatores presentes no conteúdo intestinal também devem atuar na solubilização do cristal (MONNERAT & PRAÇA, 2006).

A maioria das δ -endotoxinas são sintetizadas na forma inativa de protoxinas com massa molecular variando em torno de 130-140 KDa. Elas tornam-se ativas a partir da clivagem em regiões específicas, por proteases intestinais das larvas dos insetos, liberando um ou mais fragmentos tóxicos de aproximadamente 60-70 KDa que são relativamente resistentes à proteólises posteriores (ARONSON et al., 1986; HÖFTE & WHITELEY, 1989; LERECLUS et al., 1989; BRAVO et al., 2007).

Durante esta digestão, as protoxinas tem uma porção da extremidade N-terminal removida (25-30 aminoácidos para a toxina Cry1, 58 resíduos para Cry3A e 49 para Cry2Aa) e aproximadamente metade da proteína restante da extremidade C-terminal, no caso de longas protoxinas Cry (BRAVO et al., 2007).

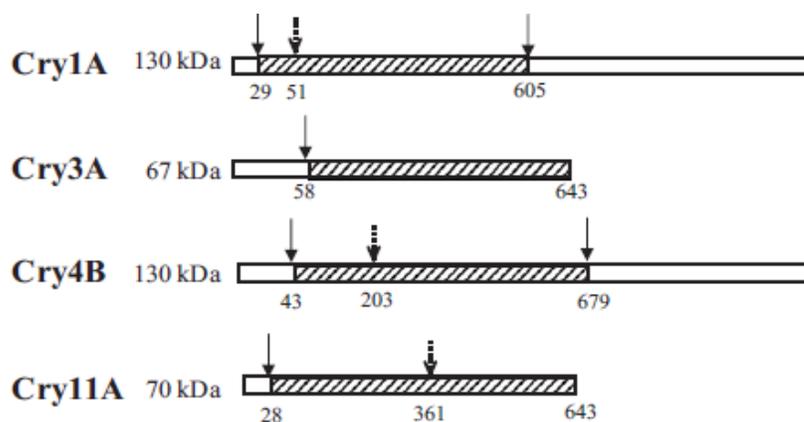


Figura 3: Esquema representativo da clivagem de algumas protoxinas Cry por protease. As caixas brancas representam a protoxina e as caixas listradas representam a toxina ativa. Setas sólidas mostram os sítios de clivagem nas extremidades amino-terminal e carboxi-terminal das proteínas ativadas e as setas listradas mostram as clivagens intramoleculares das toxinas ativas. Bravo et al., 2007.

Diferenças significativas na fisiologia do intestino e consequentemente uma variação na atividade proteolítica entre as diferentes ordens de insetos, têm um papel importante na especificidade das toxinas. Como exemplo, temos que as proteases digestivas de Coleoptera são principalmente cisteíno e aspártico-proteases enquanto em Lepidoptera e Diptera constitui-se de serino-proteases (DE MAAGD et al, 2001).

Uma hipótese sugerida para explicar o mecanismo de resistência desenvolvido pelos insetos está relacionado com as proteases envolvidas na ativação das protoxinas e com o grau de solubilidade das proteínas Cry que podem variar devido à diferenças presentes no intestino dos insetos (ARONSON et al., 1991; McGAUGLEY &

WHALON, 1992; KELLER et al., 1996; OPPERT et al., 1997; LI et al., 2004).

Uma protoxina pode se tornar ativa contra lepidópteros ou dípteros dependendo do tipo de combinação de enzimas proteolíticas presentes no extrato intestinal do inseto o qual ela é submetida. Este fato foi demonstrado após o tratamento de uma proteína de 130 KDa de *B. thuringiensis* sorovar *aizawai*, com atividade tóxica para lepidópteros e dípteros, com o extrato do intestino médio de *Pieris brassicae*. A toxina, após o tratamento, mostrou-se tóxica para larvas de *P. brassicae* e *Aedes aegypti*. Entretanto, quando ativada com proteases do intestino de *A. aegypti*, a toxina ativa apresentava toxicidade apenas para larvas de dípteros (HAIDER & ELLAR, 1989).

2.5.2 União aos receptores

As proteínas Cry uma vez ativadas se ligam a receptores específicos encontrados nas microvilosidades apicais das membranas das células colunares do intestino médio dos insetos susceptíveis e a união a estes sítios é uma etapa determinante da especificidade assim como da toxicidade das proteínas Cry (DE MAAGD et al, 2001).

A ligação das toxinas Cry ao intestino dos insetos envolve dois passos, um reversível e outro irreversível, sendo portanto bifásica. Na primeira etapa ocorre o reconhecimento do receptor que é reversível e pode levar à dissociação do complexo toxina-receptor, na segunda etapa, ocorre a inserção da toxina na membrana apical da célula tornando a ligação irreversível (VAN RIE et al., 1990; SCHENEPF et al., 1998).

São conhecidos quatro tipos de receptores proteicos envolvidos no complexo processo de ligação das proteínas Cry1 às microvilosidades da membrana apical das larvas de Lepidoptera. Uma aminopeptidase-N (APN) e uma fosfatase alcalina (ALP), estando ambas ligadas à membrana por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), uma proteína do tipo caderina (CADR) e um glicoconjugado (GCR) de 270KDa (BRAVO et al., 2007; PIGOTT & ELLAR, 2007; SOBERÓN et al., 2009).

Alguns trabalhos sugerem que glicolipídeos ou proteínas intracelulares, tais como V-ATPase subunidade A e actina também podem atuar como moléculas receptoras (McNALL & ADANG, 2003; GRIFFITS et al, 2005; KRISHNAMOORTHY et al., 2007; BAYYAREDDY et al., 2009).

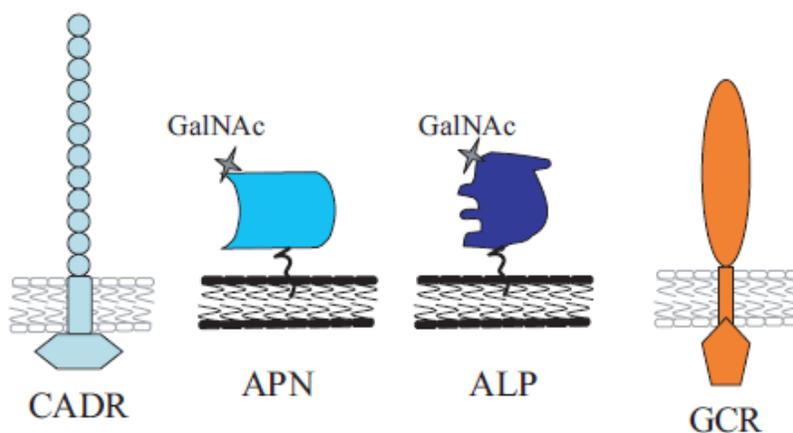


Figura 4: Moléculas receptoras de proteínas Cry1A. CADR (caderina), APN (aminopeptidase-N), ALP (fosfatase alcalina) GCR (glicoconjugado). BRAVO et al., 2007.

As proteínas caderinas constituem uma superfamília de glicoproteínas envolvidas no contato intracelular. A primeira proteína caderina demonstrada como sendo capaz de interagir com toxinas Cry foi a BT-R₁, uma glicoproteína de 210 kDa identificada em BBMV's de *Manduca sexta* (VADLAMUTI et al., 1993). A partir da clonagem e análise da sequência do receptor BT-R₁ foi demonstrado que as caderinas são proteínas transmembranas com um domínio citoplasmático e um domínio extracelular com várias repetições de caderina, apresentando 12 repetições no caso deste receptor específico (VADLAMUTI et al., 1995).

Desde então, outras caderinas de lepidópteros foram identificadas e todas têm provado possuir uma organização de domínio semelhante, dentre elas os receptores BtR175 de *Bombyx mori* e HevCaLP de *Heliothis virescens* (GAHAN et al., 2001; MORIN et al., 2003; WANG et al., 2005; FLANNAGAN et al., 2005).

Enquanto as caderinas clássicas encontram-se principalmente dentro de junções envolvidas na adesão célula-célula (ANGST et al., 2001), as proteínas caderinas de lepidópteros foram identificadas na membrana apical das células colunares do epitélio do intestino médio (AIMANOVA et al., 2006), local alvo das toxinas Cry (CHEN et al., 2005).

A interação das proteínas Cry com a CADR é uma interação complexa que envolve três epítomos da CADR correspondentes às regiões extracelulares denominados CR7, CR11 e CR12, em que CR12 é proximal ao domínio de membrana da caderina. Estes epítomos da proteína CADR interagem com as alças expostas 2, 3 e α -8 do domínio II da toxina, promovendo uma clivagem proteolítica

adicional da extremidade N-terminal, e também da hélice α -1 do domínio I (GÓMEZ et al., 2002; ATSUMI et al., 2008).

A clivagem da hélice α -1 expõe regiões hidrofóbicas do domínio I, e foi levantada a hipótese de que a clivagem desta hélice é necessária para desencadear a formação da estrutura oligomérica do pré-poro da toxina antes da inserção na membrana (GÓMEZ et al., 2002; PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010).

Os receptores do tipo APN e ALP são proteínas ancoradas a GPI e estão localizados no interior de plataformas de lipídeos (Lipid Rafts) que constituem pequenos domínios na membrana celular. Essas estruturas apresentam altas concentrações de colesterol e glicosíngolipídeos e provavelmente estão envolvidas em vias de transdução de sinal (GRIFFITS et al., 2005).

As aminopeptidases N (APN) são exopeptidases e atuam no intestino larval de lepidópteros juntamente com endopeptidases e carboxipeptidases digerindo as proteínas derivadas da dieta do inseto (WANG et al., 2005). Além de serem estudadas pelo seu papel na digestão, as APNs têm sido amplamente estudadas como receptores das toxinas Cry de *B. thuringiensis*, uma vez que foi mostrado que as proteínas Cry podem se ligar a APN (KNIGHT et al., 1994; SANGADALA., 1994). Muitos tipos diferentes de APNs foram isoladas e caracterizadas com isso as APNs dos vários grupos de insetos lepidópteros foram classificadas dentro de cinco grupos: APN1, APN2, APN3, APN4 e APN5 (HERRERO et al., 2005).

Vários estudos têm relatado que as ALPs também funcionam como receptores das toxinas Cry, no qual foi demonstrado que a proteína ALP pode atuar como um receptor de Cry1Ac em *M. sexta*

(SANGADALA et al., 1994; McNALL & ADANG, 2003) e *H. virescens* (ENGLISH & READDY., 1989; JURANT-FUENTES & ADANG, 2004) e como um receptor Cry11Aa em *Aedes aegypti* (FERNANDEZ et al., 2006).

A interação da proteína Cry com a APN ocorre através da alça-3 exposta do domínio II e a interação com a ALP é estabelecida através da folha- β 16 do domínio III (MASSON et al, 1995; PACHECO et al, 2009; ARENAS et al., 2010).

As ALPs, APNs e CADR interagem de modo consecutivo com diferentes estruturas da toxina ao longo do mecanismo de ação das proteínas Cry. Em larvas de lepidópteros as toxinas ativas Cry1A primeiramente se ligam aos receptores ALP e APN através de uma interação de baixa afinidade (MASSON et al., 1995; PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010). A interação com ALP e APN concentra a toxina ativada nas microvilosidades da membrana das células do intestino médio tornando-as aptas a se ligarem através de uma interação de alta afinidade com os receptores CADR (VADLAMUDI et al., 1995; GÓMEZ et al., 2006; PACHECO et al., 2009; ARENAS et al., 2010).

Após a toxina ativa se ligar à CADR ocorre sua primeira mudança conformacional, no qual a região N-terminal da proteína incluindo a α -hélice 1 é exposta e clivada por proteases da membrana promovendo a oligomerização das toxinas Cry (na forma de um tetrâmero) que corresponde à estrutura chamada pré-poro (GÓMEZ et al., 2002; ATSUMI et al., 2008).

A estrutura oligomérica Cry apresenta maior afinidade pelos receptores ALP e APN, assim o oligômero se liga à estes receptores e

em seguida ocorre a inserção da toxina ativa na membrana de forma irreversível induzindo a abertura ou formação de poros que provocam uma quebra no balanço osmótico da célula e consequente lise celular (PARDO-LÓPEZ et al., 2006; ARENAS et al., 2010; PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

MODO DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS CRY AO NÍVEL MOLECULAR

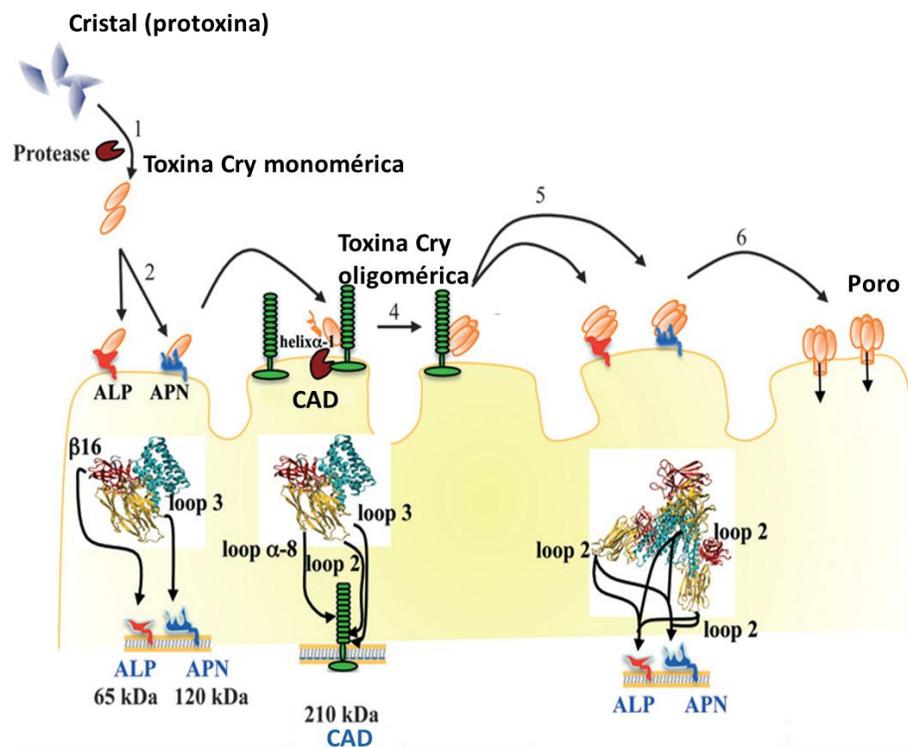


Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação das toxinas Cry em Lepidoptera no nível molecular. 1- A prototoxina após ser ingerida pelo inseto é solubilizada no lúmen do intestino médio das larvas

devido ao elevado pH e às condições de redução, posteriormente é ativada por proteases do intestino, gerando o fragmento de toxina. 2- A toxina Cry monomérica liga-se aos receptores ALP e APN, numa interação de baixa afinidade, a toxina fica então localizada em estreita proximidade com a membrana. 3- A toxina Cry monomérica se liga ao receptor CADR numa interação de alta afinidade e esta interação induz a clivagem proteolítica da extremidade N-terminal da toxina, incluindo a hélice α -1 do domínio I. 4- A toxina Cry clivada torna-se capaz de formar um oligômero com as outras toxinas constituindo uma estrutura de pré-poro. 5- A estrutura oligomérica Cry liga-se com alta afinidade aos receptores ALP e APN. 6- O pré-poro insere-se na membrana promovendo a formação de poros. PARDO-LÓPEZ et al., 2013.

2.6 Aplicações das toxinas do *Bacillus thuringiensis* na agricultura

As proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* constituem o princípio ativo de muitos biopesticidas e de culturas geneticamente modificadas que expressam os genes responsáveis pela codificação destas toxinas (culturas Bt). Para o controle de pragas da ordem Lepidoptera, as classes de proteínas Cry1 e Cry2 de *B. thuringiensis* têm sido usadas tanto nos inseticidas biológicos quanto em plantas transgênicas (SCHNEPF et al., 1998; FERRÉ et al., 2008).

Os biopesticidas dentro do contexto do controle biológico têm assumido uma importância crescente nos programas de manejo integrado de pragas (MIP) atuando como uma importante ferramenta, especialmente em um momento que muito se debate sobre a produção integrada visando uma agricultura mais sustentável (HIGUCHI et al., 2007).

As formulações baseadas em *B. thuringiensis* têm sido utilizadas no campo ao longo dos últimos 50 anos e ocupam uma posição de destaque, representam cerca de 90% dos biopesticidas totais

utilizados (ALI et al., 2010) e 2% de todo mercado inseticida (BRAVO et al., 2011).

Diferentes produtos a base de Bt foram desenvolvidos para o controle de insetos na agricultura e também contra espécies de mosquitos. A maioria destes produtos baseiam-se na preparação de cristais e esporos derivados de algumas cepas do tipo selvagem, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD1 ou HD73, *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, *B. thuringiensis* var. *san diego* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* (SOBERÓN et al., 2009)

Produtos à base de Btk são eficazes no controle de vários lepidópteros que se alimentam de folhas e que são considerados importantes pragas de culturas ou desfolhadoras florestais. Os biopesticidas baseados em Bt *aizawai* são especialmente ativos contra larvas de lepidópteros que se alimentam de grãos armazenados. Já aqueles baseados em Bt *tenebrionis* ou Bt *san diego* são adequados para pragas de coleópteros. Finalmente, os produtos à base de Bt *israelensis* são utilizados para o controle de mosquitos que são vetores de doenças humanas como a dengue e malária (SOBERÓN et al., 2009).

