



**No Brasil, a maioria das variedades de algodão transgênicas** resistentes a insetos expressa toxinas Cry oriundas do *Bacillus thuringiensis* (Bt), que controlam espécies de lepidópteros. Essas toxinas são ferramentas excelentes, pois são muito específicas para a praga-alvo e, geralmente, não apresentam impacto sobre os organismos não alvo. Porém, ao longo dos anos, várias pragas adquiriram níveis de resistência às proteínas de Bt contidas nas variedades GM, o que reforça a importância de o produtor usar refúgios quando cultiva essas variedades. Esse boletim apresenta amplo conjunto de informações sobre as proteínas Bt das construções das plantas transgênicas, métodos de transformação genética usados em algodoeiro, eficiência dessas tecnologias em diversas pragas, assim como recomendações para o manejo das variedades Bt. São relatados também os principais trabalhos sobre algodoeiro resistente a pragas, financiados e desenvolvidos em Mato Grosso por diversas instituições de pesquisa como Embrapa e IMAmt.

Apoio financeiro:



INSTITUTO MATO-GROSSENSE DO ALGODÃO

Rua Eng Edgard Prado Arze, 1777  
Ed. Cloves Vettorato 2 andar Quadra 03  
Centro Político Administrativo, Cuiabá - MT  
CEP 78049-015  
Fone: (65) 3624-1840  
ima@imamt.com.br



Boletim de P&D

O algodão geneticamente modificado para resistência a pragas

N.4 | Março de 2019

Boletim de P&D

Número 4 | Março de 2019



## O algodão geneticamente modificado para resistência a pragas:

Eficiência e medidas para o manejo da resistência



INSTITUTO MATO-GROSSENSE DO ALGODÃO

**O algodão geneticamente  
modificado para  
resistência a pragas:**

Eficiência e medidas para  
o manejo da resistência



INSTITUTO MATO-GROSSENSE DO ALGODÃO

Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmT)  
Rua Eng Edgard Prado Arze, 1777  
Ed. Cloves Vettorato 2 andar Quadra 03  
Centro Político Administrativo, Cuiabá - MT  
CEP 78049-015  
Fone: (65) 3624-1840

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Instituto Mato-grossense do Algodão - IMAmT

**O algodão geneticamente modificado para  
resistência a pragas: Eficiência e medidas para  
o manejo da resistência** / editores técnicos: Jean Louis Belot e  
Patrícia M. C. A. Vilela - Cuiabá (MT), 2019.

288 p: il.; 14,8 x 21 cm

ISBN: 978-85-66457-15-5

1. Tecnologia (Ciências Aplicadas). 2. Agricultura.  
I. Título.

CDD: 600, 630

CDU: 001, 63

**Jean Louis Bélot**  
**Patrícia M. C. A. Vilela**  
editores técnicos

# **O algodão geneticamente modificado para resistência a pragas:** Eficiência e medidas para o manejo da resistência

**BOLETIM DE P&D**  
Número 4 | Março de 2019



# **DIRETORIA DO IMAmt**

Gestão 2017-2019

## **Presidente**

Alexandre Pedro Schenkel

## **Vice-presidente**

Eraí Maggi Scheffer

## **1º Secretário**

Paulo Sérgio Aguiar

## **2º Secretário**

Guilherme Mognon Scheffer

## **1º Tesoureiro**

Sérgio Azevedo Introvini

## **2º Tesoureiro**

Cleto Webler

## **Conselho Fiscal - Titulares**

Alessandro de Souza Polato

Arlton Cesar Riedi

Evandro Dal Bem

## **Conselheiro Fiscal - Suplentes**

Valdir Roque Jacobowski

Rudolf Thomas Maria Aernoudts

André Guilherme Sucolotti

## **Diretor executivo**

Álvaro Lorenço Ortolan Salles

## AUTORES

### Rose Monnerat

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF

E-mail: [rose.monnerat@embrapa.br](mailto:rose.monnerat@embrapa.br)

Co-autores **Erica Martins Queiroz**, IMAMt- Brasília/ DF; **Lilian Praça**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF; **Paulo Martins Queiroz**, IMAMt- Brasília/ DF  
**Carlos Marcelo Soares**, Brasília/ DF

### Jacob Crossariol Netto

Pesquisador do Instituto Mato-grossense do Algodão- Primavera do Leste/ MT

E-mail: [jacobnetto@imamt.org.br](mailto:jacobnetto@imamt.org.br)

Co-autor **Guilherme Gomes Rolim**, IMAMt- Campo Verde/ MT

### Leonardo Bitencourt Scoz

Pesquisador do Instituto Mato-grossense do Algodão- Rondonópolis/ MT

E-mail: [leonardoscoz@imamt.org.br](mailto:leonardoscoz@imamt.org.br)

Co-autores **Francisco Anghinoni**, Rondonópolis/ MT; **Francisco José Lima Aragão**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF; **Natália Lima de Sousa**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF; **Estela Reis de Andrade**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF; **Roseane Cavalcanti dos Santos**, Embrapa Algodão- Campina Grande/ PB; **Carliane Rebeca Coelho da Silva**, Embrapa Algodão- Campina Grande/ PB; **Liziane Maria de Lima**, Embrapa Algodão- Campina Grande/ PB

### Juan Luis Jurat-Fuentes

Professor- Pesquisador da Universidade do Tennessee- Knoxville/ TN, EUA

E-mail: [jurat@utk.edu](mailto:jurat@utk.edu)

### Rose Monnerat

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF

E-mail: [rose.monnerat@embrapa.br](mailto:rose.monnerat@embrapa.br)

Co-autor **Bruce Tabasknik**, Universidade de Arizona- Tucson/ AZ, EUA

### Alejandra Bravo

Pesquisadora da Universidade Nacional Autónoma de México, México

E-mail: [bravo@ibt.unam.mx](mailto:bravo@ibt.unam.mx)

Co-autor **Mário Soberón**, Universidade Nacional Autónoma de México, México

### Rose Monnerat

Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF

E-mail: [rose.monnerat@embrapa.br](mailto:rose.monnerat@embrapa.br)

Co-autores **Erica Martins Queiroz**, IMAMt- Brasília/ DF; **Lilian Praça**, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia- Brasília/ DF

### Jean Louis Bélot

Pesquisador do Instituto Mato-grossense do Algodão- Primavera do Leste/ MT

E-mail: [jeanbelot@imamt.org.br](mailto:jeanbelot@imamt.org.br)

Co-autores **Jacob Crosariol Netto**, **Guilherme Gomes Rolim**, **Leonardo Bitencourt Scoz**, **Patricia M.C. A. Vilela** e **Edson Andrade Jr.**, IMAMt



# SUMÁRIO

## INTRODUÇÃO

**Algodoeiro geneticamente transformado para resistência a pragas nos cerrados brasileiros..... 9**

## CAPÍTULO 1

***Bacillus thuringiensis* no controle de pragas do algodão..... 13**

ROSE MONNERAT (Embrapa)

ERICA MARTINS QUEIROZ (IMAmt)

LILIAN PRAÇA (Embrapa)

PAULO MARTINS QUEIROZ (IMAmt)

CARLOS MARCELO SOARES

## CAPÍTULO 2

**Principais pragas do algodoeiro no sistema de cultivo do cerrado..... 73**

JACOB CROSARIOL NETTO (IMAmt)

GUILHERME GOMES ROLIM (IMAmt)

## CAPÍTULO 3

**Transformação genética do algodoeiro para controle de pragas..... 107**

LEONARDO BITENCOURT SCOZ (IMAmt)

FRANCISCO ANGHINONI

FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO (Embrapa)

NATÁLIA LIMA DE SOUSA (Embrapa)

ESTELA REIS DE ANDRADE (Embrapa)

ROSEANE CAVALCANTI DOS SANTOS (Embrapa)

CARLIANE REBECA COELHO DA SILVA (Embrapa)

LIZIANE MARIA DE LIMA (Embrapa)



## **CAPÍTULO 4**

### **Eficiência atual das culturas Bt a campo e casos de resistência.....146**

JUAN LUIS JURAT-FUENTES (University of Tennessee, Knoxville, EUA)

## **CAPÍTULO 5**

### **Manejo da resistência no campo com plantas Bt.....197**

ROSE MONNERAT (Embrapa)

BRUCE TABASHNIK (Universidade de Arizona, Tucson, EUA)

## **CAPÍTULO 6**

### **Toxinas de Cry nativas e modificadas de *Bacillus thuringiensis* como ferramentas biotecnológicas para o manejo de insetos pragas suscetíveis e resistentes....208**

ALEJANDRA BRAVO (Unam, México)

MARIO SOBERÓN (Unam, México)

## **CAPÍTULO 7**

### **Uso de bioinseticidas Bt em cultivos Bt.....245**

ROSE MONNERAT (Embrapa)

ERICA MARTINS QUEIROZ (IMAmt)

LILIAN PRAÇA (Embrapa)

## **CAPÍTULO 8**

### **O IMAmt e o algodão transgênico no estado de Mato Grosso.....255**

JEAN-LOUIS BÉLOT (IMAmt)

JACOB CROSARIOL NETTO (IMAmt)

GUILHERME GOMES ROLIM (IMAmt)

LEONARDO BITENCOURT SCOZ (IMAmt)

PATRICIA M.C.A. VILELA (IMAmt)

EDSON ANDRADE JR. (IMAmt)

## INTRODUÇÃO

# Algodoeiro geneticamente transformado para resistência a pragas nos cerrados brasileiros

**Jean Louis Bélot**

IMAmt - Primavera do Leste/MT

Por conta do ambiente tropical úmido e do sistema de cultura vigente, o cultivo algodoeiro nos cerrados do Brasil Central é caracterizado pela importância dos problemas fitossanitários, em particular de insetos-pragas, que geram custos importantes aos produtores.

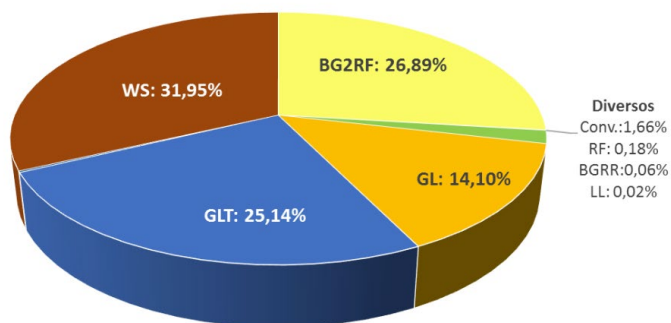
O perfil das pragas encontradas no cultivo de algodão é um dos mais amplos do mundo, composto por diversas espécies de lepidópteros, coleópteros e também por pulgões, mosca-branca, tripses, ácaros e percevejos, entre outros. Nessa situação de extrema diversidade de pragas, a introdução das variedades geneticamente modificadas (GM) de algodão resistentes a lepidópteros foi importante, por conta da facilitação do manejo do cultivo que proporcionou, mas não permitiu redução drástica da quantidade de inseticida usada no cultivo, como aconteceu em outros países.

A maioria das plantas transgênicas resistentes a insetos expressa toxinas Cry oriundas do *Bacillus thuringiensis* (Bt), que controlam principalmente espécies de lepidópteros (capítulo 1). Essas toxinas são ferramenta excelente, pois são muito específicas para a praga-alvo e, geralmente, não apresentam impacto sobre os organismos não alvo.

Muitas tecnologias para resistência a lepidópteros estão atualmente disponíveis nas variedades de algodão comercializadas em Mato Grosso.

### Tecnologias usadas em algodão- Mato Grosso (2017/18)

Fonte: Ampa, 2018



Apesar da participação menor nos últimos anos, a tecnologia WideStrike® (32,0%) ainda é a mais usada, seguida de perto por Bollgard II® (26,9%) e GLT® (25,1%). As áreas com algodoeiro convencional ou com tecnologia unicamente de resistência a herbicida representam 15%, o que inclui as áreas de refúgio.

Ao longo dos últimos anos, várias pragas adquiriram níveis de resistência a inseticidas químicos ou às proteínas de Bt contidas nas variedades transgênicas, o que reforça a importância de o produtor realizar rotação de ingredientes ativos para o controle químico das pragas e usar refúgios quando cultiva variedades GM. Dificuldades maiores surgem da adaptação de certas pragas às plantas do sistema soja- algodão-milho, assunto do capítulo 2. Como consequência, populações de certos lepidópteros podem ser submetidas a fortes pressões de seleção por conta da presença da mesma toxina de Bt em cultivos diferentes.

Essa tecnologia de plantas geneticamente transformadas requer muito tempo para ser desenvolvida e chegar ao mercado, assim como muitos investimentos. Para um novo projeto, como o do algodão resistente ao bicudo, o prazo estimado para colocar uma variedade nova no mercado é entre doze e quinze anos. Diversas técnicas de transformação genética podem ser usadas no algodoeiro (capítulo 3); a obtenção, porém, de uma planta que expressará a toxina em quantidade suficiente para matar o inseto-alvo não é fácil. A parte regulatória para colocar essas plantas no mercado é ainda a mais cara, já que a autorização para liberação comercial deve ser obtida não apenas

nos órgãos nacionais (CTNBio), mas também nos países para onde o produto será exportado.

As plantas geneticamente transformadas tornaram-se ferramenta importante para os produtores do cerrado, tanto para algodão como para soja e milho. Não é por acaso que elas ocupam tanto espaço nas áreas agrícolas (capítulo 4); mas é preciso preservar essa tecnologia. Quando submetidas a plantas transgênicas, as populações de pragas selecionam, ao longo do tempo, os indivíduos que apresentam resistência genética à toxina presente. As estratégias de refúgio são uma das ferramentas para atrasar o aparecimento de populações resistentes, mas dificilmente o impedirão (capítulo 5). Plantas GM associadas a diversas toxinas também são ferramentas mais potentes para limitar a probabilidade de aparecimento de resistência, porém são efetivas quando associam toxinas com modos de ação diferente.

Com o passar do tempo, faz-se necessário o desenvolvimento urgente de novas opções de plantas GM mais eficientes para o controle das pragas. Uma estratégia seria modificar as toxinas já conhecidas, de forma que se tornem mais eficientes (capítulo 6); outra seria descobrir novas toxinas de Bt para alvos diferentes, como o bicudo-do-algodoeiro, ou grupos de proteínas totalmente diferentes das toxinas. De qualquer forma, sabemos que toda tecnologia e/ou método para o controle de insetos-praga não pode ser usado de modo isolado, mas associado às demais, seja controle químico, cultural ou biológico (capítulo 7), a fim de preservar por maior tempo a ferramenta. Por fim, o capítulo 8 relata os esforços realizados pela Ampa e outras associações de produtores sobre algodão geneticamente modificado com genes Bt.

Esperamos que as informações contidas neste Boletim de P&D esclareçam a todos — produtores, técnicos das fazendas e estudantes — o potencial importante da ferramenta de transformação genética para o controle de insetos-praga, mas que também deixem claras fragilidades e cuidados a observar no momento do uso de uma variedade GM a campo. Apenas o respeito às recomendações de uso de refúgio preservará a médio e longo prazo a eficiência da ferramenta.



## CAPÍTULO 1

# *Bacillus thuringiensis* no controle de pragas do algodão

**Rose Monnerat**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF

**Erica Martins Queiroz**

IMAmt - Brasília/DF

**Lilian Praça**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF

**Paulo Martins Queiroz**

IMAmt - Brasília/DF

**Carlos Marcelo Soares**

Brasília/DF

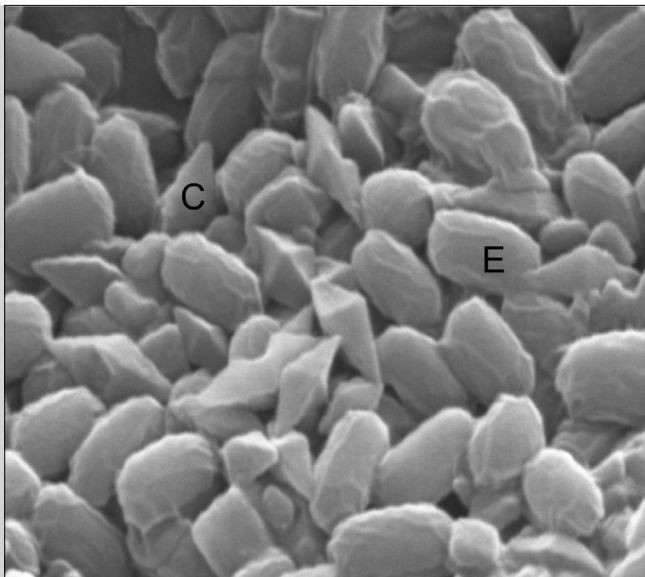
### **1. *Bacillus thuringiensis* - Informações gerais**

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, da família Bacillaceae, e que produz, no momento de sua esporulação, inclusões proteicas cristalinas conhecidas por  $\delta$ -endotoxinas (Monnerat & Bravo, 2000; Bravo *et al.*, 2005) (figura 1).

Essas toxinas são altamente específicas a seus insetos-alvo, inócuas ao ser humano, aos vertebrados e às plantas e têm efeito não poluente ao meio ambiente por serem completamente biodegradáveis (Whiteley & Schnepf, 1986; Bravo *et al.*, 2005; WHO, 1999).

A bactéria foi isolada em 1902, no Japão, pelo bacteriologista Ishiwata, que descobriu ser ela a responsável pela mortalidade de larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).

**Figura 1.**  
Esporos (E)  
e inclusões  
proteicas  
cristalinas  
bipiramidais  
(C) de *Bacillus*  
*thuringiensis*



Em 1911, Berliner, na Alemanha, descreveu a mesma bactéria, isolada de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), a traça-da-farinha, e a chamou *B. thuringiensis*, em homenagem à Turíngia, na Alemanha, onde foram coletadas as lagartas. Em 1915, o mesmo autor notou presença de inclusões paraesporais nas células de *B. thuringiensis*. As possibilidades de utilização do microrganismo em controle biológico foram logo reconhecidas, e, em 1938, uma formulação à base desta bactéria, a esporeína foi produzida na França (Weiser, 1986). A partir dos anos 1950, diversos países — Alemanha, Estados Unidos, França, Tchecoslováquia e União Soviética — começaram a produzir inseticidas biológicos à base de *B. thuringiensis* (Weiser, 1986).

Nos anos 60, foi isolada uma estirpe de *B. thuringiensis*, subespécie *kurstaki*, chamada HD-1 (Dulmage, 1970), que apresentou uma toxicidade de duas a duzentas vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. A partir de então, a procura por outras estirpes possuidoras de novas toxinas foi estimulada, e, em 1977, Goldberg e Margalit isolaram uma estirpe eficaz contra dípteros (Goldberg & Margalit, 1977). Alguns anos mais tarde, em 1983, outra estirpe foi identificada como patogênica para coleópteros (Krieg *et al.*, 1983). No mundo inteiro, diversas estirpes de *B. thuringiensis* foram isoladas e, atualmente, muitos

laboratórios continuam procurando novas. Existem várias coleções espalhadas pelo globo, e estima-se que existam 40 mil estirpes conhecidas; entre estas, algumas são tóxicas a nematoides (Edwards *et al.*, 1988), trematoides, protozoários, himenópteros, homópteros, ortópteros e ácaros (Feitelson, 1994).

Para o desenvolvimento de novos bioinseticidas é fundamental a descoberta de estirpes com maior atividade ou mais adaptadas às condições ambientais onde esses produtos serão utilizados. Podemos apontar como exemplo desse tipo de trabalho o isolamento de estirpes nativas de *B. thuringiensis* e de *B. sphaericus* (*Lysinibacillus sphaericus*) mais tóxicas que as respectivas estirpes-padrão e com toxicidade oriunda de toxinas codificadas por genes ainda não descritos (Schenkel *et al.*, 1988; Ibarra *et al.*, 2003; Monnerat *et al.*, 2004, 2005, 2007; Martins *et al.*, 2007).

*B. thuringiensis* pode ser utilizado tanto na forma nativa, como base de formulações de produtos biológicos, ou como doador de genes para a síntese de plantas geneticamente modificadas para resistência a insetos.

Estirpes da bactéria já foram encontradas em todas as partes do mundo, provenientes de vários substratos, como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos, teias de aranha e grãos armazenados (Bravo *et al.*, 1998). O número de unidades formadoras de colônias por grama de solo pode chegar a 10<sup>4</sup>, e as subespécies mais frequentemente encontradas são *kurstaki* e *galleriae*. Não há evidência alguma de correlação entre tipo de solo, quantidade, subespécies e atividade inseticida (Damgaard *et al.*, 1997).

A taxonomia de *B. thuringiensis* tem sido alvo de muitos estudos. Fizeram-se várias tentativas de classificação, começando pela elaboração de uma listagem de subespécies de bactérias, relacionando-as a insetos suscetíveis, passando pelo perfil enzimático, pela morfologia e por reações aos corantes. Até 1960, essas metodologias mostravam-se pouco apropriadas para uma classificação segura das estirpes isoladas em diversas regiões do globo. Naquela época, De Barjac & Bonnefoi (1962) introduziram o conceito dos “antígenos H” como elemento diferenciador de estirpes, baseado em substâncias existentes no flagelo de *Bacillus*. Esse sistema de classificação permitiu grande avanço na sistematização desses microrganismos (De Barjac *et al.*, 1980). Outras técnicas foram propostas, como a eletroforese de esterases (Noris, 1964), antígenos do



cristal (Krywienczyk *et al.*, 1978), eletroforese multiloco das isoenzimas (Sedlander *et al.*, 1986), a cromatografia dos ácidos graxos (Schenkel & Frachon, 1990) e a análise de plasmídeos (Lereclus *et al.*, 1992).

Diversos genes das  $\delta$ -endotoxinas já foram clonados, permitindo a caracterização das toxinas pela análise completa da sequência de DNA de cada grupo (Kronstad & Whiteley, 1986), entretanto, os estudos moleculares e genéticos de *B. thuringiensis* ganharam novo impulso a partir do emprego das tecnologias de sequenciamento genômico usando NGS (*Next Generation Sequencing* - Nova Geração de Sequenciamento) e a terceira geração de sequenciamento.

O genoma de Bt é, ainda, uma fonte a ser explorada para descoberta e identificação de novos genes com potencial tóxico aos mais variados tipos de organismos, principalmente insetos. A partir da aplicabilidade do sequenciamento de genomas, abre-se uma alternativa para estudos relacionados à filogenia e à diversidade dos genes de Bt. Existem consideráveis variações genéticas individuais entre as estirpes dessa bactéria; muitos genes já identificados estão em: 1) processos biológicos (regulação biológica, processos celulares, processos de desenvolvimento, estabelecimento de localização, localização, processos metabólicos e resposta a estímulos); 2) componente celular; 3) função molecular (ligação, atividade catalítica, atividade reguladora da transcrição e atividade de transportador; 4) processamento da informação genética (replicação e reparo); 5) metabolismo (metabolismo de aminoácido, carboidrato, terpenoides e policetonas) (Fang *et al.*, 2011).

A análise de *B. thuringiensis* em comparação a *B. cereus* e *B. anthracis* mostra uma relação filogenética mais próxima. Muitos estudos demonstraram que os membros do clado de *B. cereus* estão muito intimamente relacionados em termos de evolução filogenética, pois *B. thuringiensis* pode parecer-se com *B. cereus* ao perder seus plasmídeos característicos. O mesmo se observa para *B. cereus*, cujas estirpes podem apresentar propriedades funcionais características de *B. thuringiensis* ou *B. anthracis* quando adquirem plasmídeos destes, como os codificadores de toxinas, denominados de pBtoxis (Hu *et al.*, 2005; Klee *et al.*, 2010).

Pode-se associar, ainda, o NGS com a prospecção de genes, permitindo expandir o arsenal de potenciais agentes de biocontrole, auxiliando nos testes de toxicidade de um grande número de toxi-

nas contra uma grande faixa de insetos. Para facilitar a seleção das toxinas para estudo, critérios diferentes podem ser aplicados, incluindo a identificação da toxina em uma estirpe conhecida (a partir de um *screening* genômico prévio) em busca de uma atividade biocida de interesse ou em função de uma relação com toxinas já conhecidas (Berry & Crickmore, 2017).

O genoma de *B. thuringiensis* é o resultado de vários eventos genéticos que modelam o genoma de cada estirpe individualmente, ou seja, além das mutações que podem ocorrer ao longo do genoma de Bt, a transferência horizontal entre estirpes de Bt por meio da ação de bacteriófagos, a troca de genes entre estirpes, a ação de transposons, a existência de *hotspots*, *singletons*, *morons* e genes crípticos e a abundância de plasmídeos contribuem decisivamente para a diversidade genética entre as estirpes de Bt.

Essas informações indicam que houve um avanço no entendimento da parte estrutural das toxinas produzidas por Bt; os achados corroboram para o fato de que, dentro de uma grande família de toxinas, a diversidade é menor. Contudo, ainda há a necessidade de evolução no conhecimento de como ocorre a interação entre os receptores e as toxinas, utilizando-se apenas a sequência que codifica a toxina gerada por sequenciamento.

