



FERNANDO MANTOUVANE LANZA SOUZA

**INTERAÇÃO ENTRE ESPOROS E PROTEÍNAS CRY E VIP3
DE *Bacillus thuringiensis* NA MORTALIDADE DE LARVAS DE
Spodoptera frugiperda (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

LAVRAS - MG

2018

FERNANDO MANTOUVANE LANZA SOUZA

**INTERAÇÃO ENTRE ESPOROS E PROTEÍNAS CRY E VIP3 DE *Bacillus thuringiensis* NA MORTALIDADE DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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

Orientador

Dr. Fernando Hercos Valicente

LAVRAS - MG

2018

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

Souza, Fernando Mantouvane Lanza.

Interação entre esporos e proteínas Cry e Vip3 de *Bacillus thuringiensis* na mortalidade de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Fernando Mantouvane Lanza Souza. - 2018.

58 p. : il.

Orientador(a): Fernando Hercos Valicente.

.

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

Bibliografia.

1. Controle Biológico. 2. Lagarta-do-cartucho. 3. Purificação esporos e cristais. I. Valicente, Fernando Hercos. . II. Título.

FERNANDO MANTOUVANE LANZA SOUZA

INTERAÇÃO ENTRE ESPOROS E PROTEÍNAS CRY E VIP3 DE *Bacillus thuringiensis* NA MORTALIDADE DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

INTERACTION BETWEEN SPORES AND CRY AND VIP3 PROTEINS OF *Bacillus thuringiensis* IN *Spodoptera frugiperda* LARVAE MORTALITY (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

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

APROVADA em 03 de Agosto de 2018.
Dr. Fernando Hercos Valicente – UFLA / EMBRAPA
Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana – EMBRAPA
Dra. Simone Martins Mendes - EMBRAPA

Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente
Orientador

**LAVRAS-MG
2018**

AGRADECIMENTOS

À Isa, minha esposa companheira e incentivadora, pelo apoio incondicional em todos os momentos!

Ao meu irmão, Flávio, pelo incentivo e ajuda nesta fase da minha vida.

À minha mãe, Mariluz, que ainda me avisa sempre quando vai ter Enem.

Ao Prof. Dr. Fernando Valicente pela paciência, incentivo, orientação, conselhos, conversas e por tornar esta pesquisa possível.

Ao Dr. Ubiraci Lana, o Bira, por toda orientação, apoio e conselhos!

À Dra. Simone, por disponibilizar-se para participar como membro da banca.

A todos os amigos do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo pela grande ajuda ao longo deste estudo!

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras pelo aprendizado.

À Embrapa Milho Sorgo, por toda infraestrutura e possibilitar conhecer mentes brilhantes!

Aos meus amigos Danilo e Luiz pelas conversas e descontrações.

A Capes - O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Enfim, todos aqueles que acompanharam estes quase dois anos de muitas mudanças e percalços na minha vida...

MUITO OBRIGADO!

Invictus
(William E. Henley)

Do fundo desta noite que persiste
A me envolver em breu - eterno e espesso,
A qualquer deus - se algum acaso existe,
Por mi'alma insubjugável agradeço.

Nas garras do destino e seus estragos,
Sob os golpes que o acaso atira e acerta,
Nunca me lamentei - e ainda trago
Minha cabeça - embora em sangue - ereta.

Além deste oceano de lamúria,
Somente o Horror das trevas se divisa;
Porém o tempo, a consumir-se em fúria,
Não me amedronta, nem me martiriza.

Por ser estreita a senda - eu não declino,
Nem por pesada a mão que o mundo espalma;
Eu sou dono e senhor de meu destino;
Eu sou o comandante de minha alma.

RESUMO

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada uma praga primária do milho no Brasil, sendo os biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1915) (Bt) amplamente utilizados para controlar esta praga. Entretanto, o mecanismo de ação do Bt para matar seus hospedeiros é diverso, bem como as possíveis interações entre proteínas inseticidas expressas (Cry e Vip) e o papel do esporo na mortalidade. Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar o mecanismo de ação e avaliar a importância dos esporos de Bt na mortalidade de larvas de *S. frugiperda*. Foram selecionadas 2 cepas de Bt (que expressa Vip3 – HD1; e não expressa Vip3 - 426) após teste de mortalidade e caracterização molecular. Para separar os esporos e cristais das cepas de Bt foi realizada a adaptação da metodologia de separação por Ludox e posterior purificação dos mesmos para obter 100% de pureza. A concentração dos esporos foi determinada utilizando Câmara de Neubauer e a concentração das proteínas (Cry - cristais e Vip3 - expressa no sobrenadante) foi determinada utilizando o software *Quantity One* da Bio-Rad a partir do perfil de proteínas em SDS Page gel. O bioensaio foi conduzido utilizando adaptação do método de alimentação por micro-gotas com larvas de *S. frugiperda* com um dia após eclosão, 18 tratamentos com 4 repetições e 2 testemunhas (PBSS e meio LB 10 vezes concentrado). Somente esporos de cada cepa (HD1 e 426 padronizados a 10^4 esporos/larva), proteínas Cry (HD1: 8 ng/larva e 426: 8 ng/larva), sobrenadante (com Vip3 – HD1: 2 ng/larva e sem Vip3 - 426: 0 ng/larva) foram testados separadamente e, posteriormente, suas combinações. Durante 7 dias a cada 24h, as larvas mortas foram contadas, coletadas e armazenadas a -20°C, e no 14º dia foi feita uma última avaliação da mortalidade. Para identificação de septicemia as larvas mortas foram maceradas e realizadas a contagem direta de células vegetativas, contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) e contagem na Câmara de Neubauer. As maiores mortalidades foram as combinações entre esporos da cepa HD1 com a presença das proteínas Cry das 2 cepas (esporo e cristal de HD1: 94,64% e esporo de HD1 e cristal de 426: 90,10%). No entanto, ao adicionar os esporos, cristais e sobrenadante (Vip3) as mortalidades não foram superiores. Os tratamentos somente com esporos e cristais de ambas as cepas apresentaram altos valores na contagem de células, indicando septicemia. No entanto, os tratamentos com sobrenadante HD1 (Vip3) e esporos resultaram nos maiores valores nas contagens totais. Portanto, os resultados sugerem que larvas de *S. frugiperda* possuem o Tipo III (Septicemia) do mecanismo de ação do Bt contra insetos lepidópteros. No entanto, somente esporos de cepas que expressam Vip3 são importantes na mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, ocorrendo efeito sinérgico com proteínas Cry.

Palavras-chave: Controle Biológico. *Droplet-feeding method*. Lagarta-do-cartucho. Mecanismo de ação. Purificação de esporos e cristais. Septicemia.

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is a primary corn pest in Brazil. Biopesticides based on *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1915) (Bt) are widely used to control this pest. However, the mechanism of action of Bt to kill its hosts is diverse. Therefore, the objective of this study was to identify the Bt mechanism type of action in larvae of *S. frugiperda*, evaluating the importance of the spores in its mortality. The study was conducted at the Biological Control Laboratory in Embrapa Maize and Sorghum. Were selected 2 Bt strains (HD1: express Vip3 protein; and 426: does not express Vip3) after mortality tests and molecular characterization. To separate the spores and crystals from the Bt strains, was adapted the Ludox purification method, and after that, another purification to achieve spores and crystals 100% purified. Was used Neubauer Chamber to determinate the spores concentration and the proteins (Cry – crystals and Vip3 – expressed in the supernatant) the software Quantity One (Biorad) using results from SDS Page gel. The bioassays were conducted adapting the droplet feeding method (0.08 µL/larva) with *S. frugiperda* larvae (1 day), 18 treatments with 4 replicates and 2 controls (PBSS and concentrated LB broth). Only spores from each strain (10^4 spores/larva), Cry proteins (HD1: 8 ng/larva and 426: 8 ng/larva), supernatant (with Vip3 HD1: 2 ng/larva and without Vip3 - 426: 0 ng/larva) were tested separately, and also its combination. During 7 days and each 24 hours, the dead larvae were counted, collected and stored at – 20 °C, also, at 14th day after inoculation was made one last evaluation. To identify septicemia, the dead larvae were macerated and observed under the microscope to make the direct counting of vegetative cells, Neubauer Chamber counting and also determined CFU. The higher mortalities were the combination of HD1 spores and both Cry proteins (Crystals) (HD1 spore and crystal: 94,64% and HD1 spores and 426 crystal: 90,10%). However, the combination of spores, crystals and supernatant (Vip3) does not increased the mortality. The treatments with spores and crystals resulted in high number of cells counting, indicating septicemia. On the other hand, when combined spores and HD1 supernatant the cells counting were higher. In conclusion, the results suggest *S. frugiperda* larvae are Type III (Septcemia) of the Bt mechanism type of action against lepidopteran insects. However, only spores from Bt strains that express Vip3 proteins are important in *S. frugiperda* mortality, occurring synergism with Cry proteins.

Keywords: Biological Control. *Droplet-feeding method*. Fall armyworm. Mechanism type of action. Spores and crystals purification. Septicemia.

Sumário

PRIMEIRA PARTE - INTRODUÇÃO GERAL	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. <i>Spodoptera frugiperda</i>	12
2.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	14
2.2.1. Proteínas Cry e Cyt.....	15
2.2.2. Proteínas Vip	17
2.3. Mecanismo de ação do Bt contra insetos lepidópteros: Tipo I, II e III	19
2.4. Importância dos esporos na mortalidade de lepidópteros	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	30
QUAL IMPORTÂNCIA DOS ESPOROS DE <i>Bacillus thuringiensis</i> NA MORTALIDADE DE LARVAS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)?	31

PRIMEIRA PARTE – INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

As condições tropicais de cultivo no Brasil proporcionam a contínua sucessão de culturas ao longo do ano, em consequência este fator pode favorecer a alta incidência de diferentes pragas em todo o ciclo das culturas (VALICENTE, 2015, p. 1). *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), lagarta do cartucho, é uma das principais pragas polífagas distribuídas em todo território nacional, causando danos em diferentes cultivos. Na cultura do milho, a lagarta do cartucho é uma praga primária sendo o seu manejo realizado principalmente com plantas transgênicas e aplicações de inseticidas organossintéticos (MONNERAT et al., 2015). Nesse contexto, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma estratégia eficiente e mais sustentável para manejo de insetos, sendo a utilização do controle biológico uma importante tática a ser empregada (VALICENTE, 2015, p. 14).

Dentre os organismos entomopatogênicos utilizados no controle biológico, o *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 é uma estratégia viável e econômica. Por ser efetivo contra os insetos alvos, não afetar seus predadores naturais e a saúde humana, as toxinas de Bt têm sido utilizadas amplamente na agricultura tanto em aplicações de biopesticidas como em plantas transgênicas (HARDEE et al., 2001). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica e anaeróbica facultativa, e formadora de esporos que produz uma variedade de toxinas que possuem efeito inseticida (SCHNEPF et al., 1998). Os cristais, denominados de delta-endotoxinas, são formados a partir do acúmulo das proteínas Cry na fase de esporulação e juntamente com os esporos são liberados no meio de cultura somente depois da parede celular se desintegrar (SANAHOJA et al., 2011).

Esta bactéria possui alta variabilidade genética distribuída na natureza (VILAS-BOAS et al., 2002). Portanto, uma variedade de proteínas com potencial inseticida podem ser expressas (PALMA et al., 2014). Desta forma, o modo de ação das proteínas e o mecanismo de ação Bt em insetos lepidópteros podem ser diversos, dependendo do tipo de proteínas expressas pela cepa, da ordem ou espécie do inseto e da presença do esporo (HEIMPEL; ANGUS, 1959; GRAF, 2011; CORNFORTH et al., 2015; CHACKROUN et al., 2016).

Muitos estudos são realizados com o enfoque nas delta-endotoxinas devida sua eficiência na mortalidade de pragas, (XUEYONG et al., 2008; PALMA et al., 2014; CHACKROUN et al., 2016), porém a função do esporo na toxicidade e na capacidade de infecção das diferentes cepas de Bt tem sido discutida e se mostrado promissoras (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Além disso, as proteínas Vip (*Vegetative Insecticidal Protein*), expressas na fase de crescimento vegetativo do Bt, apresenta um amplo espectro de toxicidade

contra insetos lepidópteros, mostrando eficiência contra larvas de *S. frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa zea*, coleópteros e alguns hemípteros (GLARE; O'CALLAFHAN, 2000; PALMA et al., 2014).

Considerando as muitas pulverizações de bioinseticidas a base de Bt e o frequente uso de plantas transgênicas empregadas mundialmente, é de fundamental importância para o sucesso desta biotecnologia compreender as interações de suas proteínas e o modo/mecanismo de ação do Bt contra seus hospedeiros. Desta forma, é possível reduzir o risco de seleção de indivíduos resistentes às toxinas utilizadas (VAN FRANKENHUYZEN, 1995; GRAF, 2011).

A fim de selecionar cepas mais efetivas para formulação de biopesticidas a base de Bt e compreender o papel dos esporos na mortalidade de larvas de lepidópteros, este trabalho teve como objetivo a identificação do tipo de mecanismo de ação do Bt em larvas de *S. frugiperda* avaliando a importância dos esporos na sua mortalidade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Spodoptera frugiperda*

A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), lagarta do cartucho, é uma das principais pragas da cultura do milho (*Zea mays* L.) no Brasil. Seu ataque pode reduzir a produção de grãos em até 52% nesta cultura, além de ser uma praga polífoga, podendo causar perdas econômicas em uma variedade de culturas, tais como, soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (VALICENTE, 2015, p. 14). As larvas mais novas consomem tecidos da folha de um lado, deixando intacta a epiderme oposta. A partir do segundo ou terceiro instar as larvas fazem buracos nas folhas e se alimentam do cartucho das plantas de milho em seguida, produzindo uma característica fileira de perfurações nas folhas. O intenso ataque da lagarta do cartucho pode resultar em danos severos em uma planta de milho (Figura 1). (VALICENTE, 2015, p. 4).

Figura 1 – Danos causados pela lagarta do cartucho em milho.



Fonte: Valicente, 2015.

O ciclo de vida deste inseto é completado em 30 dias em condições de laboratório e o número de ovos pode variar de 100 a 200 por postura/fêmea, sendo que um total de 1500 a 2000 ovos podem ser colocados por uma única fêmea (Figura 2). A lagarta pode atingir 2,5 cm possuindo um “Y” invertido na capa cefálica (Figura 3), sua fase de pupa ocorre no solo. Portanto, em uma única safra é possível ocorrer aproximadamente 3 ciclos da mesma população de insetos, destacando assim o grande potencial de dano que este inseto pode causar no campo (VALICENTE; CRUZ, 1991).

Figura 2 – Ciclo da *Spodoptera frugiperda*.



Fonte: Imagem retirada do site <http://slideplayer.com.br/slide/5632548/>.
Acesso: 31/07/2017.

Figura 3 – “Y” invertido na capa cefálica da *Spodoptera frugiperda*.