Várias cepas de *B. thuringiensis* com alta patogenicidade à *S. frugiperda* ou *D. saccharalis* vêm sendo selecionadas visando a sua utilização na formulação de biopesticidas como uma forma de também controlar estas pragas (VALICENTE & FONSECA 2004; DOS SANTOS et al., 2009; VALICENTE et al., 2010; DE MACEDO et al., 2012).

No entanto alguns insetos-pragas têm sido reconhecidos por apresentarem resistência a cepas de *B. thuringiensis* após repetidas

aplicações das toxinas Cry tanto no campo quanto em laboratório. Este é um problema crucial a ser superado para garantir a eficácia dos biopesticidas e poder continuar fazendo o seu uso (HIGUCHI et al., 2007).

As culturas transgênicas expressando as proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* utilizadas comercialmente são consideradas uma das mais bem sucedidas conquistas biotecnológicas recentes (FERRÉ, et al., 2008, SENA et al., 2009), devido aos bons resultados em termos de controle dos insetos-alvo, redução no uso de inseticidas químicos e segurança ambiental (DE MAAGD et al., 1999; BETZ et al., 2000; FERRÉ & VAN RIE, 2002).

Atualmente, as mais importantes culturas Bt são a soja, milho, algodão e canola. Em 1996, a primeira cultura transgênica expressando genes de *B. thuringiensis* para proteínas que conferem resistência a insetos foi liberada comercialmente e desde então muitas outras culturas Bt foram engenheiradas e rapidamente adotadas em todo o mundo, só em 2012, foram plantados cerca de 60 milhões de hectares de transgênicos Bt (JAMES, 2012).

Várias cultivares de milho-Bt são plantadas em todo o mundo e a maioria delas expressam a proteína Cry1Ab para o controle da *D. saccharalis* e mais recentemente o milho expressando Cry1Fa foi introduzido para o controle de *Spodoptera* spp. (FERRÉ et al., 2008). O milho-Bt expressando Cry1Ac também comercializado controla pragas de lepidópteros como *Helicoverpa virescens* e *Ostrinia nubilalis* (CHRISTOU et al., 2006). As mais recentes gerações comerciais de milho-Bt expressam uma série de toxinas incluindo a toxina binária Cry34Ab/Cry35Ab e Cry3Bb para controlar pragas de coleópteros, tais

como *Diabrotica virgifera* e também Cry1A, Cry2Ab e Cry1F para o controle de pragas de lepidópteros incluindo *S. frugiperda* (CHRISTOU et al., 2006).

As plantas transgênicas que expressam genes para proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* oferecem ações de longo prazo e preventivas contra várias espécies de insetos-pragas. Porém uma das principais ameaças da ampla adoção destas culturas é a evolução da resistência dos insetos, como uma resposta à forte pressão de seleção que é imposta às populações de insetos (FERRÉ & VAN RIE, 2002).

Nos últimos anos, pelo menos quatro casos de resistência a plantas Bt foram documentadas, *Helicoverpa zea* ao algodão-Bt expressando Cry1Ac nos Estados Unidos (TABASHNIK et al., 2008), *S. frugiperda* ao milho-Bt expressando Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2010), *Busseola fusca* ao milho-Bt expressando Cry1Ab na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007) e *Pectinophora gossypiella* ao algodão-Bt expressando Cry1Ac na Índia (BAGLA, 2010).

Em condições de campo três pragas de insetos lepidópteros apresentaram resistência também a produtos formulados de *B. thuringiensis*, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* e *Trichoplusia ni* (MCGAUGHEY, 1985; TABASHNIK, 1994; JANMAAT & MYERS, 2003).

O tempo que os transgênicos Bt permanecem resistentes aos insetos é um importante aspecto que é avaliado e testado no mercado (ALI et al. 2010). Para impedir a seleção da resistência ou atrasá-la será necessário elaborar e desenvolver pesquisas, visando a construção de culturas transgênicas, mas empregando estratégias eficazes, como o

empilhamento de genes, a fim de evitar o desenvolvimento de resistência cruzada, caso contrário serão pouco valorizadas se os importantes insetos-pragas se tornarem resistentes após poucos anos (ALI et al., 2010).

A partir de uma perspectiva de monitoramento da resistência, as toxinas que utilizam os mesmos locais de ligação para exercer as suas ações tóxicas não podem ser utilizados como substitutos ou complementos um do outro (HERNÁNDEZ & FERRÉ, 2005). Seguindo este preceito diferentes estratégias têm sido utilizadas para retardar ou minimizar o aparecimento de resistência, algumas delas são baseadas na utilização de mais de uma toxina Cry sejam nas formulações de biopesticidas ou através do uso de plantas diferentes em rotação ou combinadas na mesma planta através da piramidação de genes (FERRÉ, 2003).

Outro artifício utilizado consiste na denominada “Estratégia de Refúgio Alta Dose” que implica no plantio de uma porcentagem significativa de plantas não-Bt próximas das culturas-Bt que expressam uma alta dose da toxina Cry. Os refúgios de plantas não-Bt destinam-se a manter uma população de insetos susceptíveis. Os insetos susceptíveis às toxinas Cry acasalam com os indivíduos resistentes que são potencialmente selecionados nas plantas-Bt produzindo então descendentes suscetíveis devido à característica recessiva dos alelos de resistência (TABASHNIK et al., 2008).

O mecanismo mais comum de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* é a redução da ligação da toxina às células do intestino médio, que em diferentes espécies de insetos resistentes incluem mutações nos receptores das toxinas Cry tais como CADR, ALP, APN

ou mutações no transportador ABCC2 (HERRERO et al, 2005; GAHAN et al., 2010; JURAT-FUENTES et al., 2011; BAXTER et al., 2011).

Um total de 13 países plantaram culturas geneticamente modificadas com duas ou mais características em 2012. Cerca de 43,7 milhões de hectares, o equivalente a 26% dos 170 milhões de hectares das culturas transgênicas foram empilhados em 2012, acima dos 42,2 milhões de hectares, ou 26% dos 160 milhões de hectares em 2011. (ALI et al., 2012). Dentro deste grupo está incluído as culturas transgênicas com mais de um gene de *B. thuringiensis* desenvolvidas para o controle de insetos-pragas.

A variedade de milho transgênico SmartStax (Monsanto, Dow e MI AgroSciences, IN) lançada no mercado em 2010, contendo seis genes de resistência a insetos ativos contra pragas do milho como lepidópteros, coleópteros e nematóides, (Cry34Ab1 + Cry35Ab1, Cry3Bb1, Cry1F, Cry1A.105 e Cry2Ab2) e dois genes que dão tolerância a herbicidas (glifosato e glufosinato de amônio) exemplifica bem a nova tendência entre os transgênicos que consiste na tecnologia de empilhamento de genes visando retardar a evolução da resistência devido ao uso de uma combinação de toxinas com diferentes mecanismos de ação (PARDO-LÓPEZ et al., 2013).

A necessidade do desenvolvimento de plantas transgênicas Bt resistentes aos insetos-pragas torna imprescindível a elaboração de estratégias de manejo da resistência, tais como a piramidação de genes (RENA et al., 2004; SENA et al., 2009) para isso o conhecimento dos receptores compartilhados pelas diferentes toxinas de Bt é crucial para

a concepção de um adequado empilhamento de genes (FRUTOS et al., 1999; PIGOTT & ELLAR, 2007; BRAVO & SOBERON, 2008).

2.7 β -Exotoxina

As β -exotoxinas, também denominadas thuringiensinas, são toxinas não proteicas, termoestáveis, secretadas no meio de cultura durante a fase vegetativa ou início da fase de esporulação. Existem dois tipos de β -exotoxina, a toxina do tipo I e do tipo II. A β -exotoxina I é um análogo do ATP formada por adenina, ribose, glicose e ácido fosfoalárico com massa molecular de 701Da (FARKAS et al., 1969).

Esta toxina age inibindo a atividade da RNA polimerase através da competição com o ATP pelos sítios de ligação e conseqüentemente interfere na síntese de RNA (LECADET & BARJAC, 1981) sendo particularmente ativa contra espécies de dípteros, coleópteros e lepidópteros. A β -exotoxina I pode ter efeitos contra organismos não-alvo incluindo espécies de insetos benéficos como *Apis mellifera* (CANTWELL et al., 1964) e outros invertebrados como ácaros e nematóides (BOND et al., 1971) além de ser tóxica também para vertebrados. Sua toxicidade afeta a muda e pupação dos insetos e em doses subletais apresentam efeitos teratogênicos e mutagênicos (IGNOFFO & GREGORY, 1972; LECADDET & BARJAC, 1981).

A β -exotoxina do tipo II foi inicialmente isolada e parcialmente caracterizada a partir da estirpe HD-12 (*B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* sorotipo 8ab) através de HPLC, esta toxina é um análogo do UTP e sua toxicidade é maior que a do tipo I, principalmente para coleópteros (LEVINSON et al., 1990).

Até agora, os mecanismos de regulação e determinantes genéticos envolvidos na produção de thuringiensina têm sido pouco claros. Alguns autores acreditam que a β -exotoxina atuaria como um sinal molecular dentro do microrganismo para o controle da transcrição de genes da esporulação (KLIER et al., 1973; JOHNSON et al., 1975, 1978).

Contudo devido ao padrão de ocorrência da produção de β -exotoxina foi sugerido que um único gene pode estar envolvido, e cada exotoxina pode ser o produto de uma única reação enzimática, a partir de moléculas precursoras presentes tanto em cepas de *B. thuringiensis* produtoras de β -exotoxina quanto aquelas que não sintetizam a β -exotoxina. Estes precursores que estariam intimamente envolvidos no controle da transcrição do gene de esporulação, e não a β -exotoxina em si, visto que isto não exigiria que a β -exotoxina fosse produzida por todas cepas de *B. thuringiensis* (LEVINSON et al., 1990).

Poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de desvendar os mecanismos de regulação e determinantes genéticos envolvido na produção de β -exotoxina I. No entanto foi possível identificar um locus que abriga dois genes, *berA* e *berB*, que possivelmente são responsáveis pela codificação de transportadores ABC necessários para síntese de β -exotoxina I (ESPINASSE et al., 2002a). Em um outro trabalho foi demonstrado através da caracterização e análise transcricional de um grupo de genes denominado *sigW-ecfXecfY*, que eles são essenciais para produção de β -exotoxina I em *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* cepa 407-1 (ESPINASSE et al., 2004).

A produção de β -exotoxina I está frequentemente associada à presença de plasmídeos que carregam genes *cry* (plasmídeos *cry*). Alguns estudos realizados com cepas de *B. thuringiensis* capazes sintetizar β -exotoxina I propõe que há uma forte associação entre os elevados níveis de produção de β -exotoxina I e a capacidade de produzir proteínas Cry (ESPINASSE et al., 2002b).

Isto ocorre, provavelmente, pois tanto a capacidade de secretar β -exotoxina I como a capacidade de produzir cristais foram transferidos em conjunto em *B. cereus* e *B. thuringiensis* por conjugação (LEVINSON et al., 1990). Foi relatado em cepas que perderam a capacidade de sintetizar toxinas cristal devido à perda do plasmídeo *cry* também tornaram-se incapazes de secretar β -exotoxina I, embora as cepas parentais tivessem a capacidade de produzir elevadas quantidades deste composto (OZAWA & IWAHANA, 1986).

Uma associação entre alguns determinantes que aumentam a produção de β -exotoxina I e os genes *cry1B* e *VIP2* foi encontrada em cepas que sintetizam este composto, o que sugere que estes genes estão geralmente localizados no mesmo plasmídeo (ESPINASSE et al., 2002b). A presença do gene *cry1B* e a produção de β -exotoxina foi também relatada por Perani e colaboradores (1998), porém sem estabelecer uma relação estatística entre a capacidade de produzir este metabólito e a presença dos genes da subfamília *cry1B*.

A produção do tipo I da β -exotoxina é uma propriedade de uma estirpe de *B. thuringiensis* contudo uma forte correlação entre a sua produção ou falta de produção é encontrada com o tipo de sorovariedade. Uma estirpe particular pertencente às sorovariedades *thuringiensis* ou *darmstadiensis* tem maior chance de produzir este

metabólito do que uma estirpe pertencente à outras sorovariedades e possivelmente esta associação entre a produção de β -exotoxina I por determinadas sorovariedades têm uma relação com o perfil plasmidial e o sorotipo (HERNÁNDEZ et al., 2003).

Por causa da toxicidade da β -exotoxina em mamíferos, a OMS recomenda que as cepas de *B. thuringiensis* que produzem β -exotoxina não devam ser utilizadas para o controle de insetos, ou pelo menos que, os produtos comerciais a base de *B. thuringiensis* devam ser livres desta toxina (WHO, 1999).

A detecção de β -exotoxina é assim um passo importante no desenvolvimento e na produção de biopesticidas baseados em *B. thuringiensis* (MAC INNES, 2009). Bioensaio de toxicidade constitui o método tradicional para a detecção de β -exotoxina mas vários novos métodos têm sido descritos para a detecção de β -exotoxina, dentre eles HPLC de fase reversa (RP-HPLC) é provavelmente o mais largamente utilizado.

Embora o limite de detecção do método de RP-HPLC seja bom e seja um procedimento relativamente rápido (GOHAR & PERCHAT, 2001), não avalia a toxicidade direta da β -exotoxina e há um risco de obter falsos negativos (HERNÁNDEZ et al., 2001) visto que esta técnica detecta apenas um tipo de β -exotoxina, demonstrando assim a importância de se realizar os bioensaios para avaliação quanto a produção desta toxina por cepas de *B. thuringiensis*.

Além disso a detecção de β -exotoxina através de bioensaios é relativamente simples e não exigem equipamentos de alta tecnologia, se mostrando extremamente viável para ser utilizado em países do terceiro mundo que buscam estratégias de baixa tecnologia para

verificar se cepas de *B. thuringiensis* locais produzem β -exotoxina e, portanto, se podem ser utilizadas na formulação de biopesticidas (MAC INNES, 2009).

3 REFERÊNCIAS

- AIMANOVA, K. G.; ZHUANG, M. B.; 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, Jul 2006.
- ALI, S. et al. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, Apr 2010.
- ANGST, B. D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A. I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 4, p. 629-641, Feb 2001.
- ARANTES, O. M. N.; VILAS-BÔAS, L. A.; VILAS-BÔAS, G. F. L. T. *Bacillus thuringiensis*: Estratégias no controle biológico. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.; Azevedo, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e agroindústria**. Caxias do Sul: EDUSC, p. 269-293, 2002.
- ARENAS, I. et al. Role of Alkaline Phosphatase from *Manduca sexta* in the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab Toxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 12497-12503, Apr 2010.
- ARONSON, A. I. et al. The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 981-986, Apr 1991.
- ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 1, p. 1-24, Mar 1986.
- ATSUMI, S. et al. Location of the *Bombyx mori* 175 kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Febs Journal**, v. 275, n. 19, p. 4913-4926, Oct 2008.

BAGLA, P. India hardy cotton munching pests are latest blow to GM crops. **Science**, v. 327, n. 5972, p. 1439-1439, Mar 2010.

BAXTER, S. W. et al. Parallel Evolution of *Bacillus thuringiensis* Toxin Resistance in Lepidoptera. **Genetics**, v. 189, n. 2, p. 675-814, Oct 2011.

BAYYAREDDY, K. et al. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. **Insect Biochem Mol Biol** v. 39, p. 279–286, 2009.

BERLITZ, L. D. et al. Toxicology effects of δ -endotoxins and β -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Wistar* rats. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 1, n. 1, p. 35-38, August 2006.

BETZ, F. S.; HAMMOND, B. G.; FUCHS, R. L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 156-173, Oct 2000.

BOND, R. P. M.; BOYCE, C. B. C. (1971). The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, p. 275–301. In H. D. Burges (ed.), **Microbial control of insects and mites. Academic Press, London, United Kingdom.**

BOONSERM, P. et al. Crystal structure of the mosquito larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. **Journal of Molecular Biology**, v. 348, n. 2, p. 363-382, Apr 2005.

BOONSERM, P. et al. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3391-3401, May 2006.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, Jul 2011.

BRAVO, A. et al. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, Dec 1998.

BRAVO, A., M. SOBERÓN, S.S. GILL. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. p. 175-206, 2005. In L. I. Gilbert, K. Iatrou, and S. S. Gill (ed.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, Vol. 6, Elsevier, New York, NY, USA.

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, Mar 2007.

BRAVO, A.; GILL, S.S.; SOBERÓN, M. (2005). *Bacillus thuringiensis*: Mecanismos and use. p. 175-206. In: Gilbert, L.I.; Latrou, K.; Gill, S.S., eds. **Comprehensive molecular insect science**. Elsevier, New York, NY, USA.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573-579, Oct 2008.

BUSATO, G. R. et al. Preferência para alimentação de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: noctuidae) por milho, sorgo, arroz e capim-arroz. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 215-218, abr/jun 2004.

CANTWELL, G. E. et al. Mortality of honey bees, *Apis mellifera* Linnaeus, fed exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. **J. Insect Pathol.** v. 6, p. 532-536, 1964.

CHEN, J. et al. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A delta-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Cell and Tissue Research**, v. 321, n. 1, p. 123-129, Jul 2005.

CHRISTOU, P. et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 6, p. 302-308, Jun 2006.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos: safra 2011/2012: décimo levantamento. Brasília, 2012.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos: safra 2010/2011: oitavo levantamento. Brasília, 2011.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Falmer, 2011. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso: 23 jan. 2011.

CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Falmer, 2012. Disponível em: <http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/>. Acesso: 10 nov. 2012.

CRICKMORE, N. et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 807-813, Sep 1998.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In CRUZ, J.C. et al. (Ed.) **A cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Cap.12, p.303-362, 2008.

CRUZ, I.; VIANA, P.A.; WAQUIL, J. M. Cultivo do milho: Pragas da fase vegetativa e reprodutiva. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. **Comunicado Técnico**, v. 49, p. 8, 2002.

DE MAAGD, R. A. et al. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 409-433, 2003.

DE MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, Jan 1999.

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, Apr 2001.

DENOLF, P. et al. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutella xylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin binding proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 248, n. 3, p. 748-761, Sep 1997.

DOEBLEY, J. The genetics of maize evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 37-59, 2004.

ENGLISH, L. H.; READDY, T. L. Delta-endotoxin inhibits a phosphatase in midgut epithelial membranes of *Heliothis virescens*. **Insect Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 145-152, 1989.

ESPINASSE, S. et al. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin I production. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 21, p. 5848-5854, Nov 2002a.

ESPINASSE, S. et al. Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of *cry1B* in *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4182-4186, Sep 2002b.

ESPINASSE, S. et al. An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling beta-exotoxin I Production in *Bacillus thuringiensis* subsp *thuringiensis* strain 407-1. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 10, p. 3108-3116, May 2004.

ESTRUSH, 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, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FARKAS, J. et al. Structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 34, n. 3, p. 1118-1120, 1969.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J.; KIM, L. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio-Technology**, v. 10, n. 3, p. 271-275, Mar 1992.

FERNANDEZ, L. E. et al. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemical Journal**, v. 394, p. 77-84, Feb 2006.

FERRÉ, J. 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, p. 141-155. In T. Lelley; E. Balázs; M. Tepfer (ed.), *Ecological impact of GMO dissemination in agro-ecosystems*. Facultas Verlags – und Buchhandels AG, Vienna, Austria.

FERRÉ, J. et al. Exploring the potential of corn borers to develop resistance to Bt-corn in Europe. **IOBC wprs Bull**, v. 33, p. 1–6, 2008.

FERRÉ, J. et al. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 12, p. 5119-5123, Jun 1991.

FERRÉ, J. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, p. 141–155, 2003. In T. Lelley, E. Balázs, and M. Tepfer (ed.), **Ecological impact of GMO dissemination in agro-ecosystems**. Facultas Universita Tsverlag, Vienna, Austria.

FERRÉ, J., VAN RIE, J.; MACINTOSH, S. C. (2008). **Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM)**, p. 41–85. In J. Romeis, A. M. Shelton, and G. G. Kennedy (ed.), *Integration of insectresistant genetically modified crops within IPM programs*. Springer Science and Business Media, Dordrecht, The Netherlands.

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

FLANNAGAN, R. D. et al. Identification, cloning and expression of a Cry1Ab cadherin receptor from European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera : Crambidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 33-40, Jan 2005.

FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, F. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 227-276, 1999.

GAHAN, L. J. et al. An ABC Transporter Mutation Is Correlated with Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin. **Plos Genetics**, v. 6, n. 12, Dec 2010.

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

GALITSKY, N. et al. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 57, p. 1101-1109, Aug 2001.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 615-636, 1992.

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

GOHAR, M.; PERCHAT, S. Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 298, n. 1, p. 112-117, Nov 2001.

GOMEZ, I. et al. Specific epitopes of domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 45, p. 34032-34039, Nov 2006.

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

GONZALEZ, J. M.; CARLTON, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* variety *israelensis*. **Plasmid**, New York, v. 11, n. 1, p. 28-38, 1984.

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

GUINEBRETIERE, M. H. et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 851-865, Apr 2008.

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

HAIDER, M. Z.; ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin: interaction with phospholipid vesicles. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 978, n. 2, p. 216-222, Jan 1989.

HAIDER, M. Z.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. **European Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 3, p. 531-540, May 1986.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. (2000) Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In **Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application**. Charles, J.F.; Delecluse, A.; Nielsen-LeRoux, C. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 41–64.

HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*: One species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, Jun 2000.

HERNANDEZ, C. S. et al. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I β -exotoxin production. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 1, p. 57-62, Jan 2003.

HERNANDEZ, C. S.; FERRÉ, J. Common receptor for *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ac, Cry1Fa, and Cry1Ja in *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, and *Spodoptera exigua*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5627-5629, Sep 2005.

HERNANDEZ, C. S.; FERRÉ, J.; LARGET-THIERY, I. Update on the detection of beta-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 643-647, Apr 2001.

HERRERO, S. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. **Bmc Genomics**, v. 6, Jun 2005.

HIGUCHI, M. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to brush border membrane vesicles of midgut from Cry1Ac susceptible and resistant *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 147, n. 4, p. 716-724, Aug 2007.

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

HOWLADER M. T. H. et al. Biological properties of loop-replaced mutants of *Bacillus thuringiensis* mosquitoicidal Cry4Aa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 3, p. 179-183, 2009.

HUANG, X. Q.; WEI, Z. M. High frequency plant regeneration through callus initiation from mature embryos of maize (*Zea Mays* L.). **Plant Cell Reports**, v. 22, n. 11, p. 793-800, Jun 2004.

JAMES, C., 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. **ISAAA Brief** n. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

JANMAAT, A. F.; MYERS, J. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences**, v. 270, n. 1530, p. 2263-2270, Nov 2003.

JOHNSON, D. E. Inhibition of RNA-polymerase from *Bacillus thuringiensis* and *Escherichia coli* by β -exotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 5, p. 537-543, May 1978.

JOHNSON, D. E.; L. A; BULLA, JR.; NICKERSON, K. W. 1975. Differential inhibition by β -exotoxin of vegetative and sporulation specific ribonucleic acid polymerases from *Bacillus thuringiensis* cells, p. 248-254. In P. Gerhardt, R. N. Costilow, and H. C. Sadoff (ed.), Spores VI. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.

JOHNSON, D. E.; MCGAUGHEY, W. H. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. **Current Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 54-59, Jul 1996.

JURAT-FUENTES, J. L. et al. Reduced levels of membrane bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Plos One**, v. 6, n. 3, Mar 2011.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Characterization of a Cry1Ac receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis*

virescens larvae. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 15, p. 3127-3135, Aug 2004.

KELLER, M. et al. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 365-373, Apr 1996.

KLIER, A.; M. M.; LECADET, H. DE BARJAC. Inhibition des ARN-polymerases ADN-dependantes de *B. thuringiensis* par l'exotoxine de *B. thuringiensis*. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. v. 277, n. 24, p. 2805-2808, Dec 1974.

KNIGHT, P. J. K.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D. J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase-N. **Molecular Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 429-436, Feb 1994.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, v. 24, p. 275-308, 1994.

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The Crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, v.15, p. 469-476, 1993.

KOLLER, C. N.; BAUER, L. S.; HOLLINGWORTH, R. M. Characterization of the pH mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var *san-diego* native delta-endotoxin crystals. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 184, n. 2, p. 692-699, Apr 1992.

KOLSTO, A. B.; TOURASSE, N. J.; OKSTAD, O. A. What Sets *Bacillus anthracis* apart from other Bacillus Species? **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 451-476, 2009.

KRISHNAMOORTHY, M. et al. Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. **Insect Biochem Mol Biol** v. 37, p. 189–201, 2007.

KRYWUNCZYK, J.; FAST, P. G. Sorological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 36, p. 139-140, 1980.

KUZINA, L. V. et al. Study of the nature of determinants for synthesis of delta-endotoxin and β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strains-bitoxybacillin producers. **Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.** v. 20, n. 24, 1993.

LECADET, M.M.; DE BARJAC, H. (1981) *Bacillus thuringiensis* beta exotoxin. In **Pathogenesis of Invertebrate Microbiol Diseases** ed. Davidson, E.W. p. 293-316. Totowa, NJ, USA: Allanheld, O.

LERECLUS, D. et al. Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Fems Microbiology Letters**, v. 60, n. 2, p. 211-218, Jul 1989.

LERECLUS, D. et al. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 60, p. 211-218, 1989.

LERECLUS, D.; DELECLUSES, A.; LECADET, M. M. (1993) Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes, p. 37-70. In Entwistle, P.F.; Cory, J.S.; Bailey, M.J.; Higgs, S. (eds) *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. West Sussex, **John Willey & Sons**, p. 330.

LEVINSON, B. L. et al. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid-chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3172-3179, Jun 1990.

LI, H. R. et al. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis* resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 8, p. 753-762, Aug 2004

LI, J. D.; CARROLL, J.; ELLAR, D. J. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5-Å resolution. **Nature**, v. 353, n. 6347, p. 815-821, Oct 1991.

LUTHY, P.; WOLFERSBERG, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxin In Charles J. F., Delecluse A., Nielsen-Le Roux, C. (Eds.) Entomopathogenic bacteria from laboratory to field application. Kluwer Academic Publishers, p. 167-180, 2000.

LYSENKO, O. *Bacillus thuringiensis*: evolution of a taxonomic conception. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, n. 3, p. 295-298, 1983.

MAC INNES, T. C.; BOUWER, G. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 2, Jun 2009.

MASSON, L. et al. The Cry1A(c) receptor purified from *Manduca sexta* displays multiple specificities. **J Biol Chem**, v. 270, p. 20309- 20315, 1995.

MCGAUGHEY, W. H. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 229, n. 4709, p. 193-194, 1985.

MCGAUGHEY, W. H.; WHALON, M. E. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science**, v. 258, n. 5087, p. 1451-1455, Nov 1992.

MCNALL, R. J.; ADANG, M. J. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 10, p. 999-1010, Oct 2003.

MIRALLES, M. P.; PERES, V. J. (2004) Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*, p.207-232 In Bravo, A.; Ceron, J. (eds) *Bacillus thuringiensis* em el control biológico. Bogotá, Colombia, p. 293.

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

MONNERAT, R. G. & PRAÇA, L. B. *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus shaericus*. In: Oliveira-Filho, E.C.; Monnerat, R.; G. (Eds.) Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 121-155, 2006.

MONNERAT, R.S.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, v.3, p.163-200, 2000.

MORIN, S. et al. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5004-5009, Apr 2003.

MORSE, R. J.; YAMAMOTO, T.; STROUD, R. M. Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure**, v. 9, n. 5, p. 409-417, May 2001.

NETO, D. D. ; FANCELLI, A.L. **Produção de milho** 2. ed. Guaíba: Agropecuária, p. 360. Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção, 2. ISSN 1679-012X Versão Eletrônica - 3ª edição Set 2007.

OPPERT, B. et al. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 38, p. 23473-23476, Sep 1997.

OZAWA, K.; IWAHANA, H. Involvement of a transmissible plasmid in heat stable exotoxin and δ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmstadiensis*. **Current Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 337-340, 1986.

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, Nov 2009.

PARDO-LÓPEZ, L. et al. (2006) Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by Nacetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45: 10329–10336.

PARDO-LÓPEZ, 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 & Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 91-142, May 2005.

PERANI, M.; BISHOP, A. H.; VAID, A. Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Fems Microbiology Letters**, v. 160, n. 1, p. 55-60, Mar 1 1998.

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, Jun 2007.

RANG, C. et al. Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: A basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 22-27, Jul 2004.

RUKMINI, V.; REDDY, C. Y.; VENKATESWERLU, G. *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. **Biochimie**, v. 82, n. 2, p. 109-116, Feb 2000.

SANGADALA, S. et al. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal cryIa(c) toxin binding and (RB++k+)-RB-86 efflux in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 13, p. 10088-10092, Apr 1994.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, Sep 1998.

SENA, J. A. D.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with *Spodoptera frugiperda* Midgut Binding Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, Apr 2009.

SOBERON, M.; GILL, S. S.; BRAVO, A. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 1337-1349, Apr 2009.

STORER, N. P. et al. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, Aug 2010.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 199-202, Feb 2008.

TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 47-79, 1994.

VADLAMUDI, R. K. et al. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5490-5494, Mar 1995.

VADLAMUDI, R. K.; JI, T. H.; BULLA, L. A. A Specific binding protein from *Manduca sexta* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp *berliner*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12334-12340, Jun 1993.

VALICENTE, F. H. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Bacillus thuringiensis*. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**, v. 105, p. 1-9, dez 2008.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 1, p. 1-16, Apr 2009.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by stem borer *Busseola fusca* (Fuller) to Bt transgenic maize. **S. Afr. J. Plant Soil**, v. 24, p. 147-151, 2007.

VAN RIE, J. et al. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 247, n. 4938, p. 72-74, Jan 1990.

WANG, G. R. et al. Gene cloning and expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its Cry1A binding region. **Science in China Series C-Life Sciences**, v. 48, n. 4, p. 346-356, Aug 2005.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 549-576, 1986.

WHO. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. **WHO Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2**. World Health Organization, Geneva, 1999.

CAPÍTULO 2

Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis*.

RESUMO

A utilização a longo prazo das toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* presentes nos biopesticidas ou nas culturas transgênicas pode ser comprometida pela evolução da resistência dos insetos-alvo. Entre todos os mecanismos de resistência às toxinas Cry o mais comum é a redução da ligação das toxinas às células do intestino médio do inseto, assim a piramidação de genes utilizada nas culturas Bt consiste em uma estratégia interessante a ser adotada para realizar o manejo de resistência, mas para que ela seja eficaz é necessário que as toxinas combinadas tenham modos de ação diferentes e não se liguem aos mesmos receptores no intestino médio do inseto. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac de *B. thuringiensis* aos receptores da membrana intestinal de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e determinar se estas proteínas compartilham os mesmos receptores. Para isto as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac expressas em cepas recombinantes de *B. thuringiensis* foram purificadas através de gradiente de sacarose, solubilizadas, ativadas com tripsina e biotinizadas para realização de ensaios de ligação e ensaios de competição homóloga e heteróloga. No presente trabalho verificamos através dos ensaios de ligação que as três proteínas avaliadas são capazes de se ligarem aos receptores do epitélio intestinal tanto de *S. frugiperda* quanto de *D. saccharalis* através de ligações inespecíficas, no entanto não foi verificada uma correlação entre a interação das proteínas Cry1A às BBMVs com a toxicidade visto que estas proteínas não causaram mortalidade significativa nas lagartas de ambos insetos-pragas testados. Não foi observado o compartilhamento de receptores pelas proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e

Cry1Ac em *S. frugiperda* e *D. saccharalis*, exceto Cry1Ac e Cry1Aa que competem pelos sítios de ligação em *D. saccharalis*. Um possível efeito sinérgico entre as toxinas Cry1Ab e Cry1Ac em *S. frugiperda* foi constatado.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, BBMV's, Proteínas Cry, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*.

ABSTRACT

The long-term use of Cry toxins of *Bacillus thuringiensis* present in biopesticides and transgenic Bt crops may be compromised by the development of target insect resistance. Among all the mechanisms of resistance to Cry toxins the most common is reducing the binding of the toxin to midgut cells of the insect, thereby pyramiding genes used in Bt crops consists an interesting strategy to be adopted to realize the management of resistance but for it to be effective it is necessary that the combined toxins have different modes of action and not bind to same receptors in the insect midgut. Therefore the objective of this study was to evaluate the binding of proteins Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac from *B. thuringiensis* to the intestinal membrane receptors *Spodoptera frugiperda* and *Diatraea saccharalis* and determine whether these proteins share the same receptors. For this purpose proteins Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac expressed in recombinant strains of *B. thuringiensis* were purified by sucrose gradient, solubilized, biotinylated, activated with trypsin for performing binding assays, homologous and heterologous competition assays. In the present study we verified through binding assays which evaluated the three proteins are able to bind to the receptors of the intestinal epithelium of both *S. frugiperda* as *D. saccharalis* through nonspecific bindings, however there wasn't a correlation between the interaction of proteins Cry1A with BBMV's and toxicity since these proteins did not cause significant mortality in larvae of both insect pests tested. There wasn't sharing of receptors by protein Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac in *S. frugiperda* and *D. saccharalis* except Cry1Ac and Cry1Aa that compete for binding sites on *D. saccharalis*. A possible synergistic effect between Cry1Ab and Cry1Ac toxins in *S. frugiperda* was found.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, BBMV's, Cry proteins, *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis*.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (Bt) é bastante conhecida por sua capacidade de produzir proteínas inseticidas na forma de cristais chamadas δ -endotoxinas durante a fase de esporulação (DE MAAGD et al., 2003).

A atividade inseticida destas proteínas tem sido amplamente estudada em insetos lepidópteros, demonstrando que o cristal após ser ingerido pelo inseto susceptível é solubilizado e em seguida a protoxina liberada é processada por proteases do intestino transformando-se em uma forma ativa. A toxina ativada se liga à receptores específicos das vesículas da membrana da borda escovada (BBMV's) das células do intestino médio e formam poros que geram um desequilíbrio osmótico e iônico causando a morte do inseto (ARONSON et al., 1986; KNOWLES et al., 1994; BRAVO et al., 2007).

Várias culturas transgênicas expressando os genes das proteínas inseticidas de Bt foram desenvolvidas, proporcionando assim uma forma eficaz de controlar os insetos- pragas na agricultura e reduzindo o uso de agrotóxicos aplicados no campo. Desde 1996 quando ocorreu a primeira liberação comercial de uma cultura Bt muitas outras foram desenvolvidas e rapidamente adotadas em todo o mundo. Só em 2012 foram plantados cerca de 60 milhões de hectares de culturas Bt (JAMES, 2012).