## 2. Isolamento, caracterização e alvos

A variabilidade genética de *B. thuringiensis* é muito grande. Seu cristal proteico pode ser constituído por uma ou mais  $\delta$ -endotoxinas diferentes, que podem ser patogênicas a insetos de diversas ordens e contra outros grupos de invertebrados (nematóides, ácaros e protozoários) (Edwards *et al.*, 1990; Feitelson *et al.*, 1992).

Em todo o mundo, pesquisadores buscam por novas estirpes de *Bacillus* entomopatogênicos, capazes de produzir novas toxinas, ou que sejam eficazes para o controle de outros organismos; estima-se que existam atualmente cerca de 60 mil estirpes conhecidas. Diferentes metodologias estão descritas para o isolamento de estirpes dessas bactérias (World Health Organization, 1999; Travers *et al.*, 1987), mas a mais utilizada é a descrita pela WHO (1999), que consiste em colocar 1 g de solo de cada amostra em tubos estéreis, com 10 ml de solução salina e agitar em vórtex por 2 min. Em seguida, transferir 1,5 ml para tubos tipo eppendorf estéril e submeter a

aquecimento por 12 min a 80°C e resfriamento por 5 min em gelo. As amostras são então, diluídas mil vezes em solução salina estéril, semeadas em placas de Petri contendo meio ágar nutritivo seletivo com penicilina e incubadas a 30°C por 48 horas. Após a incubação, as colônias isoladas de *Bacillus* spp. são selecionadas.

Em função da alta variabilidade do grupo *Bacillus* spp., é imprescindível a caracterização dos isolados, podendo-se, para tal, empregar diversos recursos. Os mais comuns são: caracterização entomopatogênica (por ensaios em laboratório), caracterização bioquímica e molecular (que apontaram o conteúdo gênico e perfil proteico de cada estirpe) e caracterização morfológica por microscopia óptica e eletrônica de varredura (que mostrará o padrão de cristais produzido por cada estirpe).

A microscopia de contraste de fases permite verificar a presença do cristal. Pode ser empregada ainda a microscopia eletrônica por varredura, que apresenta melhor resolução dos formatos dos cristais, uma vez que os aumentos podem chegar a 100 mil vezes.

A caracterização do complexo esporo-cristal dessas bactérias é realizada pela análise proteica por SDS-Page. Trata-se de uma ferramenta sensível que pode fornecer informações valiosas dentre-espécies ou de similaridade de subespécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Vandamme *et al.*, 1996); a técnica tem sido comumente utilizada para caracterizar isolados de *B. thuringiensis*.

A técnica de PCR (caracterização molecular) requer quantidades pequenas de DNA e permite a caracterização rápida e simultânea de muitas amostras. O procedimento tem sido usado para determinar a presença ou a ausência de genes *cry* em particular, sendo altamente sensível e rápida, podendo ser usada de maneira fácil para estudar a distribuição ou detectar novos genes *cry*. Todavia, o procedimento normal de PCR não predetermina exatamente a atividade inseticida da estirpe, tampouco outros fatores como, por exemplo, o nível de expressão dos genes *cry* presentes que estão envolvidos no potencial inseticida de cada estirpe (Martínez *et al.*, 2005). O uso de PCR foi aperfeiçoado para a detecção de genes *cry*, todavia, o método requer um número amplo de *primers*. Diversos *primers* universais degenerados foram designados para amplificar todos os membros de diferentes subfamílias de genes *cry*. Embora o uso destes oligonucleotídeos degenerados incremente a probabi-

lidade de amplificação de novos genes, a eficiência é restrita para detecção de genes relativos ao mesmo grupo (Berón *et al.*, 2005).

A caracterização entomopatogênica envolve os bioensaios realizados em laboratório e é usada para obtenção das CL50 (concentração letal para matar 50% da população testada) de cada isolado contra um inseto-alvo. É a caracterização entomopatogênica que indicará com maior precisão o potencial de controle e o espectro de ação de um determinado isolado.

A cultura do algodoeiro apresenta ampla gama de artrópodes associados, sendo que alguns deles, quando em níveis populacionais elevados, podem ocasionar prejuízos economicamente significativos, recebendo a denominação de pragas.

A adoção de táticas ou ferramentas de controle biológico que venham a mitigar os danos ocasionados pelas pragas e que possam ser utilizadas no âmbito do manejo integrado de pragas (MIP) para a cultura do algodão é um desafio ímpar. Embora o controle biológico tenha proporcionado importante avanço na cotonicultura na safra 2012/2013, motivado pela introdução de *Helicoverpa armigera*, as ferramentas disponíveis para redução populacional dessa praga ainda se ressentem de maior desenvolvimento tecnológico, citando-se, como exemplo, a melhoria das formulações dos biopesticidas e o aperfeiçoamento do sistema de dispersão de parasitoides.

Nesse sentido, o uso de Bt, seja através de bioinseticidas ou de genes inseridos em plantas geneticamente modificadas (GM) abre um leque de possibilidades para melhorias no MIP. No contexto da cotonicultura, os principais alvos são os artrópodes desfolhadores, com o uso de bioinseticidas e plantas GM, e o bicudo-do-algodoeiro, passível de controle somente por plantas GM, uma vez que, para o Bt ser tóxico a qualquer inseto, é necessária a ingestão das toxinas nos estágios larvais iniciais.

A Embrapa possui uma Coleção de Bactérias de Invertebrados (Coleção de *Bacillus* spp.), criada em 1988 e localizada no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, Distrito Federal. A formação da Coleção teve como finalidade enriquecer, conservar e agregar valor aos recursos genéticos microbianos e obter resultados expressivos, tanto do ponto de vista científico quanto tecnológico. A Coleção teve, desde sua criação, a missão de dispor de um grande número

de estirpes de *Bacillus* isolados, em sua maioria, a partir de amostras de solo, água e insetos mortos, e estratégicas no controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças humanas.

As amostras são identificadas com informações como origem, coletor, responsável pela coleta, data de isolamento e responsável pela identificação e visavam prover recursos genéticos para realização de pesquisas de controle biológico de pragas agrícolas, tais como *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), e vetores de importância na saúde pública, como *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) e *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Pesquisas utilizando as amostras dessa coleção se foram inovando a cada ano, de forma a diversificar o uso desse recurso genético nacional na prospecção de estirpes para o controle de outros insetos-praga de interesse para o agronegócio brasileiro, como *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae), *Hypsipilla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae), *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), nematoides de importância agrícola, veterinária e fitopatógenos. Foram implantados ainda outros estudos visando a utilização sistêmica de *B. thuringiensis* no controle de pragas e na promoção do crescimento vegetal, o estudo de interação inseto-planta-microrganismo e a caracterização molecular e bioquímica dos bacilos, a clonagem e a expressão gênica, o estudo de modo de ação das proteínas nos insetos e o desenvolvimento de bioprodutos. Além disso, a Coleção dá suporte a diversos projetos de pesquisa da Embrapa, atendendo a empresas e outras instituições de pesquisa no depósito de subamostras, como fiel depositário ou no fornecimento de amostras para instituições públicas e privadas. A Coleção também presta serviços ligados ao controle biológico, garantindo a qualidade de seus materiais e serviços por meio da adoção de boas práticas advindas da implantação de normas de qualidade.

Desde 2015, os ensaios estão acreditados pelo Inmetro (ISO 17.025). Inicialmente, o acervo era constituído de estirpes de *B. thuringiensis* e de *B. sphaericus* (*L. sphaericus*) preservados em papel-filtro. Em 2001, com a estruturação da Rede Nacional de Recursos Genéticos da Embrapa (Renargem), a coleção foi consolidada, sob a desig-

nação de Banco de *Bacillus* spp. para controle biológico de pragas agrícolas e vetores de doenças. Hoje, a coleção conta com outras espécies de *Bacillus* como *B. subtilis* e *B. licheniformis*, entre outras.

Em 2012, o Instituto Mato-grossense do Algodão firmou uma parceria com a Embrapa e, desde então, vem desenvolvendo projetos para prospecção de estirpes e genes de Bt visando o controle biológico e a construção de cultivares resistentes ao ataque de insetos-praga.

As principais pragas do algodoeiro, sua importância, os agentes de controle biológico e os produtos comerciais registrados encontram-se listados na tabela 1.

### **3. Ativos biológicos produzidos por *B. thuringiensis***

*B. thuringiensis* produz diferentes fatores de virulência, como as  $\delta$ -endotoxinas,  $\alpha$ -exotoxina,  $\beta$ -exotoxina, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases e fosfolipases (Hofte & Whiteley, 1989; Hansen & Salamitou, 2000). Algumas estirpes produzem toxinas na fase de crescimento vegetativo, denominadas VIP (vegetative insecticidal proteins) (Estruch *et al.*, 1996, Warren *et al.*, 1998) e SIP (secreted insecticidal proteins) (Donovan *et al.*, 2006). Podem ainda produzir moléculas bioestimuladoras e biofertilizadoras, como fito-hormônios, proteínas solubilizadoras de fosfato e sideróforos (Cherif *et al.*, 2003; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Raddadi *et al.*, 2007; 2008) além de proteínas parasporinas, as quais exibem atividade citotóxica específica contra células humanas de câncer (Ohba *et al.*, 2009, Okumura *et al.*, 2010).

#### **3.1. $\delta$ -endotoxinas**

As  $\delta$ -endotoxinas são as toxinas mais estudadas e promissoras e compreendem as proteínas Cry e Cyt. As toxinas Cry são tóxicas a diferentes insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera e a nematoides, enquanto as proteínas Cyt são na maioria das vezes tóxicas aos insetos da ordem Diptera (Bravo *et al.*, 2005).

Em 1993, foi estabelecido um comitê de nomenclatura de toxinas de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.*, 1998; 2015). Nesse siste-

**Tabela 1.** Principais pragas da cultura do algodoeiro no Estado de Mato Grosso.

Pragas	Nome científico	Importância MT <sup>1</sup>
Bicudo-do-algodoeiro	<i>Anthonomus grandis</i>	5
Pulgão	<i>Aphis gossypii</i>	3
Complexo Heliothinae	<i>Helicoverpa armigera</i> <i>Helicoverpa zea</i> <i>Chloridea virescens</i>	5
Lagarta-rosada	<i>Pectinophora gossypiella</i>	4
Curuquerê	<i>Alabama argillacea</i>	3
Falsa-medideira	<i>Pseudoplusia includens</i>	4
Lagarta-do-cartucho-do-milho	<i>Spodoptera frugiperda</i>	4
Lagarta-rosca	<i>Agrotis ipsilon</i>	2
Mosca-branca	<i>Bemisia tabaci</i>	5
Ácaros (rajado, branco, vermelho)	<i>Tetranychus urticae</i> <i>Polyphagotarsonemus latus</i> <i>Tetranychus ludeni</i>	3
Tripes	<i>Frankliniella shultzei</i>	3
Percevejo-castanho	<i>Scaptocoris castanea</i>	2
Percevejos (rajado, manchador, marrom, verde, pequeno)	<i>Horcias nobilellus</i> <i>Dysdercus</i> sp. <i>Euschistus heros</i> <i>Nezara viridula</i> <i>Piezororus guildinii</i> <i>Edessa meditabunda</i>	3
Broca-da-raiz	<i>Eutinobothrus brasiliensis</i>	3

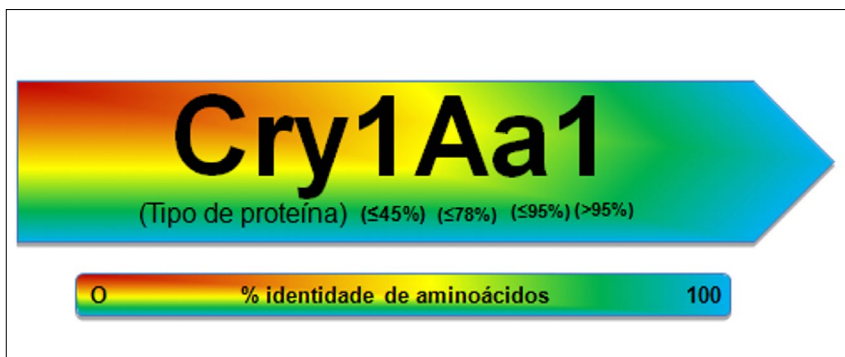
<sup>1</sup> Importância e relevância para o estado de Mato Grosso, escala de notas: 1 = sem importância, 2 = pequena importância, 3 = mediamente importante, necessitando de preocupação e estudos, 4 = importante, demandando medidas de controle, 5 = muito importante, inviabilizando a cultura se não houver controle.

Referências: Silvie *et al.*, 2013; Agrofít, 2017; Monnerat *et al.*, 2015.

ma, para cada nova toxina é dado um nome baseado na identidade de aminoácidos das toxinas previamente nomeadas (figura 2). O agrupamento por esse critério não implica em uma proteína com estrutura similar, com a mesma gama de hospedeiros, nem modo ação. Dessa forma, quatro subcategorias foram formadas: proteínas que compartilham identidade inferior a 45% (atribuído um número arábico), proteínas compartilhando identidade inferior a 78% (atribuída uma letra maiúscula), proteínas que compartilham identidade inferior a 95% (atribuída uma letra minúscula) e proteínas que compartilham mais de 95% de identidade (número arábico), formando assim o nome da proteína. As proteínas Cry estão classificadas em 74 grupos e diferentes subgrupos e são codificadas por mais de 830 genes cry já sequenciados (Crickmore *et al.*, 2017).

### 3.2. $\alpha$ -exotoxina

A  $\alpha$ -exotoxina é uma enzima que possui atividade citolítica, interagindo com fosfolipídios que formam as membranas celulares de diversos organismos (Faust & Bulla, 1982), inclusive ratos e outros vertebrados (Lechner *et al.*, 1989). A toxina é termolábil, solúvel em água e altamente tóxica a alguns insetos quando administrada via oral ou intra-hemocélica, causando degeneração e lise de hemó-



**Figura 2.** Ilustração da nomenclatura para proteínas Cry: proteínas que compartilham identidade inferior a 45% (atribuído um número arábico), proteínas compartilhando identidade inferior a 78% (atribuída uma letra maiúscula), proteínas que compartilham identidade inferior a 95% (atribuída uma letra minúscula) e proteínas que compartilham mais de 95% de identidade (número arábico), formando assim o nome da proteína.



bitos (Krieg, 1971; Hansen & Salamitou, 2000). A toxina é produzida durante a fase logarítmica de crescimento de algumas estirpes de Bt e liberada no sobrenadante, sendo também conhecida como lecitinase C, fosfolipase C ou fosfatidilcolina fosfo-hidrolase (Faust & Bulla, 1982).

### 3.3. $\beta$ -exotoxinas

Algumas estirpes de *B. thuringiensis* são capazes de secretar metabólitos secundários não proteicos e termoestáveis que não possuem atividade tóxica específica, sendo altamente tóxicos para um amplo espectro de insetos e também de mamíferos (Liu *et al.*, 2010; 2014). Esses metabólitos secundários são comumente conhecidos como  $\beta$ -exotoxinas ou turingiensinas. São produzidas durante a fase vegetativa e secretadas no meio de cultura. Existem dois tipos de  $\beta$ -exotoxinas; o tipo I é um análogo do ATP, sendo composto pelo nucleotídeo adenina, ribose, glicose e ácido fosfolárico, apresentando massa molecular de 701 daltons (Farkas *et al.*, 1969). A produção da toxina tipo II por algumas estirpes é relatado como um análogo do UTP (Levinson *et al.*, 1990). O efeito tóxico das  $\beta$ -exotoxinas dá-se através da inibição da RNA polimerase DNA dependente (Gohar & Perchat, 2001), provável razão pela qual elas podem também afetar mamíferos (McClintock *et al.*, 1995). São altamente tóxicas para várias ordens de insetos, ácaros, nematoides e também vertebrados, com efeitos teratogênicos e mutagênicos (Hansen & Salamitou, 2000). A produção de  $\beta$ -exotoxinas é mais prevalente em alguns sorotipos específicos (Hernandez *et al.*, 2003), e os genes responsáveis pela síntese dessas toxinas estão localizados em plasmídeos de 75 ou 110 MDa (Levinson *et al.*, 1990).

Por causa da toxicidade da  $\beta$ -exotoxina em mamíferos, a OMS recomenda que as cepas de *B. thuringiensis* que produzem  $\beta$ -exotoxina não sejam utilizadas para o controle de insetos, ou pelo menos que os produtos comerciais à base de *B. thuringiensis* sejam livres da toxina (WHO, 1999). Além disso, a ausência de  $\beta$ -exotoxinas é uma exigência para formulações com *B. thuringiensis* na Europa, nos Estados Unidos e no Canadá (Glare & O'Callaghan, 2000).

### 3.4. VIP

As *Vegetative insecticidal proteins* (VIP) são produzidas e secretadas por algumas estirpes de *B. thuringiensis* durante sua fase vegetativa (Estruch *et al.*, 1996; Warren, 1997). Quatro famílias de proteínas VIP foram descritas (Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4). Vip1 e Vip2 formam um sistema binário, possuindo os tamanhos de 100 kDa e 52 kDa, respectivamente. Possuem alta toxicidade contra coleópteros e seu modo de ação envolve o desarranjo do citoesqueleto de células de insetos (Warren, 1997; Shi *et al.*, 2004). Vip3 é uma proteína de 82,5 kDa, tóxica a um amplo espectro de lepidópteros (Estruch *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2003), tendo como possível modo de ação a formação de poros na membrana das células e consequente lise celular (Lee *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2012). Ao mesmo tempo em que Vip3 apresenta toxicidade sobre lepidópteros, ela não mostrou efeitos sobre insetos não alvo (Whitehouse *et al.*, 2007). Vip4 é uma proteína com peso molecular de 108 kDa. Pouco se sabe sobre seu espectro de ação, porém análises filogenéticas sugerem uma similaridade com a proteína Vip1 (Palma *et al.*, 2014; Crickmore *et al.*, 2015).

Os genes responsáveis pela síntese das proteínas VIP estão localizados em plasmídeos de alta massa molecular, juntamente com genes cry (Estruch *et al.*, 1996). Por serem produzidas em etapas iniciais do processo de crescimento das bactérias em cultura, sua obtenção pode ser antecipada, podendo-se aproveitar não só a mistura de esporos e cristais obtidos após o cultivo de *B. thuringiensis*, como também utilizar seu sobrenadante (Estruch *et al.*, 1996; Monnerat & Bravo, 2000).

### 3.5. SIP

As proteínas inseticidas secretadas (SIP) constituem uma família de proteínas descrita como o primeiro e único membro de uma família de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis* secretadas com toxicidade demonstrada contra larvas de coleópteros. A proteína SIP foi inicialmente obtida a partir de sobrenadantes de cultura da estirpe Bt EG2158 e foi designada como Sip1Aa1 (Donovan *et al.*, 2006). O gene *sip1Aa1* tem 1.104 pb que codificam uma proteína de 367 aminoácidos com aproximadamente 41 kDa. Essa proteína

apresenta peptídeo sinal de trinta aminoácidos consenso com de outras bactérias Gram-positivas.

Os trabalhos de Donovan *et al.* (2006) mostram a toxina presente em sobrenadante de meio de cultura já processada, sem seus primeiros 43 aminoácidos e que ela apresenta similaridade com a estrutura das proteínas mosquitocidas MTX3 de 36 kDa, sugerindo que sua atividade seja também pela formação de poros, mas seu modo de ação permanece desconhecido. Sip1Aa1 é letal para *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) e inibe o crescimento de *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae) e *D. virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Donovan *et al.*, 2006).

### 3.6. Quitinase

A quitina é um homopolímero de n-acetilglicosamina (NAG) conectado por uma ligação do tipo  $\beta$ -1,4, um polissacarídeo estrutural amplamente encontrado na natureza (Gooday, 1994). É um dos principais componentes de insetos, sendo responsável pela formação da cutícula, estando presente também na membrana peritrófica, uma camada protetora que reveste o intestino de insetos, responsável pelo formato celular e protegendo a célula contra danos mecânicos. Por esse motivo é um alvo para proteínas antifúngicas, como as quitinases, proteínas degradadoras de quitina (Theis & Stahl, 2004), amplamente produzidas pelas diferentes estirpes de Bt. São capazes de inibir o crescimento de fungos (Liu *et al.*, 2002; Reyes-Ramirez *et al.*, 2004) e quando utilizadas com outras proteínas inseticidas podem elevar sua toxicidade (Regev *et al.*, 1996; Sampson & Gooday, 1998).

A toxicidade de estirpes de Bt mostrou-se maior quando combinada com o sobrenadante da cultura contendo quitinase (Wiwat *et al.*, 2000) e testada contra larvas de *Plutella xylostella* (traça-das-crucíferas). A quitinase, em conjunto com proteínas VIP, apresenta uma ação de sinergismo contra larvas de *Spodoptera litura* (Arora *et al.*, 2003). A atividade inseticida das proteínas Cry e VIP na presença de quitinase oferece uma ferramenta para controle de pragas por meio da atividade sinérgica dessas proteínas, diminuindo também a resistência de insetos a Bt, além de ser uma enzima promissora no combate a fungos fitopatogênicos (Raddadi *et al.*, 2007).

### 3.7. Zwittermicina A

É um antibiótico aminopoliol linear, primeiramente identificado por seu papel na supressão de fungos fitopatógenos, sendo produzido por Bt (Silo-Suh *et al.*, 1994; Raffel *et al.*, 1996; Nair *et al.*, 2004; Raddadi *et al.* 2008). Contudo, estudos com o sinergismo de zwittermicina A e proteínas inseticidas de Bt mostraram um aumento na mortalidade de insetos tipicamente resistentes a essas toxinas (Broderick *et al.*, 2000; 2003), podendo constituir um fator adicional no aumento da eficácia de Bt e atrasando o desenvolvimento de resistência de insetos.

A zwittermicina A mostrou ter um grande espectro de inibição entre protistas, oomicetos, fungos e bactérias (Silo-Suh *et al.*, 1998). A atividade inibitória contra oomicetos poderia ser de grande interesse para o controle desses fungos filamentosos, tendo em vista que a quitinase não age contra eles, pois a falta de quitina na parede celular é uma característica comum desses fungos (Shang *et al.*, 1999; Theis & Stahl, 2004).

### 3.8. Autolisinas

Autolisinas são hidrolases peptidoglicanas endógenas que digerem os peptidoglicanos da parede celular, tanto das bactérias produtoras como de outras bactérias. De acordo com a ligação química clivada na molécula de peptidoglicano, as autolisinas são classificadas em: N-acetil muramidase, N-acetilglicosaminidase, N-acetilmuramil-L-alanine amidase e endopeptidase (Cibik & Chapot-Chartier, 2000). Essas hidrolases peptidoglicanas são sintetizadas durante o crescimento celular e estão envolvidas em diversos passos cruciais no ciclo de vida bacteriano: divisão celular, manutenção do volume da parede celular, lise celular e liberação de esporo (Smith *et al.*, 2000).

Raddadi e colaboradores (2004; 2005), através de uma varredura em mais de cem isolados de Bt, encontraram estirpes com hidrolases peptidoglicanas que possuíam atividade contra um vasto grupo de bactérias, como *Micrococcus lysodeikticus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Essas proteínas são de grande interesse, principalmente em aplicações no campo, aumentando o biocontrole de bactérias ou insetos pela adição de outros anta-

gonistas, como as bacteriocinas (Mora *et al.*, 2003) ou quitinases, tendo em vista que o produto oriundo da clivagem com quitinase é a N-acetilglicosamina, podendo ser degradada por N-acetilglicosaminidases (Sampson & Gooday, 1998; Raddadi *et al.*, 2007).

### 3.9. Bacteriocinas

Bacteriocinas são compostos sintetizados pelos ribossomos, termoestáveis e produzidos por bactérias. Possuem atividade tóxica contra outras bactérias, e a bactéria produtora apresenta um mecanismo de imunidade específico (Cotter *et al.*, 2005). Esses peptídeos são, em sua maioria, compostos catiônicos que produzem poros nas células-alvo, interferindo no potencial de membrana, levando à lise celular (Oscáriz & Pisabarro, 2001). Apresentam um espectro de ação reduzido, tóxico somente a bactérias relacionadas geneticamente à produtora ou que pertençam ao mesmo nicho ecológico (Riley & Wertz, 2002; Raddadi *et al.*, 2007). A classificação das bacteriocinas sugeridas por Klaenhammer (1993) as separa em quatro classes, de acordo com sua massa molecular, termoestabilidade, sensibilidade enzimática, presença de aminoácidos modificados pós-traducionalmente e modo de ação.

A classe I é chamada de lantibióticos, que contém o aminoácido modificado lantionina, e peptídeos pequenos (< 5 kDa, 19-38 aminoácidos); a classe II tem como característica o tamanho pequeno (< 10 kDa), termoestabilidade e peptídeos formados exclusivamente por aminoácidos não modificados (Cotter *et al.*, 2005). A classe III tem como representantes proteínas termoestáveis e de maior massa molecular (> 30 kDa). Até o momento, poucas bacteriocinas desta classe foram caracterizadas, e seu mecanismo de ação difere das outras bacteriocinas, pois a ação ocorre através da hidrólise da parede celular das células sensíveis, levando à morte celular (Cotter *et al.*, 2005). A última classe de bacteriocinas, a classe IV, contém peptídeos que possuem moléculas de carboidratos ou lipídeos (Klaenhammer, 1993).