Fonte: Imagem retirada do site <http://agronomiarustica.com/lagarta-do-cartucho-spodoptera-frugiperda/>

Acesso: 31/07/2017

O *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 (Bt) é uma alternativa viável e econômica para o controle da *S. frugiperda*. Atualmente, biopesticidas e plantas transgênicas que expressam uma ou mais proteínas do Bt estão sendo utilizados para o controle desta praga. No entanto, além de ainda causar perdas significativas na produtividade do milho, há diversos relatos de populações de *S. frugiperda* resistentes aos eventos comerciais disponíveis (MONNERAT et al., 2015). Portanto, estudos relacionados ao controle de larvas de *S. frugiperda* ainda continuam necessários para a manutenção e avanço dos produtos que utilizam proteínas Bt.

2.2. *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Bactérias entomopatogênicas possuem um enorme potencial para o controle de inseto: pragas podendo fornecer uma variedade de componentes inseticidas (De MAAGD et al., 2003). Há mais de 50 anos, bioinseticidas de diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 (Bt) já são utilizados mundialmente para o controle de pragas (LERECLUS et al., 1993). Esta bactéria ocorre naturalmente no meio ambiente e tem sido isolado de diferentes habitats incluindo solos, tecidos da planta, insetos vivos ou mortos e outros invertebrados (RAYMOND et al., 2010). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica e anaeróbica facultativa, e formadora de esporos que produz uma variedade de toxinas Cry e Cyt (delta-endotoxinas) que possuem efeito inseticida (SCHNEPF et al., 1998). Os cristais são formados a partir do acúmulo das proteínas Cry na fase de esporulação e juntamente com os esporos são liberados no meio de cultura somente depois da parede celular se desintegrar (Figura 4) (SANCHIS, 2011; SANAHUJA et al., 2011).

As toxinas do Bt exibem um estreito espectro de atuação, sendo que uma única toxina tipicamente afeta um grupo de espécies, ou subespécie, dentro de uma Ordem de inseto (KLIMOWICZ et al., 2010). Por ser efetivo contra larvas de lepidópteros e não afetar seus predadores naturais e a saúde humana, o Bt tem sido empregado amplamente na agricultura e silvicultura em aplicações como biopesticidas ou mesmo utilização de seus genes na transformação genética de plantas (HARDEE et al., 2001). Atualmente no Brasil, 22 biopesticidas formulados a base de Bt estão registrados no MAPA (AGROFIT, 2017) e 38 plantas transgênicas que expressam diferentes toxinas de Bt são comercializadas, sendo, 29 plantas de milho, 2 plantas de soja e 7 de algodão (CTNBIO, 2017).

Figura 4 – Célula de *Bacillus thuringiensis* com a presença do esporo e cristal.



Fonte: Imagem retirada do site <http://www.komunich.de/vincent-sanchis/france/bacillus-thuringiensis.html>

Acesso: 27/07/2018

2.2.1. Proteínas Cry e Cyt

As proteínas Cry, assim como as Cyt, são delta-endotoxinas que formam cristais a partir do acúmulo de proteínas na fase estacionária de crescimento do Bt. O nome Cry deriva do fato da formação do cristal parasporal (PALMA et al., 2014). Atualmente, as proteínas Cry constituem o maior grupo de proteínas inseticidas produzidas por espécies do gênero *Bacillus*, sendo classificadas, atualmente, em 75 diferentes tipos (Cry1 à Cry75) de acordo com o grau de similaridade dos aminoácidos (WARREN et al., 1998; BT TOXIN NOMENCLATURE, 2018). Cada toxina está relacionada à toxicidade contra diferentes ordens de insetos, nematoides, caramujos e até células cancerígenas humanas (PALMA et al., 2014).

O modo de ação das proteínas Cry se dá a partir da ingestão dos cristais pelo inseto. Devido as proteases e condições alcalinas do intestino médio, com pH de aproximadamente 9, ocorre a lise do cristal de proteínas originando as protoxinas. Neste momento, ocorre a ativação das toxinas a partir da remoção de aproximadamente 40 aminoácidos do terminal amino e 500 aminoácidos do terminal carboxílico, convertendo as protoxinas de aproximadamente 130 kDa à toxinas ativadas de aproximadamente, 65 kDa (PARDO-LÓPEZ et al., 2013). Desta forma, estas toxinas ativadas se ligam aos receptores específicos das células colunares na parede do intestino médio do inseto destruindo as células epiteliais. Assim, ocorre a formação de poros, que aumentam a permeabilidade da parede intestinal, provocando a perda da função da membrana peritrófica devido ao influxo massivo de solutos e extravasamento do conteúdo do intestino médio (HEIMPEL; ANGUS, 1959; TABASHNIK

et al., 2015). Consequentemente, isso resulta em alterações fisiológicas como perda da homeostase do inseto, desbalanceamento completo das funções da hemolinfa e de órgãos em geral levando o inseto a morte (Figura 5) (BRAVO et al., 2002; TABASHNIK et al., 2015).

Figura 5 – Modo de ação clássico das proteínas Cry.

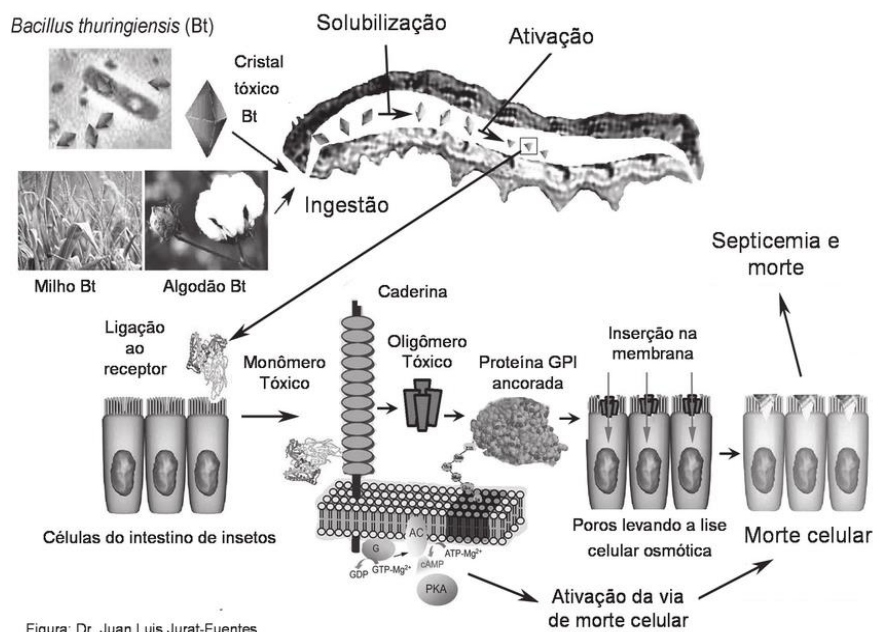


Figura: Dr. Juan Luis Jurat-Fuentes

Fonte: Imagem retirada do site

https://www.researchgate.net/publication/313251240_Toxinas_inseticidas_de_Bacillus_thuringiensis/figures?lo=1

Acesso: 10/07/2018

As proteínas Cyt constituem um grupo distinto menor de cristais de proteínas com efeito inseticida. Elas possuem atividade inseticida, principalmente, contra larvas de Diptera (BRAVO et al., 2007; SOBERÓN et al., 2013; BEN-DOV, 2014). Além disso, algumas toxinas Cyt possuem efeito sinérgico com outras proteínas de Bt (BEN-DOV, 2014). Dois diferentes modos de ação são propostos para o grupo das proteínas Cyt: um propõe um modo de ação menos específico e não totalmente elucidado, e outro propõe o modelo de formação de poros assim como as proteínas Cry (BUTKO, 2003; DE MAAGD et al., 2003; BEN-DOV, 2014). Por exemplo, para as toxinas similares à Cyt1Aa, com uma dobra típica de citolisina e um padrão hemolítico específico que difere de detergentes iônicos e não iônicos, o mecanismo de formação de poros é sugerido (COHEN, 2011). Atualmente, estão reportados 3 diferentes tipos de Cyt (Cyt1 à Cyt 3) (BT TOXIN NOMENCLATURE, 2018).

2.2.2. Proteínas Vip

Apesar da eficiência das proteínas Cry no controle de insetos, algumas pragas relevantes se mostraram altamente tolerantes a estas toxinas, tais como, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae) que causam danos significativos em milho na América do Norte (WARREN, 1997). Assim, programas de triagem que tinham como objetivo avaliar componentes inseticidas em sobrenadantes de cultura de isolados de *Bacillus* identificaram um sobrenadante da cultura de *Bacillus cereus* AB78 que induziu 100% de mortalidade em larvas de *Diabrotica virgifera virgifera* e *Diabrotica longicornis barberi* (WARREN, 1997). Verificou-se que o componente ativo deste sobrenadante era proteico. Desta forma, através de cromatografia de troca iônica seguida por SDS-PAGE identificou-se que a atividade inseticida foi devida a duas proteínas de 80 e 45 kDa que foram denominadas de Vip1Aa e Vip2Aa respectivamente (Vip: *Vegetative Insecticidal Protein*). Sequências homólogas para os genes *vip1Aa* e *vip2Aa* foram encontradas em 12 % de 463 cepas de *B. thuringiensis* testadas no estudo. Adicionalmente, uma cepa de Bt revelou uma proteína de 88,5 kDa, denominada como Vip3Aa, que se mostrou altamente tóxica para *A. ipsilon* e outras larvas de lepidópteros (WARREN, 1997). Mais recente, outra proteína denominada Vip4Aa (108 kDa) foi reportada (NCBI GenBank número de acesso AEB52299) (LIU et al., 2010; PALMA et al., 2014).

Portanto, isolados de Bt além de sintetizarem delta-endotoxinas, como as proteínas Cry e Cyt (que formam cristais), também podem sintetizar outras proteínas inseticidas durante a fase de crescimento vegetativo. Estas proteínas são subsequentemente secretadas no meio de cultura e foram denominadas como Vip (ESTRUCH et al., 1996; WARREN et al., 1998) e *Secreted insecticidal protein* (Sip – um outro grupo de proteínas descritas) (DONOVAN et al., 2006). As proteínas Vips são classificadas em quatro famílias (Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4) de acordo com o grau de similaridade dos aminoácidos (WARREN et al., 1998; CRICKMORE et al., 2014). Atualmente, 15 proteínas Vip1, 20 proteínas Vip2, 101 proteínas Vip3 e 1 proteína Vip4 foram reportadas (CRICKMORE et al., 2014, BT TOXIN NOMENCLATURE, 2018). Vip1 e Vip2 atuam como toxinas binárias para alguns insetos das ordens Coleoptera e Hemiptera (CRICKMORE et al., 2014; SCHNEPF et al., 2003; SATTAR ; MAITI, 2011), e Vip3 é ativo contra uma grande variedade de espécies de Lepidoptera (ESTRUCH et al., 1996; RUIZ DE ESCUDERO et al., 2014). Nenhum inseto alvo ainda foi encontrado para Vip4. Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 compartilham quase nenhuma homologia de

sequência entre si, sendo Vip1 e Vip4 os mais semelhantes (34% similaridade de aminoácidos) (CHAKROUN et al., 2016).

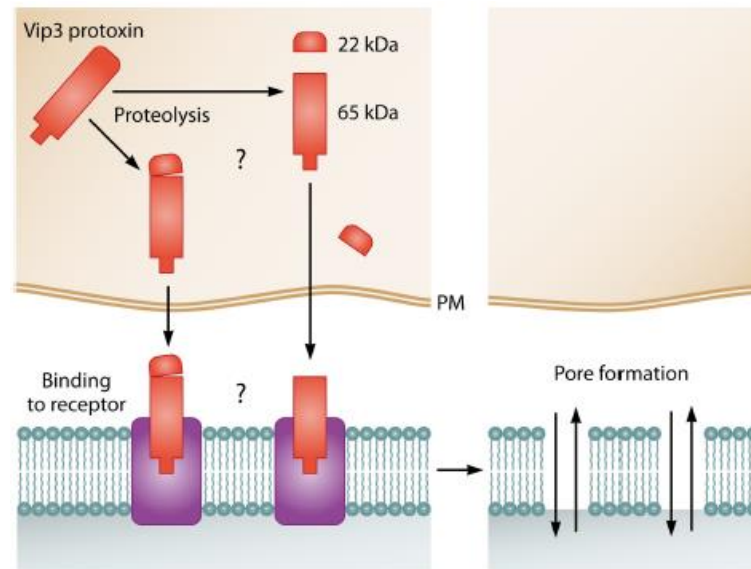
Assim como Vip1 e Vip2, as proteínas Vip3 são produzidas durante a fase de crescimento vegetativo do *B. thuringiensis* e pode ser detectada no sobrenadante da cultura a partir de 15 h após inoculação até depois da esporulação, refletindo assim sua alta estabilidade (ESTRUCH et al., 1996; MESRATI et al., 2005, CHAKROUN et al., 2016). Os primeiros genes *vip3* foram inicialmente clonados do DNA das cepas de Bt AB88 e AB424 e foram denominadas como *vip3Aa1* e *vip3Ab1* respectivamente (ESTRUCH et al., 1996). Eles codificam proteínas de 791 a.a. (88,5 kDa) e não mostram homologia com nenhuma outra proteína inseticida (ESTRUCH et al., 1996; DE MAAGD et al., 2003). Proteínas Vip3A exibem atividade inseticida contra uma grande variedade de lepidópteros e, interessantemente, as espécies menos susceptíveis à algumas proteínas Cry1A, tais como, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua* e *S. frugiperda* (ESTRUCH et al., 1996; MACINTOSH et al., 1990; CHAKROUN et al., 2016). Atualmente, existem 3 diferentes subfamílias de proteínas Vip3 que foram denominadas Vip3A, Vip3B e Vip3C. Dentre estas proteínas, há relatos de sucesso de vários genes *vip3A* no controle de lepidópteros praga, por exemplo, alguns trabalhos demonstram que cepas que expressam a proteína Vip3Aa1 possuem um potencial para controle de insetos pragas, tais como, *S. frugiperda* e *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (FANG et al., 2007; RUIZ DE ESCUDERO et al., 2014).

Em contraste com Vip1 e Vip2, proteínas Vip3 contêm sequências de peptídeos conservadas, mas não típicas, que não são processadas durante a secreção e estão presentes no peptídeo maduro secretado (ESTRUCH et al., 1996; DE MAAGD et al., 2003; LI et al., 2007). Apesar da diferença entre as toxinas Cry e Vip3, ambos os tipos de toxinas têm seu modo de ação aparentemente semelhante: as toxinas são ativadas por proteases do intestino médio, atravessam a membrana peritrófica, se liga a proteínas específicas na membrana apical das células epiteliais do intestino médio e ocorre a formação de poros (Figura 6) (LEE et al., 2003). Os sintomas comportamentais observados em insetos susceptíveis depois da ingestão da proteína Vip3Aa são semelhantes às proteínas Cry: interrupção da alimentação, perda do peristaltismo intestinal e paralisia geral do inseto (YU et al., 1997). Devido à semelhança das proteínas Vip3 com as proteínas Cry, os sítios de ligação podem ser os mesmos. Estudos com quatro insetos lepidópteros, o único que compartilhou o mesmo sítio de ligação na membrana epitelial foi a *Spodoptera eridania* (CHAKROUN et al., 2016).

Considerando o grande espectro de atividade tóxica das proteínas Vip3 em insetos, as propriedades das toxinas Vip3 estão abertas a muitas possibilidades de uso, como

biopesticidas a base de Bt para um grande número de pragas e para o manejo de insetos resistentes a eventos com proteínas Cry (SENA et al., 2009; BRAVO et al., 2011; MEHLO et al., 2005).