A aplicação das δ -endotoxinas tem contribuído substancialmente para melhoria da produtividade do milho durante a última década devido ao controle de várias pragas de lepidópteros como *Spodoptera*

frugiperda e *Diatraea saccharalis*, através do desenvolvimento do milho-Bt transgênico (UPADHYAY et al, 2012).

No entanto, o desenvolvimento de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* pelas populações de insetos ameaça a eficácia dos biopesticidas e culturas Bt (FERRÉ & VAN RIE, 2002; HIGUCHI et al. 2007). Desta forma a utilização de combinações das toxinas de *B. thuringiensis* tanto nas formulações de pesticidas biológicos como nas culturas transgênicas para o controle de insetos-pragas têm sido proposto como uma estratégia eficiente para aumentar a gama de insetos-alvos e retardar o aparecimento de insetos resistentes (FERRÉ, 2003).

A redução da ligação das toxinas Cry aos receptores do intestino médio é o principal mecanismo de resistência às toxinas de *B. thuringiensis* nos insetos (BAXTER et al., 2011). Assim o estudo da ligação das proteínas Cry aos receptores e o conhecimento do compartilhamento do receptor entre diferentes toxinas do Bt é crucial para a concepção de uma adequada piramidação de genes (PIGOTT & ELLAR, 2007; BRAVO & SOBERON, 2008).

Desse modo o presente trabalho teve como objetivo avaliar as interações das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac de *B. thuringiensis* com os sítios de ligação do intestino médio de lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* e determinar através de ensaios de competição se estas proteínas partilham os mesmos receptores. Esses resultados serão úteis ao elaborar estratégias de piramidação de genes para o desenvolvimento de milho-Bt visando o manejo de resistência de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* às proteínas Cry.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Criação de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis*

A criação de *D. shaccaralis* e *S. frugiperda* foi realizada no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS). Os insetos foram criados em BOD sob as condições de 25°C, UR 70% e fotofase de 14 horas. As *S. frugiperda* foram alimentadas com dieta artificial modificada por Valicente e Barreto (1999), contendo os seguintes componentes por litro de dieta: grãos de feijão cozido (123,6g), gérmen de trigo (59,3g), levedo de cerveja (38,0g), ácido ascórbico (3,82g), nipagin (2,36g), ácido sórbico (1,23g), ágar (15,35g), formaldeído (3,1g), ácido fosfórico (0,131ml) e ácido propiônico (1,3ml). As *D. shaccaralis* foram alimentadas com dieta artificial constituída por cloreto de colina (0,8g), sacarose (108,0g), farelo de soja (160,0g), gérmen de trigo (36,0g), nipagim (9,2g), ágar (24,0g), solução vitamínica (12,0ml), vita gold (0,8ml), ampicilina (2,0ml), formol (2,0ml) descrita por Hensley e Hammond (1968) com algumas modificações.

2.2 Extração, purificação e solubilização das proteínas

Para a síntese das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac empregadas neste trabalho foram utilizadas as cepas recombinantes de

B. thuringiensis S2211 (Cry1Aa), S2210 (Cry1Ab) e S2209 (Cry1Ac) pertencentes ao banco de *Bacillus* spp. entomopatogênicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas cepas foram cultivadas a 28°C e 200rpm por 72 horas em meio de esporulação (8g/L de caldo nutriente; 0,25g/L de MgSO₄.7H₂O; 1g/L de KCl; 0,002g/l de MnCl₂.H₂O; 0,0732g/L de Fe(SO₄).7H₂O; 0,0056% de H₂SO₄ (v/v); 0,098g/L de CaCl₂) (LERECLUS et al., 1995), contendo 10µg/ml de eritromicina.

Os esporos e cristais foram centrifugados, primeiramente por três vezes a 10000rpm e 4°C (Jouan BR4i) por 10min, com tampão contendo 0,3M de NaCl e 0,01M de EDTA (pH 8.0), e em seguida com tampão contendo PMSF a 1mM. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recuperado com tampão TTN (20mM de tris, 300mM de NaCl, 0,1% de triton x-100, pH 7.2) e centrifugado a 10000rpm a 4°C por 10min. O procedimento foi repetido três vezes e após esta etapa o material foi sonificado com três pulsos de um minuto, com intervalos iguais de um minuto, a 15W (VirSonic CelDisrutter 16-850).

A purificação das proteínas Cry das cepas recombinantes foi realizada por meio de gradiente de sacarose de acordo com o protocolo descrito por Thomas & Ellar (1983). Posteriormente, foram recuperadas com adição de triton 1% (v/v) e PMSF 1mM e solubilizadas em tampão alcalino de carbonato de sódio a 50mM (pH 10.5) com 0,2% (v/v) de β-mercaptoetanol por duas horas a 37°C com agitação constante de 60rpm. Depois deste processo, a amostra foi centrifugada por 5min a 14000rpm.

Em seguida, a proteína solúvel foi quantificada com Protein Assay (Bio Rad) pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para observação da integridade e massa molecular das proteínas foi feito um

gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%, de acordo com Laemmli (1970). Alíquotas de 20 μ l das proteínas foram misturadas à 7,5 μ l de tampão de amostra de proteína 4X (250mM Tris-HCl, pH 6.8, 40% Glicerol, 0,14mM SDS, 10% β -Mercaptoetanol, 0,1% Azul de Bromofenol) fervidas a 100°C por 5min e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Foram aplicados 7,5 μ l do marcador de proteína (marcador de massa molecular Rainbow- GE[®]).

A eletroforese foi realizada em um aparelho de eletroforese vertical (Hoefler miniVE-Amersham Pharmacia), contendo tampão de corrida 1X (Tris-base, glicina, SDS 10%), a voltagem constante de 120V, por aproximadamente 3hs. O gel foi corado com 20ml de solução corante Comassie blue (40% metanol e 25% de Comassie blue 250-G) e descorado com água destilada por 16hs até visualização dos perfis proteicos das cepas.

2.3 Ativação das proteínas com tripsina

As proteínas purificadas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram quantificadas pelo método de Bradford e em seguida incubadas com a enzima tripsina durante duas horas a 37°C com leve agitação para que fossem ativadas, tornando-se aptas a se ligarem aos receptores dos insetos. A quantidade de tripsina utilizada variou de acordo com a concentração das proteínas em uma proporção de 10:1 de proteína:enzima, respectivamente. Para inativação da enzima foi adicionado PMSF a 1mM, e em seguida centrifugado a 10000rpm por 10min e o sobrenadante coletado. Para observação da integridade das

proteínas e sua massa molecular foi feito um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%.

2.4 Biotinilação das proteínas

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram biotiniladas com auxílio do Kit ECL Protein Biotinylation System (Amersham) de acordo com as recomendações do fabricante com algumas modificações. Para isto, 500µg das proteínas foram incubadas com 10µl de biotina e tampão bicarbonato 1X (Amersham) para um volume final de 500µl durante uma hora à temperatura ambiente.

Em seguida, a coluna Sephadex G25 (Amersham) foi bloqueada com 5ml de PBS 1X (8×10^{-4} g/ml de NaCl, $1,44 \times 10^{-4}$ g/ml de Na_2HPO_4 , $0,2 \times 10^{-4}$ g/ml de KCl, $0,24 \times 10^{-4}$ g/ml de KH_2PO_4) contendo BSA 1% (m/v) e lavada com 20ml de tampão bicarbonato 1X. As proteínas ligadas com a biotina foram adicionadas à coluna e eluídas pela adição de 10ml de tampão bicarbonato 1X. A partir disso, dez frações contendo 1ml de solução foram coletadas e as proteínas de cada fração quantificadas como descrito anteriormente.

Após esse processo as proteínas da fração ou frações contendo as proteínas biotiniladas foram submetidas a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 9%. O gel foi utilizado para transferir as proteínas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham). A transferência foi realizada à corrente constante de 350mA em sistema submarino (Hoefler) por 1h em tampão de transferência [Tris-base 25mM, glicina 192mM e metanol 20% (v/v)].

A membrana foi incubada por 16hs a 4°C com PBS 1X para que fosse renaturada. Em seguida, a membrana contendo as proteínas biotinizadas foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (Amersham) diluída 1:4000 em 40ml de PBS 1X por 1h e revelada com o auxílio do Kit Super Signal Chemiluminescence Substrate (Pierce) de acordo com as especificações do fabricante.

2.5 Extração das “Brush Border Membrane Vesicles” (BBMVs)

As BBMVs foram obtidas a partir de intestinos médios de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* de quarto estágio de desenvolvimento. Os intestinos foram retirados com auxílio de pinças e tesoura entomológica, lavados e conservados em solução tampão MET (manitol 200mM, DTT 1mM e HEPES-Tris 1mM, pH 7.4) a -80°C.

Um grama dos intestinos foram submetidos a nove pulsos a 2250rpm em um aparelho homogeneizador “blender-polytron” (Glass-Col® Terre Haunt USA) juntamente com 10ml de tampão de homogeneização contendo 300mM de manitol, 17mM de Tris-HCl, 10mM de HEPES, 5mM de EGTA, 2mM de DTT, 1mM de EDTA e 1mM de PMSF, pH 7.4. Adicionou-se 10ml de solução gelada de MgCl₂ a 24mM e a mistura foi incubada em gelo por 15min. A reação foi centrifugada a 4500rpm por 15min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 10000rpm por 1hr e 30min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 2,5ml de tampão de homogeneização e 5ml de MgCl₂ a 24mM, incubado no gelo por 15min e centrifugado a 4500rpm durante 15min a 4°C. O sobrenadante coletado foi novamente centrifugado a

15000rpm por 40min e o sedimento ressuspensionado em 1ml de tampão de homogeneização. As BBMV's purificadas foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), divididas em pequenas alíquotas e armazenadas a -80°C.

2.6 Ensaio de ligação

O ensaio de ligação foi realizado como descrito por Aranda et al. (1996) com algumas modificações e caracterizou-se pela ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac às BBMV's extraídas do intestino médio de *S. frugiperda* e *D. shaccaralis*. Cada toxina biotinizada (50nM) foi incubada com 10µg de BBMV's em 100µl de tampão de ligação [PBS 1X (pH 7.4) - Tween 20 0,1% (v/v)] à temperatura ambiente durante 1hora.

As proteínas não ligadas às BBMV's foram removidas no processo de centrifugação por 10min a 14000 rpm. As BBMV's foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspensionadas em 10µl de PBS 1X - Tween 20 0,1% e 3µl do tampão de amostra Laemmli 4X [Tris-HCl 0,125M (pH 6.8), SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), 2-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Brofenol 0,01% (m/v)]. Em seguida, as amostras foram fervidas por 3min e aplicadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) 9%.

O gel foi utilizado para transferir as proteínas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham). A transferência foi realizada à corrente constante de 350mA em sistema submarino (Hofer) por 1hr em tampão de transferência [Tris base 25mM, glicina 192mM e metanol 20% (v/v)]. A membrana foi incubada por 16hs a 4°C com

PBS 1X para que fosse renaturada. Em seguida, a membrana contendo as ligações das toxinas marcadas com as BBMV's foi incubada com streptavidina conjugada com peroxidase (Amersham) diluída 1:5000 em 40ml de PBS 1X por 1h e revelada com o auxílio do Kit Super Signal Chemiluminescence Substrate (Pierce) de acordo com as especificações do fabricante.

2.7 Ensaio de competição

O ensaio de competição foi realizado como descrito por Fernandez et al. (2006) com algumas modificações e caracterizou-se pela ligação e competição das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac aos receptores extraídos do intestino médio de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*. Uma toxina biotinizada (50nM) foi incubada com 10µg de BBMV's e com 5000nM de uma proteína não biotinizada em 100µl de tampão de ligação [PBS 1X (pH 7.4), Tween 20 0,1% (v/v)] à temperatura ambiente durante uma hora. Inicialmente, a proteína Cry1Aa marcada foi incubada separadamente com as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac não-biotinizadas, constituindo assim três ensaios. O mesmo foi feito com as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac marcadas.

As proteínas não ligadas às BBMV's foram removidas no processo de centrifugação (10min a 14000rpm). As BBMV's foram lavadas três vezes no tampão de ligação e ressuspensas em 10µl de PBS 1X e 3µl de tampão de ligação Laemmli 4X [Tris-HCl, 125M pH 6.8, SDS 4% (m/v), glicerol 20% (v/v), β-mercaptoethanol 10% (v/v), Azul de Brofenol 0,01% (m/v)]. Depois, as amostras foram fervidas por 3min e aplicadas em um gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-

PAGE) a 9%. O gel foi utilizado para transferir as proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL - Amersham), como descrito acima. O processo de lavagem e revelação da membrana foi o mesmo descrito no ensaio de ligação.

2.8 Bioensaios com as proteínas purificadas

As cepas recombinantes de *B. thuringiensis* expressando as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram cultivadas por 72hs em meio de esporulação (LERECLUS et al., 1995) a 28°C e 200rpm. A partir da cultura bacteriana os cristais foram extraídos, solubilizados e as proteínas solubilizadas ativadas com tripsina como descrito anteriormente para que pudessem ser utilizadas nos bioensaios. Para os bioensaios seletivos alíquotas de 100µl contendo 5000ng de cada proteína foram aplicadas uniformemente sobre a superfície de pedaços da dieta artificial com 1cm³ distribuídas em 24 copos plásticos no qual foi colocado uma lagarta de 2 dias de idade/primeiro ínstar. A mortalidade foi avaliada após 7 dias.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Purificação e solubilização das proteínas

O perfil das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac solúveis em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (Figura 6) apresentou bandas de 130 KDa compatíveis com o tamanho esperado destas proteínas, estando, portanto, de acordo com o relatado em outros trabalhos (HÖFTE & WHITELEY, 1989; SCHNEPF et al., 1998; SHARMA et al., 2011, BRAVO et al., 2011).

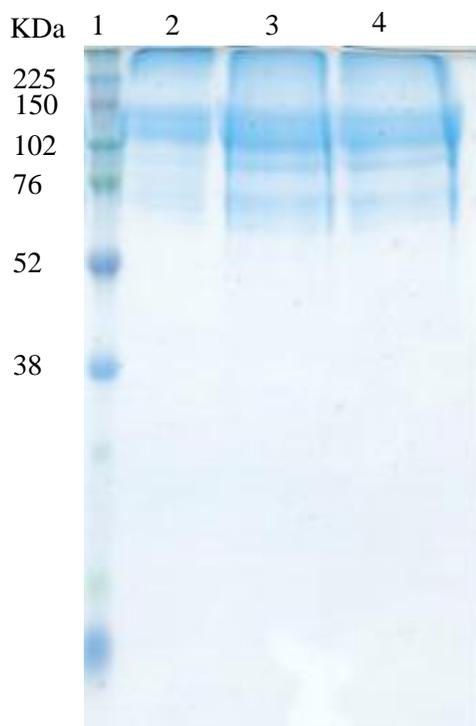


Figura 6: Perfil proteico obtido das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac solúveis em SDS-PAGE a 12%. 1: marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2: proteína Cry1Aa solúvel; 3: proteína Cry1Ab solúvel e 4: proteína Cry1Ac solúvel.

3.2 Ativação das proteínas com tripsina

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac após serem ativadas com tripsina apresentaram massa molecular de aproximadamente 65 KDa (Figura 7). Höfte & Whiteley 1989, Van Rie et al., 1990 e Bravo et al., 2007 descrevem que essas proteínas ativas apresentam tamanho de cerca de 65 KDa condizendo com os resultados encontrados.

A proteína Cry1Ab tripsinada produziu três polipeptídeos, um com cerca de 65 KDa e outros dois com massa molecular entre 38 e 24 KDa, já a proteína Cry1Ac ativada com tripsina apresentou dois polipeptídeos de aproximadamente 65 KDa e 38 KDa. A presença de outras bandas após a ativação das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac com tripsina pode estar associada com a degradação das proteínas visto que o procedimento de ativação foi realizado sem a presença de inibidores de proteases o que pode ter contribuído para degradação das mesmas.

O tempo de incubação da proteína com a tripsina e a proporção entre a concentração das proteínas Cry e a concentração da enzima também pode ter contribuído para que fossem gerados estes polipeptídeos com peso molecular abaixo de 65 KDa. Resultados parecidos foram encontrados por Miranda et al. (2001) ao clivar a proteína Cry1Ab com tripsina utilizando a proporção de 1:1 (tripsina/protoxina) no qual foram produzidos fragmentos 62 e 33 kDa.

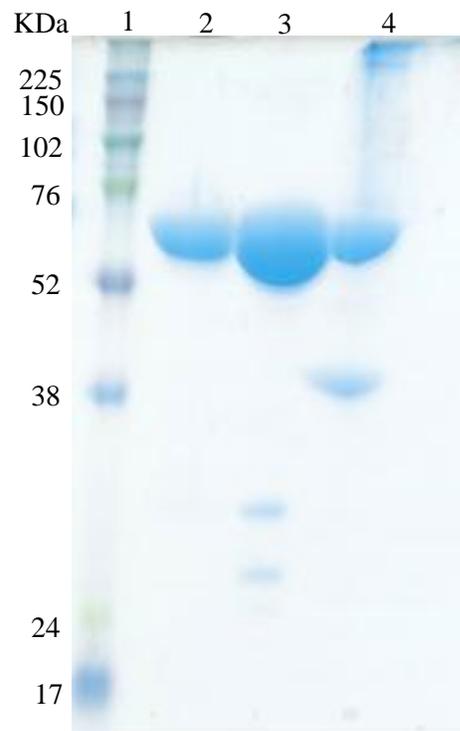


Figura 7: Ativação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac com tripsina em SDS-PAGE 12%. 1: marcador de massa molecular Rainbow da GE; 2: proteína Cry1Aa ativada; 3: proteína Cry1Ab ativada e 4: proteína Cry1Ac ativada.