As bacteriocinas produzidas por *B. thuringiensis* são normalmente conhecidas como turicinas e apresentam um espectro variado de ação. Possuem ação bacteriostática ou bacteriolítica contra diversas espécies de procariotos, como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, dentre várias outras espécies de importância clínica e alimentar (Paik *et al.*, 1997; Cherif *et al.*, 2001; Ahern *et al.*, 2003; Cherif *et al.*, 2003; Kamoun *et al.*, 2005; Barboza-Corona *et al.*, 2007; Chemini *et al.*, 2007; Cherif *et al.*, 2008). Diversas estirpes de Bt já foram descritas produzindo diferentes bacteriocinas, como turicina, tochicina (Paik *et al.*, 1997), turicina 7 (Cherif *et al.*, 2001), turicina 439 (Ahern *et al.*, 2003), entomocina 9 (Cherif *et al.*, 2003), bacticurina F4 (Kamoun *et al.*, 2005), entomocina 110 (Cherif *et al.*, 2008).

### 3.10. AHL-Lactonases

Várias espécies de bactérias usam sistemas complexos de comunicação que interagem com a densidade celular e a expressão de genes para regulação de funções biológicas. Esse tipo de comunicação célula a célula é conhecido como *quorum sensing*, o qual depende da produção, da difusão e do reconhecimento de pequenas moléculas sinalizadoras ou autoindutores (Miller & Bassler, 2001; Fuqua *et al.*, 2001).

Em bactérias Gram-negativas, o sistema de *quorum sensing* mais estudado está relacionado com a interação de N-acilhomoserina lactonas (AHLs), moléculas que partilham anéis de lactona homoserina, mas variam em comprimento e substituição da cadeia lateral acil. Os sinais de AHL estão envolvidos na regulação de uma grande variedade de funções biológicas, como luminescência, produção de antibióticos, transferência plasmidial, motilidade, virulência e formação de biofilmes (Whitehead *et al.*, 2001; Zhang, 2003; Federle & Bassler, 2003).

As vias de *quorum sensing* poderiam ser alteradas pela produção de produtos naturais que ajam como antagonistas de AHLs e pela expressão de enzimas que extingam essa via de comunicação por meio da hidrólise dessas moléculas AHL sinalizadoras (Ren *et al.*, 2005). Diversas estirpes de *B. thuringiensis* foram identificadas como portadoras do gene *aiiA*, que codifica uma enzima AHL-lactonase (Dong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Raddadi *et al.*, 2008).

A presença de estirpes de Bt produtoras de AHL-lactonase suprime a virulência de bactérias fitopatogênicas através de interferência de sinal, bem como a expressão do gene *aiiA* de Bt em bactérias

fitopatogênicas é capaz de reduzir significativamente a virulência desses fitopatógenos (Dong *et al.*, 2001; 2004). Estudos mostraram que plantas transgênicas expressando AHL-lactonase podem efetivamente extinguir a sinalização de *quorum sensing* e eliminar populações bacterianas causadoras de infecção (Dong *et al.*, 2001). Esses resultados ilustram o potencial promissor de exploração dos mecanismos antagonistas microbianos como a interferência de sinal para o controle e prevenção de doenças infecciosas (Raddadi *et al.*, 2007).

### 3.11. Ácido indolacético (AIA) ou auxinas

A habilidade de produzir fito-hormônios é muitas vezes considerada restrita ao reino vegetal, porém, a produção de fito-hormônios é comum em bactérias de solo e associadas a plantas (Costacurta & Vanderleyden, 1995); sendo assim, determinantes na estimulação do crescimento da planta, na patogênese e nas interações simbióticas planta-microrganismo (Glickmann *et al.*, 1998; Patten & Glick, 2002; Sergeeva *et al.*, 2002).

Fito-hormônios desempenham um papel importante como sinalizadores e reguladores de crescimento e desenvolvimento de plantas. Dentre eles, as auxinas e, em particular, o ácido 3-indol-acético (AIA) são os reguladores de crescimento de plantas mais estudados, considerando os aspectos bioquímicos, genéticos e fisiológicos (Del Pozo *et al.*, 2005). Com base em estudos genéticos e na regulação dos mecanismos de biossíntese de AIA, várias vias de produção são conhecidas, sendo divididas em vias dependentes de triptofano e vias independentes de triptofano (Glick *et al.*, 1999). Bactérias benéficas sintetizam AIA predominantemente pelas vias dependentes de triptofano (Costacurta *et al.*, 1994; Patten & Glick, 2002; Schutz *et al.*, 2003).

Por meio de estudos bioquímicos e com o gene *ipdC*, que codifica uma indolpiruvato descarboxilase, enzima fundamental em uma das vias dependentes de triptofano, demonstrou-se que o Bt é capaz de produzir concentrações benéficas de AIA para plantas por ambas as vias dependentes de triptofano, a do ácido 3-indol pirúvico e a do 3-indol acetamida (Raddadi *et al.*, 2007; 2008).

Estudos realizados avaliando plântulas de repolho *in vitro*, cujas sementes foram tratadas com *B. thuringiensis*, demonstraram que

houve um incremento significativo na emergência das plântulas em 200%. Acredita-se que a produção de AIA pode ter influenciado o desenvolvimento inicial das plântulas, uma vez que a estirpe de *B. thuringiensis* testada apresentou uma produção de AIA menor que 1 µg/mL, no meio Embrapa, 9,92 µg/mL, no meio King B, e 20,61 µg/mL, no meio DYGS (Praça, 2012). Sabe-se que o fito-hormônio pode atuar sobre o desenvolvimento da parte aérea das plantas (Silva & Bettioli, 2009).

É importante salientar que a produção de AIA pode apresentar resultados diferentes entre os meios, podendo sua produção variar entre diferentes espécies e estirpes e, ainda, ser influenciada por estágios e condições de crescimento e pelo substrato avaliado (Mirza *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com diferentes estirpes de *Bacillus* sp. (Beneduzi *et al.*, 2008) e com diferentes sorotipos de *B. thuringiensis* (Raddadi *et al.*, 2008).

### 3.12. ACC deaminase

O ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é um aminoácido de ocorrência natural, precursor do etileno, um fito-hormônio essencial, importante no desenvolvimento e na resposta ao estresse de plantas. É responsável ainda pela regulação da germinação de sementes, cicatrização de feridas, senescência, amadurecimento dos frutos e vários outros processos relacionados ao crescimento vegetal (Abeles *et al.*, 1992; Deikman, 1997). Vários microrganismos, incluindo bactérias promotoras do crescimento vegetal, são capazes de produzir ACC deaminase, uma enzima que converte o ACC em  $\alpha$ -cetobutarato e amônia (Ghosh *et al.*, 2003; Wenbo *et al.*, 2003; Hontzeas *et al.*, 2004; Glick, 2005), permitindo que esses microrganismos utilizem o ACC como fonte de nitrogênio e carbono (Belimov *et al.*, 2005). Várias estirpes pertencentes ao grupo de *B. cereus* apresentaram genes de ACCD, incluindo Bt, sendo capazes de crescer em meio mineral contendo ACC como única fonte de nitrogênio (Ivanova *et al.*, 2003; Hoffmaster *et al.*, 2004; Raddadi *et al.*, 2007; 2008). Quando inoculado em plantas, Bt, por meio da produção de ACCD, é capaz de estimular o enlorgamento de raízes, o aumento do comprimento da parte aérea, bem como o peso fresco e seco dessas plantas (Ghosh *et al.*, 2003).

Além de facilitar o crescimento e o desenvolvimento vegetal



(Glick, 1995; Glick *et al.*, 1998), bactérias promotoras do crescimento vegetal expressando ACCD demonstraram proteger a planta contra estresses ambientais como excesso de metais pesados, alagamentos, alta salinidade, secas e fitopatógenos (Burd *et al.*, 2000; Belimov *et al.*, 2005; Grichko & Glick, 2001; Mayak *et al.*, 2004a; 2004b; Wang *et al.*, 2000).

### **3.13. Solubilização de fosfato**

Apesar de o fósforo (P) ser bastante abundante em muitos solos, é um dos principais nutrientes limitantes no crescimento vegetal. A maioria do P encontrado no solo está na forma insolúvel, e as plantas absorvem P apenas em duas formas solúveis, a monobásica e a dibásica (Glass, 1989). Para tornar-se disponível às plantas, é necessária a solubilização; bactérias solubilizadoras de fosfato são comumente encontradas em solos e fazem a transformação de fosfato insolúvel para solúvel por meio de ações enzimáticas e produção de ácidos orgânicos (Goldstein, 1986; Pal, 1998; Rodriguez & Fraga, 1999; Nautiyal *et al.*, 2000). Esse processo é realizado por fosfatases ácidas e fitases (Rodriguez & Fraga, 1999; Nautiyal *et al.*, 2000), sendo um dos modos de ação mais comuns envolvidos com microrganismos promotores do crescimento vegetal, aumentando a disponibilidade de nutrientes para a planta hospedeira (Richardson, 2001). Raddadi e colaboradores (2008) identificaram através de PCR estirpes de Bt que possuem os genes de fitase e da fosfatase ácida, capazes de solubilizar quantidades significativas de fosfato *in vitro*.

### **3.14. Sideróforos**

O crescimento e a reprodução de plantas podem ser severamente afetados por diversos estresses abióticos e bióticos; dentre os fatores abióticos, a deficiência de ferro constituiu um dos maiores problemas na redução do rendimento da colheita, principalmente em solos calcários, nos quais a solubilidade de ferro é extremamente baixa (Kobayashi *et al.*, 2005). As plantas normalmente excretam compostos orgânicos solúveis (quelantes e fitossideróforos) que se ligam ao  $Fe^{3+}$  e auxiliam na manutenção desse íon em solução. Os quelantes transportam  $Fe^{3+}$  até a superfície das raízes, onde é redu-

zido a  $\text{Fe}^{2+}$  e absorvido. Já os fitossideróforos são absorvidos com o  $\text{Fe}^{3+}$  através da membrana plasmática (Von Wiren *et al.*, 2000). Algumas bactérias rizosféricas também são capazes de produzir sideróforos por vias não ribossomais (Crosa & Walsh, 2002).

A função de microrganismos do solo no crescimento vegetal e na aquisição de ferro foi relatada por Masalha e colaboradores (2000), que relatam que, utilizando solos não estéreis, as plantas não demonstram sintomas de deficiência e têm altas concentrações de ferro em suas raízes, em contraste com plantas crescidas em solos esterilizados.

A produção de sideróforos é uma característica comum no grupo de *B. cereus*, incluindo *B. thuringiensis* (Park *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2006). Essa característica pode ser bastante relevante no controle de fungos fitopatógenos por conta do efeito da competição por ferro, além de fornecer à planta esse nutriente (Raddadi *et al.*, 2008).

### 3.15. Parasporinas

Dos grupos de toxinas Cry conhecidas até hoje, a maior parte apresenta atividade inseticida e pode ser empregada em controle de pragas e de insetos de interesse em saúde pública. Porém, algumas estirpes produzem outra toxina parasporal, sem atividade conhecida para invertebrados, denominadas parasporinas; o grupo compreende as toxinas Cry31A, Cry41A, Cry45A, Cry46A, Cry63A e Cry64A e apresenta uma atividade específica contra células cancerígenas humanas. Por isso, foram classificadas como parasporina-1 (PS1 - com 11 membros) (Mizuki *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2007; Uemori *et al.*, 2007; Yasutake *et al.*, 2008; Nagamatsu *et al.*, 2010), parasporina-3 (PS3 - com dois membros) (Yamashita *et al.*, 2005), parasporina-4 (PS4 - com um membro) (Okumura *et al.*, 2004), parasporina-2 (PS2 - com três membros) (Ito *et al.*, 2004; Hayakawa *et al.*, 2007), parasporina-6 (PS6 - com um membro) e parasporina-5 (PS5 - com um membro) (Nagamatsu *et al.*, 2010), respectivamente (Ohba *et al.*, 2009; Okumura *et al.*, 2016).

As parasporinas apresentam modo de ação diferente entre as famílias, assim como espectro citotóxico e nível de atividade diferentes (Ohba *et al.*, 2009). Para sua ativação, assim como as proteínas inseticidas, é de importância crucial a ativação das protoxinas em toxinas, com o auxílio de proteases.

Ao contrário das já conhecidas proteínas Cry inseticidas, a parasporina não é uma toxina formadora de poros. Katayama e colaboradores (2007) demonstraram que a PS1Aa1 (Cry31) ativada causa um influxo de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para o interior celular. Esse influxo não está relacionado com canais de  $\text{Ca}^{2+}$  nem com  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, mas com  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Esse influxo de cálcio leva à ativação de proteínas relacionadas à morte celular, como a caspase-3 e a poli (ADP-ribose) polimerase. Além disso, proteínas G heterotriméricas ou receptores acoplados à proteína G estão relacionados a esse mecanismo de ação, induzindo a célula à morte por apoptose.

A toxina parasporina 2 (PS2Aa1 - Cry46A) proveniente da estirpe de Bt A1547 (sorotipo *dakota*), diferentemente da PS1, não possui três domínios e, conseqüentemente, faltam-lhe os blocos conservados presentes nas proteínas Cry inseticidas. Porém, apresenta uma identidade (<25%) com a proteína Cry15Aa, à qual pertencem as toxinas tipo MTX de *Lysinibacillus sphaericus* (Ito *et al.*, 2004; Akiba *et al.*, 2009). Trata-se de uma proteína com 338 resíduos de aminoácidos e traduzida a partir de um gene de 1.014 pb; apresenta toxicidade contra células T leucêmicas (MOLT-4 e Jurkat), câncer de útero (Sawano) e câncer hepático (HepG2). Utilizando cortes histológicos de biópsias de câncer do colo do útero e câncer de fígado, PS2 preferencialmente matou as células de câncer, deixando as células normais do pedaço de tecido intactas (Ito *et al.*, 2004). As sequências de aminoácidos dessas proteínas sugerem uma homologia com toxinas aerolisinas formadoras de poro do tipo  $\beta$  ( $\beta$ -PFTs). A protoxina (37 kDa), após processamento proteolítico com proteinase K, gera a toxina ativa (30 kDa), que formará oligômeros (>200 kDa) em regiões da membrana ricas em colesterol, as jangadas lipídicas, levando à formação de poros e, conseqüentemente, à lise celular, não ocorrendo assim apoptose (figura 4).

Proteínas ancoradas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) estão envolvidas nessa atividade citotóxica, possivelmente como receptoras dessa proteína (Ito *et al.*, 2004; Kitada *et al.*, 2009; Akiba *et al.*, 2009). Há grande homologia entre as sequências de aminoácidos de PS2Aa1 e a toxina épsilon de *Clostridium perfringens*, bem como em seus mecanismos de ação envolvidos na morte celular (Ohba *et al.*, 2009).

As parasporinas 3 (PS3Aa1 e PS3Ab1 – Cry41) são proteínas de 88 kDa e possuem 825 resíduos de aminoácidos, que formam

uma protoxina de 88 kDa. Após tratamento com proteinase K, geram uma toxina ativa de 64 kDa. Apresentam toxicidade e especificidade contra células de câncer de fígado (HepG2) e células T leucêmicas (HL-60) (Yamashita *et al.*, 2005). Apesar de ter uma baixa similaridade com as proteínas Cry e Cyt, possuem estrutura de três domínios, em que a sequência de aminoácidos possui cinco blocos conservados comumente achados em proteínas Cry inseticidas. Baseado nisso, PS3 provavelmente segue o modelo similar de ligação a receptores específicos e formação de poros na membrana celular. Essa ideia tem como suporte o fato que PS3Aa1 aumenta a permeabilidade de membrana das células-alvo (Yamashita *et al.*, 2005). A parasporina 4 (Cry45) possui 274 aminoácidos, formando uma protoxina de 30 kDa, traduzida por um gene de 828 pb. Não possui três domínios e, conseqüentemente, faltam-lhe os blocos conservados presentes nas proteínas Cry inseticidas. Após a ativação com proteinase K, produz uma toxina de 27 kDa, tóxica contra células T leucêmicas (MOLT-4 e HL-60), células de câncer de cólon (CACO-2) e células de câncer do colo do útero (Sawano e TCS) (Ohba *et al.*, 2009).

Assim como PS2, a parasporina 4 possui homologia com aerolinas formadoras de poro do tipo  $\beta$ , com um mecanismo de ação muito semelhante à PS2. PS4 liga-se inespecificamente à membrana plasmática das células-alvo, formando oligômeros e induzindo a célula à morte. Diferentemente de outras  $\beta$ -PFTs, PS4 é uma proteína formadora de poro independente de colesterol; o receptor específico e a composição de oligômeros de PS4 permanecem desconhecidos (Okumura *et al.*, 2008; 2011).

A PS5 (Cry64), oriunda da estirpe A1100, possui uma protoxina de 34 kDa, ativada com proteinase K, dando origem a uma toxina ativa de 30 kDa. Assim como PS2 e PS4, possui homologia com aerolinas formadoras de poro do tipo  $\beta$ ; seu mecanismo de ação é ainda desconhecido, mas, baseado em sua homologia com aerolinas, possivelmente forma poros nas membranas das células-alvo (Ekino *et al.*, 2014).

PS6 (Cry66) compartilha uma estrutura muito parecida com as PS1 e PS3, possuindo estrutura de três domínios, em que a sequência de aminoácidos possui cinco blocos conservados comumente achados em proteínas Cry inseticidas. Seu precursor é uma protoxina de 84 kDa, que, após ativação com tripsina, produz uma proteína ma-

dura de 73 kDa formada por um heterodímero de 59 kDa e 14 kDa. Apresenta citotoxicidade contra as linhagens de câncer de fígado (HepG2) e câncer do colo do útero (HeLa) (Nagamatsu *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação dessa proteína em células de câncer humano ainda não foi esclarecido. Especula-se que PS6 possa ser uma proteína formadora de poro (Nagamatsu *et al.*, 2010).

## 4 . Toxinas e alvos

*B. thuringiensis* é capaz de produzir uma ampla gama de proteínas tóxicas a insetos que podem ser utilizadas nas tecnologias de controle de pragas do algodoeiro. A seguir, a tabela 2 mostra a diversidade de potencial de uso das toxinas de Bt no controle de algumas das principais pragas do algodoeiro.

Dentre as proteínas de Bt mais amplamente utilizadas estão as toxinas que formam cristal (Cry), particularmente Cry1Ac em algodão Bt (figura 3). Essa proteína se tem mostrado tóxica a várias larvas de lepidópteros. Uma etapa crucial no modo de ação das toxinas Cry1A é a ligação da toxina a proteínas receptoras da membrana do intestino médio, reconhecidamente, caderina, aminopeptidase N (APN) e fosfatase alcalina (ALP) (Chen *et al.*, 2015).

A toxina Cry1Ac tem sido usada no controle de várias espécies de Lepidoptera como, por exemplo, *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda*, *Pectinophora gossypiella* e *Chloridea virescens*.

Já as proteínas inseticidas VIP (principalmente referentes à Vip3A) não têm identidade de sequência e não compartilham nenhum local de ligação com as proteínas Cry. O modo de ação distinto de Vip3A faz com que essa proteína seja uma potencial candidata à piramidação com as proteínas Cry em culturas transgênicas de algodão para retardar a evolução de resistência dos insetos da ordem Lepidoptera e ampliar o espectro inseticida (Wei *et al.*, 2017). Essa toxina tem sido usada no controle de lepidópteros como *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera frugiperda* e *Chloridea virescens*.

Já para o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), inseto da ordem Coleoptera e praga responsável por perdas elevadas na produção de algodão, não há uma toxina de Bt empregada em eventos transgênicos.

**Tabela 2.** Principais toxinas de *B. thuringiensis* usadas no controle de algumas das espécies de invertebrados que são pragas da cultura do algodão.

Espécie	Nome	Toxina	CL <sub>50</sub>	Un.	Referência
<i>Agrotis ipsilon</i>	Lagarta-rosca	Cry1J Cry1Ca Cry1AC Cry1Ba Cry1Ab	>200 >200 >200 >200 20	ug/ml ug/ml ug/ml ug/ml ug/ml	Gilliland <i>et al.</i> (2002) Wang <i>et al.</i> (2015)
<i>Chrysodeixis includens</i>	Lagarta-falsa-medideira	Cry1AC Cry1Fa Cry1Ca Cry2Aa	31 4,7 3,8 9,1	ng/cm <sup>2</sup> ng/cm <sup>2</sup> ng/cm <sup>2</sup> ng/cm <sup>2</sup>	Bel <i>et al.</i> (2017)
<i>Helicoverpa armigera</i>	Lagarta-do-tomate	Cry1AC Vip3Aa Cry2AC Cry1Ah Cry1Ai Cry2Ab2	0,013 0,05 to 1,31 131 7,04 >500 5,12 a 50,71	ug/ml ug/cm <sup>2</sup> ng/ml ug/ml ug/ml ug/ml	Chen <i>et al.</i> (2015) Wei <i>et al.</i> (2017) Saleem & Shakoori (2017) Zhou <i>et al.</i> (2017) Brévault <i>et al.</i> (2009)

continua

**Tabela 2.** Principais toxinas de *B. thuringiensis* usadas no controle de algumas das espécies de invertebrados que são pragas da cultura do algodão.

<b>Espécie</b>	<b>Nome</b>	<b>Toxina</b>	<b>CL<sub>50</sub></b>	<b>Uh.</b>	<b>Referência</b>
<i>Helicoverpa zea</i>	Lagarta-da-espiga-do-milho	Cry1Ac Vip3A	0,94 97	ug/ml ng/cm <sup>2</sup>	Ali <i>et al.</i> (2006) Ali; Luttrell (2011)
<i>Chloridea virescens</i>	Lagarta-das-maçãs	Cry1Aa Cry1Ac Cry1Ca Vip3Aa Vip3Ae Vip3Af Cry2Aa	3,5 0,04 3,1 1,65 0,946 0,874 4,3	ug/cm <sup>2</sup> ug/cm <sup>2</sup> ug/cm <sup>2</sup> ug/cm <sup>2</sup> ug/cm <sup>2</sup> ug/cm <sup>2</sup> ug/ml	Lemes <i>et al.</i> (2014) Jurat-Fuentes <i>et al.</i> (2003)
<i>Myzus persicae</i>	Pulgões	Cry41Ab1 e Cry41Aa1	32,7	ug/ml	Palma <i>et al.</i> (2014)
<i>Pectinophora gossypiella</i>	Lagarta-rosada	Cry1Ac Cry2Ab	0,25 1,44	ug/ml ug/g	Fabrick <i>et al.</i> (2009) Malthankar & Gujar (2016)

continua

continuação

**Tabela 2.** Principais toxinas de *B. thuringiensis* usadas no controle de algumas das espécies de invertebrados que são pragas da cultura do algodão.

Espécie	Nome	Toxina	CL <sub>50</sub>	Un.	Referência
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Lagarta-militar	Cry1Ia10	69,52	ng/cm <sup>2</sup>	Bergamasco et al. (2013) Ríos-Díez et al. (2012)  Monnerat et al. (2015) Martins et al. (2008)
		Vip3Aa	24,66	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry1Ab	159	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry1Ac	790	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry1Fa	342	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry1Aa	73	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry1Ab	403	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry1Ac	545	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry2Aa	668	ng/cm <sup>2</sup>	
		Cry2Ab	> 3.500	ng/cm <sup>2</sup>	
Cry1Ia12	0,289	ug/ml			
<i>Anthonomus grandis</i>	Bicudo-do-algodoeiro	cry10Aa	7,12	ug/ml	Aguiar et al. (2012) Martins et al. (2010) Martins et al. (2008)
		Cry1Ba	32,44	ug/ml	
		Cry1Ia	21,5	ug/ml	



As larvas de *A. grandis* localizam-se dentro dos botões florais, resultando na destruição da qualidade da fibra e dificultando o controle químico, causando perdas consideráveis na produção e elevação nos custos quanto ao emprego de inseticidas. Por conta da importância econômica do bicudo, a busca de toxinas Cry específicas para a espécie é essencial.

Aguiar *et al.* (2012) relataram a obtenção de uma versão recombinante da toxina Cry10Aa de *B. thuringiensis* que se mostrou altamente tóxica para o bicudo-do-algodoeiro. Essa toxina de Bt pode ser uma candidata promissora para eventos transgênicos visando o controle do inseto.

## 5. Modo de ação das toxinas Cry

O modo de ação das toxinas Cry tem sido caracterizado principalmente em insetos lepidópteros, e o processo pode ser dividido em várias etapas: solubilização e processamento das toxinas, união ao receptor, inserção na membrana, agregação, formação do poro e citólise (Knowles & Dow, 1993; Bravo *et al.*, 2005).