Figura 6 – Modo de ação proposto das proteínas Vip3.



Fonte: Chakroun et al., 2016.

2.3. Mecanismo de ação do Bt contra insetos lepidópteros: Tipo I, II e III

Há décadas o estudo do Bt tem revelado formas diversificadas de seu modo de ação sobre os seus lepidópteros hospedeiros (ANGUS, 1962; PALMA et al., 2014; CHAKROUN et al., 2016). Considerando as muitas pulverizações de formulados a base de Bt e o frequente uso de plantas transgênicas empregadas mundialmente, então, entender a ação destas toxinas é de fundamental importância (GRAF, 2011).

Processos em níveis ecológicos, fisiológicos e moleculares são determinantes para o sucesso desta bactéria entomopatogênica (VAN FRANKENHUYZEN, 1994). Adicionalmente, segundo Heimpel, Angus (1959) e Graf (2011), lepidópteros mortos por toxinas de Bt ainda se enquadram em três categorias distintas de acordo com o mecanismo de ação, sendo:

Tipo I (toxemia), insetos exibem paralisia geral e perda da integridade do intestino médio causada pela delta-endotoxina (cristal), resultando em morte entre 1 à 7 horas por toxemia. A paralisia geral do inseto é causada pelo aumento do pH da hemolinfa de 1 à 1,5.

Este aumento do pH é resultado do vazamento dos componentes alcalinos do intestino através dos danos causados pela toxina para a hemolinfa do inseto.

Tipo II (toxemia), os insetos exibem paralisia do intestino, porém sem vazamento de seus componentes e sem aumento do pH da hemolinfa. Estes morrem lentamente, entre 2 e 4 dias, sem nenhum sintoma de paralisia geral, entretanto não se alimentam mais.

Tipo III (septicemia), os insetos morrem por septicemia, após a germinação dos esporos no intestino médio e consequentemente o crescimento vegetativo das células resultando em infecção generalizada.

Dentre os insetos susceptíveis a toxinas de Bt, o tipo II (toxemia), que morrem lentamente sem se alimentar, são os mais comuns. Este é o mecanismo amplamente aceito onde se formam danos na membrana do intestino e se interrompe a absorção de alimentos levando as larvas à morte (GRAF, 2011).

2.4. Importância dos esporos na mortalidade de lepidópteros

Muitos fatores virulentos estão envolvidos na ação inseticida do Bt, como as *enterotoxinas*, um grupo de toxinas que resultam em diarreia e infecções; *enzimas hidrolíticas*, como fosfolipase, hemolisina, proteinase, e quitinase; e *outros fatores virulentos* como a beta-exotoxina (entretanto, esta toxina também afeta mamíferos e não são utilizadas para a obtenção de formulados de cepas de Bt que a expressam) (HANSEN ; SALAMITOU, 2000).

Apesar da descoberta relativamente recente das toxinas Vip e a vários relatos de septicemia resultante de Bt, ainda, muitos estudos tem seu enfoque nas delta-endotoxinas Cry (XUEYONG et al, 2008). Além disso, a função do esporo na toxicidade e capacidade de infecção das diferentes cepas de Bt tem sido discutida e se mostrado promissoras (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Navon (1993) mostra que as toxinas dos cristais possuem maior importância na morte de larvas de lepidópteros. Entretanto, muitos relatos mostram sinergismo entre cristais e esporos em toxicidade ou mortalidade direta (GLARE; O'CALLAGHAN, 2000). Toxinas Cry purificadas de Bt variedade *kurstaki* (Btk) tiveram sua mortalidade aumentada em 146 vezes com a adição de esporos (purificados) contra larvas de *Plutella xylostella* (Plutellidae) (MISYASONO et al., 1994), resultado também descrito por Cornforth et al. (2015). De modo semelhante, Johnson e McGaughey (1996) reportaram que a adição de esporos teve efeito sinérgico com delta-endotoxinas contra larvas de *Plodia interpunctella* (Pyralidae). Dubois e Dean (1995) encontraram que mesmo esporos ou células

vegetativas de diferentes bactérias, como *Bacillus cereus* Frankland e Frankland 1887, *Bacillus megaterium* de Bary 1884 e *Bacillus subtilis* Ehrenberg 1835, aumentaram significativamente a toxicidade de toxinas Cry quando fornecidos em conjunto. Entretanto, quando utilizado somente esporos e células isoladamente não foi observado toxicidade contra *Lymantria dispar* (Lymantriidae).

Outra função entre o sinergismo de esporos e delta-endotoxinas observada pode ser a repressão do desenvolvimento de insetos resistentes a delta-endotoxinas. Em uma pesquisa com *Spodoptera exigua* (Noctuidae) resistentes às toxinas Cry1Ca, parte de sua sensibilidade foi retomada quando utilizados esporos de Btk HD-1 juntamente as toxinas Cry1CA (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

Desta forma, apesar do Bt ser estudado há muitas décadas, esta bactéria ainda surpreende pela sua diversidade de proteínas inseticidas expressas. Em 2010, foi relatada a presença de uma nova toxina expressa na fase vegetativa do Bt, proveniente da germinação do esporo, a já citada Vip4. No entanto, a função desta toxina ainda é desconhecida, talvez esta seja uma toxina binária que perdeu um dos seus componentes (PALMA et al., 2014; CHACKROUN et al., 2016).

Portanto, a função dos esporos na toxicidade do *B. thuringiensis* é altamente variável, pode ser que as cepas que expressam proteínas Vip3 aumentem a mortalidade de insetos que morrem por septicemia. Assim, pode depender do tipo do inseto (I, II ou III) de acordo com o mecanismo de ação, da combinação de proteínas, da cepa do Bt, da condição geral da larva do inseto, bem como de outros microrganismos presentes em seu intestino (HANSEN; SALAMITOU, 2000).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários: Consulta Aberta. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso: 03 de junho de 2017.

ANGUS, T.A. The biochemistry and mode of action of *Bacillus thuringiensis* Berliner and its varieties. **College International Pathology, Insect**, Paris, n. 37, p. 5, 1962.

BEN-DOV, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. **Toxins**, n. 6, p. 1222–1243, 2014.

BRAVO, A.; MIRANDA, R.; GÓMEZ, I.; SOBERÓN, M. Pore formation activity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in an improved membrane vesicle preparation from *Manduca sexta* midgut cell microvilli. *Biochimica et Biophysica Acta*. **Biomembranes**, n. 1562, p. 63–69, 2002.

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

BT TOXIN NOMENCLATURE. *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Disponível em <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso: 30 de Agosto de 2018.

BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 69, p. 2415–2422, 2003.

CÉRON, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. PCR analysis of the cryI insectidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 1, p. 353–356, 1994.

CÉRON, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Specific PCR primers directed to identify cryI and cryIII genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3826-3831, 1995.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329-350, 2016.

COHEN, S.; ALBECK, S.; BEN-DOV, E.; CAHAN, R.; FIRER, M.; ZARITSKY, A.; DYM, O. Cyt1Aa toxin: Crystal structure reveals implications for its membrane-perforating function. **Journal of Molecular Biology**, n. 413, p. 804–814, 2011.

CORNFORTH, D.; MATTEWS, A.; BROWN, S.; RAYMOND, B. Bacterial Cooperation Causes Systematic Errors in Pathogen Risk Assessment due to the Failure of the Independent Action Hypothesis. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 11. p. 1-13, 2015. <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.72f4s>.

CTNBIO (COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA). Liberações Comerciais: Tabela de Plantas. Disponível em <http://ctnbio.mcti.gov.br/>. Acesso: 03 de julho de 2017.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D.R.. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. 2014. Disponível em <http://www.btnomenclature.info/>. Acesso em: 30 de maio de 2017.

DE MAAGD, R.A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H.E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, n. 37, p. 409–433, 2003.

DUBOIS, N.R.; DEAN, D.H. Synergism between CryIA insecticidal Crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. **Environmental Entomology**, n. 24, p. 1741-1747, 1995.

ESCUADERO, R I.; BANYULS N.; BEL Y.; MAEZTU M.; ESCRICHE B.; MUÑOZ D.; CABALLERO, P.; FERRÉ, J.. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 117, p. 51–55, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.01.006>.

FANG, J.; XU, X.; WANG, P.; ZHAO, J.Z.; SHELTON, A.M.; CHENG, J.; FENG, M.G.; SHEN, Z. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 956–996, 2007. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02079-06>.

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

GRAF, J. Shifting paradigm on *Bacillus thuringiensis* toxin and a natural model for *Enterococcus faecalis* septicemia. **mBio**, n. 2, v. 4, p. 1-2, jul/ago. 2011.

HANSEN, B.M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: CHARLES, J.-F. et al. (Eds). **Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application**, Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 41-64.

HARDEE, D.D.; VAN DUYN, J.W.; LAYTON, M.B.; BAGWELL, R.D. Bt cotton & management of the tobacco budworm-bollworm complex. **Agricultural Research Service**, Washington, n. 154, p. 40, 2001.

HEIMPEL, A.M.; ANGUS, T.A. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. **Journal of Insect Pathology**, n. 1, p. 152-170, 1959.

HUDAK, J.; RASKE, A G. Forest Insect Pests in the Newfoundland and Labrador Region In: ARMSTRONG, J.A.; IVES, W.G.H. (Eds). (Natural Resources Canada). **Forest Insect Pests in Canada**. Ottawa: Science and Sustainable Development Directorate, 1995, Chap. 1, p. 1-9.

HUGHES, P.R.; VAN BEEK, N.A.M.; WOOD, H.A. A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 48, p. 187-192, 1986.

JOBIN, L. Gypsy moth, *Lymantria dispar*. In: ARMSTRONG, J. A.; IVES, W. G. H. (Eds). (Natural Resources Canada). **Forest Insect Pests in Canada**. Ottawa: Science and Sustainable Development Directorate, 1995. Chap. 14, p. 133-139.

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

KLIMOWICZ, A.K.; BENSON, T.A.; HANDELSMAN, J. A quadruple-enterotoxin-deficient mutant of *Bacillus thuringiensis* remains insecticidal. **Microbiology**, Grã-Bretanha, n. 156, p. 3575-3583, set. 2010.

LERECLUS, D.; DELÉCLUSE, A.; LECADET, M.M. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Eds.). **Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester : John Wiley & Sons, 1993. p.37-69.

LIMA, A.S.G.; GUIDELLI, A.M.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. Identification of new isolates of *Bacillus thuringiensis* using rep-PCR products and δ -endotoxin electron microscopy. **Genetics and Molecular Biology**, n. 25, p. 225–229, 2002.

MIYASONO, M.; INAGAKI, S.; YAMAMOTO, M.; OHBA, K.; ISHIGURO, T.; TAKEDA, R.; HAYASHY, Y. Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, n. 63, p. 111-112, 1994.

MONNERAT, R. et al. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. **PlosOne**, n. 10, p. 1–13, 2015.

MOSCARDI, F.; SOUZA, M.L. Baculovírus para o controle de pragas: panaceia ou realidade? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 24, p. 22-29, jan./fev. 2002.

NAVON, A. Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J.; HIGGS, S. (Eds.). ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice***. Chichester : John Wiley & Sons, 1993. p. 125-146.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, n. 6, p. 3296-3325, 2014.

PARDO-LÓPEZ L, SOBERÓN M, BRAVO A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. **FEMS Microbiol Rev**, n 37, p. 3–22, 2013.

RAYMOND, B.; JOHNSTON, P. R.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 189-194, maio, 2010.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R.M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnol J.**, n. 9, p. 283–300, 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agron Sustain**, n. 31, p. 217–231, 2011 <http://dx.doi.org/10.1051/agro/2010027>.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology**, n. 62, p. 775-806, 1998.

SHANGKUAN, Y.H.; CHANG, Y.H.; YANG, J.F.; LIN, H.C.; SHAIIO, M.F. Molecular characterization of *Bacillus anthracis* using multiplex PCR, ERIC-PCR and RAPD. **Letters in Applied Microbiology**, n. 32, p. 139–145, 2001.

SHUNEMANN, R.; KNAACK, N.; FIUZA, L.M. Mode of Action and Specificity of *Bacillus thuringiensis* Toxins in the Control of Caterpillars and Stink Bugs in Soybean Culture. **Microbiology**. p. 1-12, janeiro, 2014.

SOBERON, M.; LOPEZ-DIAZ, J.A.; BRAVO, A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. **Peptides**, n. 41, p. 87–93, 2013.

TABASHINK, B. E.; ZHANG, M.; FABRICK, J.A.; WU, Y.; GAO, M.; HUANG, F.; WEI, J.; et al. Dual mode of action of *Bt* proteins: protoxin efficacy against resistant insects. **Scientific Reports**, n. 5, p. 1-10, out. 2015.

VALICENTE, F.H.; PEIXOTO, M.J.V.V.D.; PAIVA, E.; KITAJIMAS, E.W. Identificação e purificação de um vírus-de-granulose em lagartas-do-cartucho-do-milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 23, p.291-296, 1988.

VALICENTE, F.H. Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 18, n. 1, p. 119-127, 1989.

VALICENTE, F.H.; CRUZ, I. **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus spodoptera***. 1991. 23p. Circular Técnica 15 (Embrapa/Cnpms) Sete Lagoas, MG.

VALICENTE, F.H; LANA, U.G.P. **Caracterização molecular dos isolados 344 e 1644 de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), eficazes no controle da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)**. 2010. 20 p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Embrapa Milho e Sorgo). ISSN 1679-0154; 32.

VALICENTE, F.H. **Manejo integrado de pragas na cultura do milho**. 2015. 14p. Circular Técnica 208 (Embrapa/Cnpms) Sete Lagoas, MG.

VAN DEN BOSCH, R.; MESENGER, P.S.; GUTIÉRREZ, A.P. An Introduction to Biological Control. Plenum Press, New York and London, p. 247. 1982.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Effect of temperature on the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* Berliner in larvae of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clem. (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, n. 126, p. 1061-1065, 1994.

VAN FRANKENHUYZEN, K. Development and Current Status of *Bacillus thuringiensis* for Control of Defoliating Forest Insects. In: ARMSTRONG, J.A.; IVES, W.G.H. (Eds). (Natural Resources Canada). **Forest Insect Pests in Canada**. Ottawa: Science and Sustainable Development Directorate, 1995, Chap. 34, p. 315-325.

VAN FRANKENHUYZEN, K; GRINGORTEN, L.; DEDES, J.; GAUTHIER, D. Susceptibility of different instars of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* estimated with a droplet-feeding method. **Forest Entomology**, n. 90, p. 560-565, 1997.

VAN FRANKENHUYZEN, K.; RÉGNIÈRE, J.; CARDOU, B. M. Response of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* at different ingested doses and temperatures. **Journal of Invertebrate Pathology**. n. 99, p. 263-274, 2008.

VILAS-BOAS, G.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; LEMOS, M.V.F.; BOURGUET, D. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied Environmental Microbiology**. n. 68, p. 1414–1424, 2002.

WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; MULLIN, M.A.; NYE, G.J.; CARR, B.; DESAI, N.M.; KOSTICHKA, K.; DUCK, N.B.; ESTRUCH, J.J. Auxiliary proteins for enhancing the insecticidal activity of pesticidal proteins. **US patent**, n. 5, p. 770, junho 1998.