As protoxinas solubilizadas no lúmen do intestino médio dos insetos são clivadas por proteases intestinais tornando-se ativas. Esta etapa do mecanismo de ação é necessária para que posteriormente a toxina ativada possa passar por complexos eventos sequenciais de ligação com diferentes receptores do intestino que levam à sua inserção à membrana e à formação de poros. Portanto, foi utilizado tripsina para simular *in vitro* o que naturalmente ocorre no intestino dos insetos de forma que as protoxinas Cry fossem ativadas.

Ferreira et al. (1994) demonstrou que *S. frugiperda*, assim como em muitas outras espécies de lepidópteros como *D. saccharalis*, apresenta inúmeras enzimas intestinais do tipo serino-proteinases, das quais tripsina e quimotripsina são particularmente predominantes. Vários trabalhos têm demonstrado que as serina-proteinases são determinantes para o potencial inseticida das proteínas Cry por afetar a sua solubilização e ativação (HAIDER et al., 1986; OPPERT, 1999; LIGHTWOOD et al, 2000; MIRANDA et al., 2001).

Diferenças na síntese de proteases intestinais entre populações de insetos resistentes e susceptíveis explica em alguns casos o surgimento de resistência às proteínas Cry em populações de insetos como relatam alguns estudos (KELLER et al., 1996; OPPERT et al., 1997; LI et al., 2004, RODRIGUEZ-CABRERA et al., 2011) demonstrando a importância desta etapa no mecanismo de ação das proteínas Cry.

3.3 Biotinilação das proteínas

A análise do filme fotográfico marcado com as proteínas tripsinadas e biotiniladas revelou a presença de fortes bandas com cerca de 65 KDa para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (Figura 8). Esses resultados demonstram que as proteínas se ligaram à biotina além do que mantiveram-se íntegras após passarem pelo processo de biotinilação e que o tamanho esperado das proteínas está de acordo com os encontrados em outros trabalhos (HÖFTE & WHITELEY., 1989; BRAVO et al., 2007).

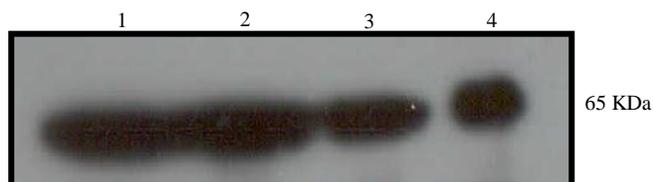


Figura 8 – Biotinilação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (SDS-PAGE a 9%). 1: proteína Cry1Aa ativada e biotinilada, 2: proteína Cry1Ab ativada e biotinilada, 3: proteína Cry1Ac ativada e biotinilada, 4: marcador Biotinylated High range (BioRad).

3.4 Ensaio de ligação

As membranas contendo as BBMV's das populações de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* apresentaram ligações quando submetidas à marcação com as proteínas tripsinadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac (Figura 9). Estes resultados indicam que possivelmente o intestino médio das lagartas destas duas populações de insetos apresentam receptores para as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac e que estas toxinas são capazes de se ligarem à estes receptores.

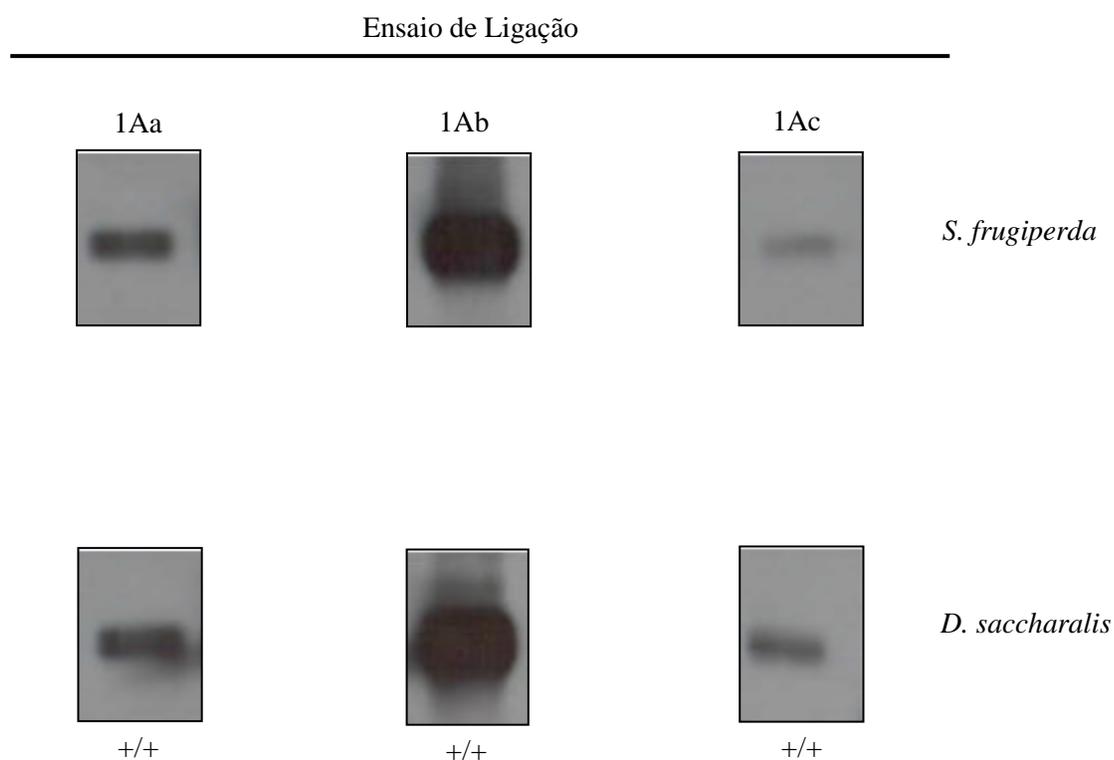


Figura 9: Ensaio de ligação das proteínas ativadas e biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac aos possíveis receptores intestinais de populações de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*. Os sinais positivos indicam ocorrência de ligação das proteínas aos possíveis receptores.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rang e colaboradores (2004) no qual demonstraram através de ensaios de ligação que Cry1Ab e Cry1Ac ligam-se às BBMVs de *S. frugiperda* e de *D. saccharalis*. De Macedo et al. (2012) também relataram que as BBMVs de *D. saccharalis* apresentaram ligações quando submetidas à marcação das proteínas biotiniladas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac.

Aranda et al. (1996) mostraram que as toxinas biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram capazes de ligar-se ao longo das microvilosidades do intestino médio de *S. frugiperda* quando colocadas em contato com seções do tecido intestinal confirmando, portanto, os resultados encontrados com os ensaios de ligação deste trabalho.

Foram observadas diferenças significativas na intensidade de marcação nas ligações das proteínas Cry às BBMV's. A afinidade de ligação, concentração dos sítios de ligação e a irreversibilidade da ligação têm sido demonstrados como fatores críticos na determinação da atividade e especificidade inseticida (LEE et al., 2006) e podem estar relacionados com esta diferença no grau de marcação visualizada nos ensaios de ligação. Além do que a afinidade de ligação pode ser influenciada pela conformação que ambos polipeptídeos envolvidos na interação se encontram.

Bravo e colaboradores (2007) descreveram em um modelo para o mecanismo de ação das toxinas Cry1A que os receptores caderina, aminopeptidase N e fosfatase alcalina, desempenham um papel fundamental na interação das proteínas Cry1A com o intestino médio de lagartas de Lepidoptera, assim é possível que estes receptores estejam envolvidos na ligação das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac às BBMV's de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*.

APN e caderina já foram identificados como possíveis receptores para as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac em diferentes espécies de lepidópteros, além destes receptores ALP também foi relatado como um possível receptor envolvido no reconhecimento da proteína Cry1Ac (PIGGOT & ELLAR, 2007).

A redução nos níveis da expressão dos genes dos receptores fosfatase alcalina e caderina foi detectada respectivamente em lagartas de *S. frugiperda* resistentes à Cry1F e lagartas de *D. saccharalis* resistente à Cry1Ab quando comparado com lagartas susceptíveis (JURAT-FUENTES et al., 2011; YANG et al., 2011) demonstrando assim a associação deste receptores com proteínas Cry1.

Para determinar os prováveis receptores envolvidos na ligação das proteínas Cry1Aa e Cry1Ab e Cry1Ac às BBMV's de *D. saccharalis* e *S. frugiperda* ensaios de ligação para determinação do tamanho dos receptores e ensaios enzimáticos deverão ser realizados posteriormente.

3.5 Ensaio de Competição

A expressão de múltiplas toxinas Cry com diferentes modos de ação têm sido sugerido para prevenir ou retardar o aparecimento de resistência nas culturas transgênicas Bt e ampliar a gama de insetos controlados por esta tecnologia (CHRISTOU et al., 2006; BRAVO & SOBERÓN, 2008; ALI et al., 2010).

Uma vez que grande parte dos casos de resistência ocorrem devido à alterações nos receptores das toxina Cry, para garantir a eficácia da piramidação de genes nas culturas Bt é recomendável que as toxinas utilizadas não devam competir pelos receptores (LEE et al., 2006). Assim compreender os padrões de ligação das toxinas Cry às BBMV's dos insetos é importante para realizar as escolhas das melhores combinações das toxinas a serem utilizadas no desenvolvimento da cultura Bt.

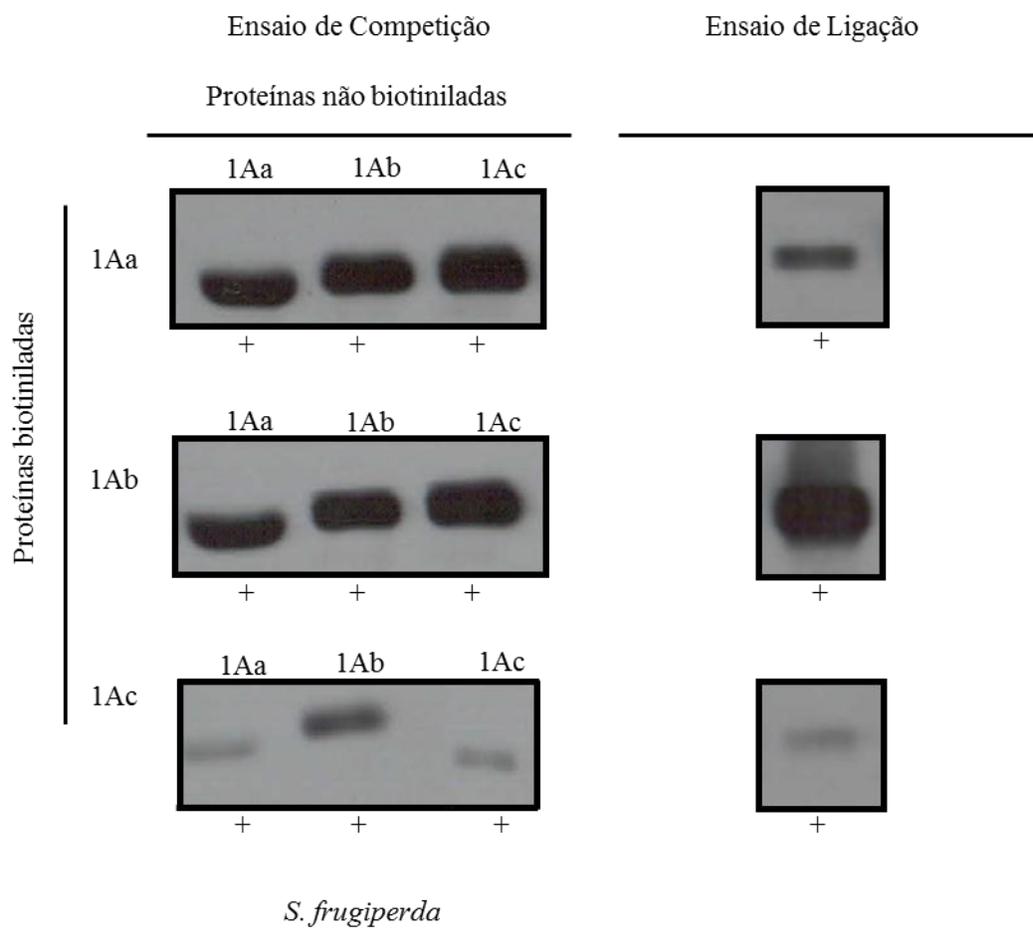


Figura 10: Ensaio de competição homóloga e heteróloga das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac aos receptores intestinais de populações de *S. frugiperda*. Os sinais positivos indicam que não ocorreu competição entre as proteínas testadas, enquanto os sinais negativos indicam ocorrência de competição entre as proteínas.

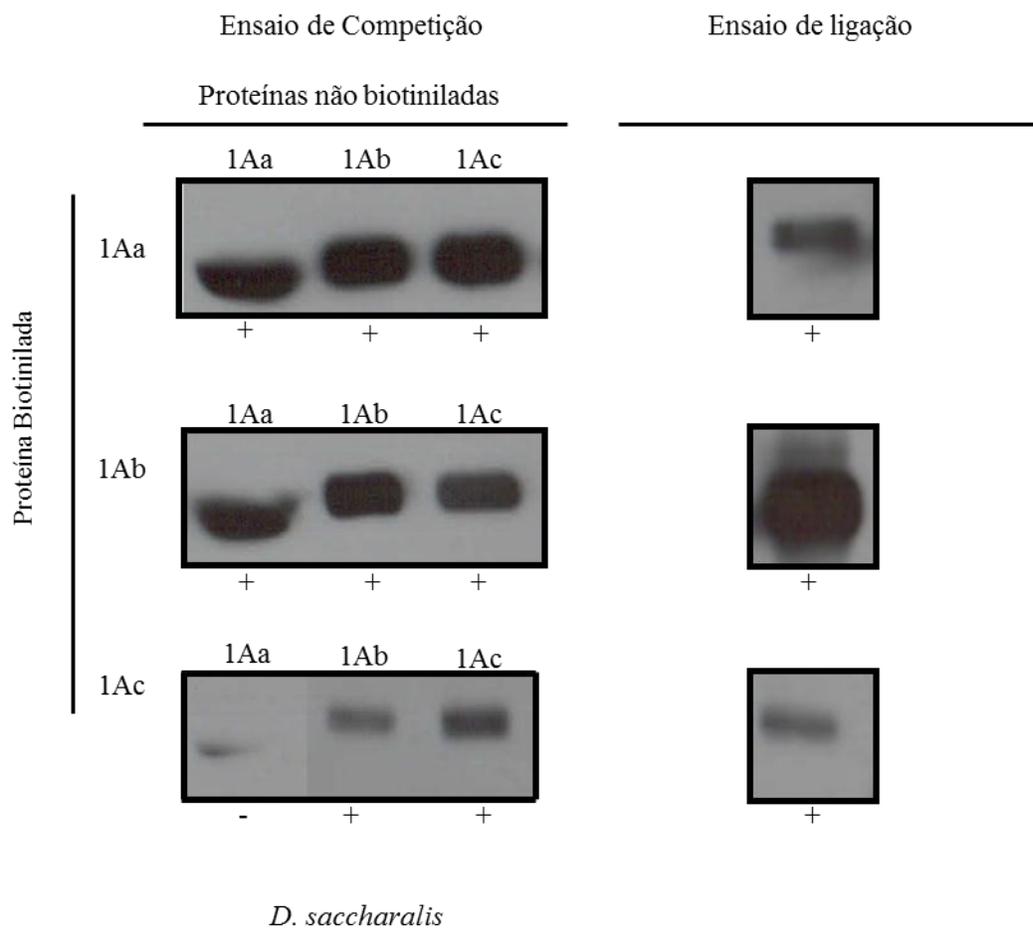


Figura 11: Ensaio de competição homogênea e heterogênea das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac aos receptores intestinais de populações de *D. saccharalis*. Os sinais positivos indicam que não ocorreu competição entre as proteínas testadas, enquanto os sinais negativos indicam ocorrência de competição entre as proteínas.

Nos ensaios de competição homóloga a adição de um excesso das proteínas não biotinizadas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, não reduziu a ligação das respectivas proteínas homólogas biotinizadas, indicando que a maioria das ligações foi inespecífica. Aranda et al. (1996) apresentou resultados semelhantes, demonstrando que a ligação da proteína Cry1Ab às BBMV's de *S. frugiperda* foi inespecífica, entretanto Sena et al. (2009) observaram que esta proteína se liga de forma específica. As três toxinas ligam-se especificamente aos receptores de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* segundo Rang et al. (2004).

Os resultados obtidos com os ensaios de competição heteróloga demonstram que não houve competição entre as proteínas pelos receptores, exceto entre as toxinas Cry1Ac e Cry1Aa em *D. saccharalis*, visto que as proteínas marcadas foram capazes de se ligar aos receptores mesmo na presença de outra proteína heteróloga não biotinizada.