Os sintomas observados a partir do momento em que as larvas dos insetos suscetíveis ingerem cristais e esporos de *B. thuringiensis* são: perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte (Aronson *et al.*, 1986). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade, e o tegumento adquire tonalidade marrom-escura. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib & Andrade, 1998; Monnerat & Bravo, 2000). Dos muitos grupos de toxinas de Cry atualmente descritos ([Http://www.btnomenclature.info/](http://www.btnomenclature.info/)), as Cry3d (toxinas Cry de três domínios) representam a maior família e tem sido as mais estudadas, tanto quanto à toxicidade como ao modo de ação (Gomez *et al.*, 2014; Bravo *et al.*, 2015). Para as Cry3d são descritos dois tamanhos de protoxinas diferentes: as protoxinas curtas que têm um tamanho de aproximadamente 70 kDa; e as protoxinas longas com 130 kDa (Schnepf *et al.*, 1998); ambas formam inclusões cristalinas que podem originar cristais com diferentes formas: bipiramidal, romboide ou oval.

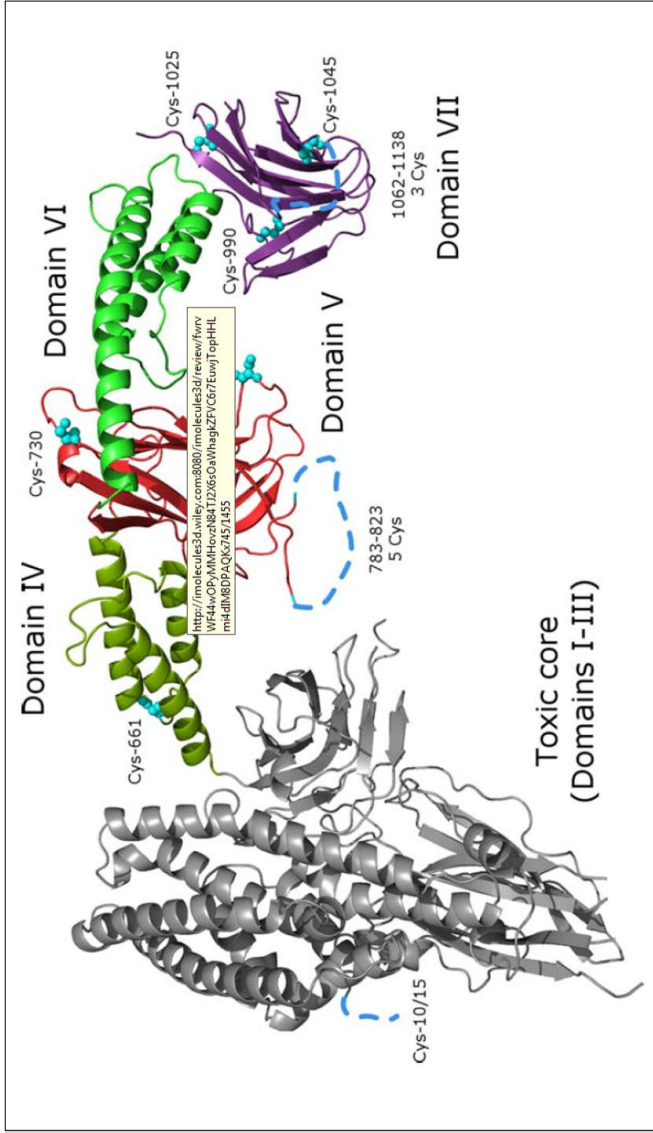
Durante o processo de ativação destas toxinas, por proteases secretadas no lúmen do intestino dos insetos, um fragmento da re-

gião N-terminal é clivado tanto em protoxinas curtas quanto em longas, uma parte importante da região C-terminal (cerca de seiscentos aminoácidos) é também digerida pelas atividades proteolíticas. A ativação resulta em um núcleo final, resistente à ação proteolítica, de 60 kDa e com uma estrutura composta de três domínios (como mostrado na figura 5).

Foi proposto que a região terminal C das protoxinas longas poderia estar envolvida na formação de cristais e que poderia não ser essencial para a ação tóxica, uma vez que é clivada durante a ativação da toxina. No entanto, é notável que a região é extremamente conservada entre todas as protoxinas Cry (De Maagd *et al.*, 2003; Crickmore *et al.*, 2017).

Evdokimov e colaboradores (2014) mostraram, pela primeira vez, a estrutura tridimensional da protoxina de Cry1Ac. A região C-terminal da protoxina é composta por mais quatro domínios além dos três que podem ser vistos nas toxinas ativas. Os novos domínios foram numerados de IV a VII. Os IV e V são compostos por  $\alpha$ -hélices e assemelham-se a domínios estruturais/de interação; os domínios V e VII são formados de cadeias  $\beta$  (figura 3). Não sendo, significativamente, diferente da estrutura das toxinas Cry ativadas.

A ação das proteínas Cry3d (toxinas Cry de três domínios) é complexa e envolve múltiplos mecanismos (Gomez *et al.*, 2014). Duas hipóteses têm sido propostas para explicar como as toxinas Cry1A agem no intestino dos insetos; uma seria pela formação de poros (figura 4) e a outra por via de sinalização (figura 5) (Bravo *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006). Essas teorias compartilham etapas iniciais, em que protoxinas Cry1A são ingeridas, solubilizadas no intestino e clivadas pela ação de proteases do intestino médio, tais como tripsina, para produzir toxinas monoméricas ativadas que se ligam à caderina com afinidade (Vadlamudi *et al.*, 1995). O modelo de sinalização sugere que as toxinas monoméricas ativadas por proteases se ligam à caderina, iniciando uma cascata de sinalização que leva à morte celular (Zhang *et al.*, 2006). Em contraste, com base nos resultados de experiências *in vitro* e bioensaios, o modelo de formação de poros propõe que os monômeros ativados por protease se ligam à caderina para facilitar a clivagem proteolítica da região N-terminal da toxina, incluindo a alfa-hélice-1 do domínio I (Gómez *et al.*, 2002; Jiménez-Juárez *et al.*, 2007). Essa clivagem induz a formação de oligômero da toxina, aumentando a



**Figura 3.**  
 Estrutura geral do  
 monômero da toxina  
 Cry1Ac, por domí-  
 nios: domínios I a III  
 (o núcleo tóxico) em  
 cinza-claro; domínio IV,  
 verde escuro; domínio  
 V, vermelho; domínio  
 VI, verde; e o domínio  
 VII, violeta (Evdokimov  
*et al.*, 2014).

afinidade de ligação desta a receptores secundários (Soberón *et al.*, 2016; Bravo *et al.*, 2017).

Em 2014, Gómez e colaboradores demonstraram que a toxina Cry1Ab, tanto em sua forma de protoxina quanto na de toxina ativada, foi capaz de ligar-se à caderina com afinidades semelhantes e que dois diferentes pré-poros foram observados interagindo com a caderina na presença de proteases intestinais do inseto. Estes pré-poros diferiram em seu tamanho, sensibilidade à temperatura, na capacidade de inserir em membranas sintéticas e nas características de poro, sugerindo que o mecanismo de ação de Cry3d é complexo e mostrando que a região da protoxina (que neste caso não foi clivada) de toxinas formadoras de poro (TFP) pode ter um papel funcional, que foi selecionado durante a evolução. A presença deste fragmento na proteína permite um mecanismo de ação alternativo que, em 2015, foi denominado de “modelo dual” por Tabashnik e seus colaboradores (figura 6).

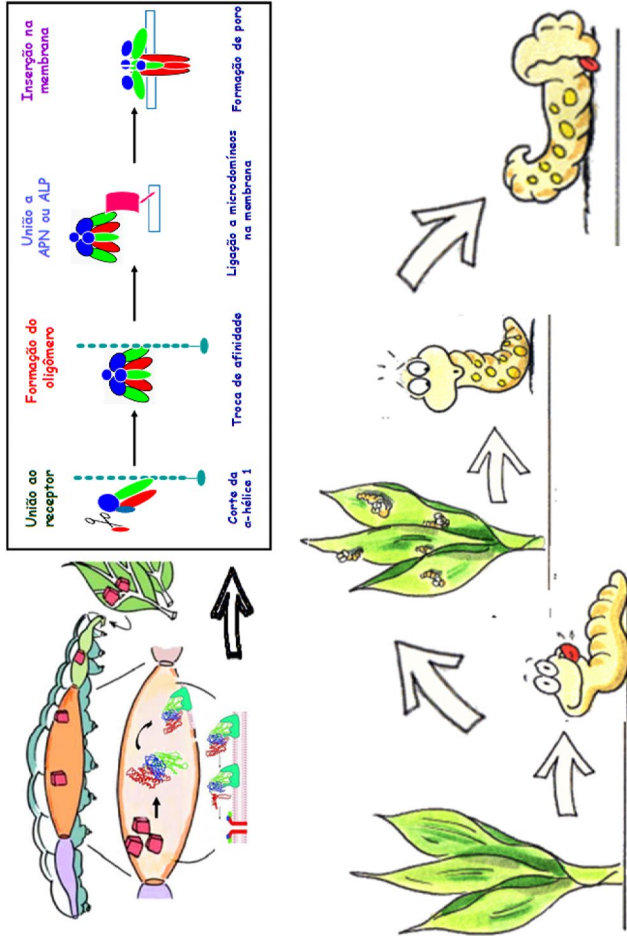
Em 2015, Tabashnik e colaboradores demonstraram que a atividade de protoxinas, inicialmente proposta por Gómez *et al.* (2014), foi muito importante para o controle de insetos resistentes a toxinas Cry. Eles testaram tanto a toxina quanto a protoxina de Cry1A para *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea* e *Diatraea saccharalis*, e os resultados mostram que as protoxinas foram mais potentes que as toxinas ativas, contradizendo o modelo clássico e suportando o modelo dual.

Em geral, quatro receptores proteicos têm sido descritos como possíveis moléculas para ligação das proteínas Cry aos intestinos dos insetos suscetíveis: uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma fosfatase alcalina ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI) e um glicoconjugado de 270 kDa (Bravo *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007). Outros experimentos têm mostrado que glicolípídeos também podem estar envolvidos como moléculas receptoras em alguns insetos e nematoides (Gómez *et al.*, 2007).

As proteínas caderinas representam uma grande família de glicoproteínas responsáveis pelo contato intercelular. São proteínas transmembranas com um domínio citoplasmático e um ectodomínio extracelular com várias repetições de caderinas, no caso do receptor Bt-R1, as repetições de caderinas são em número de doze (Vadlamudi *et al.*, 1995). Chen *et al.* (2005) demonstraram que a

**Figura 4.**

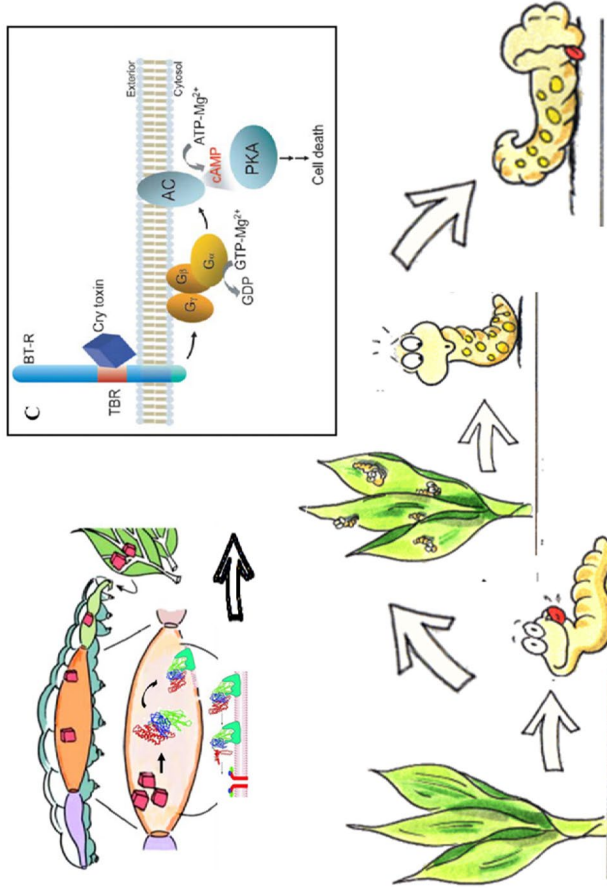
Esquema do modo de ação de toxinas Cry1A para lepidópteros proposto por Bravo. A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva, os cristais são solubilizados e ativados em proteínas monoméricas que se ligam ao primeiro receptor (caderina ou receptor glico-conjugado de 270 kDa). C – a toxina sofre mudanças conformacionais e a  $\alpha$ -hélice 1 é clivada, levando à formação do oligômero e à ligação da forma oligomérica da toxina ao segundo receptor (APN-GPI ou ALP-GPI), à inserção na plataforma de lipídeos da membrana e à formação do poro; D – levando o inseto à morte (adaptado de Bravo *et al.*, 2007).

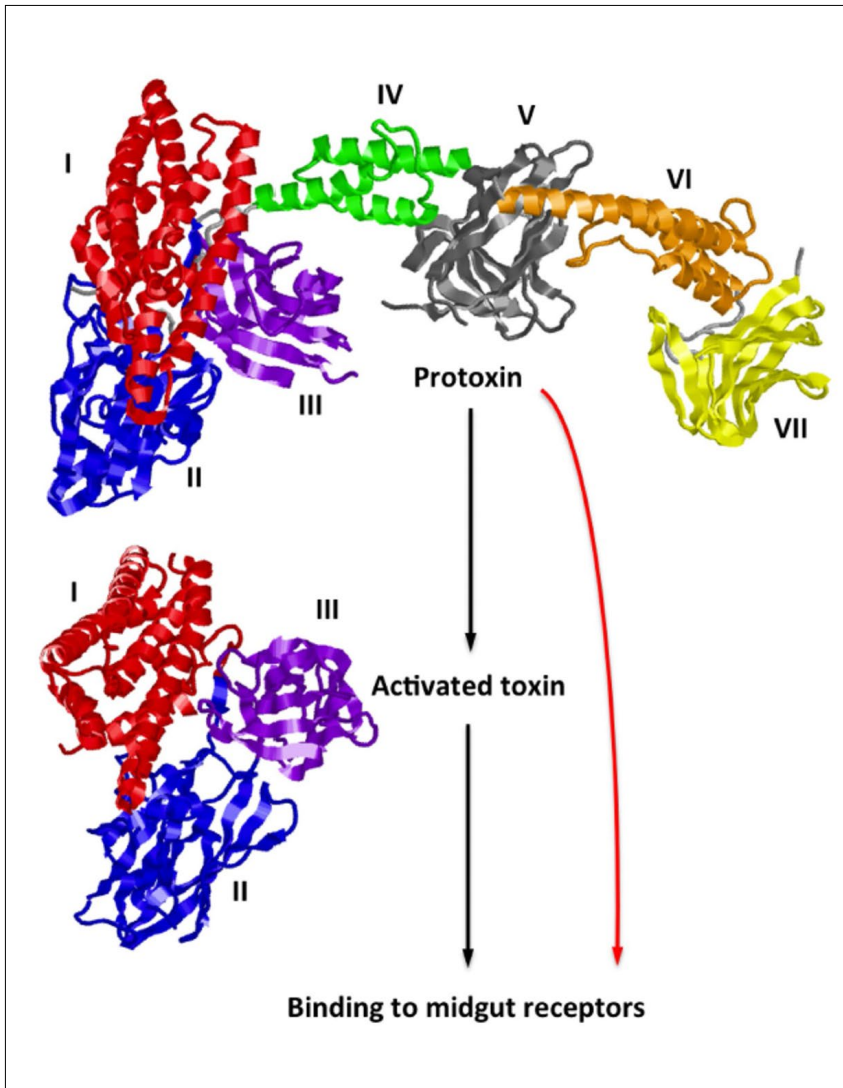


**Figura 5.**

Esquema do modo de ação de toxinas Cry1A, proposto por Zhang.

A – O inseto ingere a proteína cristal; B – no intestino médio da larva, os cristais são solubilizados e ativados; C – a toxina Cry liga-se ao receptor BT-R, estimulando a proteína G e o adeni- lato ciclase, que ativa a produção intracelular de AMPc. Desta forma, a ativação da proteína quinase A desestabiliza o citoesqueleto e os canais iônicos; D – levando o inseto à morte (Adaptado de Zhang *et al.*, 2006 e Zhang *et al.*, 2005).





**Figura 6.** Demonstração da atividade de uma protoxina em seu modelo clássico (setas pretas) e no modelo “dual” (seta vermelha). No modelo clássico, a protoxina Cry1Ac (domínios I-VII) é convertida em toxina ativa (domínios I-III) antes de ligar-se aos receptores do intestino médio do inseto para exercer sua toxicidade. No modelo “dual”, a ativação da protoxina não ocorre. Assim, os domínios de IV-VII também contribuem para a toxicidade por uma via secundária (seta vermelha), que pode ser especialmente importante para controle de insetos resistentes. Em ambos os modelos, a ligação aos receptores do intestino médio dá início a eventos em cadeia que, eventualmente, levam à morte do inseto (adaptado de Tabashnik *et al.*, 2015).

CADR de *Manduca sexta* está localizada nas microvilosidades das células do intestino médio da lagarta.

As aminopeptidases N (APN) são exopeptidases ancoradas a GPI. As APNs de vários grupos de insetos lepidópteros foram classificadas dentro de quatro grupos: APN1, APN2, APN3 e APN4. Vários estudos têm demonstrado que APN1 está relacionada com a ligação da proteína Cry1Ac (Oltean *et al.*, 1999; Herrero *et al.*, 2005; Rajagopal *et al.*, 2002 citados por Gómez *et al.*, 2007).

As APNs e as ALPs são proteínas ancoradas a GPI e estão incluídas dentro de plataformas de lipídeos (“lipid rafts”), ordenadas em espaços diferenciados dentro de microdomínios das membranas celulares. Essas plataformas de lipídeos são enriquecidas com glicoesfingolipídeos, colesterol e com proteínas ancoradas a GPI e, possivelmente, estão envolvidas em vias de transdução de sinal. Segundo Gómez *et al.* (2007), a interação de toxinas que formam poros com as proteínas Cry e plataformas de lipídeos pode resultar em eventos celulares adicionais, incluindo internalização da toxina, transdução de sinal e resposta celular.

Até o momento, já foram identificados vários receptores para diferentes insetos (tabela 3).

## **6. Aplicação e usos da bactéria *B. thuringiensis* em bioinseticidas**

Os bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* são de fácil utilização, pois são aplicados de forma similar aos produtos químicos. Não são tóxicos ao ser humano e tampouco atacam a fauna não alvo. A primeira formulação à base de *B. thuringiensis*, a esporéina, foi produzida na França, em 1938. Na década de 1950, iniciou-se a produção em larga escala, com o lançamento do bioinseticida comercial “Thuricide”, seguido por produtos similares de empresas localizadas na Rússia, na Tchecoslováquia, na Alemanha e nos Estados Unidos (De Maagd *et al.*, 1999). No princípio de 1998, existiam nos Estados Unidos mais de duzentos produtos à base



Tabela 3. Receptores para proteínas Cry.

Toxina	Inseto	Tamanho do receptor (kDa)	Identidade	Referência
Cry1Aa	<i>Bombix mori</i>	120	aminopeptidase N	Yaoi <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	210	caderina	Vadlamudi <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ab	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ab	<i>Plutella xylostella</i>	120	aminopeptidase N	Denolf <i>et al.</i> , 1997
Cry1Ac	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Knight <i>et al.</i> , 1994; Sangadala <i>et al.</i> , 1994
Cry1Ac	<i>Chloridea virescens</i>	120	aminopeptidase N	Gill <i>et al.</i> , 1995

continua

continuação

**Tabela 3.** Receptores para proteínas Cry.

Toxina	Inseto	Tamanho do receptor (kDa)	Identidade	Referência
Cry1Ac	<i>Lymantria dispar</i>	120	aminopeptidase N	Valaitis <i>et al.</i> , 1995
Cry1Ac	<i>Plutella xylostella</i>	120	aminopeptidase N	Luo <i>et al.</i> , 1997
Cry1C	<i>Manduca sexta</i>	120	aminopeptidase N	Luo <i>et al.</i> , 1996
Cry4Ba	<i>Aedes aegypti</i>	65	GPI-fosfatase alcalina	Fernández <i>et al.</i> , 2006
Cry11Aa	<i>Aedes aegypti</i>	65	GPI-fosfatase alcalina	Fernández <i>et al.</i> , 2006
Cry11Ba	<i>Anopheles quadri-maculatus</i>	120	aminopeptidase N	Abdullah <i>et al.</i> , 2006

de *B. thuringiensis* registrados (Schnepf *et al.*, 1998).

Inicialmente, tais produtos eram utilizados somente para o controle de larvas de lepidópteros. Mais tarde, principalmente a partir dos anos 1970, outras subespécies da bactéria (*israelensis*, *tenebrionis*) mostraram-se eficientes contra insetos das ordens Diptera, Coleoptera (Weiser, 1986; Edwards *et al.*, 1988). Quarenta anos mais tarde, foi verificado que estirpes anteriormente conhecidas apenas como tóxicas a dípteros poderiam controlar efetivamente coleópteros (Monnerat *et al.*, 2012), demonstrando a riqueza da espécie *B. thuringiensis* e o quanto ainda há para investigar e inovar nesse ramo.

*B. thuringiensis* é o principal princípio ativo biológico produzido e utilizado, ocupando 2% do total de inseticidas vendidos no mundo (Estruch *et al.*, 1996; Baum *et al.*, 1999) e conferindo níveis adequados e consistentes de controle no campo (Praça *et al.*, 2010). As formulações da maior parte dos produtos biológicos agrícolas existentes no mercado, é baseada nas estirpes subespécie *kurstaki* HD-1 (Harrison & Bonning, 2000) e subsp. *aizawai* (Bravo *et al.*, 2011).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) – Agrofit (2017), existem dez produtos à base de *B. thuringiensis* no mercado para o controle de pragas agrícolas: Able, Able OF, Agree, Bac-Control WP, Bactur WP, Dipel, Dipel WP, Dipel WG, Thuricide e Xentari. Esses produtos comerciais têm como princípios ativos as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai*, que são utilizados no controle de lagartas como *Helicoverpa armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja) e *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) (Lepidoptera: Gelechiidae), *P. xylostella* (traça-das-crucíferas) (Lepidoptera: Plutellidae), entre outras espécies pertencentes à ordem Lepidoptera.

Produtos comerciais para controle de larvas de mosquitos vetores de doenças também estão disponíveis. Esses produtos são registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e são formulados à base da subespécie *israelensis* em diferentes tipos de formulações: pó, granulado, tablete, suspensão concentrada. Esses produtos são altamente eficazes para controle de mosquitos como *Culex quinquefasciatus*, vetor de filariose, *Anopheles* spp.,

vetor da malária, *Aedes aegypti*, vetor dos vírus causadores de dengue, zika, chicungunha e febre amarela, dentre outros, e de *Simulium* spp. (borrachudos), vetores da oncocercose (Monnerat *et al.*, 2005). Essa bactéria tem seu uso recomendado para utilização em campanhas de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1999) e é empregada com sucesso em diversas regiões do mundo (Sanchis & Bourget, 2008).

No Brasil, ainda que hajam resultados de controle de vetores muito positivos, produtos dessa natureza são pouco utilizados (Monnerat *et al.*, 2012).

Em 2013, por conta da detecção da lagarta *H. armigera* no Brasil e pela presença de populações de *S. frugiperda* resistentes a toxinas de *B. thuringiensis*, uma parceria entre a Embrapa e o Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt) foi implementada para prospecção de uma nova estirpe visando o controle de *H. armigera* e *S. frugiperda*. Desenvolveu-se o produto INOVA-BTK, que estará em breve no mercado. Ainda em parceria com o IMAmt, foram sintetizados e estarão disponíveis em 2019 os produtos INOVA-B-ti, desenvolvido à base de *Bacillus thuringiensis israelensis* para controle de *A. aegypti*, e o INOVA-Lbs, desenvolvido à base de *L. sphaericus* para controle de larvas de *C. quinquefasciatus*.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, M.A.F.; VALAITIS, A. P.; DEAN, D.H. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11ba toxin-binding aminopeptidase from mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. **BMC Biochem.** 2006.

ABELES, F.; MORGAN, P.; SALTVEIT JR., M. **Ethylene in plant biology**, 2nd Edn, Academic Press, New York. 1992.

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: Março de 2017.

AGUIAR, R.W.S.; MARTINS, E.S.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Cry10aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields. **Bt Research**, 3, 4, 20-28, 2012.

AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; VAN SINDEREN, D. Isolation and characterization of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. **Fems Microbiol. Lett.**, 220, 127- 131, 2003.

AKIBA, T.; ABE, Y.; KITADA, S.; KUSAKA, Y.; ITO, A.; ICHIMATSU, T.; KATAYAMA, H.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; MIZUKI, E.; *et al.* Crystal structure of the parasporin-2 *Bacillus thuringiensis* toxin that recognizes cancer cells. **J. Mol. Biol.**, 386, 121–133, 2009.

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Susceptibility of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3A insecticidal protein expressed in VipCot™ cotton. **Journal of Invertebrate Pathology**, 108,76–84, 2011.