WARREN, G.W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests, p 109–121. In Carozzi NB, KozielM (Ed), **Advances in insect control, the role of transgenic plants**. Taylor & Francis Ltd, London, United Kingdom, 1997.

XUEYONG, Z. et al. Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, p. 37–42, 2008.

ZHU, Y.S.; BROOKES, A.; CARLSON, K.; FILNER, P. Separation of protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* by Ludox gradient centrifugation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1279-1281, maio 1989.

SEGUNDA PARTE – ARTIGO**Normas de formatação da Revista *Journal of Invertebrate Pathology*
(Versão Preliminar)**

QUAL A IMPORTÂNCIA DOS ESPOROS DE *Bacillus thuringiensis* NA MORTALIDADE DE LARVAS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)?

Fernando Mantouvane Lanza Souza ^a, Ubiraci Gomes de Paula Lana ^b, Fernando Hercos Valicente ^{b*}

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

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

*Autor Correspondente – fernando.valicente@embrapa.br

Resumo

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a principal praga do milho no Brasil. Biopesticidas a base de *Bacillus thuringiensis* (Berliner 1915) (Bt) são utilizados no manejo desta praga. Entretanto, o mecanismo de ação do Bt para matar seus hospedeiros é diverso. Portanto, objetivo deste trabalho foi a identificação do tipo de mecanismo de ação do Bt em larvas de *S. frugiperda* avaliando a importância dos esporos na sua mortalidade. O estudo foi conduzido no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo. Foram selecionadas 2 cepas de Bt (que expressa Vip3 – HD1; e não expressa Vip3 - 426) após teste de mortalidade e caracterização molecular. Para separar os esporos e cristais das cepas de Bt foi realizada a adaptação da metodologia de separação por Ludox e posterior purificação para obter 100% de pureza. A concentração dos esporos foi determinada utilizando Câmara de Neubauer e a concentração das proteínas foi pelo software *Quantity One* da Bio-Rad. Foi adaptado o método de alimentação por micro-gotas (0,08 µL/larva) para os bioensaios utilizando larvas de *S. frugiperda* (1 dia após eclosão), 18 tratamentos com 4 repetições e 2 testemunhas. Somente esporos de cada cepa (HD1 e 426 padronizados a 10⁴ esporos/larva), proteínas Cry (HD1: 8 ng/larva e 426: 8 ng/larva), sobrenadante (com Vip3 – HD1: 2 ng/larva e sem Vip3 - 426: 0 ng/larva) foram testados separadamente e, posteriormente, suas combinações. Durante 7 dias a cada 24h, as larvas mortas foram contadas, coletadas e armazenadas a -20°C, e no 14º dia uma última avaliação da mortalidade. As larvas mortas foram maceradas e realizadas a contagem direta de células vegetativas, UFC e Câmara de Neubauer. As maiores mortalidades foram esporo mais cristal da cepa HD1 (94,64%), e esporo da cepa HD1 mais cristal da cepa 426 (90,10%). No entanto, a combinação dos esporos, cristais e sobrenadante HD1 (Vip3) não houve incremento da mortalidade. Os tratamentos com esporos e cristais de ambas as cepas apresentaram altos valores na contagem de células, indicando septicemia. Entretanto, tratamentos com sobrenadante HD1 e esporos resultaram nos maiores valores nas contagens totais. Portanto, os resultados sugerem que larvas de *S. frugiperda* possuem o Tipo III (Septicemia) do mecanismo de ação do Bt contra insetos lepidópteros. No entanto, somente esporos de cepas que expressam Vip3 são importantes na mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, ocorrendo efeito sinérgico com proteínas Cry.

Keywords: Controle Biológico. *Droplet-feeding method*. Lagarta-do-cartucho. Mecanismo de ação. Purificação de esporos e cristais. Septicemia.

1. Introdução

As condições tropicais do Brasil proporcionam a contínua sucessão de culturas ao longo do ano, em consequência este fator pode favorecer a alta incidência de diferentes pragas em todo o ciclo das culturas (Valicente, 2015). A *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), lagarta do cartucho, é uma destas pragas distribuídas em todo território nacional, causando danos em diferentes cultivos. Na cultura do milho, a lagarta do cartucho é uma praga primária sendo o seu controle realizado principalmente com plantas transgênicas e aplicações de inseticidas organosintéticos (Monnerat et al., 2015). No entanto, o Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma alternativa eficiente e mais sustentável para manejo de insetos, sendo a utilização do controle biológico uma importante tática a ser empregada (Valicente, 2015).

Dentre os organismos entomopatogênicos utilizados no controle biológico, o *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 é uma alternativa viável e econômica. Por ser efetivo contra os insetos alvos, não afetar seus predadores naturais e a saúde humana, as toxinas de Bt têm sido utilizadas amplamente na agricultura tanto em aplicações de biopesticidas como em plantas transgênicas (Hardee et al., 2001). *B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica e anaeróbica facultativa, e formadora de esporos que produz uma variedade de toxinas que possuem efeito inseticida (Schnepf et al., 1998). Os cristais, denominados de delta-endotoxinas, são formados a partir do acúmulo das proteínas Cry na fase de esporulação e juntamente com os esporos são liberados no meio de cultura somente depois da parede celular se desintegrar (Sanchis, 2011; Sanahuja et al., 2011).

Esta bactéria possui alta variabilidade genética distribuída na natureza (Vilas-Boas et al., 2002). Portanto, uma variedade de proteínas com potencial inseticida podem ser expressas (Palma et al., 2014). Desta forma, o modo de ação das proteínas e o mecanismo de ação do Bt em insetos lepidópteros podem ser diversos, dependendo do tipo de proteínas expressas pela cepa, da ordem ou espécie do inseto e da presença do esporo (Heimpel and Angus, 1959; Graf, 2011; Cornforth et al., 2015; Chackraborty et al., 2016).

Muitos estudos são realizados com o enfoque nas delta-endotoxinas devida sua eficiência na mortalidade de pragas. Porém a função do esporo na toxicidade e na capacidade de infecção das diferentes cepas de Bt ainda é discutida (Glare and O'Callaghan, 2000; Xueyong et al., 2008; Cornforth et al., 2015). Além disso, as proteínas Vip (*Vegetative Insecticidal Protein*), expressas na fase de crescimento vegetativo do Bt, tem apresentado um amplo espectro de toxicidade contra insetos lepidópteros, mostrando eficiência contra larvas de *S. frugiperda* (Noctuidae), *S. exigua*, *Helicoverpa zea* (Noctuidae), coleópteros e alguns

hemípteros (Warren, 1997; Glare and O'Callaghan, 2000; Palma et al., 2014, Chackraborty et al., 2016).

Segundo Heimpel e Angus (1959) e Graf (2011), lepidópteros mortos por toxinas de Bt ainda se enquadram em três categorias distintas de acordo com o mecanismo de ação, sendo; Tipo I (toxemia - insetos exibem paralisia geral e perda da integridade do intestino médio causada pela delta-endotoxina (cristal), resultando em morte entre 1 à 7 horas por toxemia. A paralisia geral do inseto é causada pelo aumento de pH da hemolinfa de 1 à 1,5. Este aumento do pH é resultado do vazamento dos componentes alcalinos do intestino através dos danos causados pela toxina para a hemolinfa do inseto); Tipo II (toxemia - os insetos exibem paralisia do intestino, porém sem vazamento de seus componentes e sem aumento do pH da hemolinfa. Estes morrem lentamente, entre 2 e 4 dias, sem nenhum sintoma de paralisia geral, entretanto não se alimentam mais) e; Tipo III (septicemia - os insetos morrem por septicemia, após a germinação dos esporos no intestino médio e consequentemente o crescimento vegetativo das células resultando em infecção generalizada.

Considerando as muitas pulverizações de bioinseticidas a base de Bt e o frequente uso de plantas transgênicas empregadas mundialmente, é de fundamental importância para o sucesso desta tecnologia compreender as interações de suas proteínas e o modo/mecanismo de ação do Bt contra seus hospedeiros. Desta forma, é possível reduzir o risco de seleção de indivíduos resistentes às toxinas utilizadas (van Frankenhuyzen, 1995; Graf, 2011).

A fim de selecionar cepas mais efetivas para formulação de biopesticidas a base de Bt, compreendendo o papel dos esporos na mortalidade de larvas de lepidópteros, este trabalho teve como objetivo a identificação do tipo de mecanismo de ação do Bt em larvas de *S. frugiperda* avaliando a importância dos esporos na sua mortalidade.

2. Material e Métodos

2.1. Seleção das Cepas de Bt

Para selecionar duas cepas de *B. thuringiensis* que possuam mortalidade acima de 70% para larvas de *S. frugiperda*, sendo que uma expresse a proteína Vip3 no sobrenadante e outra não, foram testadas 4 cepas a partir de resultados prévios de Valicente et al. (2010) e Pinheiro (2017) para realização de bioensaios preliminares. Duas cepas (426 e 1641) pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo, onde o estudo foi

conduzido, (Valicente and Barreto, 2003; Valicente et. al., 2010) e duas cepas comerciais (Bt *kurstaki* HD1 e Bt *aiwazai* T07).

2.1.1. Bioensaios preliminares

Os bioensaios preliminares foram realizados utilizando cubos de dieta artificial para *S. frugiperda* de aproximadamente 1 cm³ depositados em copos descartáveis de 50 mL. As 4 cepas de Bt (426, 1641, HD1 e T07) foram crescidas por 72 h a 30 °C em 2 placas de Petri contendo meio LB sólido, composto por 5 g de extrato de levedura, 10 g de Triptona, 10 g de cloreto de sódio e 12 g de ágar bacteriológico. As placas foram raspadas e transferidas a massa celular para tubos Falcon contendo 20 mL de água deionizada e autoclavada mais uma gota de Tween. A concentração final foi determinada utilizando Câmara de Neubauer e padronizada na concentração de 10⁸ esporos/mL. Foram pipetados 150 µL da suspensão de Bt sobre cada cubo de dieta e aguardado sua absorção e secagem pela mesma. Em cada copo contendo a dieta com Bt foi depositado uma larva de *S. frugiperda* de 1 dia após eclosão. Os bioensaios foram realizados com 24 larvas, 4 réplicas e testemunha (água deionizada autoclavada mais uma gota de Tween) para cada cepa. O experimento foi acondicionado a 25 °C sendo avaliada a mortalidade das larvas diariamente por 7 dias. As cepas que resultaram em mortalidade acima de 70% foram selecionadas.

2.1.2. Screening de genes por PCR

A fim de selecionar uma cepa que possua o gene *vip3* e outra que não possua, foi utilizado o *screening* primer do gene *vip3* segundo Hernandez-Rodriguez et al. (2009). Para extração do DNA genômico, as 4 cepas foram crescidas em placas de Petri contendo meio LB por 16 h a 30 °C. Uma colônia isolada de cada cepa foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido e incubada a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 16 h. O Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) foi utilizado para a extração do DNA genômico seguindo o protocolo do fabricante. As amostras foram quantificadas utilizando Nanodrop (ND-1000 V3.1.2 - Spectrophotometer) e a integridade visualizada em gel de agarose 1%. Após seleção das duas cepas com características desejadas foram utilizados primers para os genes *cry1A*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1D*, *cry1Ea/Eb*, *cry1Fb1*, *cry2Aa*, *cry2Ab*, *cry2Ad*, *cry9A* e *cry9B* segundo Ceron et al. (1994) para detecção dos possíveis genes *cry* presentes nas cepas.

2.2. Crescimento do Bt para os bioensaios

As duas cepas selecionadas (com presença e ausência do gene *vip3*) que apresentaram mortalidade superior a 70% foram crescidas novamente em placas de Petri utilizando meio de cultura LB sólido. As cepas foram plaqueadas e acondicionadas na incubadora a 30 °C por 72 h, posteriormente, visualizadas utilizando microscópio de contraste de fase a fim de averiguar a formação de esporos, cristais e possível contaminação. Cada cepa foi crescida novamente em 4 erlenmeyers contendo 250 mL de meio líquido para obtenção de uma quantidade suficiente de massa celular a ser utilizada nas próximas etapas.

2.3. Bioensaios com sobrenadantes

Para realização dos bioensaios preliminares com possíveis proteínas expressas na fase vegetativa do Bt presentes no sobrenadante, cada cepa selecionada foi inoculada em 2 erlenmeyers contendo 250 mL do meio LB líquido cultivada a 30 °C sob agitação constante de 250 rpm por 48 horas. Posteriormente, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 rpm por 15 min e o sobrenadante filtrado através do filtro TPP 0,2 µm. Foram realizadas análises microscópicas do sobrenadante filtrado para confirmar que não há presença de células, esporos ou cristais. Posteriormente, foram pipetados 150 µL dos sobrenadantes filtrados sobre cada cubo de dieta artificial para *S. frugiperda* de 1 cm³ e aguardado sua absorção e secagem pela mesma. Em cada copo contendo a dieta com sobrenadante foi depositado uma larva de *S. frugiperda* de 1 dia após eclosão. Os bioensaios foram realizados com 24 larvas, 4 réplicas e testemunha para cada cepa. O experimento foi acondicionado a 25 °C sendo avaliada a mortalidade das larvas diariamente por 7 dias.

Para o bioensaio final, repetiu-se o mesmo processo descrito anteriormente. No entanto, para aumentar a concentração de proteínas no sobrenadante das duas cepas selecionadas (com e sem Vip3), os mesmos foram concentrados 10 vezes em centrífuga a vácuo.

2.4. Separação dos esporos e cristais

Para separar os esporos e cristais foi utilizada a adaptação da metodologia de (Zhu et al., 1989). As duas cepas selecionadas na etapa anterior foram crescidas em meio LB foram transferidas para frascos de 500 mL para realizar a lavagem da massa celular com uma

solução composta por 0,1 mol/L Tris base, 1 mol/L de NaCl, 10 mmol/L EDTA, 0,02 % NaN_3 , 0,01 % Triton X-100 e pH 7,2.

Foi adicionado aproximadamente 200 mL da solução nos frascos de 500 mL contendo os *pellets* transferidos da cepa após centrifugação à 15000 rpm por 30 min e agitados vigorosamente por 15 min manualmente. Os frascos foram centrifugados durante 15 min à 15000 rpm e 4 °C, sendo descartado o sobrenadante. Este processo foi repetido até a massa celular apresentar uma coloração clara e os *pellets* se soltarem facilmente do fundo dos frascos permanecendo uma parte sem decantar (partículas brancas flutuando no sobrenadante). Em seguida, os *pellets* foram reunidos em um frasco e lavados seis vezes utilizando água destilada e autoclavada através de centrifugação à 15000 rpm e 4 °C durante 15 min. Foram adicionados 100 mL de água destilada e autoclavada, 1 g de lisozima e 1 mL de 1 % Triton (TX-100) para realizar a lise das células vegetativas remanescentes. Este frasco foi depositado no agitador a 20 °C e 150 rpm durante 48 h para se obter melhores resultados. Após esta etapa foi obtido o *crude*, uma mistura de esporo, cristal, algumas células vegetativas e outros contaminantes oriundos do processo. Desta forma, é possível fazer a separação dos esporos e cristais utilizando Ludox HS-40.