O mesmo não foi verificado por Rang et al. (2004) que demonstraram em populações de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac competem pelo mesmo sítio de ligação, diferindo portanto dos resultados encontrados neste trabalho. Contudo resultados semelhantes foram relatados por Aranda et al. (1996), através de ensaios de competição heteróloga realizados com BBMV's de *S. frugiperda* e as toxinas Cry1Ab e Cry1Ac mostraram que a ligação da toxina Cry1Ac biotinizada às BBMV's não foi afetada pela presença de um excesso de 1000 vezes da toxina nativa Cry1Ab, sugerindo que ambas as toxinas têm diferentes sítios de ligação. Fiuza (2009) demonstrou que também não houve competição entre as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac pelos receptores de populações resistentes e susceptíveis de *Anticarsia gemmatalis*.

Karim et al. (2000), Estela et al. (2004) e Gonzáles-Cabrera et al. (2006) demonstraram que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ac e Cry1Ab compartilham o mesmo sítio de ligação respectivamente em populações de *Helicoverpa zea*, *Plutella xylostella* e *Pectinophora gossypiella/H. zea*. Em algumas outras espécies de lepidópteros testadas, foi verificado que Cry1Ac e Cry1Ab compartilham o mesmo receptor (FIUZA et al., 1996; HERRERO et al., 2001; JURAT-FUENTES & ADANG, 2001).

Monnerat et al. (2006) demonstraram, através de ensaios de ligação realizados com as toxinas Cry1Ba, Cry1Ca, e Cry1Da, que diferentes populações de *S. frugiperda*, provenientes do Brasil, México e Colômbia apresentaram diferenças quanto à capacidade de ligação às BBMV's e especificidade da ligação e estas variações encontradas puderam ser associados com a variabilidade genética verificada entre as populações de insetos. A variabilidade genética existente entre as populações de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* utilizadas nestes trabalhos podem portanto explicar as diferenças encontradas nos resultados.

Quando as proteínas não biotinizadas competem com as proteínas biotinizadas pelo receptor, não há marcação do filme fotográfico ou a marcação é menos intensa, visto que por elas estarem em maior concentração se ligam primeiro aos sítios de ligação impedindo a ligação das proteínas marcadas, isto foi observado quando o ensaio foi realizado com a proteína Cry1Ac biotinizada e Cry1Aa não marcada e as BBMV's de *D. saccharalis*, demonstrando que provavelmente elas competem pelo mesmo receptor. O compartilhamento de receptores por estas proteínas têm sido demonstrado em várias espécies de lepidópteros (ESCRICHE et al, 1997; LUO et al., 2006; SHARMA et al., 2011).

Ao incubar a proteína biotinilada Cry1Ac e a proteína não marcada Cry1Ab juntamente com as BBMV's de *S. frugiperda* foi verificado um aumento na intensidade da banda, isto ocorreu pois possivelmente há sinergismo entre essas duas toxinas. Este resultado condiz com os obtidos por Sharma et al. (2010) no qual foi verificado através de bioensaios com insetos de uma população de *Chilo partellus* que estas proteínas apresentam atividade tóxica cinco vezes maior juntas quando comparado à sua utilização isolada, indicando que elas têm efeito sinérgico contra larvas de *C. partellus*.

Da mesma forma, Lee et al. (1996) demonstrou que as toxinas Cry1Aa e Cry1Ac apresentaram atividade sinérgica contra lagartas de *Lymantria dispar*, aumentando em 4,9 vezes sua toxicidade quando os insetos foram alimentados com a mistura das proteínas e, neste caso, foi verificado que a combinação das duas toxinas levou também à uma maior formação de poros do que as toxinas individuais, demonstrando portanto a possibilidade de interação sinérgica entre proteínas Cry1A potencializando sua atividade tóxica.

Estes resultados do compartilhamento dos sítios de ligação de BBMV's do intestino médio de *D. saccharalis* pelas toxinas Cry1Aa e Cry1Ac e o possível efeito sinérgico entre as toxinas Cry1Ab e Cry1Ac em *S. frugiperda*, serão úteis para trabalhos visando o desenvolvimento de estratégias de gestão da resistência em milho transgênico Bt no futuro.

3.6 Ensaios de toxicidade com as proteínas purificadas

Os bioensaios seletivos com as proteínas purificadas e ativadas com tripsina Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac não causaram mortalidade significativa tanto em lagartas de *S. frugiperda* quanto de *D. saccharalis* mesmo utilizando uma alta dose da proteína (5000 ng/cm²), embora tenha sido verificado a ligação das proteínas às BBMV's destes insetos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bohorova et al. (1997) em um trabalho no qual foi avaliado a susceptibilidade das principais pragas do milho à diferentes proteínas Cry1, foi verificado que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac causaram baixa taxa de mortalidade sobre lagartas de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*.

Aranda et al. (1996) ao utilizarem as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac em bioensaios com *S. frugiperda*, demonstraram que estas proteínas não foram tóxicas para esta espécie, apresentando CL₅₀ superior a 2000 ng/cm². Foi observado que estas proteínas se ligaram às microvilosidades apicais de seções do tecido do intestino médio de *S. frugiperda* e, portanto, assim como neste trabalho não houve uma correlação estrita entre a capacidade de ligação e a toxicidade destas δ -endotoxinas.

Sugeriram ainda que nesta espécie de inseto há pelo menos dois tipos de ligação das toxinas Cry com as microvilosidades apicais do intestino médio, uma delas é uma interação não específica, enquanto que a outra é altamente específica e saturável, e apenas esta última está correlacionada com a toxicidade, condizendo com os resultados obtidos neste trabalho visto que as proteínas testadas se ligaram de forma inespecífica.

O mecanismo de ação das proteínas Cry1 geralmente aceito é um processo composto por duas etapas, primeiro a etapa reversível que envolve a ligação específica das proteínas aos receptores da membrana escovada e posteriormente uma etapa irreversível que envolve uma mudança conformacional da proteína que leva à sua inserção na membrana celular e formação de poros (VAN RIE et al., 1990; SCHENEPEF et al., 1998) o qual tem sido diretamente relacionada com a toxicidade das δ -endotoxinas (IHARA et al., 1993, 2008; LIANG et al., 1995; RAJAMOHAN et al., 1996).

Assim é possível que as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac tenham se ligado aos receptores de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* mas como a primeira etapa é reversível, ou seja, a ligação pode ser desfeita, houve o desligamento da proteína do sítio de ligação do receptor interrompendo o mecanismo de ação e conseqüentemente impedindo que estas proteínas exerçam alguma atividade tóxica no inseto. Contudo, estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

A ligação das toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac às vesículas da membrana da borda escovada de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* apesar de ser uma etapa necessária não foi suficiente para conferir atividade inseticida. Demonstrando que em alguns modelos, os efeitos *in vivo* das toxinas Cry não estão necessariamente relacionados à capacidade inicial de reconhecimento e ligação aos receptores, mas sim ao caráter irreversível da ligação.

Dos Santos et al. (2009) verificaram que as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab foram mais tóxicas para lagartas de *S. frugiperda* quando

comparadas com a proteína Cry1Ac e toxicidade semelhante para Cry1Ab foi constatada por Sena et al. (2009).

Através de bioensaios realizados com as proteínas Cry individuais e lagartas de *D. saccharalis*, observou-se que a CL₅₀ das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram 222, 327 e 610 ng/cm² respectivamente (De MACEDO et al., 2012). Wu et al. (2009) verificaram que Cry1Aa apresentou maior toxicidade que Cry1Ac sobre *D. saccharalis*, diferentemente Tan et al. (2011) demonstraram que Cry1Ac foi a proteína mais tóxica seguida de Cry1Aa e Cry1Ab.

As variações na susceptibilidade às δ -endotoxinas observadas entre este e os demais trabalhos relatados pode estar relacionada com o fato de terem sido utilizadas diferentes populações de insetos. Monnerat et al. (2006) ao analisarem populações de *S. frugiperda* nativas do México, Brasil e Colômbia quanto à susceptibilidade à Cry1B, Cry1C e Cry1D verificaram que o grau de toxicidade destas proteínas variou entre as populações de insetos e isto foi associado com a alta variabilidade genética encontrada entre as lagartas.

Em um outro trabalho foi constatado que a atividade tóxica de Cry1Ac e Cry1F sobre várias isofamílias de lagarta do cartucho provenientes de lavouras de milho dos EUA, Porto Rico e México apresentou diferenças (BLANCO et al. 2010). Rio-Diez et al. (2012) também demonstraram que houve diferença na toxicidade das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac entre populações de *S. frugiperda* coletadas em plantações de milho e arroz na Colômbia, as lagartas do cartucho do arroz foram mais susceptíveis à ambas δ -endotoxinas, e nas duas populações analisadas a toxicidade de Cry1Ab foi maior que de Cry1Ac.

Huang et al. (2008) detectou variações significativas nas concentrações letais da proteína Cry1Ab entre populações de *D. saccharalis* provenientes do Texas e da Louisiana (EUA).

As populações por serem provenientes de regiões geográficas distintas provavelmente são geneticamente diferenciadas fazendo com que elas apresentem também variações quanto à susceptibilidade às δ -endotoxinas. Estes resultados divergentes da toxicidade das proteínas Cry demonstram a importância em se avaliar a susceptibilidade dos insetos-pragas da região geográfica a qual se busca controlar para garantir o sucesso do uso de biopesticida a base de *B. thuringiensis* ou cultura Bt, de forma que sejam escolhidas as toxinas mais eficientes visando reduzir o número dos insetos-pragas e realizar o manejo da resistência. Sugerindo, portanto, que cada toxina particular de *B. thuringiensis* a ser expressa no milho-Bt deve ser cuidadosamente selecionada visto que a atividade tóxica das proteínas Cry são difíceis de serem generalizadas para uma determinada espécie de inseto.

4 CONCLUSÕES

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac de *B. thuringiensis* se ligam às vesículas da membrana da borda escovada (BBMV) de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* de forma inespecífica.

As proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac não apresentaram toxicidade para as populações de *S. frugiperda* e *D. saccharalis* avaliadas.

Não foi encontrado uma correlação entre a capacidade de ligação das toxinas Cry1A às BBMV e a atividade tóxica contra *S. frugiperda* e *D. saccharalis*.

As toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac não competem pelos mesmos sítios de ligação nos receptores das populações de insetos testadas, exceto as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac que compartilham os mesmos sítios de ligação em *D. saccharalis*.

As toxinas Cry1Ab e Cry1Ac possivelmente agem de forma sinérgica em *S. frugiperda*.

Este trabalho fornece dados que serão relevantes para posteriores trabalhos visando a elaboração de estratégias de gestão resistência em milho transgênico Bt.

5 PERSPECTIVAS

Realizar novos ensaios de ligação e competição para confirmar os resultados obtidos neste trabalho.

Identificar os possíveis receptores envolvidos na ligação das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac às BBMV's de *S. frugiperda* e *D. saccharalis*.

6 REFERÊNCIAS

ALI, S. et al. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, Apr 2010.

ARANDA, E. et al. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 68, n. 3, p. 203-212, Nov 1996.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 1, p. 1-24, Mar 1986.

BAXTER, S. W. et al. Parallel Evolution of *Bacillus thuringiensis* Toxin Resistance in Lepidoptera. **Genetics**, v. 189, n. 2, p. 675-814, Oct 2011.

BLANCO, C. A. et al. Susceptibility of Isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, v. 35, n. 3, p. 409-415, Sep 2010.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93-99, Feb 1987.

BOHOROVA, N. et al. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, p. 412-415, Apr 1997.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, Jul 2011.

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

BRAVO, A.; SOBERON, M. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573-579, Oct 2008.

CHRISTOU, P. et al. Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 6, p. 302-308, Jun 2006.

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, Apr 2001.

DE MACEDO, C. L. et al. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* efficient strains against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1759-1765, Dec 2012.

DE POLANIA, I. Z. et al. Susceptibility of four noctuid pests (Lepidoptera) to the Cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* incorporated into cotton. **Revista Colombiana De Entomologia**, v. 34, n. 1, p. 41-50, Jan-Jun 2008.

DOS SANTOS, K. B. et al. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 50, n. 2, p. 157-163, Aug 2009.

ESCRICHE, B.; FERRE, J.; SILVA, F. J. Occurrence of a common binding site in *Mamestra brassicae*, *Phthorimaea operculella*, and

Spodoptera exigua for the insecticidal crystal proteins CryIA from *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 7, p. 651-656, Jul 1997.

ESTELA, A.; ESCRICHE, B.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1378-1384, Mar 2004.

FERNANDEZ, L. E. et al. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochemical Journal**, v. 394, p. 77-84, Feb 2006.

FERRÉ, J. 2003. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins, p. 141-155. In T. Lelley; E. Balázs; M. Tepfer (ed.), **Ecological impact of GMO dissemination in agro-ecosystems**. Facultas Verlags – und Buchhandels AG, Vienna, Austria.

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

FERREIRA, C. et al. Digestive enzymes in midgut cells, endoperitrophic and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 26, n. 4, p. 299-313, 1994.

FIUZA, L. M. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of shared binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1544-1549, May 1996.

FIUZA, V. D. Clonagem e avaliação da toxicidade de proteínas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* para populações de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera:Noctuidae) e de *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). 2009. 140f (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FRUTOS, R.; RANG, C.; ROYER, F. Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 227-276, 1999.

GONZALEZ-CABRERA, J. et al. Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2594-2600, Apr 2006.

HAIDER, M. Z.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. **European Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 3, p. 531-540, May 1986.

HENSLEY, S. D.; HAMMOND, A. H. Laboratory techniques for rearing the sugar cane borer on an artificial diet. **Jornal of Economic Entomology**, v. 61, p. 1742-1743, 1968.

HERRERO, S. et al. Shared binding sites in lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5729-5734, Dec 2001.

HIGUCHI, M. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to brush border membrane vesicles of midgut from Cry1Ac susceptible and resistant *Plutella xylostella*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 147, n. 4, p. 716-724, Aug 2007.

HUANG, F. et al. Geographical susceptibility of Louisiana and Texas populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera : Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein. **Crop Protection**, v. 27, n. 3-5, p. 799-806, Mar-May 2008.

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

IHARA, H. et al. Specific toxicity of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis* to *Bombyx mori*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 2, p. 200-204, Feb 1993.

IHARA, H.; HIMENO, M. Study of the irreversible binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa to brush border membrane vesicles from *Bombyx mori* midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 98, n. 2, p. 177-183, Jun 2008.

JAMES, C., 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **ISAAA Brief** n. 41. ISAAA, Ithaca, NY.

JURAT-FUENTES, J. L. et al. Reduced Levels of membrane-bound Alkaline Phosphatase are common to Lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Plos One**, v. 6, n. 3, Mar 2011.

JURAT-FUENTES, J. L.; ADANG, M. J. Importance of Cry1 delta-endotoxin domain II loops for binding specificity in *Heliothis virescens* (L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 323-329, Jan 2001.

KARIM, S. et al. Determination of receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) and pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) midgut brush border membrane vesicles. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 67, n. 3, p. 198-216, Jul 2000.

KELLER, M. et al. Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 365-373, Apr 1996.

KNAAK, N. et al. Histopathology and the lethal effect of Cry proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *Spodoptera frugiperda* JE Smith Caterpillars (Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 677-684, Aug 2010.

KNOWLES, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. **Advances in Insect Physiology**, Vol 24, v. 24, p. 275-308, 1994.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, M. K. et al. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAc on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 583-586, Feb 1996.

LEE, M. K.; MILES, P.; CHEN, J. S. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 4, p. 1043-1047, Jan 2006.

LERECLUS, D. et al. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0a mutant. **Bio-Technology**, v. 13, n. 1, p. 67-71, Jan 1995.

LI, H. R. et al. Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis* resistant and susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 34, n. 8, p. 753-762, Aug 2004.

LIANG, Y. Z.; PATEL, S. S.; DEAN, D. H. Irreversible binding kinetics of *Bacillus thuringiensis* cry1A delta-endotoxins to gypsy moth brush border membrane vesicles is directly correlated to toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 42, p. 24719-24724, Oct 1995.

LIGHTWOOD, D. J.; ELLAR, D. J.; JARRETT, P. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5174-5181, Dec 2000.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUO, S. D. et al. Binding of three Cry1A toxins in resistant and susceptible strains of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 2, p. 104-109, Jun 2006.

MIRANDA, R.; ZAMUDIO, F. Z.; BRAVO, A. Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 12, p. 1155-1163, Nov 2001.

MONNERAT, R. et al. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera : Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7029-7035, Nov 2006.

OPPERT, B. et al. Proteinase mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 38, p. 23473-23476, Sep 1997.

OPPERT, B. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 42, n. 1, p. 1-12, Sep 1999.

PARDO-LÓPEZ, 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.

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, Jun 2007.

RAJAMOHAN, F. et al. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 5, p. 2390-2396, Feb 1996.

RANG, C. et al. Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: A basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Current Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 22-27, Jul 2004.

RIOS-DIEZ, J. D.; SIEGFRIED, B.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac Entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 3, p. 281-293, Sep 2012.

RODRIGUEZ-CABRERA, L. et al. RNAi mediated knockdown of a *Spodoptera frugiperda* trypsin-like serine-protease gene reduces susceptibility to a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 protoxin. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 2894-2903, Nov 2010.

SCHNEPF, E. et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 775-806, Sep 1998.

SHARMA, P. et al. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with brush border membrane vesicles of maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 2, p. 333-335, Feb 2011.

SHARMA, P. et al. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 42-47, Jul 2010.