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.Y. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **J. Econ. Entomol.**, 99, 1, 164-175, 2006.

ARORA, N.; AHMAD, T.; RAJAGOPAL, R.; BHATNAGAR, R. K. A Constitutively expressed 36 Kda exochitinase from *Bacillus thuringiensis* hd-1. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, 307, 620-625, 2003.

ARONSON, A. I.; BECKMAN, W.; DUNN, P. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. **Microbiol. Rev.**, 50, 1–24, 1986.

BARBOZA-CORONA, J. E.; VAZQUEZ- ACOSTA, H.; BIDESHI, D.K.; SALCEDO- HERNANDEZ, R. Bacteriocin-like inhibitor substances produced by mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. **Arch. Microbiol.**, 187, 117-126, 2007.

BAUM, J.A; JOHNSON, T.B.; CARLTON, B.C. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. **Methods Biotechnology**, 5, 189-209, 1999.

BEL, Y.; SHEETS, J.J.; TAN, S.Y.; NARVA, K.E.; ESCRICHE, B. Toxicity and binding studies of *Bacillus thuringiensis* Cry1ac, Cry1f, Cry1c, and Cry2a proteins in the soybean pests *Anticarsia gemmatilis* and *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 83, 11, e00326-17, 2017.

BELIMOV, A. A.; HONTZEAS, N.; SAFRONOVA, V. I.; DEMCHINSKAYA, S. V.; PILUZZA, G.; BULLITTA, S.; GLICK, B. R. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). **Soil Biol. Biochem.**, 37, 241-250, 2005.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L. K.; ZANETTINI, M. H.; PASSAGLIA, L. Evaluation of genetic diversity and pgpr activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in south Brazil. **Applied Soil Ecology**, 39, 311-320, 2008.

BERGAMASCO, V.B.; MENDES, D.R.P.; FERNANDES, O.A.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus thuringiensis* Cry1ia10 and Vip3aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, 112, 152–158, 2013.

BERON C.M.; CURATTI, L.; SALERNO, G.L. New strategy for identification of novel Cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **App. Environ. Microbiol.**, 71, 2, 761–765, 2005.

BERRY, C.; CRICKMORE, N. Structural classification of insecticidal proteins—Towards an *in silico* characterisation of novel toxins. **J. Invertebr. Pathol.**, 142: 16–22, 2017.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, 4: 343-350, 2001.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: Gilbert, L.I.; Latrou, K.; Gill, S.S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, Vol. 6, Elsevier, New York, Usa. 2005, p. 175-206.

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

BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUÑOZ- GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochim. Biophys. Acta**, 1667, 1, 38-46, 2004.

BRAVO, A. ; GOMEZ, I. ; MENDOZA, G. ; GAYTAN, M. ; SOBERON, M. Different models of the mode of action of *Bt* 3d-Cry toxins. In: Bravo,A. (Edt), **Bt Resistance – Characterization and strategies for GM crops expressing Bacillus thuringiensis toxins**. Oxford. Cabi. 2015, p. 56-68.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry**, 41, 7, 423-431, 2011.

BRAVO, A.; PACHECO, S.; GOMEZ, I.; GARCIA-GOMEZ, B.; ONOFRE, J.; SOBERON, M. Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. In: Crickmore,N. (Edt.), **Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: characterization and use in the field of biocontrol**. Cham. Springer International Publishing. 2017, p. 53-66.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P. NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, 64, 12, 4965-4972, 1998.

BREVAULT, T.; PRUDENT, P.; VAISSAYRE, M.; CARRIERE, Y. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1ac and Cry2ab2 insecticidal proteins in four countries of the west african cotton belt. **J. Econ. Entomol.**, 102, 6, 2301-2309, 2009.

BRODERICK, N. A.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, K. F. Effect of host diet and insect source on synergy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* by Zwittermicina. **Environ. Entomol.**, 32, 387-391, 2003.

BRODERICK, N. A.; GOODMAN, R. M.; RAFFA, K. F.; HANDELSMAN, J. Synergy between Zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). **Environ. Entomol.**, 29, 101-107, 2000.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Can. J. Microbiol.**, 46, 237-245, 2000.

CHEMINI, S. Purification and partial amino acid sequence of Thuricin S, a new anti-listeria bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*. **Can. J. Microbiol.**, 53, 284-290, 2007.

CHEN, J.; BROWN, M. R.; HUA, G.; ADANG, M.J. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxin and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Cell. Tissue. Res.**, 321, 123-129, 2005.

CHEN, W.; LIU, C.; XIAO, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, Y.; LI, X.; TABASHNIK, B.E.; WU, K. A. Toxin-binding alkaline phosphatase fragment synergizes Bt toxin Cry1ac against susceptible and resistant *Helicoverpa armigera*. **Plos One**, 10, 4: E0126288, 2015.

CHEN, J.J.; YU, J.X.; TANG, L.X.; TANG M.J., SHI Y.X., PANG Y. Comparison of the expression of *Bacillus thuringiensis* fulllength and n-terminally truncated Vip3a gene in *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, 95, 310-316, 2003.

CHERIF, A.; CHEHIMI, S.; LIMEM, F.; ROKBANI, A.; HANSEN, B.M.; HENDRIKSEN, N.B.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Purification and characterization of the novel bacteriocin entomocine 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* Hd9. **J. Appl. Microbiol.**, 95, 990-1000, 2003.

CHERIF, A.; OUZARI, H.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, H.; BEN SLAMA, K.; HASSEN, A.; JAOUA, S.; BOUDABOUS, A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* Bmg1.7, a new strain isolated from soil. **Let. Appl. Microbiol.**, 32: 243-247, 2001.

CHERIF, A.; REZGUI, W.; RADDADI, N.; DAFFONCHIO, D.; BOUDABOUS, A. Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Entomocidus* Hd110. **Microbiological Research**, 163, 6, 684-692, 2008.

CIBIK, R.; CHAPOT-CHARTIER, M. P. Autolysis of dairy leuconostocs and detection of peptidoglycan hydrolases by renaturing Sds-Page. **J. Appl. Microbiol.**, 89, 862-869, 2000.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Mol. Gen. Genet.**, 243, 463-472, 1994.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Accumulation of phytohormones by plant-associated bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.**, 21, 1-18, 1995.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews/Microbiology**, 3, 777-788, 2005.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K. et al. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available From: <http://www.btnomenclature.info/> ; 2017.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. and Molec. Biol. Rev.**, 62, 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: [Http://www.biols.susx.ac.uk/home/neil\\_crickmore/bt/](Http://www.biols.susx.ac.uk/home/neil_crickmore/bt/) Acesso em: 08 maio 2015.

CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 66, 223-249, 2002.

DAMGAARD, P.; HANSEN, B.; PEDERSEN, J.; EILENBERG, J. Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. **Journal of Applied Microbiology**, 82, 253-258, 1997.



DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Essai de classification bio- chimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *B. thuringiensis*. **Entomophaga**, 7, 5-31, 1962.

DE BARJAC, H.; BONNEFOI, A. Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis*. **Entomophage**, 18, 5-17, 1973.

DE BARJAC, H.; VERON, M.; COSMAO DUMANOIR, V. Caracterisation biochimique et chronologique des souches de *Bacillus sphaericus* pathogenes ou non pour les moustiques. **Annales de Microbiologie**, 131B, 191-201, 1980.

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. **Annual Review of Genetics**, 37, 409-433, 2003.

DE MAAGD, R.A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Sciences**, 4, 9-13, 1999.

DEIKMAN, J. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. **Physiol. Plant.**, 100, 561-566, 1997.

DEL POZO, J. C.; LOPEZ-MATAS, M. A.; RAMIREZ-PARRA, E.; GUTIERREZ, C. Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiol. Plant.**, 123, 173-183, 2005.

DENOLF, P.; HENDRICKX, K.; VAN DAMME, J.; JANSSENS, S.; PEFEROEN, M.; DEGHEELE, D.; VAN RIE, J. Cloning and characterization of *Manduca sexta* and *Plutellaxylostella* midgut aminopeptidase N enzymes related to *Bacillus thuringiensis* toxin-binding proteins. **Eur. J. Biochem.**, 248, 748-761, 1997.

DONG, Y. H.; GUSTI, A. R.; ZHANG, Q.; XU, J. L.; ZHANG, L. H. Identification of quorum-quencing n-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 1754-1759, 2002.

DONG, Y. H.; WANG, L. H.; XU, J. L.; ZHANG, H. B.; ZHANG, X. F.; ZHANG, L. H. Quenching quorum-sensing dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. **Nature**, 411, 813-817, 2001.

DONOVAN, W.P.; ENGLEMAN, J.T.; DONOVAN, J.C.; BAUM, J.A.; BUNKERS, G.J.; CHI, D.J.; CLINTON, W.P.; ENGLISH, L.; HECK, G.R.; ILAGAN, O.M.; KRASOMIL-OSTERFELD, K.C.; PITKIN, J.W.; ROBERTS, J.K.; WALTERS, M.R. Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 72, 4, 713-719, 2006.

DULMAGE H. T. Insecticidal activity of Hd-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *Alesti*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 15, 232-239, 1970.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **European Patent Application** Ep O 303 426 A2, 1988.

EDWARDS, D. L.; PAYNE, J.; SOARES, G. G. Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. **U.S. Patent 4,948,734**. 1990.

EKINO, K.; OKUMURA, S.; ISHIKAWA, T.; KITADA, S.; SAITOH, H.; AKAO, T.; OKA, T.; NOMURA, Y.; OHBA, M.; SHIN, T.; MIZUKI, E. Cloning and characterization of a unique cytotoxic protein parasporin-5 produced by *Bacillus thuringiensis* A1100 strain. **Toxins**, 18, 6, 1882-1895, 2014.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; GRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3a, A Novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** (Pnas), 93, 5389-5394, 1996.

EVDOKIMOV, A.G.; MOSHIRI, F.; STURMAN, E.J.; RYDEL, T.J.; ZHENG, M.; SEALE, J.W. et al. Structure of the full-length insecticidal protein Cry1ac reveals intriguing details of toxin packaging into in vivo formed crystals. **Protein Sci.**, 23, 1491-1497, 2014.

FABRICK, J.A.; FORLOW, J.L.; HENNEBERRY, T.J. Novel pink bollworm resistance to the Bt toxin Cry 1ac: effects on mating, oviposition, larval development and survival. **J. Insect. Sci.**, 9, 24. Doi: 10.1673/031.009.2401. 2009.

FANG, Y.; LI, Z.; LIU, J.; SHU, C.; WANG, X.; ZHANG, X.; YU, X.; ZHAO, D.; LIU, G.; HU, S.; ZHANG, J.; AL-MSSALLEM, I.; YU, J. A pangenomic study of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, 38, 12, 20, 567-576, 2011.

FARKAS, J.; SEBESTA, K.; HORSKA, K.; SAMEK, Z. ; DOLLIJS, J. ; STORM, F. The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. **Collect. Czech. Chem. Commun.**, 34, 1118-1120, 1969.

FAUST, R. M.; BULLA, L.A. Bacteria and their toxins as insecticides. In: E. Kurstak (Ed). **Microbial and viral pesticides**, 1982, p. 75-208.

FEDERLE, M. J.; BASSLER, B. L. Interspecies communication in bacteria. **J. Clin. Invest.**, 112, 1291-1299, 2003.

FEITELSON J. S. Novel pesticidal delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*. In : **Proceedings** of Xxvii Annual Meeting Of The Society For Invertebrate Pathology, 1994, 184. Montpellier, France.

FEITELSON, J. S.; PAYNE, J; KIM, L. *Bacillus thuringiensis* insects and beyond. **Biotechnol.**, 10, 271-275, 1992.

FERNÁNDEZ, L. E.; AIMANOVA, K.G.; GILL, S.S.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. A Gpi-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. **Biochem. J.**, 394, 77–84, 2006.

FUQUA, C.; PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acylhomoserine lactone quorum sensing. **Annu. Rev. Genet.**, 35, 439-468, 2001.

GHOSH, S.; PENTERMAN, J. N.; LITTLE, R. D.; CHAVEZ, R.; GLICK, B. R. Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. **Plant Physiol. Biochem.**, 41, 277-281, 2003.

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; FRANCIS, V. Identification, isolation, and cloning of a *Bacillus thuringiensis* Cry1ac toxin-binding protein from the midgut of the lepidopteran insect *Heliothis virescens*. **J. Biol. Chem.**, 270, 27277–27282, 1995.

GILLILAND, A.; CHAMBERS, C.E.; BONE, E.J.; ELLAR, D.J. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 4, 1509–1515, 2002.

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

GLASS, A. D. M. **Plant nutrition: an introduction to current concepts**. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, Usa. 1989.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Can. J. Micro-Biol.**, 41,109-117, 1995.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme Acc Deaminase. **Fems Microbiol. Lett.**, 251: 1-7, 2005.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIM, G.; PENROSE, D. M. **Biochemical genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**, lcp, Covent Garden, London. 1999.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. **J. Theor. Biol.**, 190, 63-68, 1998.

GLICKMANN, E.; GARDAN, L.; JACQUET, S.; HUSSAIN, S.; ELASRI, M.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Molecular Plant-Microbe Interact.**, 11, 156-162, 1998.

GOHAR, M.; PERCHAT, S. sample preparation for beta-exotoxin determination in *Bacillus thuringiensis* cultures by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Anal. Biochem.**, 298, 112-117, 2001.

GOLDBERG L. J.; MARGALIT J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti*, and *Culex pipiens*. **Mosquito News**, 37, 355-358, 1977.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **Am. J. Altern. Agr.**, 1: 51-57, 1986.

GOMEZ, I.; PARDO-LOPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L.E.; PEREZ, C.; SANCHEZ, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, 28, 169-173, 2007.

GOMEZ, I.; SÁNCHEZ, J.; MIRANDA, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **Febs Lett.**, 513, 2-3, 242-246, 2002.

GOMEZ, I.; SANCHEZ, J.; MUNOZ-GARAY, C.; MATUS, V.; GILL, S.S.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1a toxins are versatile-proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochemical Journal**, 459, 383-396, 2014.

GOODAY, G. W. Physiology of microbial degradation of chitin and chitosan. In: Ratledge C. (Ed.), **Biochemistry of Microbial Degradation**, Kluwer, Dordrecht, 1994, p. 279-312.

GRICHKO, V. P.; GLICK, B. R. Amelioration of flooding stress by Acc Deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiol. Biochem.**, 39, 11-17, 2001.

HABIB, M.E.M.; ANDRADE, C.F.S. Bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (Edt), **Controle Microbiano de Insetos**, Fealq, Piracicaba, p. 383-446, 1998.

HANSEN, B. M.; SALAMITOU, S. Virulence of *Bacillus thuringiensis*. In: Charles, J. et al. (Eds), **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**, Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 41-64.

HARRISON, R. L.; BONNING, B. C. Genetic engineering of biocontrol agents for insects. In: Jack E. Rechaige, J.E. & Rechagl, N.A. (Edts), **Biol. and Biotechnology control of Insect Pests**. Crc Press Llc. 2000, p. 243-280.

HAYAKAWA, T.; KANAGAWA, R.; KOTANI, Y.; KIMURA, M.; YAMAGIWA, M.; YAMANE, Y.; TAKEBE, S.; SASAKI, H. Parasporin-2ab, a newly isolated cytotoxic crystal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Curr. Microbiol.**, 55, 278-283, 2007.

HERNANDEZ, C.S.; MARTINEZ, C.; PORCAR, M.; CABALLERO, P.; FERRE, J. Correlation between serovars of *Bacillus thuringiensis* and type I Beta-exotoxin production. **J. Invertebr. Pathol.**, 82, 57-62, 2003.

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

HOFFMASTER, A. R.; RAVEL, J.; RASKO, D. A.; CHAPMAN, G. D.; CHUTE, M. D.; MARSTON, C. K.; DE, B. K.; SACCHI, C. T.; FITZGERALD, C.; MAYER, L. W.; MAIDEN, M. C. J.; PRIEST, F. G.; BARKER, M.; JIANG, L.; CER, R. Z.; RILSTONE, J.; PETERSON, S. N.; WEYANT, R. S.; GALLOWAY, D. R.; REA, T. D.; POPOVIC, T.; FRASER, C. M. identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. **Proc. Natl. Acad. Sci. Usa**, 101, 8449-8454, 2004.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Review**, 53, 2, 242-255, 1989.

HONTZEAS, N.; ZOIDAKIS, J.; GLICK, B. R; ABU-OMAR, M. M. Expression and characterization of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase from the rhizobacterium *Pseudomonas putida* Uw4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion. **Biochim. Biophys. Acta**, 1703, 11-19, 2004.

HU, X.; HANSEN, B.M.; YUAN, Z.; JOHANSEN, J.E.; EILENBERG, J.; HENDRIKSEN, N.B.; SMIDT, L.; JENSEN, G.B. Transfer and expression of the mosquitocidal plasmid Pbtaxis in *Bacillus cereus* group strains. **Fems Microbiol. Lett.**, 245, 239-247, 2005.

IBARRA, J.; RINCON, C.; ORDÚZ, S.; BENINTENDE, G.; MONNERAT, R.; REGIS, L.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from latin america with insecticidal activity against different mosquitoes species. **Journal of Environmental Microbiology**, 69, 9, 5269-5274, 2003.

ITO, A.; SASAGURI, Y.; KITADA, S.; KUSAKA, Y.; KUWANO, K.; MASUTOMI, K.; MIZUKI, E.; AKAO, T.; OHBA, M. A. *Bacillus thuringiensis* crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. **J. Biol. Chem.**, 279, 21282–21286, 2004.

IVANOVA, N.; SOROKIN, A.; ANDERSON, I.; GALLERON, N.; CANDELON, B.; KAPATRAL, V.; BHATTACHARYYA, A.; REZNIK, G.; MIKHAILOVA, N.; LAPIDUS, A.; CHU, L.; MAZUR, M.; GOLTSMAN, E.; LARSEN, N.; D'SOUZA, M.; WALUNAS, T.; GRECHKIN, Y.; PUSCH, G.; HASELKORN, R.; FONSTEIN, M.; EHRLICH, S. D.; OVERBEEK, R.; KYRPIDES, N. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. **Nature**, 423: 87–91, 2003.

JIMÉNEZ-JUÁREZ, N.; MUÑOZ-GARAY, C.; GOMEZ, I.; SAAB-RINCON, G.; DAMIAN-ALMAZO, J.Y.; GILL, S.S.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. **J. Biol. Chem.**, 282, 21222–21229, 2007.

JUNG, Y.C.; MIZUKI, E.; AKAO, T.; CÔTE, J.C. Isolation and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* strain expressing a novel crystal protein with cytotoxic activity against human cancer cells. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 65–79, 2007.

JURAT-FUENTES, J.L.; GOULD, F.L.; ADANG, M.J. Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1ac and Cry2aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, 10, 5898–5906, 2003.

KAMOUN, F. et al. Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin f4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.**, 98, 881–888, 2005.

KATAYAMA, H., KUSAKA, Y., YOKOTA, H., AKAO, T., KOJIMA, M., NAKAMURA, O., MEKADA, E.; MIZUKI, E. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*, induces Ca<sup>2+</sup> influx and a sustained elevation of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in toxin-sensitive cells. **J. Biol. Chem.**, 282, 7742–7752, 2007.

KITADA, S.; ABE, Y.; MAEDA, T.; SHIMADA, H. Parasporin-2 requires Gpianchored proteins for the efficient cytotoxic action to human hepatoma cells. **Toxicology**, 264, 80–88, 2009.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Fems Microbiol. Rev.**, 12, 1–3, 39–85, 1993.

KLEE, S.R., BRZUSKIEWICZ, E.B., NATTERMANN, H., BRÜGGEMANN, H., DUPKE, S., WOLLHERR, A., FRANZ, T., PAULI, G., APPEL, B., LIEBL, W., COUACY-HYMAN, E., BOESCH, C., MEYER, F.-D., LEENDERTZ, F.H., ELLERBROK, H., GOTTSCHALK, G., GRUNOW, R., LIESEGANG, H. The genome of a bacillus isolate causing anthrax in chimpanzees combines chromosomal properties of *B. cereus* with *B. anthracis* virulence plasmids. **Plos One** **5**, E10986, 2010.

KNIGHT, P.J.; CRICKMORE, N.; ELLAR, D.J. The receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIa(C)  $\Delta$ -Endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase **N. Mol. Microbiol.**, 11, 429– 436, 1994.

KNOWLES, B.H.; DOW, J.A.T. The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. **BioEssays**, 15, 7, 469 – 476, 1993.

KOBAYASHI, T.; SUZUKI, M.; INOUE, H.; ITAI, R.; TAKAHASHI, M.; NAKANISHI, H.; MORI, S. ; NISHIZAWA, N. Expression of iron-acquisition-related genes in iron-deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron-deficiency-responsive elements. **J. Exp. Bot.**, 56, 1305–1316, 2005.

KRIEG, A. Is The potencial pathogenicity of bacilli for insects related to production of alpha-exotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, 18, 425-426, 1971.

KRIEG, A.; HUGER, A.M.; LANGENBRUCH, G.A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer, gegenüber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. **Zeitschrift Fur Ang. Entomology.**, 96, 500-508, 1983.

KRONSTAD, J. W.; WHITELEY, H. R. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystalprotein genes. **Gene**, 43, 29-40, 1986.

KRYWIENCZYK J.; DULMAGE H.T.; FAST,P.G. Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3a,3b var. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Patology**, 31, 372-375, 1978.

LECHNER,M.; KUPKE,T.; STEFANOVIC,S.; GÖTZ,F. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol- specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. **Molecular Microbiology**, 3, 621-626, 1989.

LEE, S. J.; PARK, S. Y.; LEE, J. J.; YUM, D. Y.; KOO, B. T.; LEE, J. K. Genes encoding the N-Acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 3919-3924, 2002.

LEE, M. K.; WALTERS, F. S.; HART, H.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3a differs from that of Cry1ab D-endotoxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69: 4648-4657; 2003.

LEMES, A.R.N.; DAVOLOS, C.C.; LEGORI, P.C.B.C.; FERNANDES, O.A.; FERRE, J. et al. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3a and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Plos One** 9, 10: E107196.2014.

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. (Edts), ***Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide : theory and practice***, 1992, p.36-69.

LEVINSON, B. L.; KASYAN, K. J.; CHIU, S. S.; CURRIER, T. C.; GONZALEZ, J. M. Jr. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. **J. Bacteriol.**, 172, 3172–3179, 1990.

LIU, M.; CAI, Q. X.; LIU, H. Z.; ZHANG, B. H.; YAN, J. P.; YUAN, Z. M. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* their synergistic effects on larvicidal activity. **J. Appl. Microbiol.**, 93, 374-379, 2002.

LIU, X.Y.; RUAN, L.F.; HU, Z.F.; PENG, D.H.; CAO, S.Y.; YU, Z.N.; LIU, Y.; ZHENG, J.S.; SUN, M. Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. **J. Biol. Chem.**, 285, 39191–39200, 2010.

LIU, X.; RUAN, L.; PENG, D.; LI, L.; SUN, M.; YU, Z. Thuringiensin, a thermostable secondary metabolite from *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against a wide range of insects. **Toxins**, 6, 2229–2238, 2014.

LUO, K.; LU, Y.-J.; ADANG, M.J. A 106 Kda from of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry Ic  $\Delta$ -endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, 26, 783-791, 1996.

LUO, K.; SANGADALA, S.; MASSON, L.; MAZZ, A.; BROUSSEAU, R.; ADANG, M.J. The *Heliothis virescens* 170 Kda aminopeptidase functions as “receptor A” by mediating specific *Bacillus thuringiensis* Cry1a delta-endotoxin binding and pore formation. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 27, 735-743, 1997.

MALTHANKAR, P.A.; GUJAR, G.T. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry2ab and the inheritance of Cry2ab resistance in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders). **Indian Journal of Experimental Biology**, 54, 586-596, 2016.



MARTÍNEZ, C.; IBARRA, JE.; CABALLERO, P. Association analysis between serotype, Cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. **Journal of Invertebrate Pathology**, 90, 2, 91-97, 2005.

MARTINS, E.S.; AGUIAR, R.W.D.S.; MARTINS, N.F.; MELATTI, V.M. ; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M.; RIBEIRO, B.M.; MONNERAT, R.G. Recombinant Cry1ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, 104 , 1363–1371, 2008.

MARTINS, E.S.; MONNERAT, R.G.; QUEIROZ, P.R.; DUMAS, V.F.; BRAZ, S.V.; DE SOUZA AGUIAR, R.W., GOMES, A.C.; SÁNCHEZ, J.; BRAVO, A., RIBEIRO, B.M. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 40, 138–145, 2010.

MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B. ; DUMAS, V. F. ; SILVA-WERNECK, J. O. S. ; SONE, E. H. ; WAGA, I. C. ; COLIN, B. ; MONNERAT, R.G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Biol. Control.**, 40, 65-68, 2007.

MASALHA, J.; KOSEGARTEN, H.; ELMACI, O.; MENGEL, K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. **Biology and Fertility of Soils**, 30, 433-439, 2000.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiol. Biochem.**, 42, 565-572, 2004a.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Sci.**, 166, 525-530, 2004b.