Ludox HS-40 é uma solução contendo sílica coloidal com 40 % de concentração suspensos em água e pH 9,7 (Sigma®). Foram preparados 100 mL de Tris-HCl (15,67 g de Tris – HCl para 100 mL de água destilada, o pH da solução foi ajustado para 2,5 utilizando HCl) utilizado no ajuste do pH do Ludox para 8. Este Ludox com o pH 8 foi definido como solução de 100 % de concentração e a partir desta foram testadas 4 diluições (45, 55, 65 e 75%) a fim identificar dois gradientes do Ludox que possibilitassem a separação desejada. Foram adicionados em tubos de polipropileno de 17 mL (Ultraclear), 8 mL de uma das diluições de Ludox e, com auxílio de uma pipeta de 1000 µl abaixo do mais diluído, foram adicionados 4 mL de Ludox mais concentrado formando assim dois gradientes desta solução (e.g.: 45 e 55 %).

Foi feita uma diluição do *crude* para 50 % proveniente da etapa anterior e acrescentado 4 mL desse sobre o gradiente de Ludox. Estes tubos foram centrifugados em diferentes rotações variando de 5000 a 10000 x g utilizando ultracentrífuga (Hitachi: modelo Himac CP80β com o rotor SW 28 swinging – bucket) a 4 °C em tempos de 10 a 60 minutos. Após a centrifugação com as condições adequadas foi possível identificar camadas em suspensão no Ludox. Foi utilizada uma pipeta de 1000 µl para retirada de cada camada, sendo estas transferidas para tubos cônicos contendo 30 mL de água deionizada. As camadas separadas foram examinadas no microscópio de contraste de fase. Esta separação proporciona

aproximadamente 95 % de separação do cristal e do esporo. Portanto, é necessário realizar a purificação a seguir para alcançar a pureza desejada.

2.4.1. *Purificação dos esporos*

Os esporos separados através dos gradientes do Ludox foram centrifugados por 15 min a 10000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 10 mL de 0,05 % de NaOH com pH 12 com auxílio de uma pipeta de 1000 µl e encubados por 1 h a 22 °C. Em seguida, os esporos em NaOH foram centrifugados por 15 min a 10000 rpm, sendo descartado o sobrenadante e adicionado 10 mL de água destilada ao pellet. Esta operação foi repetida três vezes utilizando água deionizada. Ao final deste processo, o *pellet* (esporos) foi ressuscitado em 20 mL de água deionizada, observados em microscópio de contraste de fase, para confirmar se houve a eliminação dos cristais. Para determinação da concentração de esporos foi utilizada a Câmara de Neubauer.

2.4.2. *Purificação dos cristais*

Para obter os cristais purificados, foi utilizado uma pipeta esterilizada para transferir os 30 mL da suspensão de cristal separada com Ludox para dois tubos de polipropileno de 17 mL. Estes foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 20 °C para decantar os cristais. Os *pellets* foram ressuscitados em 15 mL de 0,2 M CAPS com pH 10,5. Os tubos foram selados com parafilme e incubados por 24 h a 28 °C e 175 rpm em um agitador, sendo estes posicionados inclinados para melhor agitação. Periodicamente, os tubos foram observados para garantir que os cristais permaneceram misturados no CAPS tampão para máxima solubilização. Após 24 h, os tubos foram centrifugados por 5 min à 8000 rpm (qualquer esporo remanescente foi decantado) e o sobrenadante foi filtrado utilizando 0,2 µm acrodisco com uma seringa de 10 mL. Isto garantiu que nenhum esporo permanecesse na amostra. Os cristais solubilizados (o sobrenadante filtrado) foram observados através do microscópio de contraste de fase, para confirmar a ausência de esporos, transferidos para tubos cônicos de 50 mL e acondicionados a 4 °C. Nesta etapa, é importante ressaltar que, as proteínas aglomeradas como cristais estão solubilizadas na forma de protoxinas, ou seja, as proteínas estão presentes, mas não foi possível a visualização dos cristais por microscópio.

2.5. Quantificação de proteínas totais

Para quantificar as proteínas totais foi utilizado o Método de Bradford utilizando o *crude*, o sobrenadante (10 vezes concentrado), os esporos purificados, os cristais purificados e Albumina Bovina (AB) para determinar a curva padrão (0,05; 0,075; 0,1; 0,125 ug/mL). Primeiramente, foi realizada a extração das proteínas totais utilizando 900 µl de 0,05 M KOH + 50 µl 0,1 M KOH + 50 µl *crude*, sobrenadante, esporo ou cristal em um microtubo de 1,5 mL. Este foi incubado 1 h a 28 °C a 160 rpm em um agitador e posteriormente centrifugado a 5000 rpm por 15 min a 6 °C. Então, foram retirados 900 µl do sobrenadante.

Posteriormente, foi utilizado o reagente de Bradford, sendo 200 µl do reagente + 50 µl Amostra (*crude*, sobrenadante, esporo ou cristal, e Albumina Bovina). Desta forma, as amostras foram quantificadas através do espectrofotômetro e foi gerada a Curva Padrão e, finalmente, determinadas as concentrações de proteínas totais.

2.5.1. Avaliação do perfil de proteínas e determinação de suas concentrações

Para avaliação do perfil de proteínas, as amostras (*crude*, sobrenadante, esporo e cristal) foram preparadas contendo 1 µg/µl de proteínas a partir dos resultados das concentrações de proteínas totais (etapa anterior). Estas foram aquecidas em termociclador por 3 min e aplicadas no gel de acrilamida 10 % SDS-PAGE (Bio-Rad). Foram utilizadas como amostra padrão Albumina Bovina em 4 diluições (0,5; 1; 2 e 4 µg). Para determinação das concentrações de toxinas através das bandas geradas foi utilizado o software *Quantity One* da Bio-Rad (versão 4.4).

2.6. Bioensaio por alimentação de micro-gotas

Larvas de *S. frugiperda* neonatas foram obtidas da criação controlada e estabelecida no Laboratório de Controle Biológico da Embrapa Milho e Sorgo. Para os bioensaios foi adaptado o método de alimentação por micro-gotas (*droplet-feeding bioassay method*) descrito previamente por Hughes et al., (1986) e adaptado por van Frankenhuyzen et al. (1997) utilizando a bomba de seringa para infusão modelo Pump 11 Elite da Harvard Apparatus. Assim, as larvas neonatas ficaram em inanição por 16 h, sendo transferidas individualmente para microtubos de 500 µL contendo micro-gotas da solução PBSS (PBSS: 8,5 g/L de NaCl, 6 g/L de K₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄, 0,1 mL/L de Triton X-100, 8,561 g de

Sacarose e 0,1 g de Azul de Bromophenol; pH ajustado para 6,8 utilizando KOH 1M). Adicionalmente, foram testados 3 volumes de gotas (0,250 μ L; 0,150 μ L e 0,08 μ L) e 3 concentrações de proteínas Cry (cristais) diluídas em PBSS das duas cepas selecionadas (4, 8 e 16 ng/ μ L) a fim de identificar o volume de gota que a larvas consumissem totalmente e a concentração de proteínas Cry que mais se aproximasse de 50% de mortalidade. A temperatura de acondicionamento das larvas foi de 25 °C. Desta forma, foi possível avaliar o possível incremento na mortalidade das larvas na presença das outras variáveis testadas.

Após a determinação da concentração das proteínas e o volume da micro-gota, o bioensaio foi conduzido com 18 tratamentos contendo 16 larvas, quatro repetições além de duas testemunhas:

- Tratamentos:

- Testemunha PBSS
- Testemunha Meio LB Líquido (10 vezes concentrado) + PBSS
- Esporo Cepa sem Vip3
- Esporo Cepa com Vip3
- Cristal Cepa sem Vip3
- Cristal Cepa com Vip3
- Sobrenadante Cepa sem Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3
- Esporo Cepa sem Vip3 + Cristal Cepa sem Vip3
- Esporo Cepa sem Vip3 + Cristal Cepa com Vip3
- Esporo Cepa com Vip3 + Cristal Cepa com Vip3
- Esporo Cepa com Vip3 + Cristal Cepa sem Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Cristal Cepa com Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Cristal Cepa sem Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Esporo Cepa com Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Esporo Cepa sem Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Esporo Cepa com Vip3 + Cristal Cepa com Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Esporo Cepa com Vip3 + Cristal Cepa sem Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Esporo Cepa sem Vip3 + Cristal Cepa com Vip3
- Sobrenadante Cepa com Vip3 + Esporo Cepa sem Vip3 + Cristal Cepa sem Vip3

O experimento foi avaliado durante 168 h, em intervalos de 24 h as larvas mortas foram contadas, coletadas e armazenadas a -20 °C. Adicionalmente, 336 h após inoculação uma última avaliação foi realizada. Para identificar septicemia, as larvas mortas congeladas coletadas no intervalo de maior mortalidade foram maceradas em uma proporção de 25 µL/larva em água deionizada e estéril observadas em microscópio de contraste de fase em lâminas contendo 10 µL para confirmar, ou não, a presença de células vegetativas ou esporos de Bt fazendo a contagem direta das mesmas. Além disso, foi determinada a concentração das células e esporos utilizando Câmara de Neubauer e também plaqueadas em meio LB sólido para contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram transformados em raiz quadrada de $Y + 0,5 - \text{SQRT}(Y + 0,5)$, submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, por meio do programa SISVAR (Ferreira, 2011).

3. Resultados

3.1. Bioensaios preliminares e screening de genes por PCR

As quatro cepas selecionadas para os bioensaios preliminares, 426, 1641, HD1 e T07, resultaram em mortalidade das larvas de *S. frugiperda* de 91,67; 100; 100 e; 100 %, respectivamente. Portanto, para selecionar as duas cepas, que possuam e não possuam o gene *vip3*, foi utilizado *screening primer vip3* (Hernandez-Rodriguez et al., 2009). Todas as cepas, exceto 426, amplificaram o gene *vip3* (Figura 1). As cepas 426 e HD1 foram selecionadas para as próximas etapas.

Adicionalmente foi realizada a detecção de genes *cry* por PCR das duas cepas. A cepa 426 apresentou os genes *cry1A*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1Ea/Eb*, *cry1Fb1*, *cry2Aa* e amplificação inespecífica do *cry2Ab*, e a cepa HD1 os genes *cry1A*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1Fb1*, *cry2Aa*, *cry2Ab* e amplificação inespecífica do *cry1Ea/Eb* (Figura 2).

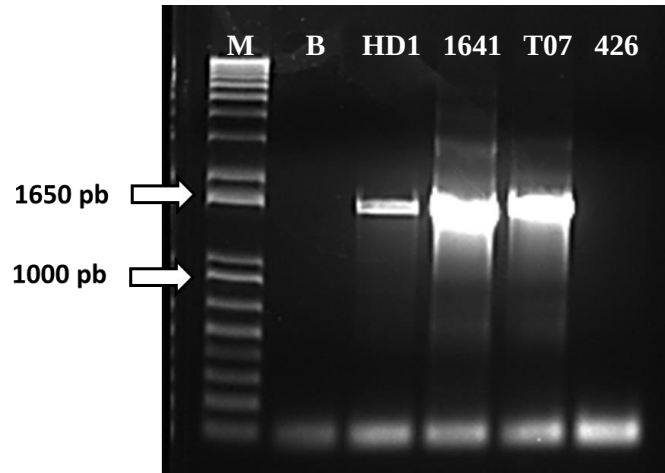


Fig. 1. Produtos de PCR obtidos com o DNA extraídos das cepas de *B. thuringiensis* utilizando *screening primer vip3*. M refere-se ao marcador molecular 1Kb Plus Ladder (Invitrogen), B corresponde ao controle negativo da reação, e as cepas testadas: HD1 (também como controle positivo), 1641, T07 e 426. Eletroferese em gel de agarose 1,2%. Somente a cepa 426 não apresentou o gene *vip3*.

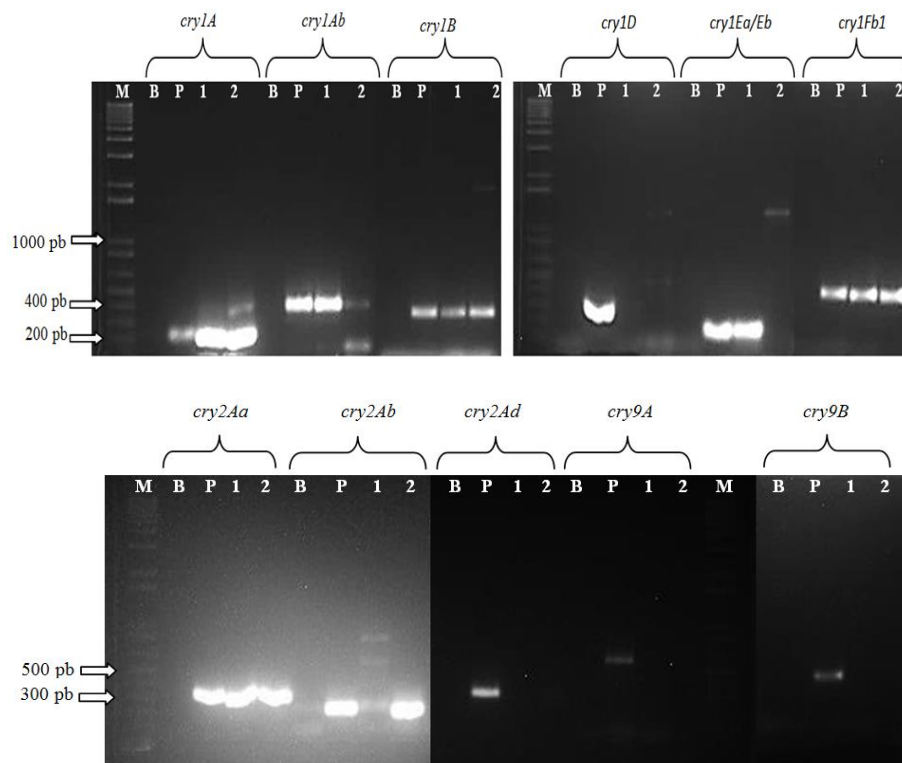


Fig. 2. Amplificação com *primers cry-específicos*. Purificação de gel a partir da PCR das amostras 426 (1) e HD1 (2). M= Marcador 1Kb Plus (Invitrogen), B= Branco (Controle Negativo) e P= Controle Positivo respectivo de cada gene.

Os bioensaios preliminares com sobrenadantes das duas cepas resultaram em 12,77% de mortalidade para 426 e 26,09% para HD1, indicando a possível presença da proteína Vip3 no sobrenadante da cepa HD1 a ser confirmada nas próximas etapas.

3.2. Separação por Ludox, purificação dos esporos e cristais e quantificação de proteínas

Para separação e purificação dos esporos e cristais foi necessário adaptar a metodologia descrita por (Zhu et al., 1989). Os gradientes de Ludox que resultaram em uma separação de aproximadamente 95 % foram 55 e 65 % e centrifugação a 8000 x g por 30 minutos. Foram formadas 5 camadas em suspensão no Ludox resultante do processo. Estas camadas foram coletadas separadamente utilizando pipeta de 1000 µL e observadas em microscópio de contraste de fase. As camadas 3) Esporos e 5) Cristais (*pellet*) foram utilizadas na etapa seguinte de purificação.