SENA, J. A. D.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S.; FERRE, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A Proteins with

Spodoptera frugiperda Midgut Binding Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2236-2237, Apr 2009.

TAN, S. Y. et al. Comparative susceptibility of *Ostrinia furnacalis*, *Ostrinia nubilalis* and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins. **Crop Protection**, v. 30, n. 9, p. 1184-1189, Sep 2011.

THOMAS, W. E.; ELLAR, D. J. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. **Febs Letters**, v. 154, n. 2, p. 362-368, 1983.

UPADHYAY, S. K. et al. Compatibility of garlic (*Allium sativum* L.) leaf agglutinin and Cry1Ac delta-endotoxin for gene pyramiding. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2365-2375, Mar 2012.

VALICENTE, F. H.; BARRETO, M. R. Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Londrina, v. 28, n. 2, p. 333-337, jun 1999.

VAN RIE, J. et al. Receptors on the brush-border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1378-1385, May 1990.

VANRIE, J. et al. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. **Science**, v. 247, n. 4938, p. 72-74, Jan 1990.

WU, X. Y. et al. Susceptibility of Cry1Ab resistant and susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 1, p. 29-34, Jan 2009.

YANG, Y. et al. Down regulation of a gene for cadherin, but not alkaline phosphatase, associated with Cry1Ab resistance in sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. **PLoS ONE** v.6, p.25783, 2011.

CAPÍTULO 3

Avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina em isolados de *Bacillus thuringiensis*.

RESUMO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, entomopatogênica amplamente utilizada no controle biológico de insetos-pragas entretanto algumas cepas produzem β -exotoxina que é tóxica tanto para insetos como para vertebrados e muito persistente no ambiente. Por isso foi proibido o uso de cepas de *B. thuringiensis* que produzam este metabólito na formulação de biopesticidas de acordo com recomendações da Organização Mundial de Saúde. O objetivo deste trabalho foi caracterizar cepas de *B. thuringiensis* quanto à capacidade de sintetizar β -exotoxina e avaliar se o tempo de cultivo influencia a produção desta toxina. Para isso, uma alíquota de 10 μ l de cada cepa foi inoculada em 10ml de meio LB com sais e incubado a 28°C e 200rpm por 16hs. Este pré-inóculo foi vertido em 50ml de meio LB com sais de modo que a concentração inicial da cultura fosse 10⁶ células/ml e incubado a 28°C e 200rpm. Os tempos de cultivo para cada cepa foram 48, 72, 96, 120 e 144hs. Após o cultivo a cultura foi centrifugada a 10000rpm por 10min e o sobrenadante autoclavado a 121°C por 20min e filtrado. Para os bioensaios foram aplicados 165 μ l do sobrenadante sobre um pedaço de dieta com 1cm³ e oferecido a 40 lagartas de *Spodoptera frugiperda* de 2 dias de idade, por repetição foram utilizadas 10 lagartas sendo que cada tratamento constituiu-se de 4 repetições. A avaliação do número de lagartas mortas e o peso foi realizado 8 dias após a montagem do bioensaio. Seis cepas incluindo os controles positivos foram capazes de produzir β -exotoxina, as cepas HD-125, 462A e T-10 a partir de 96hs de cultivo, as cepas 344 e T-09

a partir de 144hs e a cepa 566 a partir de 48hs. Demonstrando que o tempo de cultivo afeta a produção desta toxina e o tempo no qual é detectada a presença da β -exotoxina nos sobrenadantes através dos bioensaios é variável em função da cepa de *B. thuringiensis*.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*, β -exotoxina, Bioensaio, Tempo de cultivo, Sobrenadante bacteriano.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive entomopathogenic bacteria widely used in biological control of insect pests however some strains produce β -exotoxin which is toxic either to vertebrates as insects and very persistent in the environment. So it was forbidden to use strains that produce this metabolite in the formulation of biopesticides in accordance with recommendations of the World Health Organization. The purpose of this study was to characterize strains of *B. thuringiensis* for the ability to synthesize β -exotoxin, and assess whether the culture time influences the production of this toxin. For this, an aliquot of 10 μ l from each strain was inoculated into 10ml of LB medium with salts and incubated at 28°C, 200rpm for 16 hours. This pre-inoculum was poured into 50ml of LB medium with salts, so that the initial concentration of the culture was 10⁶ cells/ml and incubated at 28°C and 200rpm. The culture times for each strain were 48, 72, 96, 120 and 144 hours. After growing the culture was centrifuged at 10000rpm for 10min and the supernatant autoclaved at 121°C for 20 minutes and filtered. For bioassays 165 μ l of the supernatant was applied on each piece diet with 1cm³ and offered to 40 *Spodoptera frugiperda* 2 days old, for repeat were used 10 larvae and each treatment consisted of 4 replications. The evaluation of the number of dead larvae and the weight was conducted 8 days after to mount the bioassay. Six strains including positive controls, were able to produce β -exotoxin, the strains HD-125, 462A and T-10 from 96 hours of cultivation, strains 344 and T-09 from 144 hours and strain 566 from 48 hours. Demonstrating that the cultivation time affects the production of this toxin and the time in which it is detected the presence of β -exotoxin in the supernatants through bioassays is variable depending on the strain of *B. thuringiensis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, β -exotoxin, Bioassay, Time cultivation, bacterial supernatant.

1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Bacillus thuringiensis* é um patógeno de insetos que produz diferentes δ -endotoxinas capazes de matar seus hospedeiros (DE MAAGD et al., 2003) representando assim uma alternativa viável para o controle de insetos-pragas na agricultura e vetores de doenças de grande importância na saúde pública (CRICKMORE et al., 2011). O *B. thuringiensis* vem sendo usado como um agente de controle biológico a mais de 50 anos e representam aproximadamente 90% do total de biopesticidas e cerca de 2% do total do mercado inseticida (ALI et al., 2010; BRAVO et al., 2011).

Contudo, algumas cepas de *B. thuringiensis* produzem β -exotoxina, uma toxina termoestável secretada no meio de cultura, inespecífica e com amplo espectro de ação podendo assim ter efeitos prejudiciais sobre organismos não-alvo incluindo vertebrados (IGNOFFO & GREGORY, 1972; BERLITZ et al., 2006). Por causa de sua toxicidade aos vertebrados, a maioria das formulações comerciais de biopesticidas são preparadas a partir de cepas de *B. thuringiensis* que não produzem β -exotoxina de acordo com recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999). Portanto, a detecção da síntese de β -exotoxina é uma importante etapa no desenvolvimento e produção de biopesticidas à base de *B. thuringiensis* (MAC INNES & BOUWER, 2009).

Vários países do terceiro mundo estão buscando estratégias de baixa tecnologia para caracterizar cepas de *B. thuringiensis* locais quanto à produção de β -exotoxina visando a formulação de

biopesticidas, assim sendo, os bioensaios por poderem ser realizados com equipamentos de baixa tecnologia têm se mostrando uma alternativa viável para esta finalidade além de permitir avaliar a toxicidade direta da β -exotoxina e detectar também a β -exotoxina do tipo II (HERNÁNDEZ et al., 2001; MAC INNES & BOUWER, 2009).

Entretanto, como não há um tipo de bioensaio geralmente aceito ou padrão, há muita variação com relação ao tempo de cultivo do *B. thuringiensis* utilizado na metodologia dos vários trabalhos que buscam caracterizar as cepas quanto à capacidade de produzir β -exotoxina. Deste modo é importante avaliar se o tempo de cultivo influencia a síntese da β -exotoxina para que possa obter resultados confiáveis e não falsos negativos.

Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produzir β -exotoxina por diferentes cepas de *B. thuringiensis* e o efeito do tempo de cultivo sobre a produção desta toxina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

Neste estudo foram utilizadas 32 cepas bacterianas cujos complexos esporo/cristal causam mortalidade superior à 75% em *S. frugiperda*, sendo estas pertencentes à coleção de *B. thuringiensis* da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), provenientes de coletas realizadas em diferentes locais do Brasil e também cepas pertencentes ao *Institut Pauster* (Paris, França) e ao *United States Department of Agriculture* (USDA) (Columbus, OH).

2.2 Cultivo dos isolados bacterianos

Inicialmente foi preparado um pré-inóculo adicionando 10µl das cepas de *B. thuringiensis* em 10ml de meio LB acrescido dos sais MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄ e MnSO₄, feito de acordo com Valicente & Barreto (2003). Após serem cultivadas à 28°C e 200rpm por 16hs foi realizada a contagem do número de células através da visualização em microscópio de contraste de fases. Uma alíquota do pré-inóculo foi acrescentada à 50ml de meio LB com sais de modo que a concentração inicial fosse de 1x10⁶ células/ml e cultivado durante 48, 72, 96, 120 e 144hs sob as mesmas condições citadas acima. Posteriormente, a cultura foi centrifugada à 10000rpm por 10 min, o sobrenadante

aquecido a 121°C por 20min, filtrado (filtro TPP - 0,22 µm) e armazenado à -20°C até o uso.

2.3 Bioensaios

Copos plásticos de 50ml contendo pedaços de dieta artificial a base de feijão, gérmen de trigo e farelo de soja com aproximadamente 1cm³ foram banhadas com 165µl do sobrenadante da cultura bacteriana das cepas citadas anteriormente. Após a evaporação do excesso de umidade, 40 lagartas de *S. frugiperda* com dois dias de idade foram acondicionadas individualmente nos copos, perfazendo desta forma 4 repetições por tratamento com 10 unidades experimentais por repetição. Este procedimento foi realizado igualmente para a testemunha, substituindo o sobrenadante bacteriano por água destilada autoclavada sobre a dieta e o controle positivo foi realizado com as cepas HD-125 e T-09 que são capazes de produzir β-exotoxina.

Os copos foram colocados em suportes de isopor e acondicionados em sala aclimatizada (26±2°C, 70±10 de UR e fotofase de 12hs). A avaliação da mortalidade e a pesagem das lagartas foram feitas 8 dias após a montagem do bioensaio. As médias e erros-padrão da mortalidade e peso das lagartas foram calculadas para cada tratamento. Nos biensaios, os sobrenadantes das culturas foram considerados tóxicos, ou seja, com a presença de β-exotoxina quando a mortalidade foi igual ou superior à 50% e/ou quando o desenvolvimento das lagartas foi anormal.

2.4 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado para comparação das médias de mortalidade e peso das lagartas de *S. frugiperda*, e delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (época x cepas) para avaliar a interação das cepas e tempo de cultivo sobre a taxa de mortalidade e peso médio das lagartas. Os dados coletados para porcentagem de mortalidade foram submetidos à transformação $\arcsen\sqrt{\%}$ antes de realizar as análises estatísticas visando normalizar os dados. Os dados com taxa de mortalidade iguais a zero (0) antes da transformação $\arcsen\sqrt{\%}$ foram substituídos por $1/(4n)$, sendo “n” o número de lagartas que geraram cada taxa de mortalidade. Essa transformação foi necessária para diminuir um pouco mais a variabilidade dos dados. As médias foram comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade ($p < 0,05$) utilizando o programa SISVAR.

2.5 Extração de DNA

O DNA das cepas de *B. thuringiensis* foi extraído e purificado de acordo com Shuhaimi (2001), com algumas modificações. As cepas foram plaqueadas em meio LB sólido e mantidas à temperatura de 30°C por aproximadamente 16hs. Com o auxílio de uma alça, toda massa celular foi raspada e transferida para um microtubo e ressuspensa em 700µl de solução tampão (50mM Glucose, 25mM Tri-HCl e 10mM EDTA, pH 8.0) e lisozima na concentração de 20mg/ml, sendo levado

ao banho maria a 37°C por 30min. Adicionou-se 25µl de SDS 10% e 5µl de proteinase K (20mg/ml) à solução e incubou por 1h à 60°C.

Após este período 500µl de fenol/clorofórmio/octanol (25:24:1) foram adicionados seguido de centrifugação por 2min a 13000rpm, posteriormente 300µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo e acrescentado o mesmo volume de acetato de potássio 3M e 600µl de álcool isopropanol e centrifugado a 13000rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 300µl de etanol 70% e novamente centrifugado a 13000rpm por 5min. O pellet foi então seco e ressuspendido em 150µl de água.

A qualidade do DNA foi observada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e quantificado através do Nanodrop (ND-1000 V3.1.2). Após esses processos as amostras foram diluídas para concentração de 10ng/µl a partir da solução concentrada e armazenadas a -4°C.

2.6 Caracterização molecular

Nas reações de amplificação foram utilizados primers específicos para os genes *cry1B* e *vip2* descritos na literatura (CERÓN et al., 1994, HERNANDEZ et al., 2009).

As reações de PCR foram preparadas para um volume final de 20µl, consistindo de 30ng de DNA purificado, 3mM de MgCl₂, tampão 10X (20mM de Tris e 50mM de KCl), 250µM de dNTP, 20µM de cada primer e 2U de *Taq DNA Polimerase*. As amplificações foram efetuadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Tabela 7- Primers usados na caracterização molecular das cepas de *B. thuringiensis*

Primer	Referência	Sequência (5' - 3')	pb	Tm (°C)	Controle
cry1B	Céron et al., 1994	F-TGTAGCTGGTACTGTATTG	367	55	1644
		R-CTTCATCACGATGGAGTAA			
Vip2	Hernández et al., 2009	F-GATAAAGAAAAAGCAAAA	845	55	1657
		GAATGGGRNAARRA			
		R-CCACACCATCTATATACAG			
		TAATATTTTCTGGDATNGG			

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1%. Após a eletroforese ser realizada a 110V durante uma hora, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Kodak Gel Logic 200 Imaging System.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação das cepas produtoras de β -exotoxina e caracterização molecular

Uma seleção de 32 cepas pertencentes à coleção de *B. thuringiensis* da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) foram submetidas à análise da produção de β -exotoxina através de bioensaios com lagartas de *S. frugiperda*. Para isto foram utilizadas lagartas de primeiro ínstar visto que a CL_{50} desta toxina é mais baixa para *S. frugiperda* deste estágio de desenvolvimento, permitindo que o bioensaio fosse mais sensível para a detecção da β -exotoxina (HORNBY & GARDNER, 1987).

Os sobrenadantes de seis cepas, T-10 (*Bt darmstadiensis*), 344, 566 e 462A incluindo os controles positivos HD-125 (*Bt tolworthi*) e T-09 (*Bt tolworthi*), foram tóxicos para *S. frugiperda* mesmo após a autoclavagem, demonstrando que estas cepas são capazes de sintetizar β -exotoxina (Tabela 2).

Devido ao seu largo espectro de atividade, em muitos países, a presença de β -exotoxina em produtos comerciais que utilizam esporos e cristais de *B. thuringiensis* como componentes ativos é proibida por lei (WHO, 1999) sendo portanto, necessário identificar as cepas capazes de produzir esta toxina. Através dos bioensaios foi possível caracterizar as cepas de *B. thuringiensis* quanto à capacidade de secretar β -exotoxina no meio de cultura, permitindo assim completar a caracterização destas cepas de *B. thuringiensis* que apresentam grande potencial para serem utilizadas no controle biológico de *S. frugiperda*.

Tabela 7- Resultados dos bioensaios para detecção de β -exotoxina e caracterização molecular

Identificação da Cepa	Origem	Bioensaio	Genes		Mortalidade (%)*
			<i>cry1B</i>	<i>vip2</i>	
HD-125 (<i>Bt tolworthi</i>)	USA	+	-	+	-
T-07 (<i>Bt aizawai</i>)	França	-	+	-	80,8
T-09 (<i>Bt tolworthi</i>)	França	+	+	-	95,8
T-10 (<i>Bt darmstadiensis</i>)	França	+	-	-	77,9
344	Paraná-BR	+	+	-	100
348B	Paraná-BR	-	-	-	100
348L	Paraná-BR	-	-	+	100
426	Ceará-BR	-	-	-	100
460	Paraná-BR	-	-	-	100
462A	Paraná-BR	+	-	+	100
474	BR	-	-	+	100
566	Paraná-BR	+	-	-	100
701B	São Paulo-BR	-	-	-	100
1109N	Goiás-BR	-	-	+	100
1119C	Goiás-BR	-	-	+	100
1131C	Goiás-BR	-	-	+	100
1132E	Goiás-BR	-	-	+	100
1139K	Goiás-BR	-	-	+	100
1145B	Goiás-BR	-	-	+	100
1148F	Goiás-BR	-	-	+	100
1355SLO	BR	-	-	+	100
1357	BR	-	-	+	100
1438H	Sergipe-BR	-	-	+	100
1604D	Amazonas-BR	-	-	-	100
1626C	Maranhão-BR	-	-	-	100
1641	Paraná-BR	-	+	-	100
1644	Paraná-BR	-	+	+	100
1646	São Paulo-BR	-	+	+	100
1648	São Paulo-BR	-	+	-	100
1656	Alagoas-BR	-	+	+	100
1657	Minas Gerais-BR	-	-	+	100
1658	São Paulo-BR	-	+	-	100

Detecção da presença (+) ou ausência (-) de β -exotoxina e dos genes *cry1B* e *vip2* em cepas da coleção de *B. thuringiensis* da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS). *Porcentagem de mortalidade de *S. frugiperda* obtida através de bioensaios seletivos realizados com o complexo esporo/cristal das respectivas cepas de *B. thuringiensis* de acordo com VALICENTE & FONSECA, 2004.