McCLINTOCK, J.; STONE, T. B.; SJOBLAD, R. D. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. **Pest Manag. Sci.**, 45, 95–105, 1995.

MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, 55, 165-199, 2001.

MIRZA, S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (Pgp) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, 237, 1, 47–54, 2001.

MIZUKI, E.; PARK, Y. S.; SAITOH, H.; YAMASHITA, S.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; OHBA, M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 7, 625-634, 2000.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; DEMO, C.; GOMES, A. C.; FALCÃO, R.; BERRY, C. Characterization of brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, 41, 291–295, 2007.

MONNERAT, R. G.; BRAVO, A. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In: Melo, I.S. E Azevedo, J.L (Eds), **Controle Biológico**, Jaguariúna, Sp, Embrapa Meio Ambiente, 3, 163-200, 2000.

MONNERAT, R.; DIAS, D. S.; SILVA, S.F. DA; MARTINS, E. S.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40, 103-1006, 2005.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; BERRY, C. Activity of a brazilian strain of *Bacillus thuringiensis israelensis* against the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, 41, 62–67, 2012.

MONNERAT, R.; MARTINS, E. ; MACEDO, C. ; QUEIROZ, P. ; PRAÇA, L. ; SOARES, C. M. ; MOREIRA, H. ; GRISI, I. ; SILVA, J. ; SOBERON, M. ; BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1f in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **Plos One**, 10, P. E0119544, 2015.

MONNERAT, R.; SILVA, S.; DIAS, D.; MARTINS, É.; PRAÇA, L.; JONES, G.; SOARES, C.; DIAS, J.; BERRY, C. Screening of brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Entomology**, 128, 469–473, 2004.

MORA, D.; MUSACCHIO, F.; FORTINA, M. G.; SENINI, L.; MANACHINI, P. L. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. **J. Appl. Microbiol.**, 94, 561-570, 2003.

NAGAMATSU, Y.; OKAMURA, S.; SAITOU, H.; AKAO, T.; MIZUKI, E. Three Cry toxins in two types from *Bacillus thuringiensis* Strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 74, 494–498, 2010.

NAIR, J. R.; NARASIMMAN, G.; SEKAR, V. Cloning and partial characterization of zwittermicin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain Hd1. **J. Appl. Microbiol.**, 97, 495-503, 2004.

NAUTIYAL, C.S.; BHADAURIA, S.; KUMAR, P.; LAL, H.; MONDAL, R.; VERMA, D. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **Fems Microbiol Lett.**, 182, 291-296, 2000.

NORIS, J.R. The classification of *Bacillus thuringiensis*. **J.Appl.Microbiology**. 27,3,439-447, 1964.

OHBA, M.; MIZUKI, E.; UEMORI, A. Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. **Anticancer Res.**, 29, 427-433, 2009.

OKUMURA, S.; AKAO, T.; HIGUCHI, K.; SAITOH, H.; MIZUKI,E.; OHBA, M.; INOUE, K. *Bacillus thuringiensis* serovar *shandongiensis* strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cell. **Lett. Appl. Microbiol.**, 39, 89-92,2004.

OKUMURA, S., OHBA, M.; MIZUKI, E.; CRICKMORER, N.; CÔTÉ, J. C.; NAGAMATSU, Y., KITADA S.; SAKAI, H.; HARATA, K.; SHIN, T. "Parasporin Nomenclature", 2010. [Http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/](http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/) Acessado em 13 Jan 2016.

OKUMURA, S.; SAITOH, H.; ISHIKAWA, T.; INOUE, K.; MIZUKI, E. Mode of action of parasporin-4, a cytotoxic protein from *Bacillus thuringiensis*. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1808, 1476-1482, 2011.

OKUMURA, S.; SAITOH, H.; ISHIKAWA, T.; MIZUKI, E.; INOUE, K. Identification and characterization of a novel cytotoxic protein, parasporin-4, produced by *Bacillus thuringiensis* A1470 strain. **Biotechnol. Annu. Rev.**, 14, 225-252, 2008.

OLTEAN, D.I.; PULLIKUTH, A.K.; LEE, H-K.; SARJEET S. GILL, S.S. Partial purification and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin receptor a from *Heliothis virescens* and cloning of the corresponding cDNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65, 11, 4760-4766, 1999.

OSCÁRIZ J.C.; PISABARRO, A.G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. **Int. Microbiol.**, 4, 1, 13-9, 2001.

PAIK, H. D.; BAE, S. S.; PARK, S. H.; PAN, J. G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. **J. Ind. Microbiol. Biotech.**, 19, 294-298, 1997.

- PAL, S.S. Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. **Plant Soil**, 198, 169-177, 1998.
- PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, 6, 3296-3325, 2014.
- PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; RUIZ DE ESCUDERO, I.; CABALLERO, P. Molecular and insecticidal characterization of a novel Cry-related protein from *Bacillus thuringiensis* toxic against *Myzus persicae*. **Toxins**, 6, 3144-3156, 2014.
- PARK, M.; KIM, C.; YANG, J.; LEE, H.; SHIN, W.; KIM, S.; SA, T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiology Research, Jena**, 160, 2, 127-133, 2005.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68, 3795-3801, 2002.
- PRAÇA, L. B. Interações entre estirpes de *Bacillus thuringiensis* e híbridos de repolho visando o controle de *Plutella xylostella* e a promoção do crescimento vegetal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade De Brasília, 2012. 141 P. **Tese De Doutorado**.
- RADDADI, N.; CHERIF, A.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. **Annals of Microbiology**, 58, 1, 47- 52, 2008.
- RADDADI, N.; CHERIF, A.; MORA, D.; OUZARI, H.; BOUDABOUS, A.; MOLINARI, F.; DAFFONCHIO, D. The autolytic phenotype of *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.**, 97, 158-168, 2004.
- RADDADI, N.; CHERIF, A.; MORA, D.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. The autolytic phenotype of the *Bacillus cereus* group. **J. Appl. Microbiol.**, 99, 1070-1081, 2005.
- RADDADI, N.; CHERIF, A.; OUZARI, H.; MARZORATI, M.; BRUSETTI, L.; BOUDABOUS, A.; DAFFONCHIO, D. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. **Ann. Microbiol.**, 57, 481-494, 2007.
- RAFFEL, S. J.; STABB, E. V.; MILNER, J. L.; HANDELSMAN, J.. Genotypic and phenotypic analysis of zwittermicin a-producing strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology**, 142, 3425-3436, 1996.

REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SNEH, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZKALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62, 3581-3586, 1996.

REN, D.; ZUO, R.; WOOD, T. K. Quorum-sensing antagonist (5z)-4-Bromo-5-(Bromomethylene)-3-Butyl-2(5h)-Furanone influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 66, 689-695, 2005.

REYES-RAMIREZ, A.; ESCUDERO-ABARCA, B. I.; AGUILAR-USCANGA, G.; HAYWARD-JONES, P. M.; BARBOZA-CORONA, J. E. Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. **J. Food Sci.**, 69, 131-134, 2004.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soli microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, 28, 897-906, 2001.

RILEY, M. A. & WERTZ, J. E. Bactericidin: evolution, ecology and application. **Annu.Rev.Microbiol.** 56, 117-137, 2002.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advance**, 17: 319-339, 1999.

SALEEM, F.; SHAKOORI, A.R. The first Cry2ac-type protein toxic to *Helicoverpa armigera*: cloning and overexpression of Cry2ac7 gene from Sbs-Bt1 strain of *Bacillus thuringiensis*. **Toxins**, 9, 358, 2017

SAMPSON, M. N.; GOODAY, G. W. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology**, 144: 2189-2194, 1998.

SANCHIS, V.; BOURGUET, D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. **A Review. Agron. Sustain. Dev.**, 28, 11-20, 2008.

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

SCHENKEL R. G. M., FRACHON E., Identification by gas chromatographic analysis of fatty acids of *Bacillus* sp. strains isolated from Brazilian soils. **Atas. II Simposio de Controle Biologico.** Brasilia, DF. 14-18 Outubro de 1990.

SCHENKEL R. G. M, VILARINHOS P. T. R., HONDA C. S., Isolamento de nova cepa de bacilo entomopatogenico na região do Distrito Federal. In: Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, 2. **Anais**. Águas de Lindoia (SP), Outubro de 1988.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62, 775–806, 1998.

SCHUTZ, A.; GOLBIK, R.; TITTMANN, K.; SVERGUN, D. I.; KOCH, M. H. J.; HUBNER, G.; KONIG, S. Studies on structure-function relationships of indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacter cloacae*, a key enzyme of the indole acetic acid pathway. **Eur. J. Biochem.**, 270, 2322-2331, 2003.

SEDLANDER, RK.; CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N.; WHITTAN, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, 51, 873- 884, 1986.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, 215, 229-238, 2002.

SHANG, H.; CHEN, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Behavior of *Pythium torulosum* zoospores during their interaction with tobacco roots and *Bacillus cereus*. **Curr. Microbiol.**, 38, 199-204, 1999.

SHI, Y.; XU, W.; YUAN, M.; TANG, M.; CHEN, J.; PANG, Y. Expression of *vip1/vip2* genes in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and the analysis of their signal peptides. **J. Appl. Microbiol.**, 97, 757–765, 2004.

SILO-SUH, L. A.; LETHBRIDGE, B. J.; RAFFEL, S. J.; HE, H.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* Uw85. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, 2023-2030, 1994.

SILO-SUH, L. A.; STABB, E. V.; RAFFEL, S. J.; HANDELSMAN, J. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. **Curr. Microbiol.**, 37, 6-11, 1998.

SILVA, H. S. A; BETTIOL, W. Microrganismos endofíticos como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro e de promoção de crescimento. In: Bettiol, W. E Morndi, M. A. B. (Eds) **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. 2009, p. 277-288.

SILVIE, P. J.; THOMAZONI, D.; SORIA, M. F.; SARAN, P. E.; BÉLOT, J. L. **Pragas e seus danos em algodão**. Primavera do Leste, MT, 2013. 184 p. (IMAmt Boletim de identificação nº1).

SMITH, T. J.; BLACKMAN, S. A.; FOSTER, S. J. Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. **Microbiology**, 146, 249-262, 2000.

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. In: Gopalakrishnakone P. et al. (Eds) **Microbial Toxins**. 1ed.: Springer Netherlands, 2016, p. 1-13.

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

THEIS, T.; STAHL, U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. **Cell. Mol. Life Sci.**, 61, 437-455, 2004.

TRAVERS, R. S., P. A. W. MARTIN, AND C. F. REICHELDERFER. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 53, 1263-1266, 1987.

UEMORI, A., MAEDA, M., YASUTAKE, K., OHGUSHI, A., KAGOSHIMA, K., MIZUKI, E. AND OHBA, M. Ubiquity of parasporin-1 producers in *Bacillus thuringiensis* natural populations of Japan. **Naturwissenschaften**, 94, 34-39, 2007.

VADLAMUDI, R.K.; WEBER, E.; JI, I.; JI, T.H.; BULLA Jr, L.A., Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. **J. Biol. Chem.** 270, 5490-5494, 1995.

VALAITIS, A. P.; LEE, M. K.; RAJAMOCHAN, F.; DEAN, D. H. Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the gypsy moth serves as the receptor for the CryIA(c) & endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Insect Biochem. Molec. Biol.**, 25, 1143-1151, 1995.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.** 60, 2, 407-38, 1996.

VON WIREN, N.; KRODR, H.; HIDER, R.C. Hydroxylated phytosideroophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron (III). **Plant Physiol.**, 124, 1149-1158, 2000.

WANG, Y.; HU, Z.; WU, W. Different effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1ab on midgut cell transmembrane potential of *Mythimna separata* and *Agrotis ipsilon* larvae. **Toxins**, 7, 5448-5458, 2015.

WANG, C.; KNILL, E.; GLICK, B. R.; DEFAGO, G. Effect of transferring 1-Aminocyclopropoane-1-Carboxylic Acid (Acc) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain Ch40 and its gaca derivative Cha96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. **Can. J. Microbiol.**, 46, 898-907, 2000.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: Carozzi N., Koziel M. (Eds), **Advances in insect control: the role of transgenic plants**, Taylor and Francis Ltd., London, Uk, 1997, pp. 109-121.

WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; MULLINS, 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. **U.S. Patent**, 5, 770, 696, 1998.

WEI, Y.; WU, S.; YANG, Y.; WU, Y. Baseline susceptibility of field populations of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* Vip3aa toxin and lack of cross-resistance between Vip3aa and Cry toxins. **Toxins**, 9, 127, 2017.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: Krieg, A.; Huger, A. M. *Mitteilungen* (Eds), **Aus Der Biologischen Bundesanstalt Für Land Und Forstwirtschaft**, Berlin-Dahlem Heft, Paul Parey, Berlin, 233, 1986, p. 37-50.

WENBO, M.; SEBASTIANOVA, S. B.; SEBASTIAN, J.; BURD, G. I.; GUINEL, F. C.; GLICK, B. R. Prevalence of 1-Aminocyclopropane- 1-Carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. **Antoine Van Leeuwenhoek**, 83, 285-291, 2003.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J.; SALMOND, G. P. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. **Fems Microbiol. Rev.**, 25, 365-404, 2001.

WHITEHOUSE, M. E.; WILSON, L. J.; CONSTABLE, G. A. Target and non-target effects on the invertebrate community of Vip cotton, a new insecticidal transgenic. **Australian J. Agric. Res.**, 58, 273-285, 2007.

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

WHO. **Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use**. Who Document who/cds/cpc/whopes/99.2 World Health Organization, Geneva, 1999.



WILSON M. K., ABERGEL R. J., RAYMOND K. N., ARCENEUX J. E., BYERS B. R. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 348, 320–325, 2006.

WIWAT, C.; THAITHANUN, S.; PANTUWATANA, S.; BHUMIRATANA, A. Toxicity of chitinase-producing *Bacillus thuringiensis* Ssp. *kurstaki* Hd-1 (G) toward *Plutella xylostella*. **J. Invert. Pathol.**, 76, 270–277, 2000.

YAMASHITA, S.; KATAYAMA, H.; SAITOH, H.; AKAO, T.; PARK, Y.S.; MIZUKI, E.; OHBA, M.; ITO, A. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. **J. Biochem.**, 138, 663 – 672, 2005.

YAOI, K.; KADOTANI, T.; KUWANA, H.; SHINKAWA, A.; TAKAHASHI, T.; IWAHANA, H.; SATO, R. Aminopeptidase N from *Bombyx mori* as a candidate for the receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Eur. J. Biochem.**, 246, 652–657, 1997.

YASUTAKE, K.; UEMORI, A.; BINH, N.D.; MIZUKI, E.; OHBA, M. Identification parasporin genes in vietnamese isolates of *Bacillus thuringiensis*. **Z. Naturforsch** , 63, 139–143, 2008.

YU, X.; LIU, T.; SUN, Z.; GUAN, P.; ZHU, J.; WANG, S.; LI, S.; DENG, Q.; WANG, L.; ZHENG, A.; *et al.* Co-expression and synergism analysis of Vip3aa29 and Cyt2aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Curr. Microbiol.** 64, 326–331, 2012.

ZHANG, L. H. Quorum quenching and proactive host defense. **Trends Plant Sci.**, 8, 238–244, 2003.

ZHANG, X.; CANDAS, M.; GRIKO, N. B.; ROSE-YOUNG, L.; BULLA Jr., LA. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor Bt-R(1) expressed in insect cells. **Cell. Death. Differ.** 12, 1407–1416, 2005.

ZHANG, M. CANDAS, N. B. GRIKO, R. TAISSING, L. A. BULLA JR. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 103, 9897, 2006.

ZHOU, Z.; LIU, Y.; LIANG, G.; HUANG, Y.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M.; SONG, F.; ZHOU, X.; ZHANG, J. Insecticidal specificity of Cry1ah to *Helicoverpa armigera* is determined by binding of Apn1 via domain ii loops 2 and 3. **Appl. Environ. Microbiol.**, 8, 83(4): e02864-16, 2017.

# Principais pragas do algodoeiro no sistema de cultivo do cerrado

**Jacob Crosariol Netto**

IMAmt - Primavera do Leste/MT

**Guilherme Gomes Rolim**

IMAmt - Campo Verde/MT

A produção brasileira de grãos para a safra 2017/2018 está estimada em 227,9 milhões de toneladas, com estimativa de área cultivada de 61,5 milhões de hectares. A região Centro-Oeste figura nacionalmente como a maior região produtora de culturas como milho, soja e algodão (Conab, 2018). O destaque em produção observado na região Centro-Oeste só é possível por conta das condições edafoclimáticas do bioma cerrado, como temperatura elevada, predominância de relevo plano ou suavemente ondulado e precipitação média anual entre 1.200 e 1.800 mm (MMA, 2018). Condições estas que permitem a intensificação da agricultura, propiciando o cultivo de duas safras ao longo do ano; tal característica torna o cerrado uma região estratégica para o fornecimento de alimento para o planeta. Entretanto, essa intensificação promove o aumento nos surtos de alguns grupos de praga (Zhao *et al.*, 2015).

## 1. Principais pragas do algodoeiro nos cerrados brasileiros

A produção do algodoeiro pode ser afetada por diversos fatores estressantes abióticos e bióticos durante os vários estádios de desenvolvimento das plantas. Nesse sentido, algumas espécies de insetos podem causar grandes prejuízos econômicos, reduzindo a

produtividade ou diminuindo a qualidade da fibra do algodão.

Dentre as pragas classificadas como iniciais, nas últimas safras, as que mais se destacam pela ocorrência intensiva são: *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), percevejo-castanho *Scaptocoris* spp., mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), pulgão-do-algodoeiro *Aphis gossypii* (Glover, 1877) (Hemiptera: Aphididae), tripses *Frankliniella schultzei* (Trybom, 1920) e *Caliothrips* spp. (Thysanoptera: Thripidae).

Geralmente, esse grupo de pragas ganha importância por ocorrer justamente no início do ciclo do algodoeiro, ou seja, nos primeiros 45 dias de desenvolvimento das plantas. Durante o processo de alimentação, as pragas iniciais podem afetar significativamente o desenvolvimento das plantas, travando-lhes crescimento ou até mesmo ocasionando-lhes a morte. O que impacta na redução do número de plantas/metro (redução do estande).

Nesse período, além de as plântulas serem mais sensíveis, condições como distribuição irregular de chuvas (veranicos), adubações nitrogenadas e solos mais arenosos tornam o ambiente mais favorável a ocorrência desse grupo de pragas, promovendo ocorrência mais intensa e ataques mais severos.

As chamadas pragas intermediárias são as que ocorrem no meio do ciclo do algodoeiro; geralmente, o potencial de dano destas pragas é variável, ou seja, algumas lagartas e ácaros, por exemplo, preferem alimentar-se de folhas, no entanto, insetos como o bicudo-do-algodoeiro e lagartas da subfamília Heliiothinae preferem alimentar-se de estruturas reprodutivas, como botões florais, flores e maçãs presentes nas plantas do algodoeiro. Assim, esse grupo de pragas apresenta maior potencial de danos.

No cerrado brasileiro, destacam-se como pragas intermediárias lagartas pertencentes ao gênero *Spodoptera*, principalmente as espécies *S. frugiperda*, *S. eridania*, pertencentes à subfamília Heliiothinae, conhecida como lagartas-das-maçãs, *H. armigera* e *C. virescens*, a lagarta-falsa-medideira *C. includens*, algumas espécies de ácaro, com destaque para o ácaro-rajado *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (Acari: Tetranychidae), o complexo de percevejos migrantes da soja, com destaque para o percevejo-marrom *Euschistus heros* (Fabricius: 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) e principalmente o bicudo-do-algodoeiro, sendo este considerado a

principal praga da cotonicultura no país.

As pragas classificadas como tardias são as que ocorrem no final do ciclo do algodoeiro, ou seja, período próximo da colheita. A preocupação com esse grupo de pragas é que sua ocorrência nesse momento pode comprometer a qualidade da fibra, pois, geralmente, durante o processo de alimentação ocorre a eliminação de substâncias que podem sujar ou deixar a pluma com aspecto pegajoso.

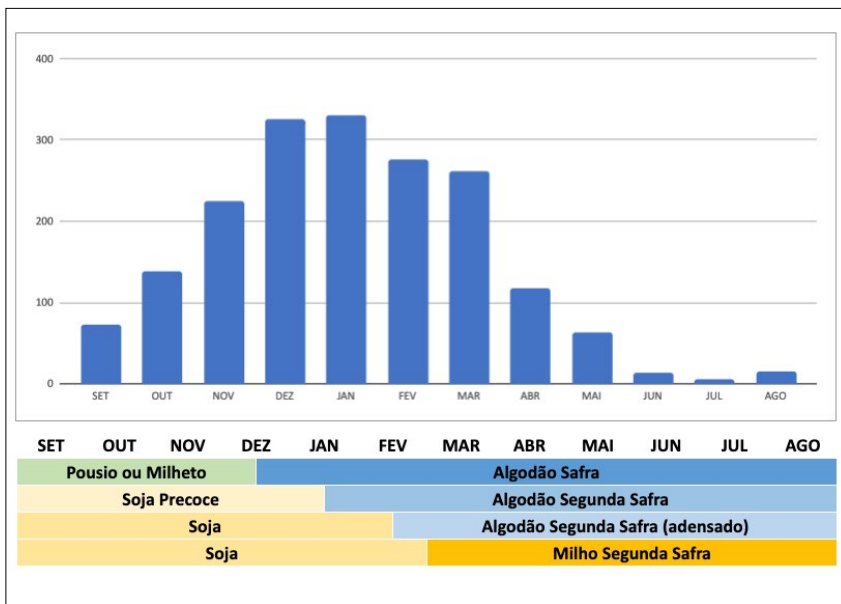
Dentre essas pragas destacam-se a mosca-branca, o pulgão-do-algodoeiro e o percevejo do gênero *Dysdercus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae), conhecido vulgarmente como percevejo-manchador.

## 2. Os sistemas de cultura do cerrado

Um dos fatores que possibilitam a taxa de produção de grãos elevada nessa região durante o ano é a formação dos chamados sistemas de cultivo (cultivos em sucessão no tempo ou ocorrendo de forma simultânea no espaço) (tabela 1). No entanto, a adoção desses sistemas favorece o aparecimento de problemas fitossanitários relacionados à ocorrência de insetos-praga e doenças, fato que se agrava quando, por conta de a maioria destas espécies de insetos apresentar aspectos bioecológicos e comportamentais caracterizados pela polifagia e elevado potencial biótico (Crosariol Netto *et al.*, 2015), podendo causar danos significativos às lavouras, bem como a cultivos vizinhos e subsequentes (Busoli *et al.*, 2014).

Além dessas características, as particularidades associadas ao agroecossistema soja-milho-algodoeiro comumente encontrado no cerrado, outros fatores podem contribuir para a ocorrência de insetos-praga, como a elevada capacidade de dispersão entre as áreas cultivadas simultaneamente em idades fenológicas diferentes ou ainda ter seu desenvolvimento e reprodução favorecidos pela cultura hospedeira (Crosariol Netto *et al.*, 2015).

Portanto, a sucessão de culturas e o plantio escalonado de diversas culturas têm enfrentado desafios por conta da oferta continuada de alimento a determinados insetos-praga. Essa situação favorece, por exemplo, o processo migratório das mariposas entre lavouras formadas por espécies vegetais semelhantes, naquelas implantadas em épocas diferentes e também entre



**Tabela 1.** Distribuição de chuvas e principais sistemas de cultivos adotados no Estado de Mato Grosso.

diferentes espécies botânicas, prolongando a sobrevivência de insetos-praga, principalmente os polípagos (Santos, 2001; Santos *et al.*, 2003; Barros & Torres, 2009; Boregas *et al.*, 2013).

Dentre os insetos beneficiados por esse sistema destacam-se os lepidópteros, principalmente as espécies pertencentes ao complexo *Spodoptera*, como *S. frugiperda* (Smith, 1797), *S. cosmioides* (Walker, 1858), *S. eridania* (Cramer, 1782) e *S. albula* (Walker, 1857). Além de lagartas pertencentes à subfamília Heliothinae, como *Chloridea virens* (Fabricius, 1781), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805), e Plusinae *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857). Essas espécies vêm se destacando ao longo das últimas safras agrícolas em decorrência do número elevado de indivíduos e a severidade dos ataques, mesmo em plantas transgênicas que expressam proteínas inseticidas (Busoli *et al.*, 2017).

### 3. Pragas do sistema

#### 3.1 Spodoptera

As lagartas pertencentes ao gênero *Spodoptera* compreendem as consideradas de grande expansão, pois se apresentam tanto nas folhas como nas estruturas reprodutivas das plantas cultivadas. Como principal característica, as lagartas desse gênero possuem um Y invertido na parte frontal da cabeça, facilitando a identificação (Gallo *et al.*, 2002; Waquil, 2003).