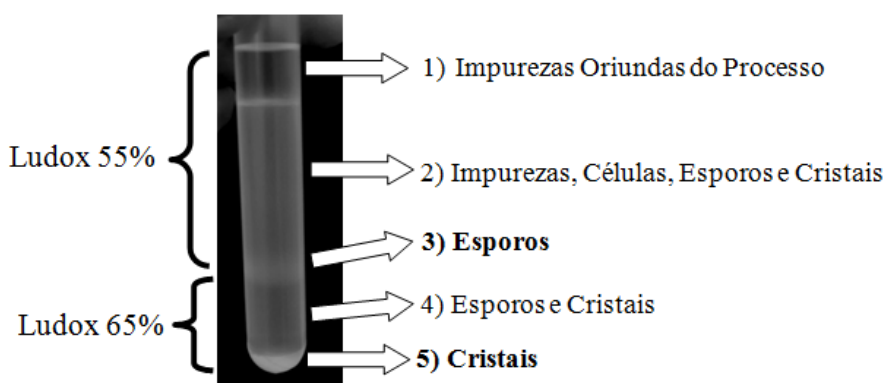
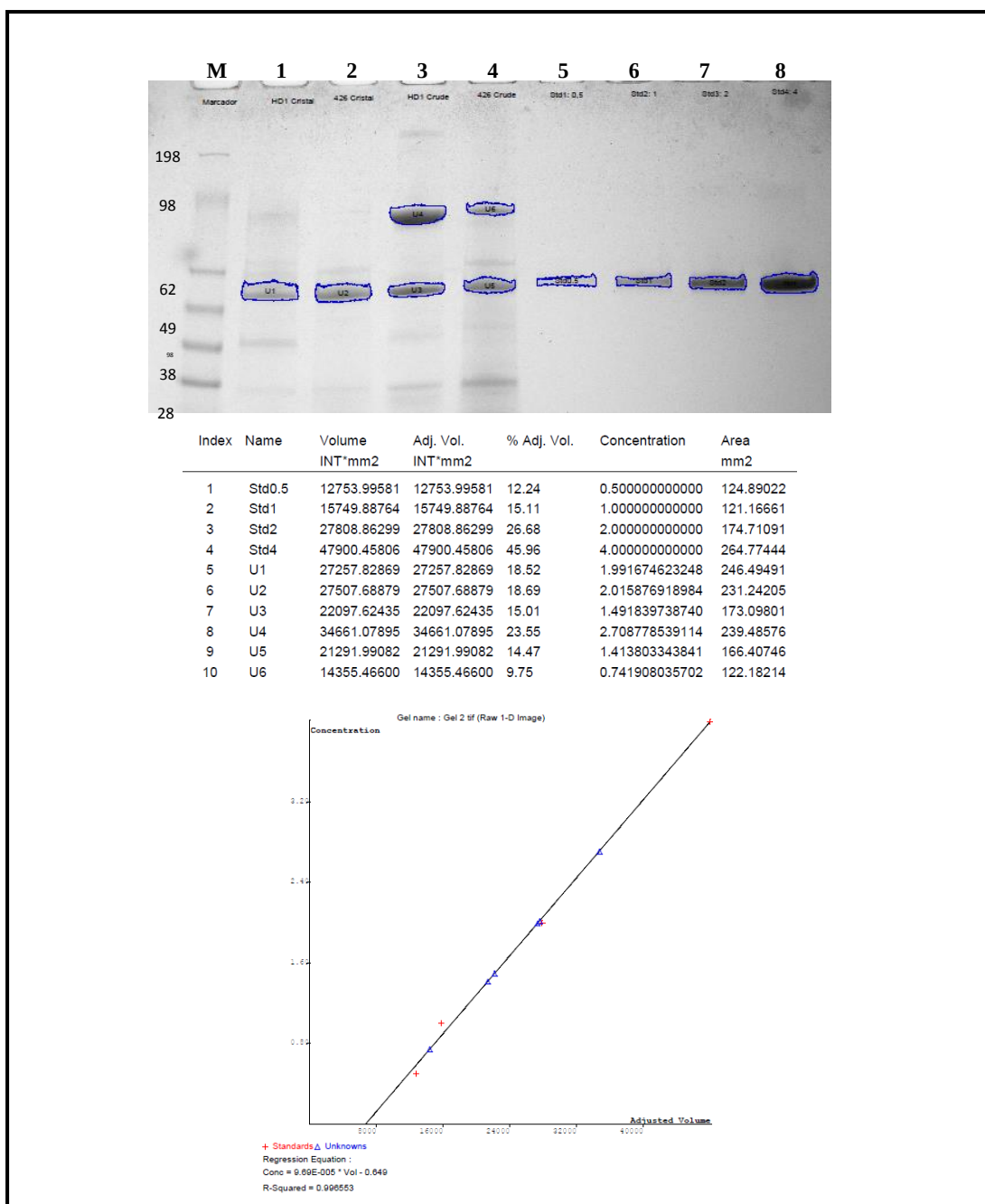


Fig. 3. Separação por Ludox. Dois gradientes de Ludox. 55 e 65%. Identificação de 5 camadas após centrifugação. Destaque para as camada 3) Esporos e 5) Cristais que foram coletadas para purificação.

Após o processo de purificação dos esporos e cristais das cepas selecionadas, foram determinadas as concentrações dos esporos pela contagem na Câmara de Neubauer. As cepas HD1 e 426 apresentaram concentrações de $2,7 \times 10^8$ esporos/mL e $1,52 \times 10^8$ esporos/mL, respectivamente.

Para determinar as concentrações das proteínas, a partir das leituras de proteínas totais pelo Método de Bradford, foi identificada por SDS-Page o perfil de proteínas dos cristais purificados (proteínas Cry), dos sobrenadantes 10 vezes concentrados (proteínas Vip3) e confirmação da purificação dos esporos (ausência de proteínas), além do *crude* de ambas as cepas. Este mesmo SDS-Page gel foi utilizado para quantificação das proteínas Cry e Vip3 utilizando o *software* Quantity One da Bio-Rad (versão 4.4).

A cepa 426 resultou em 404 ng/ μ L para proteínas Cry (Cristal) e ausência de proteínas Cry e Vip3 nos esporos e sobrenadante. A cepa HD1 resultou em 400 ng/ μ L para proteínas Cry (Cristal), 42 ng/ μ L para proteína Vip3 no sobrenadante 10 vezes concentrado e ausência de proteínas nos esporos (Figuras 4 e 5).



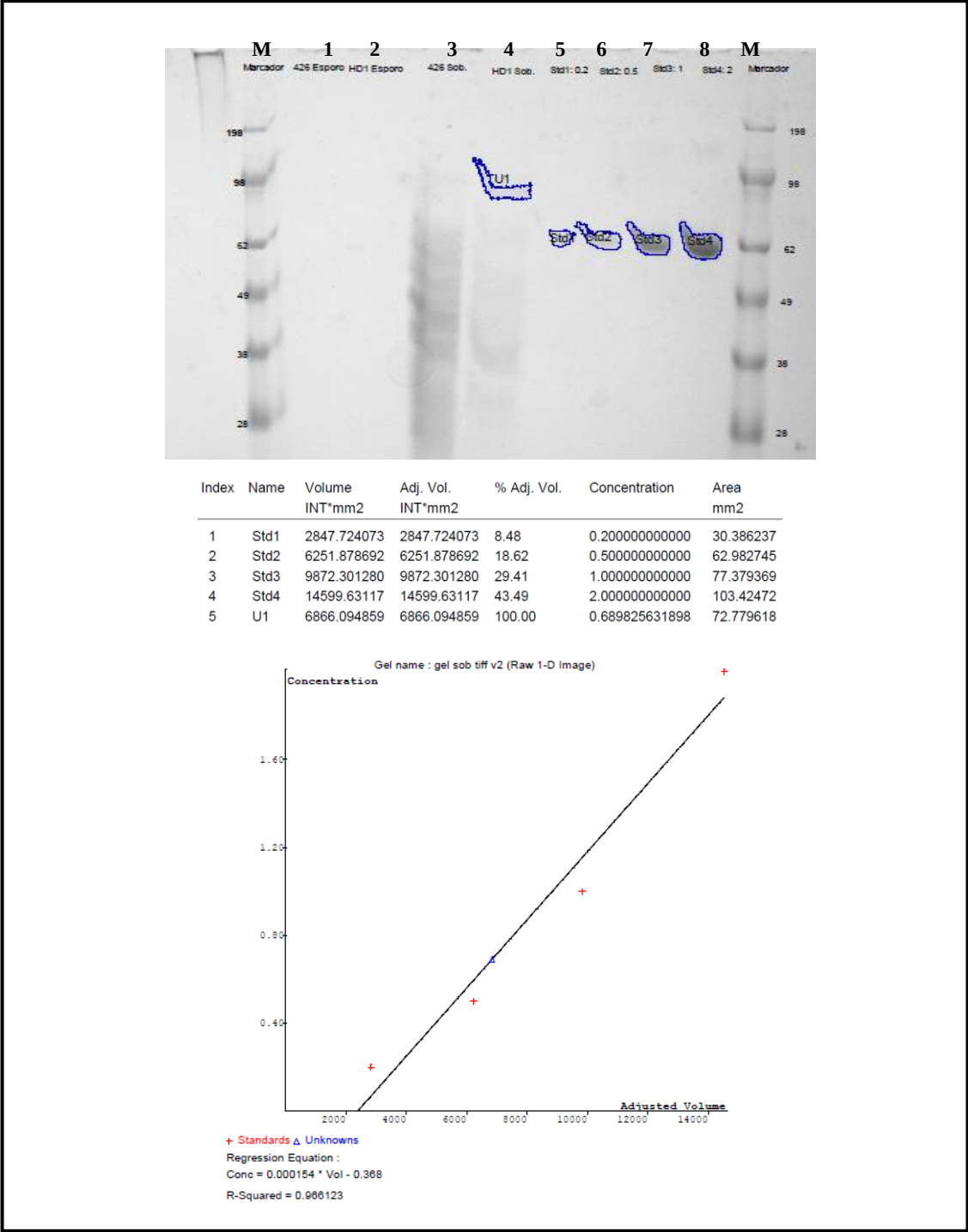


Fig. 5. Resultados gerados pelo *software* *Quantity One* da Bio-Rad (versão 4.4). Amostras do SDS-Page gel: M) Marcador kDa, SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Life technologies); 1) Esporos 426; 2) Esporos HD1; 3) Sobrenadante 426; 4) Sobrenadante HD1; 5 Std1 0,2 µg BSA; 6) Std2 0,5 µg BSA; 7) Std3 1 µg BSA; 8) Std4 2µg BSA e M) Marcador (kb). Presença de banda somente na mostra do sobrenadante HD1, correspondente ao peso molecular da proteína Vip3 (89 kDa). Tabela com os resultados das leituras e Curva Padrão.

3.3. Bioensaio por alimentação de micro-gotas e mortalidades

Para realização dos bioensaios por micro-gotas o volume de 0,08 μ L foi o que possibilitou a total ingestão da gota pelas larvas de *S. frugiperda* de 1 dia após eclosão. As concentrações de 8,08 ng/larva de proteínas Cry da cepa 426 e 8 ng/larva de proteínas Cry da cepa HD1 resultaram em 54,46% e 62,84% de mortalidade, respectivamente. Portanto, estas concentrações foram definidas para realização do bioensaio final. As concentrações dos esporos de ambas as cepas foram padronizadas para 10^4 esporos/larva de acordo com o volume de gota. Portanto, as mortalidades dos 18 tratamentos mais as duas testemunhas do bioensaio final estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Mortalidade Total das larvas de *S. frugiperda* por interações entre esporos, sobrenadantes e cristais das cepas HD1 e 426.

Tratamentos	Mortalidade Total (%)*
Testemunha PBSS	3,13 A
Testemunha LB + PBSS	5,36 A
Esporo 426	5,12 A
Sobrenadante 426	0,00 A
Esporo HD1	19,51 B
Sobrenadante HD1 (Vip3)	36,67 C
Esporo 426 + Cristal HD1	49,42 C
Sobrenadante HD1 + Cristal HD1	40,78 C
Sobrenadante HD1 + Cristal 426	50,31 C
Sobrenadante HD1 + Esporo HD1	38,33 C
Sobrenadante HD1 + Esporo 426	33,71 C
Cristal 426	54,47 D
Cristal HD1	62,85 D
Esporo 426 + Cristal 426	70,00 D
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1	72,18 D
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal 426	49,82 D
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal HD1	61,18 D
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal 426	62,37 D
Esporo HD1 + Cristal HD1	94,64 E
Esporo HD1 + Cristal 426	90,10 E

* Médias seguidas por letras distintas maiúsculas na coluna diferem pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

O tratamento somente com esporos purificados da cepa 426, que não expressa Vip3, resultou em mortalidade total semelhante à testemunha (5,12 %), ou seja, não houve

mortalidade relacionada a este tratamento. No entanto, o tratamento somente com esporos purificados da cepa HD1, que expressa Vip3, resultou em uma mortalidade total de 19,51 %. A mortalidade total do tratamento com cristais purificados (proteínas Cry) da cepa 426 foi de 54,47 % e da cepa HD1 62,85 %. Entretanto, ao adicionar os esporos nos tratamentos com cristais purificados os resultados foram diferentes. Apesar do incremento na mortalidade total do tratamento com os esporos e cristais da cepa 426 (Esporo 426 + Cristal 426; mortalidade de 70 %), ao adicionar o espora da cepa 426 ao cristal da cepa HD1 (Esporo 426 + Cristal HD1), os resultados sugerem uma ação antagonista reduzindo a mortalidade para 49,42 %.

No entanto, os tratamentos com esporos da cepa HD1 e as proteínas Cry de ambas as cepas (Esporo HD1 + Cristal HD1; mortalidade de 94,64 % / Esporo HD1 + Cristal 426; mortalidade de 90,1 %) apresentaram maiores valores de mortalidade total que todos os outros tratamentos (Figura 6).

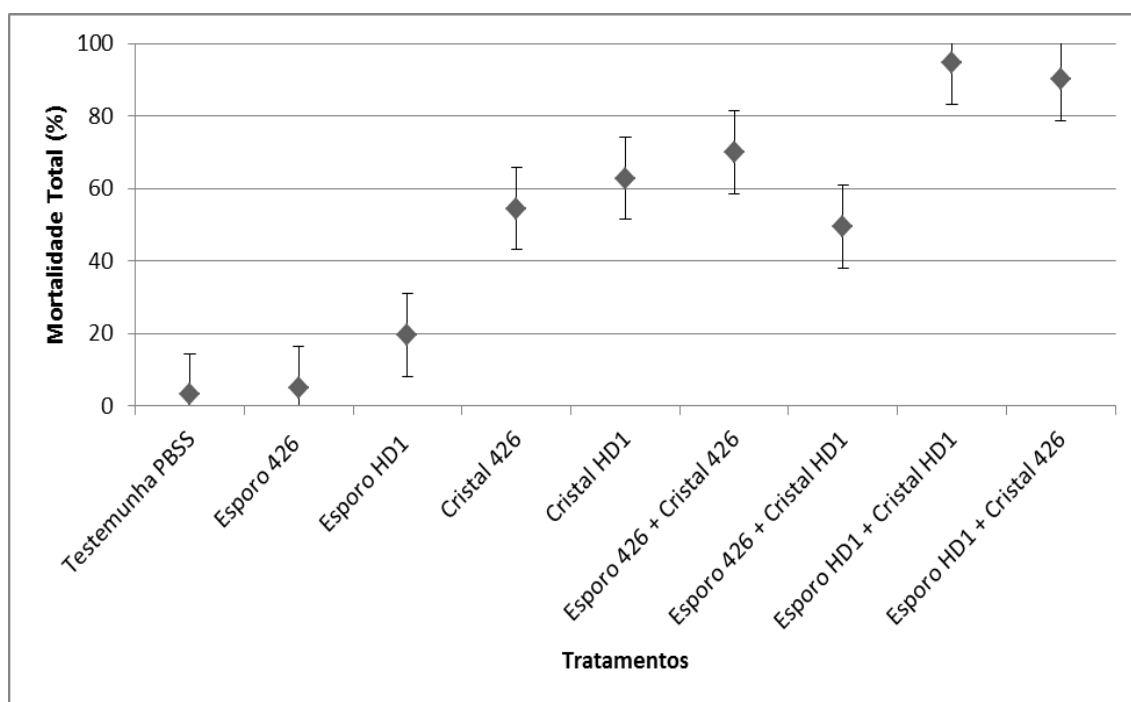


Fig. 6. Mortalidade total das larvas de *S. frugiperda* por interações com esporos das cepas 426 (não expressa proteína Vip3) e HD1 (expressa a proteína Vip3), cristais 426 e HD1, suas combinações e respectiva testemunha.