As cepas que produziram β -exotoxina representam apenas 13,3% do número total das cepas analisadas. Epinasse et al. (2002a) encontraram uma frequência semelhante (9%) de cepas cujos sobrenadantes foram tóxicos para *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Mas provavelmente um número maior de cepas de *B. thuringiensis* produtoras de β -exotoxina I seriam identificadas se fosse utilizado HPLC visto que o limite de detecção desta molécula utilizando este procedimento é mais elevado (GOHAR & PERCHAT, 2001). Assim, análises através de HPLC poderão ser realizadas posteriormente para confirmar os resultados obtidos com os bioensaios.

Os bioensaios de toxicidade com insetos consistem em um método tradicional para detecção da β -exotoxina, através deste procedimento é possível avaliar a toxicidade direta deste metabólito, permite detectar também a β -exotoxina do tipo II, além do que não exige equipamentos sofisticados e de alto custo para sua execução (HERNÁNDEZ et al., 2001; MAC INNES & BOUWER, 2009) demonstrando assim a viabilidade e importância em se utilizar os bioensaios nas pesquisas envolvendo a detecção de cepas produtoras de β -exotoxina.

Ao contrário do que ocorre com as δ -endotoxinas os determinantes genéticos envolvidos na síntese da β -exotoxina não são bem conhecidos, apresentando poucas informações a seu respeito (KUZINA et al., 1993; ESPINASSE et al., 2002b, ESPINASSE et al. 2004). Isto torna especialmente difícil encontrar uma relação direta entre a presença de um gene específico envolvido na via metabólica da β -exotoxina e a capacidade de produzi-la pelo *B. thuringiensis*.

Contudo, acredita-se que um ou vários genes contidos nos plasmídeos que carregam os genes *cry* controlem a produção ou secreção de β -exotoxina I (HERNÁNDEZ et al., 2003). Estes genes atuam como elementos regulatórios mas não seriam diretamente os responsáveis pela biossíntese da molécula, os genes para a síntese de β -exotoxina I são provavelmente cromossômicos ou estão localizados em outros plasmídeos (ESPINASSE et al., 2002b).

Nós verificamos que o gene *cry1B* foi detectado em 9 cepas, correspondendo portanto a 28% do total de cepas analisadas, dentre estas, apenas duas cepas também produziram β -exotoxina, T-10 e 344. E foram 17 cepas (52%) que amplificaram o gene *vip2* durante a PCR, incluindo as cepas, HD-125 e 462A que sintetizaram β -exotoxina.

Em um trabalho realizado por Espinasse et al. (2002a) foi verificado que todas as cepas capazes de produzir altas quantidades de β -exotoxina I apresentaram amplificação dos genes *cry1B* e *vip2* indicando que existe uma forte associação entre a produção de níveis elevados de β -exotoxina I e a presença desses genes numa dada estirpe e sugerindo que *cry1B*, *vip2* e os determinantes genéticos da β -exotoxina I estão localizados no mesmo plasmídeo. Tal associação com o gene *cry1B* foi também relatada por Perani et al. (1998), mas esses autores não encontraram uma relação estatística entre a capacidade de produzir este metabólito e a presença deste gene.

3.2 Influência do tempo de cultivo sobre a produção de β -exotoxina

Os dados referentes ao peso médio e porcentagem de mortalidade das lagartas de *S. frugiperda* obtidos com os bioensaios

mostraram que a produção da β -exotoxina foi detectada a partir de 96 horas de cultivo nas cepas HD-125, 462A e T-10, de acordo com os parâmetros estabelecidos. Em cada uma das cepas a partir deste tempo, no geral foram observados os maiores valores de mortalidade e menores pesos médios das lagartas de *S. frugiperda*, que foram semelhantes entre si e diferentes da testemunha. As cepas 344 e T-09 causaram a maior taxa de mortalidade e menor peso médio com 144hs de cultivo no qual foi detectada a presença da β -exotoxina. Já na cepa 566 foi detectada a presença da β -exotoxina em todos tempos avaliados como pode ser observado na tabela 3.

Estes resultados demonstram que geralmente a detecção da β -exotoxina foi possível em fases mais tardias de desenvolvimento, em *B. thuringiensis*, que é considerado um patógeno de insetos, a capacidade de produzir níveis elevados de β -exotoxina I durante a fase estacionária pode ter uma contribuição significativa para determinar os efeitos inseticida das cepas bacterinas (ESPINASSE et al., 2002a) que podem conferir vantagens evolutivas às cepas hospedeiras.

Tabela 3- Médias e erros-padrão dos pesos e mortalidades das lagartas de *S. frugiperda* submetidas aos sobrenadantes bacterianos de *B. thuringiensis*.

Médias \pm erros-padrão a $p \leq 0,05\%$

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso médio das lagartas(mg)
Água	2,50 \pm 5,00 a	45,35 \pm 1,37 d
T-09 48hs	2,52 \pm 5,00 a	34,77 \pm 7,53 c
T-09 72hs	2,52 \pm 5,00 a	36,29 \pm 2,13 c
T-09 96hs	3,02 \pm 6,00 a	36,13 \pm 3,11 c
T-09 120hs	23,00 \pm 12,49 b	14,40 \pm 11,24 b
T-09 144hs	61,75 \pm 9,03 c	1,07 \pm 0,29 a

Água	2,50 \pm 5,00 a	45,35 \pm 1,37 b
T-10 48hs	5,00 \pm 5,77 a	37,45 \pm 12,5 b
T-10 72hs	2,50 \pm 5,00 a	40,49 \pm 11,35 b
T-10 96hs	17,50 \pm 9,57 a	3,60 \pm 1,86 a
T-10 120hs	65,00 \pm 12,90 b	1,65 \pm 0,33 a
T-10 144hs	55,00 \pm 26,45 b	2,62 \pm 1,41 a

Água	2,50 \pm 5,00 a	45,35 \pm 1,37 c
HD-125 48hs	19,01 \pm 32,01 a	28,85 \pm 13,00 b
HD-125 72hs	20,50 \pm 8,24 a	29,42 \pm 4,06 b
HD-125 96hs	68,50 \pm 15,91 b	1,52 \pm 0,37 a
HD-125 120hs	63,75 \pm 11,47 b	1,58 \pm 1,11 a
HD-125 144hs	59,75 \pm 14,85 b	1,30 \pm 0,39 a

Água	2,50±5,00 a	45,35±1,37 d
344 48hs	19,25±16,66 ab	39,32±3,67 d
344 72hs	32,50±14,59 bc	25,39±9,96 c
344 96hs	17,50±15,00 ab	15,42±6,42 b
344 120hs	10,01±11,54 ab	18,67±7,71 bc
344 144hs	50,25±25,74 c	1,98±0,86 a
Água	2,50±5,00 a	45,35±1,37 c
566 48hs	83,75±6,23 c	1,29±0,66 a
566 72hs	47,00±8,86 b	4,12±1,16 b
566 96hs	58,00±5,41 b	1,14±0,36 a
566 120hs	55,00±19,14 b	3,84±2,64 b
566 144hs	85,00±12,90 c	1,17±0,44 a
Água	2,50±5,00 a	45,35±1,37 b
462A 48hs	10,00±8,16 a	61,81±19,10 c
462A 72hs	5,00±5,77 a	50,28±17,98 bc
462A 96hs	56,25±17,01 b	4,10±3,30 a
462A 120hs	67,50±16,58 b	1,19±0,52 a
462A 144hs	72,50±17,07 b	1,01±1,37 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

Não é possível afirmar que nos tempos de cultivo no qual não foi detectada a produção de β -exotoxina nas cepas que foram positivas para este metabólito através dos bioensaios, realmente não houve a sua síntese uma vez que pode ter havido a produção mas as quantidades de β -exotoxina foram abaixo do limite de toxicidade detectável contra *S. frugiperda* em nossas condições de teste.

BEKHEIT et al. (1993) ao avaliar o sobrenadante do meio cultivado com *B. thuringiensis* quanto à presença de β -exotoxina em diferentes tempos de cultivo, variando de 6 à 66 horas após a inoculação, demonstrou um aumento crescente nos níveis de β -exotoxina produzida, sendo que os maiores valores foram encontrados com 66 horas de cultivo. Deste modo, o fato da β -exotoxina ser detectada em tempos tardios de cultivo na maioria das cepas avaliadas neste trabalho se deve provavelmente ao acúmulo desta toxina no meio de cultivo até atingir um nível no qual os seus efeitos puderam ser constatados nos insetos.

Apesar de o sobrenadante destas cepas em alguns tempos não causarem altas porcentagens de mortalidade nas lagartas de *S. frugiperda* foi verificado a inibição do crescimento normal e lenta movimentação das lagartas. Estes sintomas são típicos de envenenamento por β -exotoxina como descrito em diversos estudos (BOND & BOYCE, 1971; EPINASSE et al., 2002b).

Nas cepas que foram positivas para produção de β -exotoxina através dos bioensaios foi verificado que o tempo a partir do qual é iniciada a síntese ou secreção deste metabólito é influenciada pelo tempo de cultivo e é variável em função da cepa bacteriana, como pode ser observado nas tabelas 4 e 5. Provavelmente esta diferença entre os tempos de crescimento no qual é constatada a presença da β -exotoxina esteja relacionada com o início do processo de esporulação que também pode ser variável entre as cepas.

Tabela 4- Média das taxas de mortalidade de *S. frugiperda* por cada tempo de cultivo

Tempo de cultivo	Cepas						
	T-09	T-10	462A	HD-125	344	566	
48hs	2,52 Aa	5,00 Aa	10,00 Aa	19,01 Aa	19,25 ABa	83,00 Bb	
72hs	2,52 Aa	2,50 Aa	5,01 Aab	20,50 Abc	32,50 BCcd	47,00 Ad	
96hs	3,02 Aa	17,50 Aa	56,25 Bb	68,50 Bb	17,50 ABa	58,00 Ab	
120hs	23,00 Ba	65,00 Bb	67,50 Bb	63,75 Bb	10,01 Aa	55,00 Ab	
144hs	61,75 Ca	55,00 Ba	72,50 Bab	59,75 Ba	50,25 Ca	85,00 Bb	

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

Através da observação dos resultados da análise estatística apresentados na tabela 4 foi possível constatar que houve interação entre cepa e tempo de cultivo ($p < 0,00001$), dessa forma não é possível explicar a influência das cepas nas taxas de mortalidade de forma independente do tempo de crescimento. Em geral os sobrenadantes das cepas com menor tempo de cultivo provocaram as menores taxas de mortalidade, provavelmente pois nos primeiros tempos a síntese ou secreção de β -exotoxina ainda não havia iniciado ou as quantidades produzidas foram baixas, mas as cepas 344 e 566 fugiram à essa regra.

A cepa 344 causou a menor taxa de mortalidade no tempo de 120hs, apesar de a maior taxa de mortalidade ter continuado a tendência semelhante das demais cepas no tempo de 144hs. A cepa 566 causou as menores taxas de mortalidade nos tempos de 72, 96 e 120hs e as maiores taxas de mortalidade nos tempos de 48 e 144hs, contudo apresentaram porcentagens de mortalidade geralmente acima de 50% indicando a presença da β -exotoxina no sobrenadante bacteriano em todos os tempos

de cultivo. Em cada tempo de cultivo, aparentemente a cepa 566 sempre causou a maior taxa de mortalidade. Mas as demais cepas tiveram comportamento inconstante, dependendo do tempo de cultivo em questão.

Tabela 5- Médias dos pesos das lagartas de *S. frugiperda* por cada tempo de cultivo

Tempo de cultivo	Cepas											
	566		344		HD-125		T-09		T-10		462A	
48hs	1,29	Aa	39,32	Cc	28,85	Bb	34,77	Cbc	37,45	Bbc	61,81	Cd
72hs	4,12	Aa	25,39	Bb	29,42	Bbc	36,29	Ccd	40,49	Bde	50,28	Be
96hs	1,14	Aa	15,42	Bb	1,52	Aa	36,13	Cc	3,60	Aa	4,10	Aa
120hs	3,84	Aa	18,67	Bb	1,58	Aa	14,40	Bb	1,65	Aa	1,19	Aa
144hs	1,17	Aa	1,98	Aa	1,30	Aa	1,07	Aa	2,62	Aa	1,01	Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

Na Tabela 5, cujos dados foram submetidos ao teste t de Student ($p \leq 0,05$), notamos que também houve interação entre cepas e tempo de cultivo na determinação do peso médio ($p < 0,00001$). Na cepa 566, as médias de peso foram baixas e iguais entre si, independente do tempo de cultivo. Nas cepas 344, HD-125, T-09 e 462A, o tempo de cultivo por 144hs sempre apresentou a menor média de peso e em todas cepas, os tempos de cultivo por 48hs ou 72hs foram os que apresentaram maior média de peso.

No tempo de cultivo por 48hs, a cepa 566 foi a que apresentou a menor média de peso enquanto a 462A obteve a maior média de peso. Para o tempo de cultivo por 96hs, as cepas 566, HD-125, T-10 e 462A

tiveram as menores médias de peso enquanto as cepas 344 e T-09 apresentaram as duas maiores médias. Quando as cepas foram crescidas por 120hs, as menores médias de peso foram observadas nas cepas 566, HD-125, T-10 e 462A, já as cepas 344 e T-09 apresentaram as maiores médias de peso. Todas as cepas apresentaram médias de peso baixas e semelhantes entre si no tempo de cultivo por 144hs.

Os resultados que encontramos demonstram que é aconselhável prolongar o tempo de cultivo dos cepas bacterianas para realizar a detecção da β -exotoxina visto que para a maioria das cepas avaliadas a β -exotoxina foi constatada em fases mais tardias de cultivo.

4 CONCLUSÕES

As cepas de *B. thuringiensis* 344, 566, 462A e T10 produzem β -exotoxina.

A produção de β -exotoxina é influenciada pelo tempo de cultivo.

O tempo no qual é detectada a presença da β -exotoxina nos sobrenadantes através dos bioensaios é variável entre as cepas de *B. thuringiensis*.

5 PERSPECTIVAS

Avaliar outras cepas da coleção de *B. thuringiensis* da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) potenciais para serem utilizadas na formulação de biopesticidas, quanto a capacidade de produzir β -exotoxina.

Avaliar as cepas de *B. thuringiensis* através de procedimentos baseados em HPLC para confirmar os resultados obtidos com os bioensaios e determinar a quantidade de β -exotoxina produzida nos diferentes tempos de cultivo.

6 REFERÊNCIAS

- ALI, S. et al. *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, Apr 2010.
- BEKHEIT, H. K. M. et al. Development of an enzyme linked immunosorbent assay for the beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 9, p. 1530-1536, Sep 1993.
- BERLITZ, L. D. et al. Toxicology effects of δ -endotoxins and β -exotoxins of *Bacillus thuringiensis* in *Wistar* rats. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 1, n. 1, p. 35-38, August 2006.
- BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423-431, Jul 2011.
- BOND, R. P.; BOYCE, C. B. C. (1971). The thermostable exotoxin of *Bacillus thuringiensis*, p. 275–301. In H. D. Burges (ed.), *Microbial control of insects and mites*. **Academic Press**, London, United Kingdom.
- CERÓN, J. et al. PCR analysis of the *cryI* insectidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, n. 1, p. 353-356, 1994.
- CRICKMORE N et al., 2011. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/index.html.
- 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, Apr 2001.

ESPINASSE, S. et al. An ABC transporter from *Bacillus thuringiensis* is essential for beta-exotoxin I production. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 21, p. 5848-5854, Nov 2002b.

ESPINASSE, S. et al. An extracytoplasmic-function sigma factor is involved in a pathway controlling beta-exotoxin I Production in *Bacillus thuringiensis* subsp *thuringiensis* strain 407-1. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 10, p. 3108-3116, May 2004.

ESPINASSE, S. et al. Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cry1B in *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4182-4186, Sep 2002a.

GOHAR, M.; PERCHAT, S. Sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 298, n. 1, p. 112-117, Nov 2001.

HERNÁNDEZ, C. S. et al. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I beta-exotoxin production. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 1, p. 57-62, Jan 2003.

HERNÁNDEZ, C. S.; FERRÉ, J.; LARGET-THIERY, I. Update on the detection of beta-exotoxin in *Bacillus thuringiensis* strains by HPLC analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 643-647, Apr 2001.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. S. et al. Screening and identification of *vip* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 219-225, Jul 2009.

HORNBY, J. A.; GARDNER, W. A. Dosage mortality response of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) and other noctuid larvae to beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 80, n. 4, p. 925-929, Aug 1987.

IGNOFFO, C. M.; B. G. GREGORY. Effects of *B. thuringiensis* β -exotoxin on larval maturation, adult longevity, fecundity, and egg viability in several species of lepidoptera. **Environ. Entomol.** v. 1, p. 269–272, 1972.

KUZINA, L. V. et al. Study of the nature of determinants for synthesis of delta-endotoxin and β -exotoxin in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* strains bitoxybacillin producers. **Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.** p. 20–24, 1993.

LEVINSON, B. L. et al. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high performance liquid chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 6, p. 3172-3179, Jun 1990.

MAC INNES, T. C.; BOUWER, G. An improved bioassay for the detection of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 101, n. 2, Jun 2009.

MOHDSALLEH, M. B.; BEEGLE, C. C. Fermentation media and production of exotoxin by 3 varieties of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 35, n. 1, p. 75-83, 1980.

PERANI, M.; BISHOP, A. H.; VAID, A. Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Fems Microbiology Letters**, v. 160, n. 1, p. 55-60, Mar 1 1998.

SHUHAIMI, M. et al. Utilisation of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 9, p. 731-736, May 2001.

WHO, 1999. Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use. **WHO Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2**. World Health Organization, Geneva.