Dentre as lagartas pertencentes ao gênero *Spodoptera*, a que mais se adapta às condições do cerrado é *S. frugiperda* (figura 1). Segundo Barros *et al.* (2010), a espécie apresenta bom desenvolvimento e reprodução quando criada em algodoeiro, milho, soja e milheto, culturas que compõem os sistemas sucessivos de produção dos cerrados brasileiros, o que favorece a lagarta pelas sucessões simultâneas.



Figura 1. *Spodoptera frugiperda*.

Além dessas culturas, Silva *et al.* (1968) mencionam que *S. frugiperda* pode ter outros hospedeiros, como alface, almeirão, amendoim, batata-doce, berinjela, café, cítrus, couve, feijão, maracujá, dentre outras. Trata-se de uma espécie nativa das Américas, cuja distribuição vai do Uruguai e do norte da Argentina até a Flórida e o Texas, no sul dos Estados Unidos, incluindo a América Central e o Caribe (Sparks, 1979; Ashley *et al.*, 1989; Nagoshi & Meagher, 2008). Mais recentemente, a espécie foi relatada atacando cultivos no continente África (Goergen *et al.*, 2016). Assim, *S. frugiperda* é considerada uma das pragas mais importante no Brasil, onde se estima que os custos para seu controle excedam US\$ 600 milhões/ano (Ferreira Filho *et al.*, 2010).

Os adultos de *S. frugiperda* têm entre 35-40 mm de envergadura de asas, com coloração pardo-escura nas anteriores e branco-acinzentada nas posteriores. Os machos apresentam manchas mais claras nas asas anteriores, diferenciando-os da fêmea; as posturas caracterizam-se sempre por massas de ovos, localizadas preferencialmente na face adaxial das folhas, em grupos que podem conter de cinquenta a trezentos ovos (Alves *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 1995; Gallo *et al.*, 2002).

As lagartas recém-eclodidas são esbranquiçadas, possuem cápsula cefálica escura e mais larga que o corpo e apresentam mais cerdas que as lagartas em estágio larval mais avançado. No primeiro ínstar, medem 1,9 mm de comprimento, com cápsula cefálica medindo 0,3 mm de largura; já no último ínstar, têm o corpo cilíndrico, de coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, que também apresenta manchas de coloração marrom-avermelhada (Gallo *et al.*, 2002).

A duração da fase larval é de doze a trinta dias, a depender de fatores como temperatura e umidade. Ao final do período larval, as lagartas penetram na superfície do solo, onde se transformam em pupas. Inicialmente, a pupa é de coloração verde-clara, com tegumento transparente. Nessa fase, o corpo é frágil e sensível a injúrias; depois de alguns minutos, a pupa torna-se alaranjada, passando à coloração marrom-avermelhada e, próximo à emergência, a pupa torna-se escura, quase preta. Seu comprimento atinge 13-16 mm por 4,5 mm de diâmetro (Cruz, 1995).

Por não apresentar diapausa, *S. frugiperda* é uma praga de ocorrência sazonal nas áreas de clima temperado e, sob temperaturas mais altas, pode produzir até treze gerações por ano (Afonso *et al.*, 2009). Em gramíneas, como, por exemplo, o milho, *S. frugiperda* apresenta hábito desfolhador, ficando alojada e alimentando-se preferencialmente das folhas mais novas presentes no cartucho da planta. Já na cultura do algodoeiro, o que se tem observado nas últimas safras é que as lagartas são encontradas com maior frequência alojadas e alimentando-se em estruturas reprodutivas das plantas como, por exemplo, botões e maçãs.

*S. frugiperda* tem se destacado nos últimos anos como uma das principais pragas dos sistemas de cultivos adotados no cerrado, não só pelos altos índices de ocorrência, mas também pela capacidade de sobreviver em cultivos com expressão de proteínas inseticidas. Crosariol Netto *et al.* (2016) verificaram em condições de laboratório taxa de sobrevivência superior a 80% de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com cultivares WideStrike® de algodoeiro; além disso, nesse mesmo trabalho, foram constatadas taxas de sobrevivência 12% para cultivares Bollgard II® e 7% para cultivares TwinLink®. Esses dados refletem a atual condição observada a campo, em que, nas últimas safras, tem sido realizadas aplicações específicas com inseticida visando o controle de *S. frugiperda* em cultivares Bt de algodoeiro.

Portanto, o controle de *S. frugiperda* não tem se mostrado uma tarefa fácil e bem definida, pois o inseto apresenta resistência à maioria dos grupos químicos de inseticidas; atrelado a isso, o sistema de cultivo de soja-milho-algodão Bt expõe as populações de *S. frugiperda* a repetidas pressões de seleção a proteínas Bt com mesmo sítio de ação e conformação estrutural, propiciando um cenário favorável para evolução da resistência, caso as estratégias de Manejo da Resistência de Insetos não sejam efetivamente implementadas (Bernardi, 2012; Omoto *et al.*, 2016).

Outra espécie pertencente a esse gênero desponta como importante praga presente nos atuais sistemas de cultivo: *S. eridania* (figura 2), que demonstra o comportamento migratório ao passar das plantas de soja em final de ciclo para plantas invasoras conhecidas como corda-de-violão. Essas plantas invasoras ocorrem na maioria das áreas cultivadas com algodoeiro e soja



e permanecem vegetando por um período maior que as plantas cultivadas. Por essa razão, acredita-se que a disponibilidade sequencial de hospedeiros alternativos possa viabilizar o desenvolvimento e a permanência de *S. eridania* em áreas de cultivo de algodão e soja (Bernardi, 2012).



Figura 2. *Spodoptera eridania*.

### 3.2 Heliiothinae

Além de lagartas do gênero *Spodoptera*, espécies pertencentes à subfamília Heliiothinae também têm se destacado nos sistemas de cultivo adotados no cerrado nos últimos anos. Dentre elas destaca-se *Helicoverpa armigera* (figura 3), com ocorrência confirmada no Brasil desde a safra 2012/2013 (Czepak et al., 2013a; Spech et al., 2013) o que aumentou as preocupações drasticamente. Segundo Bueno e Sosa-Gómez (2014), nessa primeira safra a espécie causou perdas de US\$ 800 milhões.



Figura 3. *Helicoverpa armigera*

*H. armigera* está amplamente distribuída pelo mundo, com registro em mais de 120 plantas hospedeiras (Fitt, 1989). Atualmente, a espécie encontra-se distribuída por todo o continente americano, sendo sua presença confirmada em países como Argentina (Murua *et al.*, 2014) e, desde junho 2015, nos Estados Unidos (Hayden; Brambila, 2015).

Dentre os fatores que tornam *H. armigera* um dos principais lepidópteros-praga presentes no cerrado brasileiro, destaca-se o alto potencial reprodutivo; cada fêmea, durante o período de oviposição, que é de 5,3 dias, pode colocar de 2,2 mil até 3 mil ovos sobre as plantas hospedeiras (Naseri *et al.*, 2011; Reed, 1965).

Além disso, a espécie apresenta alta capacidade de sobrevivência em condições climáticas adversas. Segundo Fitt (1989), *H. armigera* apresenta alta capacidade de sobrevivência em ambientes com excesso de calor, frio ou seca, sendo possível ter várias gerações ao longo do ano, uma vez que o ciclo de ovo a adulto pode ser completado dentro de quatro a cinco semanas.

As mariposas fêmeas apresentam as asas posteriores amareladas, enquanto que nos machos elas são cinza-esverdeadas,

com uma metade ligeiramente mais escura no terço distal e uma pequena mancha escurecida no centro da asa. As asas posteriores são mais claras, apresentando uma borda marrom em sua extremidade apical. As fêmeas apresentam longevidade média de 11,7 dias e os machos, de 9,2 dias (Ali & Choudhury, 2009). Os adultos de *H. armigera* são fortemente atraídos por flores que produzem néctar, sendo esse recurso importante na seleção do hospedeiro, o qual também influencia sua capacidade de oviposição (Cunningham *et al.*, 1999).

Os ovos de *H. armigera* são de coloração branco-amarelada, com aspecto brilhante, tornando-se marrom-escuros próximo ao momento de eclosão da larva. A porção apical do ovo é lisa, porém, o restante de sua superfície apresenta nervuras longitudinais. O período de incubação dos ovos é, em média, de 3,3 dias, com seu comprimento variando de 0,42 mm a 0,60 mm e largura de 0,40mm a 0,55 mm (Ali & Choudhury, 2009).

Durante seu desenvolvimento larval, *H. armigera* passa por seis distintos ínstares. Os primeiros ínstares larvais apresentam coloração variando de branco-amarelada a marrom-avermelhada e cápsula cefálica entre marrom-escuro a preto; alimentam-se inicialmente das partes mais tenras das plantas, onde podem produzir um tipo de teia ou até mesmo formar um pequeno casulo. À medida que as larvas crescem, apresentam colorações diferentes, variando do amarelo-palha ao verde, além de listras de coloração marrom, lateralmente no tórax, no abdômen e na cabeça, podendo o tipo de alimentação utilizado pela lagarta influenciar em sua coloração (Ali & Choudhury, 2009).

A partir do quarto ínstar, as lagartas apresentam tubérculos abdominais escuros e bem visíveis na região dorsal do primeiro segmento abdominal, dispostos em semicírculos, aparentando formato de sela, sendo essa característica determinante para a identificação de lagartas da espécie (Matthews, 1999). Outra característica detectável nas lagartas diz respeito à textura de seu tegumento, que se apresenta com aspecto levemente coriáceo, diferindo das demais espécies de Heliiothinae que ocorrem no Brasil (Czepak *et al.*, 2013b).

A pupa da espécie apresenta coloração marrom-mogno e superfície arredondada nas partes terminais. O estágio dura entre dez e catorze dias (Ali & Choudhury, 2009). O desenvolvimento

pupal ocorre no solo e, dependendo das condições climáticas, pode entrar em diapausa (Karim, 2000).

Desde a constatação da espécie no Brasil, sua presença tem sido percebida nos sistemas de cultivos adotados no cerrado, sendo grande parte das populações observadas em cultivos de cobertura, como, por exemplo, milheto, e em meio a cultivos de algodão, milho e soja sem expressão de proteínas inseticidas.

No entanto, na última safra foram constatadas ocorrências de lagartas de *H. armigera* em talhões de algodão com expressão das proteínas Cry1Ac + Cry1F, dando indícios de uma possível seleção de população resistente às cultivares que expressam de forma conjunta essas proteínas.

Em estudos realizados pelo IMAmt, Barros *et al.* (2016), ao verificarem a eficiência dos *traits* transgênicos de algodão sobre *H. armigera*, constataram que as tecnologias WideStrike®, Bollgard II® e TwinLink® apresentavam alta taxa de controle sobre lagartas neonatas até aquela safra. Já na safra atual (2017/2018), foram observados cerca de 40% de lagartas sobreviventes até o quarto instar em cultivares de algodoeiro WideStrike® (dados não publicados). Portanto, ao que tudo indica, essa possível seleção é recente.

Nesta safra, escapes também foram observados em soja IPRO (Cry1Ac) (Instituto Phytus, 2018). Por conta da pressão de seleção exercida pelo sistema de cultivo adotado, tudo indica que os problemas ocasionados por *H. armigera* serão ainda mais frequentes no cerrado.

### 3.3 Chrysodeixis

Outra espécie favorecida pelos sistemas de cultivo adotados no cerrado brasileiro é *C. includens*, a popularmente conhecida como lagarta-falsa-medideira (figura 4). Trata-se de espécie polífaga, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo do norte dos EUA ao sul da América do Sul (Herzog, 1980; Alford & Hammond Jr., 1982). Além da cultura da soja e do algodoeiro, constatou-se sua presença em diversas culturas, como alface, feijão, fumo, girassol, tomate, entre outras (Herzog, 1980). No Brasil, *C. includens* deixou de apresentar ocorrência secundária e assumiu o *status* de praga principal nas lavouras de soja de di-

ferentes regiões do Brasil (Bueno *et al.*, 2011) como também em lavouras de algodoeiro (Specht *et al.*, 2015).



Figura 4. *Chrysodeixis includens*

Essa mudança para o patamar de praga-chave aparentemente está relacionada ao hábito que a lagarta tem de abrigar-se nas regiões medianas e inferiores do dossel das plantas, dificultando o controle com os inseticidas químicos ou biológicos, e ao uso indiscriminado de inseticidas e fungicidas, causando desequilíbrio biológico nas lavouras, principalmente por contribuir com a alta mortalidade de agentes de controle biológico (Degrande & Vivan, 2009; Sosa-Gómez *et al.*, 2010; Baldin *et al.*, 2014; Specht *et al.*, 2015).

As lagartas, ao eclodirem, são de coloração verde-clara, com listras longitudinais brancas e pontuações pretas e, quando desenvolvidas, atingem de 40 mm a 45 mm de comprimento em seu último estágio larval (Sosa-Gómez *et al.*, 2010). Apresentam dois pares de falsas pernas abdominais, deslocando-se como se estivessem medindo palmo, durante todo o estágio larval (Gallo *et al.*, 2002; Silvie *et al.*, 2007). As lagartas constroem uma teia de fios, em que se transformam em pupa, em geral na face abaxial

das folhas (Sosa-Gómez *et al.*, 2010), sendo que essa fase tem duração média de sete dias (Canerday & Arant, 1967; Mitchell, 1967).

Os adultos da espécie são mariposas com 35 mm de envergadura; as asas anteriores são de coloração escura, com duas manchas prateadas e brilhantes na parte central, e as asas posteriores são de coloração marrom (Gallo *et al.*, 2002; Sosa-Gómez *et al.*, 2010). A longevidade varia entre 6,5 e 17,9 dias (Mason & Mack, 1984; Vázquez, 1988). Fêmeas de *C. includens* ovipositam em média setecentos ovos, os quais são depositados isoladamente na face inferior das folhas e, nos dois terços superiores do dossel das plantas (Jost & Pitre, 2002; Funichello *et al.*, 2011).

Cada safra que passa, *C. includens* consolida-se como uma das principais lagartas desfolhadoras presentes no cerrado, sendo que as populações da espécie são observadas principalmente em cultivos de algodão e soja sem a expressão de proteínas inseticidas e em cultivares de algodoeiro Bollgard I®.

Essas cultivares expressam a proteína Cry1Ac de forma isolada e, ao decorrer das safras, apresentam falhas de controle para a espécie em questão. Funichello *et al.* (2013), em estudos realizados com populações de *C. includens* coletadas no Centro-Oeste brasileiro, constataram 56% de sobrevivência de lagartas alimentadas com folhas de algodão dessa tecnologia; Viana *et al.* (2014) constataram que a taxa de sobrevivência aumentou para 62% e, mais recentemente, Viana (2018) observou 73% de viabilidade de lagartas nessas cultivares. A diminuição da suscetibilidade de uma população de insetos-alvo a uma determinada proteína inseticida Cry pode ser considerada como uma evolução da resistência da praga em cultivares Bt (Tabashnik *et al.*, 2009).

Apesar de expressar a mesma proteína inseticida, as cultivares de soja Bt (IPRO) atualmente não apresentam falhas de controle para *C. includens*. Estudos realizados por Bernardi *et al.* (2012) e Viana (2018) demonstram que cultivares de soja IPRO causaram 100% de mortalidade nas lagartas logo no primeiro ínstar. A alta taxa de mortalidade é explicada pelo fato de que as cultivares de soja expressam maior quantidade de proteína inseticida que as cultivares de algodão.

Para as demais cultivares de algodoeiro (WideStrike® e Twin-Link®) não se tem observado atualmente relatos de ataque de

*C. includens* nas áreas cultivadas no cerrado brasileiro. A alta eficiência de controle das cultivares foi verificada por Tindall *et al.* (2009), Viana *et al.* (2014) e Viana (2018), que demonstram essas cultivares serem ótimas ferramentas de controle para a espécie, por conta da expressão de proteínas Cry piramidadas.

### 3.4 Bicudo-do-algodoeiro

Outra praga importante no agroecossistema do cerrado é o bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* (Boheman, 1843) (figura 5), que mesmo sendo específico do algodoeiro e não causar danos à soja e ao milho, pode ser classificado como praga do sistema, pois se mantém nele durante a entressafra do algodoeiro, em plantas rebrotadas ou germinadas no meio das lavouras de soja e milho (i. e., plantas tigueras). Essa permanência faz com que medidas antes não necessárias tenham de ser adotadas, com aplicações de inseticida nas lavouras de soja durante o período vegetativo ou na dessecação, visando controlar bicudos em plantas tigueras, onerando ainda mais a produção do sistema.



Figura 5. Bicudo-do-algodoeiro

*A. grandis* Boh. (Coleoptera: Curculionidae) possui metamorfose completa, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. A fêmea deposita seus ovos em um orifício feito na estrutura reprodutiva do algodoeiro, seja botão floral ou maçã, com preferência pela base do botão floral (Showler, 2004). Logo após a deposição do ovo, o orifício é coberto com uma substância gelatinosa translúcida, que tem função protetora.

Os botões florais com oviposição abortam entre quatro e cinco dias após o ataque. Após a eclosão, a larva completa o desenvolvimento dentro da estrutura reprodutiva atacada (Coakley *et al.*, 1969), e a pupa completa o desenvolvimento no interior dos botões florais caídos no solo (Showler & Cantú, 2005; Showler, 2008). Entretanto, quando a oviposição é realizada nas maçãs com mais de 10 mm de diâmetro, essas permanecem na planta e todo o desenvolvimento do bicudo-do-algodoeiro ocorre na estrutura reprodutiva retida à planta (Neves, 2013).

Os adultos podem viver mais de cem dias em condições de laboratório (Cross, 1973). Em condições de temperatura de 25°C a 27°C, a eclosão da larva ocorre no terceiro dia após a oviposição; esta possui três instares, sendo os dois primeiros com duração média de dois dias cada e o terceiro instar com duração média de quatro dias. O período pupal dura de quatro a seis dias, quando, então, emergem os adultos. As fêmeas jovens precisam alimentar-se por três a cinco dias antes de iniciarem a oviposição (Lloyd, 1986).

O primeiro relato do bicudo-do-algodoeiro no Brasil foi em 1983 (Barbosa *et al.*, 1983), e, desde sua entrada no país, a praga continua sendo um dos principais entraves para a expansão da cotonicultura (Azambuja & Degrande, 2014). O elevado potencial como praga é decorrente de as perdas estarem relacionadas ao desenvolvimento do inseto nas estruturas reprodutivas do algodão, ocasionando queda acentuada de botões florais e ataque de maçãs com abertura irregular dos capulhos (capulhos carimãs).

A praga foi uma das principais causas do declínio da cultura do algodão cultivado sob baixa adoção de tecnologia em todo o Nordeste brasileiro (Torres, 2008). Em cultivos empresariais, o bicudo é responsável pela maior parte das pulverizações durante a fase reprodutiva da cultura nos cerrados (Richetti *et al.*, 2004)



e nas demais regiões produtoras no mundo onde se cultiva o algodão com a presença dessa praga, como no México e nos Estados Unidos (Haney *et al.*, 2009). Fatos estes que justificaram consideráveis investimentos para sua erradicação na maioria das áreas produtoras dos Estados Unidos (Suarez *et al.*, 2000; Haney *et al.*, 2009), além da grande atenção dada à praga no contexto quarentenário nos países produtores de algodão onde o bicudo não está presente.

Além das injúrias diretas ocasionadas pela oviposição e pelo desenvolvimento da larva no interior das estruturas reprodutivas, esse comportamento torna as fases de ovo, larva e pupa protegidas, as quais seriam relativamente mais suscetíveis aos métodos de controle. Desse modo, as técnicas de controle são direcionadas para a fase adulta (Dias *et al.*, 2004; Showler, 2012). Diante disso, são necessárias várias pulverizações sequenciais em forma de baterias (i. e., pulverizações seguidas em curtos intervalos de tempo).

No cerrado, as aplicações podem variar entre 15 e 26 em uma safra direcionadas para o bicudo-do-algodoeiro, como contabilizado em algumas regiões no Estado de Mato Grosso na safra 2014/2015 (Miranda & Rodrigues, 2015); o número de aplicações elevado torna-se responsável pelo aumento nos custos de produção. Como ocorrido na safra 2015/2016, quando as perdas somadas aos custos de controle resultaram em um valor médio de US\$ 360/ha (Belot *et al.*, 2016).

Mesmo com todos os esforços para a manutenção de baixas populações da praga, o bicudo-do-algodoeiro permanece como principal ameaça à sustentabilidade do agroecossistema do cerrado, pois, além dos custos com controle e dos prejuízos diretos causados pela alimentação e pela oviposição em estruturas reprodutivas, o controle do inseto vem se tornando mais complexo por conta da proibição de alguns inseticidas eficientes, bem como relatos de baixa eficiência de grande parte dos ingredientes ativos registrados, tanto em condições de laboratório como em testes de campo (Soria *et al.*, 2013; Barros *et al.*, 2016; Cro-sariol *et al.*, 2017).

Dessa forma, há grande necessidade de novas ferramentas com o objetivo de suprir as falhas, bem como serem compatíveis com outros métodos de controle já adotados e, assim, assegurar

a sustentabilidade do sistema de cultivo no qual, muitas vezes, a cotonicultura é a principal cultura. Nesse contexto, pesquisas realizadas pelo IMAMt em parceria com a Embrapa têm o objetivo de desenvolver cultivares transgênicos de algodoeiro capazes de expressar proteínas inseticidas, capazes de atingir a fase jovem que se desenvolve dentro das estruturas reprodutivas e, com isso, suprimir a população da praga sem a necessidade de realizar numerosas aplicações de inseticida.

### 3.5 Percevejos

O sistema intensificado de cultivo adotado no cerrado mato-grossense, além de beneficiar o complexo de mastigadores (por exemplo, lepidópteros) que atacam as culturas envolvidas no sistema vem contribuindo para a manutenção das populações de alguns sugadores como percevejos e moscas-brancas. Isso ocorre principalmente nos sistemas com predominância de rotação entre soja e algodão, nos quais a importância dos sugadores vem aumentando ao longo das últimas safras por conta da migração dos insetos da soja para ao algodão após a colheita.

No caso dos percevejos, o controle é realizado com pouco critério, pois o nível de controle é desconhecido para a maioria dos migrantes em algodão e, por isso, são utilizados inseticidas neurotóxicos de espectro amplo de toxicidade elevada. Além disso, o aumento crescente no cultivo de variedades de algodoeiro que possuem genes de resistência a lepidópteros (cultivares Bt) (Céleres, 2017) vem contribuindo para a redução, em longo prazo, do número de aplicações de inseticidas não seletivos e propiciando o uso de defensivos de impacto reduzido para o controle de pragas que não são controladas pelas proteínas Cry expressas nas variedades Bt (Soria *et al.*, 2010).

Assim, a gama de percevejos fitófagos migrantes da soja vem conquistando cada vez mais importância econômica nas lavouras algodoeiras no cerrado, atingindo em algumas localidades e em alguns períodos o *status* de praga primária, da mesma forma como ocorrido em algumas áreas produtoras dos EUA após a erradicação do bicudo-do-algodoeiro e com o início do cultivo de variedades geneticamente modificadas para resistência a lepidópteros apresentarem problemas com controle de sugadores

como percevejos e moscas-branca (Torres, 2005) por conta da redução no número de aplicações, bem como da falta de eficiência dos eventos transgênicos para esse grupo de insetos.

No cerrado, três espécies de percevejos migrantes no sistema soja algodão destacam-se: o percevejo-marrom (*Euschistus heros*) (Hemiptera: Pentatomidae) (Fabricius, 1798), o percevejo-verde-pequeno (*Piezodorus guildinii*) (Hemiptera: Pentatomidae) (Westwood, 1837) e o percevejo-asa-preta (*Edessa meditabunda*) (Hemiptera: Pentatomidae) (Fabricius, 1794), pela frequência cada vez maior nas lavouras de algodoeiro, importância econômica e população elevada. Dentre esses pentatomídeos, o percevejo-marrom destaca-se como o de maior importância e mais abundante praga da soja no Brasil, tanto nas regiões mais quentes, do norte do Paraná ao Centro-Oeste (Degrande & Vivan, 2009); nas últimas safras vem aumentando a frequência de registros de *E. heros* em lavouras de algodão (*Gossypium hirsutum*) no cerrado (Soria *et al.*, 209).

Os danos diretos são causados tanto por ninfas como por adultos, ao alimentarem-se de botões florais e, principalmente, de maçãs na fase de enchimento ou causarem danos indiretos, como a depreciação da pluma por conta da inoculação de toxinas durante a alimentação (Belot & Vilela, 2017). Após o ataque, os botões florais e maçãs pequenas tornam-se amarelados e caem da planta; as maçãs maiores apresentam manchas pardo-avermelhadas e pontuações brilhantes (Belot & Vilela, 2017).

Os insetos são facilmente identificáveis, visto que os adultos são de coloração marrom-escuro, apresentando no pronoto dois prolongamentos laterais em forma de espinhos e, no final do escutelo, possuem uma mancha amarelada em forma de meia lua. A longevidade média dos adultos é de 116 dias, porém alguns podem sobreviver mais trezentos dias nas condições do cerrado (Panizzi, 1997). Isso ocorre graças à capacidade de permanecer em diapausa, estado de dormência que ocorre entre maio e novembro, quando os insetos permanecem abrigados sob a palhada sem alimentar-se ou reproduzir-se, sobrevivendo das reservas energéticas que armazenaram no corpo durante a safra (Mourão & Panizzi, 2000).