A mortalidade total dos tratamentos somente com os sobrenadantes 10 vezes concentrados apresentaram mortalidade de 0 % para o sobrenadante da cepa 426, que não expressa Vip3, e 36,67 % para cepa HD1, que expressa Vip3. Entretanto, ao adicionar o

sobrenadante da cepa HD1 às outras variáveis, esporos e cristais das duas cepas, os resultados da mortalidade total dos tratamentos foram variáveis.

Tratamentos com proteínas Cry (Cristal) e sobrenadantes da cepa HD1 não resultaram em incremento na mortalidade total, sendo que em alguns tratamentos a mortalidade foi reduzida (Sobrenadante HD1 + Cristal HD1; mortalidade de 40,78 % / Sobrenadante HD1 + Cristal 426; mortalidade de 50,31 %) assim como os tratamentos com esporos e sobrenadantes (Esporo HD1 + Sobrenadante HD1; mortalidade de 38,33 % / Esporo 426 + Sobrenadante HD1; mortalidade de 33,71 %) (Tabela 1 e Figura 7).

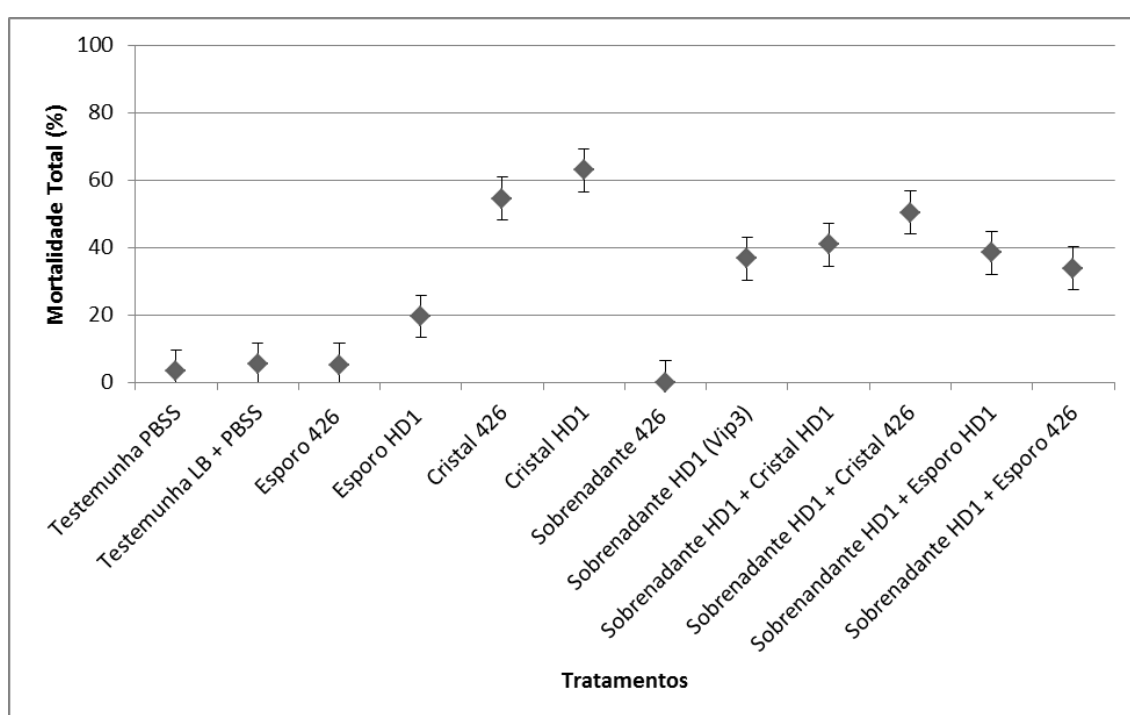


Fig. 7. Mortalidade total das larvas de *S. frugiperda* por tratamentos com esporos das cepas 426 (não expressa a proteína Vip3) e HD1 (expressa a proteína Vip3), sobrenadantes 426 e HD1, suas combinações com o sobrenadante HD1 (Vip3) e respectivas testemunhas.

Semelhante aos tratamentos com cristais e sobrenadante, e esporos e sobrenadante, a mortalidade total dos tratamentos com as três variáveis (esporos, cristais e sobrenadante) das duas cepas não resultaram no incremento da mortalidade (Sobrenadante HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1; mortalidade de 72,18 % / Sobrenadante HD1 + Esporo HD1 + Cristal 426; mortalidade de 61,18 % / Sobrenadante HD1 + Esporo 426 + Cristal HD1; mortalidade de 49,82 % / Sobrenadante HD1 + Esporo 426 + Cristal 426 + Sobrenadante HD1; mortalidade de 62,37 %) (Tabela 1).

A avaliação da mortalidade a cada 24 horas, durante 168 horas (7 dias) e uma última avaliação às 336 horas após inoculação (14 dias), demonstrou diferenças de mortalidade por dia entre os tratamentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade por avaliação das larvas de *S. frugiperda* com interações entre esporos, sobrenadantes e cristais das cepas HD1 (cepa que expressa a proteína Vip3) e 426 (cepa que não expressa a proteína Vip3).

Tratamentos	Mortalidade por Avaliação (%)*							
	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H	336H
Testemunha PBSS	0.00	0.00	3.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Testemunha LB + PBSS	3.33	0.00	0.00	0.00	1.67	0.00	0.00	0.00
Esporo 426	0.00	0.00	0.00	0.00	1.67	0.00	3.45	0.00
Esporo HD1	1.72	1.72	3.45	1.72	1.72	3.45	5.17	0.00
Cristal 426	3.13	31.25	10.94	3.13	3.13	0.00	1.56	0.00
Cristal HD1	15.52	18.97	18.39	6.90	0.00	5.17	0.00	0.00
Sobrenadante 426	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sobrenadante HD1 (Vip3)	15.00	3.33	3.33	3.33	3.33	6.67	0.00	0.00
Esporo 426 + Cristal 426	1.85	38.89	12.96	5.56	7.41	0.00	3.70	0.00
Esporo 426 + Cristal HD1	0.00	9.26	11.11	0.00	1.85	1.85	5.56	20.37
Esporo HD1 + Cristal HD1	7.41	27.78	12.96	11.11	3.70	11.11	5.56	12.96
Esporo HD1 + Cristal 426	8.06	46.77	20.97	1.61	1.61	3.23	1.61	6.45
Sobrenadante HD1 + Cristal HD1	12.90	0.00	1.61	1.61	4.84	4.84	4.84	9.68
Sobrenadante HD1 + Cristal 426	11.29	4.84	3.23	8.06	4.84	6.45	1.61	9.68
Sobrenadante HD1 + Esporo HD1	0.00	3.45	3.45	5.17	1.72	5.17	8.62	12.07
Sobrenadante HD1 + Esporo 426	0.00	1.67	3.33	3.33	9.52	27.27	28.57	11.67
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1	20.69	6.90	6.90	4.60	6.90	0.00	1.72	27.59
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal 426	0.00	0.00	10.34	1.72	10.34	5.17	1.72	20.69
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal HD1	7.69	1.92	5.77	3.85	1.92	3.85	1.92	32.69
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal 426	1.85	1.85	11.11	3.70	11.11	0.00	1.85	25.93

*Médias das 4 repetições. Valores em destaque representam maiores valores de mortalidade por avaliação de cada tratamento.

Os tratamentos somente com esporos de ambas as cepas apresentaram maiores valores de mortalidade por avaliação semelhante, 68 h, mesmo com mortalidades totais diferentes. Tratamentos com somente proteínas Cry (Cristal) também apresentaram maiores valores de mortalidade por avaliação semelhante, 48 h, para as duas cepas. Ao adicionar os cristais aos esporos os valores permaneceram maiores na avaliação de 48 h, exceto o tratamento Esporo 426 + Cristal HD1, 336 h, tratamento que aparentemente teve efeito antagonista.

Ao adicionar os cristais ao sobrenadante da cepa HD1 (Vip3) os maiores valores de mortalidade foram diferentes, reduzindo o maior valor de mortalidade dos tratamentos somente com cristais para as primeiras 24 h, destacando que o sobrenadante HD1 isolado e o sobrenadante HD1 juntamente aos cristais de ambas as cepas, resultaram em maiores valores de mortalidade na mesma avaliação, 24 h.

No entanto, ao adicionar os esporos ao sobrenadante, os resultados sugerem que as mortalidades por avaliação foram semelhantes aos tratamentos com esporos isolados (168 h e 336 h). Da mesma forma, os tratamentos com as três variáveis (sobrenadante + esporo + cristal) também resultaram em maior mortalidade por avaliação às 336 h após inoculação.

Com as avaliações finalizadas, ao somar as médias das mortalidades por avaliação, foi gerada a Tabela 3 de todos os tratamentos e dois gráficos com as curvas de mortalidade acumulada (Figura 8 e Figura 9) dos tratamentos com esporos isolados, cristais isolados e esporos mais cristais de ambas as cepas. Estes tratamentos foram selecionados, pois resultaram em altos valores de mortalidade sendo estatisticamente diferente dos demais tratamentos (Tabela 1).

Tabela 3 – Mortalidade Acumulada das larvas de *S. frugiperda* por interações entre esporos, sobrenadantes e cristais das cepas HD1 (expressa Vip3) e 426 (não expressa Vip3).

Tratamentos	Mortalidade Acumulada ao longo do tempo (%)*							
	24H	48H	72H	96H	120H	144H	168H	336H
Testemunha PBSS	0.00	0.00	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
Testemunha LB + PBSS	3.33	3.33	3.33	3.33	5.36	5.36	5.36	5.36
Esporo 426	0.00	0.00	0.00	0.00	1.67	1.67	5.12	5.12
Esporo HD1	1.72	3.45	6.90	8.62	10.34	13.79	19.51	19.51
Cristal 426	3.13	34.38	45.31	48.44	51.56	51.56	54.47	54.47
Cristal HD1	15.52	34.48	52.87	59.77	59.77	64.94	64.94	64.94
Sobrenadante 426	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Sobrenadante HD1 (Vip3)	15.00	18.33	21.67	25.00	28.33	36.67	36.67	36.67
Esporo 426 + Cristal 426	1.85	40.74	53.70	59.26	66.67	66.67	70.00	70.00
Esporo 426 + Cristal HD1	0.00	9.26	20.37	20.37	22.22	24.07	29.63	49.42
Esporo HD1 + Cristal HD1	7.41	35.19	48.15	59.26	62.96	74.07	79.63	94.64
Esporo HD1 + Cristal 426	8.06	54.84	75.81	77.42	79.03	82.26	83.87	90.10
Sobrenadante HD1 + Cristal HD1	12.90	12.90	14.52	16.13	20.97	25.81	30.65	40.78
Sobrenadante HD1 + Cristal 426	11.29	16.13	19.35	27.42	32.26	38.71	40.32	50.31
Sobrenadante HD1 + Esporo HD1	0.00	3.45	6.90	12.07	13.79	18.97	27.59	38.33
Sobrenadante HD1 + Esporo 426	0.00	1.67	5.00	8.33	13.33	18.33	21.67	33.71
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1	20.69	27.59	34.48	39.08	45.98	45.98	47.70	72.18
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal 426	0.00	0.00	10.34	12.07	22.41	27.59	29.31	49.82
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal HD1	7.69	9.62	15.38	19.23	21.15	25.00	26.92	61.18
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal 426	1.85	3.70	14.81	18.52	29.63	29.63	31.48	62.37

*Médias das 4 repetições.

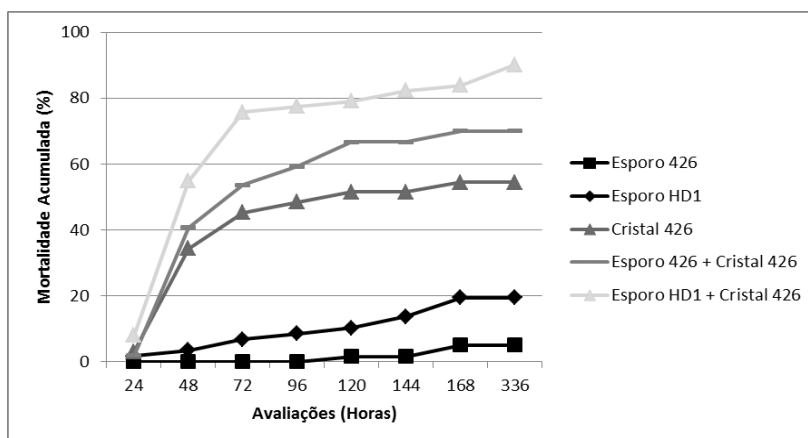


Fig. 8. Mortalidade acumulada ao longo do tempo das larvas de *S. frugiperda*. Tratamentos com esporos 426 e HD1 e combinações com os cristais da cepa 426.

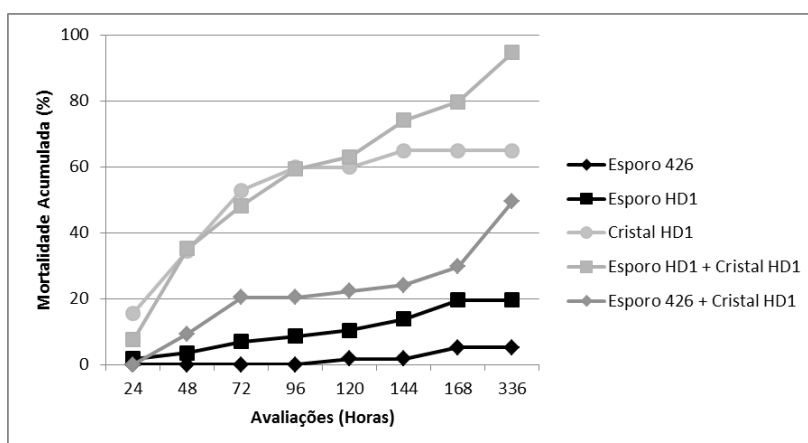


Fig. 9. Mortalidade acumulada ao longo do tempo das larvas de *S. frugiperda*. Tratamentos com esporos 426 e HD1 e combinações com os cristais da cepa HD1.

As curvas de mortalidade acumulada sugerem o contínuo aumento da mortalidade dos tratamentos com esporos mais cristais. Destacando que, os tratamentos somente com esporos resultaram em maior mortalidade, e estabilização desta mortalidade, às 168 h após inoculação e os tratamentos com esporos HD1 mais cristais de ambas as cepas resultaram nos maiores valores de mortalidade ao final das avaliações.

3.4. Identificação de septicemia

As larvas mortas coletadas nos maiores valores de mortalidade por avaliação foram maceradas em água destilada e feita a contagem direta de células de *Bacillus* spp. e outras bactérias, como *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (bactérias que ocorrem naturalmente

no intestino médio das lagartas), determinação das UFC's, e a contagem na Câmara de Neubaur sem diferenciar as bactérias. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Contagem das bactérias presentes nas larvas de *S. frugiperda* mortas por interações entre esporos, sobrenadantes e cristais das cepas HD1 (cepa que expressa a proteína Vip3) e 426 (cepa que não expressa a proteína Vip3).

Tratamentos	Contagem Direta*		UFC / mL		Câmara de Neubauer x 10 ⁴ cel / mL
	<i>Bacillus</i>	Outras Bactérias	<i>Bacillus</i>	Outras Bactérias	
Testemunha PBSS	0	2	0	0	12
Testemunha LB + PBSS	0	2	0	0	0
Esporo 426	6	12	30	10	525
Esporo HD1	14	6	60	20	2080
Cristal 426	0	3	0	30	175
Cristal HD1	0	4	0	60	225
Sobrenadante 426**	0	0	0	0	0
Sobrenadante HD1 (Vip3)	0	1	0	10	7,5
Esporo 426 + Cristal 426	16	42	10	10	1330
Esporo 426 + Cristal HD1	10	30	50	20	650
Esporo HD1 + Cristal HD1	60	50	80	30	1500
Esporo HD1 + Cristal 426	64	52	10	40	1330
Sobrenadante HD1 + Cristal HD1	0	2	0	40	103
Sobrenadante HD1 + Cristal 426	0	1	0	40	100
Sobrenadante HD1 + Esporo HD1	508	16	210	20	4780
Sobrenadante HD1 + Esporo 426	296	16	50	10	3580
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1	348	14	110	10	4680
Sobr. HD1 + Esporo HD1 + Cristal 426	6	2	10	10	530
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal HD1	4	2	10	40	80
Sobr. HD1 + Esporo 426 + Cristal 426	24	48	10	50	930

*Média de 5 contagens **Não houve mortalidade

Ao somar os valores dos *Bacillus* spp. e outras bactérias da contagem direta e UFC, e relacionar a contagem da Câmara de Neubauer, os valores obtidos apresentaram uma correlação dos resultados (Figura 10).

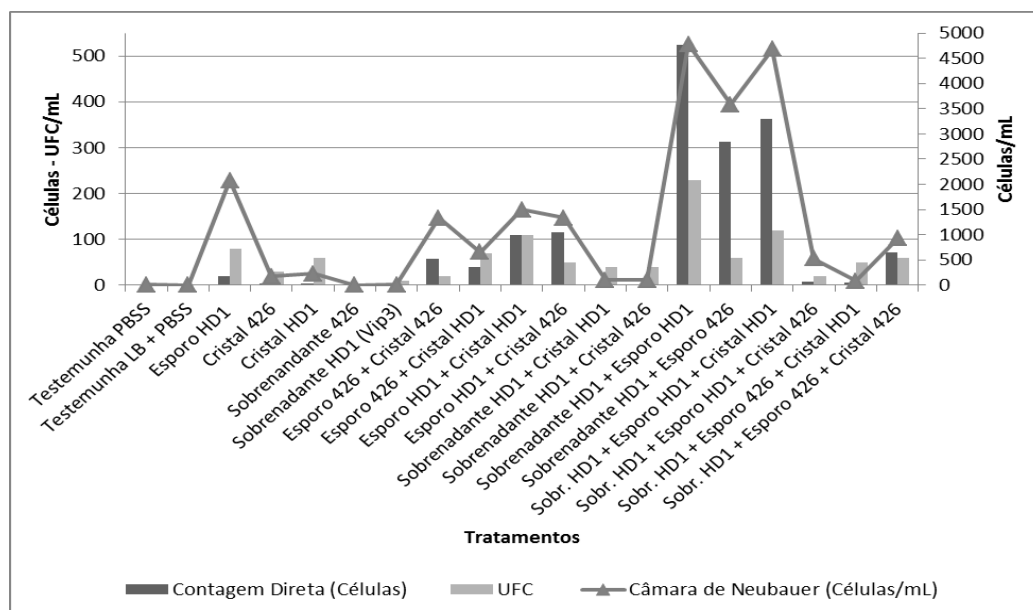


Fig. 10. Resultados da soma das bactérias identificadas na contagem direta e UFC presentes nas larvas mortas de *S. frugiperda* realacionada ao valores obtidos na contagem utilizando a Câmara de Neubauer ($r = 0,95$).

Embora os tratamentos com esporos mais cristais de ambas as cepas apresentaram valores elevados, com exceção do tratamento Esporo 426 + Cristal HD1, os tratamentos Sobrenadante HD1 + Esporo HD1, Sobrenadante HD1 + Esporo 426 e Sobrenadante HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1 resultaram nos maiores valores das contagens. Destacando o tratamento Sobrenadante HD1 + Esporo HD1 + Cristal HD1 que foi diferente dos outros tratamentos com as três variáveis (sobrenadante + esporo + cristal), sendo que estes tratamentos se comportaram de forma semelhante aos tratamentos com esporos da cepa 426 e cristais de ambas as cepas. Adicionalmente, estes mesmos tratamentos resultaram em maiores valores de mortalidade por dia nas mesmas avaliações (168h e 336 h) (Tabela 2).

4. Discussão

Neste estudo foi avaliada a importância dos esporos na mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, identificando o tipo de mecanismo de ação do Bt, além dos possíveis efeitos sinérgicos ou antagônicos entre esporos, proteínas Cry e Vip3 expressas no sobrenadante. Para tanto, a adaptação da metodologia de separação dos esporos e cristais por Ludox (Zhu et al., 1989) foi extremamente relevante para este e futuros trabalhos. Adicionalmente, adaptar a metodologia por alimentação por micro-gotas (Hughes et al., 1986; van Frankenhuyzen et al., 1997) para realização do bioensaio final foi fundamental para determinar a concentração exata

de proteínas e esporos consumida pelas larvas. Desta forma, trabalhos futuros utilizando esta metodologia poderão determinar concentrações exatas de CL₅₀, além do controle total das concentrações reais consumidas pelos insetos-alvo.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que esporos de cepas de Bt que expressam proteínas Vip3 (HD1) quando fornecidas juntamente com proteínas Cry (cristais) das duas cepas testadas (HD1 e 426) aumentam a mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, indicando efeito sinérgico. Apesar de não encontrar relatos de testes com *S. frugiperda*, Misyasono al. (1994), Dubois e Dean (1995), Johnson e McGaughey (1996) e Cornforth et al. (2015) reportaram que a adição de esporos também teve efeito sinérgico com delta-endotoxinas contra diversas larvas de insetos da ordem Lepidoptera, mesmo quando utilizados esporos de diferentes espécies do gênero *Bacillus*. No entanto, este trabalho pode ser o primeiro relato que testou esporos de cepas de Bt que expressam e não expressam Vip3 na mortalidade de larvas de *S. frugiperda* e possivelmente outros insetos da ordem Lepidoptera. Este aumento de mortalidade pode ter sido resultado da expressão da proteína Vip3 no processo de germinação do esporo e crescimento vegetativo das células (Warren, 1997; Palma et al., 2014; Chackroun et al., 2016) da cepa HD1 durante o processo de septicemia.

Além disso, este efeito pode estar diretamente relacionado ao tipo de mecanismo de ação do Bt contra insetos lepidópteros. Devido à sensibilidade das larvas de *S. frugiperda* aos esporos além do tempo de mortalidade das mesmas, os resultados obtidos sugerem que larvas de *S. frugiperda* possuem o mecanismo de ação do Bt do Tipo III (Septicemia - os insetos morrem por septicemia, após a germinação dos esporos no intestino médio e consequentemente o crescimento vegetativo das células resultando em infecção generalizada) (Heimpel and; Angus, 1959; Graf, 2011). No entanto, os dados deste trabalho destacam a importância das proteínas expressadas pelas cepas de Bt para determinação deste mecanismo. Uma vez que não foram testados esporos de cepas que expressam e não expressam proteínas Vip3 anteriormente, é extremamente importante identificar os possíveis modos de ação a nível molecular das diferentes proteínas Cry e Vip3 (Bravo et al., 2007; Pardo-Lopez et al., 2013; van der Hoeven, 2014; Chackroun et al., 2016) em insetos da ordem Lepidoptera, bem como seus efeitos sinérgicos.

Em contrapartida, os tratamentos com proteínas Vip3 expressas no sobrenadante pela cepa HD1 em conjunto dos cristais e esporos de ambas as cepas não aumentaram a mortalidade total. Possivelmente, por não ter sido utilizadas proteínas Vip3 recombinantes purificadas, não houve o incremento da mortalidade descrita em outros trabalhos com Vip3 e proteínas Cry como relatado por Chackroun et al. (2016) e Baraneck et al. (2017).

No entanto, quando foi adicionado o sobrenadante HD1 (Vip3) aos tratamentos somente com cristais de ambas as cepas, os maiores valores de mortalidade por avaliação reduziram de 48 para 24 horas. Este resultado sugere uma provável interação das proteínas Cry e Vip3 testadas. Para isso, recomenda-se em trabalhos futuros testar diferentes concentrações de Vip3 recombinante juntamente às proteínas Cry purificadas.

Os tratamentos com esporos de ambas as cepas juntamente ao sobrenadante HD1 (Vip3) apresentaram os maiores valores na Contagem Direta, UFC e Câmara de Neubauer, indicando septicemia nas larvas mortas. Apesar do não aumento da mortalidade quando comparado ao tratamento com somente o sobrenadante HD1, é possível inferir que a proteína Vip3 pode ter possibilitado a formação de poros no intestino médio das larvas, possibilitando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemolinfa e favorecimento da ocorrência de septicemia, como proposto no modo de ação das proteínas Vip3 (Chakroun et al., 2016).

Portanto, trabalhos futuros com proteínas Vip3 recombinantes e determinação da CL_{50} , utilizando bioensaios pelo método de alimentação por micro-gotas, são necessários para uma melhor compreensão das possíveis interações das proteínas Cry, Vip3 e esporos. Desta forma, será possível determinar a real influência destas variáveis em conjunto na mortalidade de insetos da ordem Lepidoptera.

5. Conclusões

Os resultados deste trabalho sugerem que larvas de *S. frugiperda* possuem o Tipo III (Septicemia) do mecanismo de ação do Bt contra insetos lepidópteros. No entanto, somente esporos de cepas que expressam Vip3 são importantes na mortalidade de larvas de *S. frugiperda*, ocorrendo efeito sinérgico com proteínas Cry.

6. Referências Bibliográficas

- Baranek, J., Konecka, E., Kaznowski, A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. *BioControl*, 62, 649–658. DOI 10.1007/s10526-017-9828-6
- Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49, 423–435.

- Céron, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., Bravo, A. 1994. PCR analysis of the cryI insectidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 353-356.
- Chakroun, M., Banyuls, N., Bel, Y., Escriche, B., Ferré, J. 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 329-350.
- Cornforth, D., Matthews, A., Brown, S., Raymond, B. 2015. Bacterial Cooperation Causes Systematic Errors in Pathogen Risk Assessment due to the Failure of the Independent Action Hypothesis. *Plos Pathogens*, 4, 1-13. <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.72f4s>.
- Dubois, N.R., Dean, D.H. 1995. Synergism between CryIA insecticidal Crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environmental Entomology*, 24, 1741-1747.
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.
- Glare, T. R., O'callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley.
- Graf, J. 2011. Shifting paradigm on *Bacillus thuringiensis* toxin and a natural model for *Enterococcus faecalis* septicemia. *mBio*, 2, 1-2.
- Hardee, D.D., Van Duyn, J.W., Layton, M.B., Bagwell, R.D. 2001. Bt cotton & management of the tobacco budworm-bollworm complex. *Agricultural Research Service*, 154, 40.
- Heimpel, A.M., Angus, T.A. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. *Journal of Insect Pathology*, 1, 152-170.
- Hernandez-Rodriguez, C.S., Boets, A., Van Rie, J., Ferre, J. 2009. Screening and identification of vip genes in *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 107,219-225. [doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04199.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04199.x).

Hughes, P.R., Van Beek, N.A.M., Wood, H.A. 1986. A modified droplet feeding method for rapid assay of *Bacillus thuringiensis* and baculoviruses in noctuid larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48, 187-192.

Johnson, D.E., Mcgaughey, W.H. 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Current Microbiology*, 33, 54-59.

Miyasono, M., Inagaki, S., Yamamoto, M., Ohba, K., Ishiguro, T., Takeda, R., Hayashy, Y. 1994. Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 63, 111-112.

Monnerat, R. et al. 2015. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. *PlosOne*, 10, 1–13.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6, 3296-3325.

Pardo-López L, Soberón M, Bravo A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 3–22.

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

Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnol J.*, 9, 283–300. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>.

Sanchis V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. *Agron Sustain*, 31, 217–231. <http://dx.doi.org/10.1051/agro/2010027>.

Schnepf, E., et al. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology*, 62, 775-806.

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

Valicente, F.H., de Toledo Picoli, E.A., de Vasconcelos, M.J.V., Carneiro, N.P., Carneiro, A.A., Guimarães, C.T., Lana, U.G., 2010. Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis* cry1 genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Biol. Control* 53, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.02.003>

Valicente, F.H. 2015. Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Circular Técnica 208 (Embrapa/Cnpms), 1-14.

Van Frankenhuyzen, K. 1995. Development and Current Status of *Bacillus thuringiensis* for Control of Defoliating Forest Insects. In: Armstrong, J.A., Ives, W.G.H. (Eds). (Natural Resources Canada). *Forest Insect Pests in Canada*. Ottawa: Science and Sustainable Development Directorate, Chap. 34, 315-325.

Van Frankenhuyzen, K, Gringorten, L., Dedes, J., Gauthier, D. 1997. Susceptibility of different instars of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* estimated with a droplet-feeding method. *Forest Entomology*, 90, 560-565.

Van der Hoeven, N. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxins: Their mode of action and potential interaction between them. *EcoTat*. Report 14/001.

Vilas-Boas, G., Sanchis, V., Lereclus, D., Lemos, M.V.F., Bourguet, D. 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1414–1424.

Warren, G.W. 1997. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In Carozzi NB, KozielM (Ed), *Advances in insect control, the role of transgenic plants*. Taylor & Francis Ltd, London, United Kingdom, 109-121.

Xueyong, Z. et al. 2008. Activity-loss characteristics of spores of *Bacillus thuringiensis* during spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 86, 37–42.

Zhu, Y.S., Brookes, A., Carlson, K., Filner, P. 1989. Separation pf protein crystals from spores of *Bacillus thuringiensis* by Ludox gradient centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology*, 5, 1279-1281.