As fêmeas depositam pequenas massas de ovos sobre folhas e brácteas do algodoeiro em fileiras duplas de cor amarela, con-

tendo geralmente entre cinco e dez ovos, que apresentam uma mancha rósea próximo à eclosão das ninfas (Belot & Vilela, 2017). Esse inseto apresenta cinco estádios (ínstares) de ninfa, com duração média de três; 4,6; 3,7; 4,6 e 7,2 dias, respectivamente, podendo variar, dependendo das condições climáticas e de alimentação (Cividanes, 1992). Logo que eclodem, as ninfas medem por volta de 1,3 mm e são de cor alaranjada, com a cabeça preta. Nos primeiros ínstares, apresentam hábito gregário, permanecendo juntas sobre a massa de ovos até atingirem o segundo ínstar, quando iniciam a alimentação. Porém, é no terceiro instar que tem início a dispersão, sendo que, a partir desse momento, as ninfas tornam-se mais ativas e capazes de causar maiores injúrias à cultura (Grazia *et al.*, 1980).

O percevejo-verde *P. guildinii*, assim como o percevejo-marrom, vem ganhado destaque como praga no cerrado, por conta das populações elevadas que causam danos na soja e, posteriormente, migram para o algodão, ocasionando danos diretos pela alimentação a botões florais e maçãs do algodoeiro ou indiretos, por meio da sucção de seiva de folhas e caule. Os adultos de medem aproximadamente 9 mm de comprimento e apresentam coloração que varia de verde-claro a amarelada. Apresenta uma lista transversal marrom-avermelhada na parte dorsal do tórax, próxima à cabeça (pronoto) (Panizzi *et al.*, 2012). Os ovos são escuros, depositados em fileiras duplas, contendo em média de onze a quinze ovos por postura (Panizzi & Silva, 1977).

As ninfas passam por cinco estágios de desenvolvimento; quando recém-eclodidas, medem cerca de 1 mm e, assim como outros pentatomídeos, permanecem juntas nos primeiros ínstares. A coloração pode variar durante o desenvolvimento, sendo mais escura nos primeiros estágios e tornando-se esverdeada com o avanço do desenvolvimento (Fraga & Ochoa, 1972).

A espécie ocasionar danos maiores que os demais percevejos, visto que o comportamento de inserção e retirada do estilete *P. guildinii* causa maior lesão às paredes celulares, bem como as enzimas salivares desses percevejos parecem causar maior dano aos tecidos vegetais (Depieri & Panizzi, 2011). Já os danos indiretos são causados pela entrada de fitopatógenos através das puncturas realizadas nas estruturas reprodutivas.

Outra espécie que vem ganhando importância é o percevejo-

-asa-preta, *Edessa meditabunda*, que eventualmente pode ser observado no algodoeiro em população elevada, logo após a colheita da soja. Também pode permanecer no agroecossistema do cerrado alimentando-se no milho e em algumas plantas de cobertura, como crotalária (Belot & Vilela, 2017). Os adultos da espécie apresentam coloração verde-escura, com os hemiélitros marrom-escuros (figura 6). Os ovos são verde-claros, com cerca de 1,5 mm de comprimento e são colocados em linhas paralelas, com cerca de catorze ovos. As ninfas apresentam geralmente com verde-amarela, mas pode ser alaranjada, e passam por cinco instares, sendo que as recém-eclodidas permanecem juntas sobre os córions até atingirem o segundo instar (Sánchez *et al.*, 1999).



Figura 6. Adulto do percevejo-asa-preta *Edessa meditabunda*.

Diferentemente do observado nas espécies citadas anteriormente, *E. mediatunda* não se alimenta das estruturas reprodutivas do algodoeiro (botões florais e maçãs), adultos e ninfas alimentam-se inserindo seu estilete no caule do algodoeiro, onde realizam a sucção de seiva, o que indiretamente pode comprometer a produtividade e qualidade da produção (Belot & Vilela, 2017).

### 3.6 Mosca-branca

A mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidea) (Gennadius, 1889), é um inseto sugador, como percevejos e pulgões. Os adultos medem cerca de 2 mm (figura 7), com corpo amarelado e asas recobertas por uma pulverulência branca. Geralmente, são encontrados na parte abaxial das folhas, prontas para voar ao menor toque nas plantas. As fêmeas depositam em torno de 110 ovos isoladamente, na parte inferior das folhas mais jovens que apresentam pilosidade moderada, para que os ovos fiquem protegidos contra o vento e dessecação (Simmons, 1994). Ao eclodir, as ninfas deslocam-se na folha e fixam-se com os estiletes bucais, tornando-se imóveis; essas apresentam corpo translúcido, com formato oval acatado e cor amarela (Byrne & Bellows Jr., 1991).



Figura 7. Adulto do mosca branca.

Tanto os adultos como as ninfas causam danos diretos por conta da sucção de seiva e ocasionando engruvilhamento das folhas, bem como murchamento e envelhecimento precoce destas. A excreção em excesso e a deposição de substância açucarada sobre as folhas das partes mais baixas na planta favorecem o desenvolvimento de fungos saprófitos (fumagina), que reduzem a absorção de luz pelas folhas e prejudicam o desenvolvimento e produção da planta (Nakano, 2011). Além disso, a deposição dessa secreção sobre capulhos deprecia a qualidade da pluma.

A espécie é muitas vezes definida como um complexo de espécies, que compreende grande número de populações geneticamente variáveis (Brown *et al.*, 1995), denominadas raças (Brown & Bird, 1992) ou biótipos (Brown *et al.*, 1995; Costa & Brown, 1991). No Brasil, a importância crescente dessa praga tem sido associada à introdução e à dispersão do biótipo B, o qual se distingue do biótipo A por apresentar maior fecundidade, ampla gama de hospedeiros, resistência a vários inseticidas, capacidade de causar sintomas de fitotoxicidade e transmitir viroses, além da dispersão em distâncias relativamente longas (Brown, 2000; Brown *et al.*, 1995). A grande plasticidade genética desse biótipo propiciou a expansão e a manutenção de grandes populações, que, antes, eram migrantes apenas no sistema soja-algodão, mas que agora também passa a desenvolver-se e multiplicar-se em milho (Quintela *et al.*, 2016). A nova adaptação torna ainda mais difícil o manejo da praga, além de apontar para um futuro mais problemático, pois sua adaptação recente em milho logo a tornara capaz de manter-se e reproduzir-se em outras monocotiledôneas, como milheto e braquiária.

Vale ressaltar que, em um contexto de sistema, os cultivos do milho, milheto ou braquiária funcionavam como ferramenta importante na redução das populações de mosca-branca, uma vez que os insetos migrantes da soja ou do algodão não se multiplicavam nas monocotiledôneas e, conseqüentemente, um número menor de insetos mantinha-se para colonizar a próxima safra.

Outro fato preocupante é a entrada de outros biótipos, o que pode agravar ainda mais o cenário atual, como é o caso de *B. tabaci* Q, já relatada no Sul do Brasil (Barbosa *et al.*, 2015), sendo muito mais agressiva em termos de variedade de hospedeiros, adaptabilidade elevada por conta de maior capacidade

reprodutiva, maior potencial de infestação e menor tempo de desenvolvimento que o biótipo B (Muñiz, 2000).

Além disso, *B. tabaci* Q é mais resistente aos neonicotinoides utilizados (Nauen *et al.*, 2002) que o biótipo B. Dessa forma, a disseminação desse biótipo no cerrado implicaria em elevação dos custos de produção por conta da dificuldade de manejo, uma vez que aproximadamente 44% dos inseticidas e/ou misturas registradas para controle da praga no sistema soja-algodão no Brasil são neonicotinoides (Agrofit, 2018). Assim, muitos conceitos e técnicas de manejo devem ser revistas para evitar que pragas já disseminadas ou exóticas venham a abalar a sustentabilidade do agroecossistema desenvolvido no cerrado brasileiro.

#### 4. Considerações finais

A agricultura no cerrado torna-se cada vez mais intensificada e dinâmica, com grandes extensões de terra destinadas ao cultivo de soja, milho e algodão. O que vem contribuindo para a elevação da produção, bem como favorecendo a entrada e a permanência do Brasil entre os maiores produtores e exportadores mundiais.

No entanto, todo esse dinamismo também vem acompanhado de elevada complexidade, principalmente fitossanitária, visto que a nova estruturação nos moldes de cultivo das grandes *commodities* acabou por tornar o agroecossistema favorável ao desenvolvimento e à multiplicação de diversas espécies de pragas, sendo que muitas dessas deixaram de ser tratadas como pragas da cultura do milho, da soja ou do algodão e hoje são vistas como problemas em um contexto de sistema, colonizando simultaneamente todas as culturas envolvidas, como no caso dos lepidópteros, ou se mantendo em plantas hospedeiras em meio a outras lavouras, como o bicudo-do-algodoeiro.

Nesse contexto, as plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos ou tolerante a herbicidas são uma realidade, pois estão cada vez mais presentes dentro desse sistema de cultivo. No entanto, há a necessidade de melhor estruturação do sistema, visando o manejo da resistência, uma vez que, atualmente, nessa sucessão são utilizadas cultivares de soja, milho e algodão praticamente com expressão das mesmas proteínas inseticidas,



acelerando o processo de seleção de lepidópteros resistentes.

Dessa forma, devem ser revistos muitos conceitos sobre o manejo de pragas antes tidas como específicas ou de baixa ocorrência nas demais culturas realizadas no cerrado. Serão necessários ainda muitos estudos para entender a dinâmica populacional, bem como as novas adaptações pelas quais esse grupo de pragas vem passando para podermos adequar de maneira mais eficiente as novas ferramentas e as técnicas de manejo utilizadas no agroecossistema das grandes culturas.

## REFERÊNCIAS

AFONSO, A.P.S.; WREGE, M.; MARTINS, J.F. da S.; NAVA, D.E. Simulação do zoneamento ecológico da lagarta-do-cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, 76, 607-612, 2009.

AGROFIT (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários) 2018. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 10/05/2018.

ALFORD, A. R.; HAMMOND Jr. A. M. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybean ecosystems as determined with loop lure-baited traps [*Pseudoplusia includens*, *Rachiplusia* ou *Trichoplusia* spp.]. **Journal of Economic Entomology**, 75, 647-650, 1982.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, 4, 1, 99-106, 2009.

ALVES, S. B.; ZUCCHI, R. A.; VENDRAMIM, J. D. Pragas do milho, arroz, trigo e sorgo. In: **Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura**. Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 273-310.

ASHLEY, T.R.; WISEMAN, B.R.; DAVIS, F.M.; ANDREWS, K.L. The fall armyworm: a bibliography. **Florida Entomologist**, 72, 152-202, 1989.

AZAMBUJA, R.; P.E. DEGRANDE, P. E. Thirty years of cotton boll weevil in Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, 1, 1-34, 2014.

BALDIN, E. L. L.; LOURENÇÃO, A. L.; SCHLICK-SOUZA, E. C. Outbreaks of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in common bean and castor bean in São Paulo State, Brazil. **Bragantia**, 73, 458-461, 2014.

BARBOSA, S.; BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M. J.; BEINGOLEA, G. O. **Relatório sobre a ocorrência do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman “BollWeevil”, no Brasil e recomendações para a sua erradicação.** Campina Grande: EMBRAPA/CNPA, 1983. 12p.

BARBOSA LF; YUKI VA; MARUBAYASHI JM; MARCHI BR; PERINI FL; PAVAN MA; BARROS DR; GHANIM M; MORIONES E; NAVAS-CASTILLO J; KRAUSE-SAKATE R. First report of *Bemisia tabaci* Mediterranean (Q biotype) species in Brazil. **Pest Management Science**, 71, 501-504, 2015.

BARROS, E. M.; CROSARIOL NETTO, J. Mortalidade do bicudo-do-algodoeiro após contato em resíduo seco de diferentes inseticidas utilizados na cultura do algodoeiro-Safra 2015/2016. Cuiabá, IMAmt, 8p. **(Circular técnica n. 27)**. 2016.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B. História de vida de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro, milho, milheto e soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 7, 2009, Foz do Iguaçu. Sustentabilidade da cotonicultura brasileira e expansão dos mercados: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 433-440.

BARROS, E.M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, 39, 996-1001, 2010.

BELOT, J. L.; BARROS, E. M.; MIRANDA J. E. Riscos e oportunidades: O bicudo-do-algodoeiro. In: AMPA (eds.), **Desafios do cerrado**. Cuiabá, Associação Mato-grossense dos Produtores de Algodão, 283p. p. 77-118. 2016.

BELOT, J. L.; VILELA, P. M. C. A. **Compêndio de identificação: Problemas agrônômicos em algodoeiro e ferramentas de controle.** Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt), Cuiabá, 2017. 304 p.

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

BOREGAS, K. G. B.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES G. W. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, 72, 1,61-70, 2013.

BROWN, J. K. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-begomovirus complexes. **Virus Research**, 71, 1-2, 233-260, 2000.

BROWN, J.K.; BIRD, J. Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in Americas and the Caribbean Basin. **Plant Dis.**, 76, 220-225, 1992.

BROWN, J.K.; FROHLICH, D.R.; ROSELL, R.C. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? **Annual Review of Entomology**, 40, 511-534, 1995.

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

BUENO A. F.; SOSA-GOMÉZ D. R. The old world bollworm in the Neotropical region: the experience of Brazilian growers with *Helicoverpa armigera*. **Outlooks on Pest Management**, 25, 1-4, 2014.

BUSOLI, A.C.; CROSARIOL NETTO, J.; VIANA, D.L.; AGUIRRE-GIL, O.J.; RA-  
INHO, H.L. Manejo Integrado de Pragas: Pesquisas, avanços e desafios. In: Busoli A.C.; Souza, L.A.; Alencar, J.R.C.C.; Fraga, D.F.; Grigolli, J.F.J. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola**, VII Jaboticabal, Maria de Lourdes Brandel - ME, 2014, p.309-330.

BUSOLI, A. C. ; MICHELOTTO, M. D. ; CROSARIOL NETTO, J. ; VIANA, D. L. ;  
PESSOA, R. Atualidades no manejo de pragas resistentes aos inseticidas e às proteínas Bt em soja, milho e algodão. In: Castilho, R. C.; Barilli, D.R.; Cruzzi, C.C. (Eds.). **Tópicos em entomologia agrícola**, 1ªed. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2017, p. 123-143.

BYRNE, D. N.; BELLOWS JUNIOR, T. S. Whitefly biology. **Annual Review of Entomology**. 36, 431-457, 1991.

CANERDAY, T. D.; ARANT, F. S. Biology of *Pseudoplusia includens* and notes on biology of *Trichoplusia ni*, *Rachiplusia nu* and *Autographa biloba*. **Journal of Economic Entomology**, 60, 3, 870-871, 1967.

CELERES. **Terceiro levantamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil, Safra 2016/17**. 2017. <http://www.celeres.com.br/3o-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/> acessado em junho 2018.

CIVIDANES, F.J. Determinação das exigências térmicas de *Nezara viridula* (L., 1758), *Piezodorus guildinii* (West., 1837) e *Euschistus heros* (Fabr., 1798) (Heteroptera: Pentatomidae) visando ao seu zoneamento ecológico. 1992. 100 f. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, Piracicaba, 1992.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanha-  
mento da safra brasileira de grãos: quinto levantamento de grãos da  
safra 2017/2018, fevereiro 2018**. Brasília: Conab. 142p.

COSTA, H.S.; BROWN, J.K. Variation in biological characteristics and esterase patterns among populations of *Bemisia tabaci*, and the association of one population with silverleaf symptom induction. **Entomol. Exp. Appl.**, 61, 211-219, 1991.

CROSARIOL NETTO, J.; BARROS, E.M.; BUSOLI, A.C. Manejo de pragas em cultivos sucessivos no Centro-Oeste brasileiro. In: Busoli, A.C.; Castilho, R.C.; Andrade, D.J.; Rossi, G.D.; Vlana, D.L.; Fraga, D.F.; Souza, L.A.. (Org.). **Tópicos em Entomologia Agrícola VIII**. 1ed. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel-ME, 2015, v. 1, p. 39-49.

CROSARIOL NETTO, J.; BARROS, E. M.; SOUZA, I. M.; CALAÇA, N. C.; BUSOLI, A. C. Aspectos biológicos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com folhas de cultivares convencionais e transgênicas de algodoeiro. In. XXVI Congresso brasileiro de entomologia e IX Congresso Latino-Americano de Entomologia. **Anais ...** Maceió. p.595. 2016.

CROSARIOL NETTO, J.; ROLIM, G. G.; ARRUDA, L. S. Mortalidade do bicudo-do-algodoeiro-do-algodoeiro após contato em resíduo seco de diferentes inseticidas utilizados na cultura do algodoeiro-Safra 2016/2017. Cuiabá, IMAmt, 8p. (**Circular técnica** n. 31). 2017.

CROSS, W. H. Biology, control and eradication of the boll weevil. **Annu. Rev. Entomol.** 13: 17-46. 1973.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 1995. 45 p. (Embrapa Milho e Sorgo. **Circular Técnica** 21).

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, 89, 3, 201-207, 1999.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 43, 110-113, 2013a.

CZEPAK, C.; VIVAN, L. M.; ALBERNAZ, K. C. Praga da vez. **Cultivar: grandes culturas**, 167, 20-27, 2013b.

DEGRANDE, P. E.; VIVAN, L. M. Pragas da soja. In: Fundação MS (Ed.). **Tecnologia e Produção: Soja e Milho**. 2009. 78p.

DEPIERI, R.A.; PANIZZI, A.R. Duration of feeding and superficial and in-depth damage to soybean seed by selected species of stink bugs (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, 40, 197-203, 2011.

DIAS, S.C.; SILVA, M. C. M.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MAGALHÃES, C. P.; TEIXEIRA, F. R.; FRANCO, O. L.; FILGUEIRA, E. L. Z.; LAUMANN, R. A.; MELLO, F.; SÁ, M. F. G. Functional expression of A a-amylase/trypsin inhibitor domain from rye and its potential use in the control of cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 20. Gramado, RS. **Resumos**. Gramado: SEB, 261 p. 2004.

FERREIRA FILHO, J.B.S.; ALVES, L.R.A.; GOTTARDO, L.C.B.; GEORGINO, M. Dimensionamento do custo econômico representado por *Spodoptera frugiperda* na cultura do milho no Brasil. Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Campo Grande, MS, 48p., Brasil, julho 2010. **Anais...** Brasília, SOBER, 2010.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, 34, 17-52, 1989.

FRAGA, C.P.; OCHOA, L.H. Aspectos morfológicos y biológicos de *Piezodorus guildinii* (West.) (Hemiptera: Pent.). **IDIA- Supl.**, 28, 103-117, 1972.

FUNICHELLO, M.; GRIGOLLI, J. F. J.; BUSOLI, A. C. Distribución vertical de huevos parasitados y no parasitados de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) por *Trichogramma pretiosum* en algodón en Brasil. In: XLVI Congreso Nacional de Entomología, Cancún, México. **Entomología Mexicana**, 10, 375-378, 2011.

FUNICHELLO, M.; GRIGOLLI, J. F. J.; SOUZA, B. H. S.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; BUSOLI, A. C. Effect of transgenic and non-transgenic cotton cultivars on the development and survival of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Agricultural Research**, 8, 5424-5428, 2013.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; DE BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 920p, 2002.

GOERGEN, G.; LAVA KUMAR, P.; SANKUNG, S.B.; TOGOLA, A.; TAMO, M. First report of outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **Plos One**. 10, 9, 2016.

GRAZIA, J.; DEL VECCHIO, M.C.; BALESTIERI, F.M.P.; RAMIRO, Z.A. Estudo das ninfas de pentatomídeos (Heteroptera) que vivem sobre soja (*Glycine max* (L.) Merrill): I – *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 9, 39-51, 1980.

HANEY, P.B.; LEWIS, W.J.; LAMBERT, W.R. **Cotton production and the boll weevil in Georgia: history, cost of control, and benefits of eradication**. College of Agricultural and Environmental Sciences, The University of Georgia, Athens, GA, 2009, 60p.

HAYDEN, J.E.; BRAMBILA, J. ***Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), the Old World Bollworm**. Pest Alert, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. Report No.: FDA-CS-02039, 2015.

HERZOG, D. C. Sampling soybean looper on soybean. In: Kogan, M.; Herzog, D.C. (Ed.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag, p.140-168, 1980.

INSTITUTO PHYTUS. **Ataque de *Helicoverpa armigera* em soja intacta é confirmado**. Disponível em: <<http://iphytus.com/blog/ataque-de-helicoverpa-armigera-em-soja-intacta-e-confirmado/>> acesso: 10 de maio de 2018.

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

KARIM, S. Management of *Helicoverpa armigera*: a review and prospectus for Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 3, 8, 1213-1222, 2000.

LLOYD, E.P. Ecologia do bicudo-do-algodoeiro, p. 135-144. In S. Barbosa., M.J. Lukefahr & R.B. Sobrinho (eds.). **O bicudo-do-algodoeiro**. Brasília, EMBRAPA, DDT, 314p. 1986.

MASON, L. J.; MACK, T. P. Influence of temperature on oviposition and adult female longevity for the soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae). **Environmental Entomology**, 13, 2, 379-383, 1984.

MATTHEWS, M. **Heliothinae moths of Australia: a guide to pest bollworms and related noctuid groups**. Melbourne: CSIRO, 1999. 320 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> . Acessado em: 10/03/2018.

MIRANDA, J.E.; RODRIGUES, S. M. M. História do bicudo no Brasil. In: J.L. Bélot (eds.), **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boh., 1843)**

**nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle.** Cuiabá, Instituto Mato-grossense do Algodão, 250p. , p. 11-45, 2015.

MITCHELL, E. R. Life History of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Georgia Entomological Society**, 2, 2, 886-890, 1967.

MOURÃO, A.P.M.; PANIZZI, A.R. Diapausa e diferentes formas sazonais em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae) no Norte do Paraná. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 29, 205-218, 2000.

MUÑIZ, M. Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. **Entomologia Experimentalis e Applicata**, 95, 1, 63-70, 2000.

MURÚA, M.G.; SCALORA, F.S.; NAVARRO, F.R.; CAZADO, L.E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M.E. et al. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Fla. Entomol.**, 97: 854-856, 2014.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, 91, 546-554. 2008.

NAKANO, O. **Entomologia Econômica**, Piracicaba, 464 p. 2011.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 13, 17-26, 2011.

NAUEN, R.; STUMPF N.; ELBERT, A. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemipteran:Aleyrodidae). **Pest Manag. Sci.**, 58, 868-875, 2002.

NEVES, R.C.S. Práticas alternativas para detecção e controle do bicudo-do-algodoeiro *Anthonomus grandis* BOH. (Coleoptera: Curculionidae). **Tese** (Doutorado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 99p. 2013.

OMOTO, C. BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, 72, 9, 1727-1736, 2016.

PANIZZI, A. R. Wild hosts of pentatomids: ecological significance and role in their pest status on crops. **Annu. Rev. Entomol.**, 42,99-122, 1997.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos, p. 335-420. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros Artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

PANIZZI, A.R.; SILVA, F.A.C. Seed-sucking bugs (Heteroptera). In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. (Ed.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 295-324.

QUINTELA, ELIANE D.; ABREU, ALUANA G.; LIMA, JULYANA F. DOS S. ; MASCARIN, GABRIEL M. ; SANTOS, JARDEL BARBOSA DOS ; BROWN, JUDITH K. . Reproduction of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) B biotype in maize fields (*Zea mays* L.) in Brazil. **Pest Management Science**, 73, n/a-n/a, 2016.

REED, W. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in western Tanganyika: II. Ecology and natural and chemical control. **Bulletin of Entomological Research**, 56, 1, 127-140, 1965.

RICHETTI, A.; MELO FILHO, G.A.; LAMAS, F.M.; STAUT, L.A.; FABRÍCIO, A.C. **Estimativa do custo de produção de algodão, safra 2004/05, para Mato Grosso do Sul e Mato Grosso**. Embrapa Pecuária Oeste, Dourados, MS, 2004, 16p.

RIZZO, H.F.E. Aspectos morfológicos y biológicos de *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera, Pentatomidae). **Agronomia Tropical**, 18, 249-274, 1968.

SÁNCHEZ, M. DEL C.; DÍAZ, D.; MASELLI, M. El comportamiento y tiempo de desarrollo de la chinche *Edessa mediatubunda* (F.) (Hemiptera; Pentatomidae). **Revista de La Facultad de Agronomía**, 25, 149-158, 1999.

SANTOS, W. J. Identificação, biologia, amostragem e controle das pragas do algodoeiro. In: EMBRAPA (Ed.) **Algodão: tecnologia e produção**. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 2001. 296 p.

SANTOS, W. J.; SANTOS, K. B.; SANTOS, R. B. Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera* spp. em algodoeiro no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 4., 2003, Goiânia. **Anais...** Goiânia: [s.n.], 2003. 1 CD-ROM.

SHOWLER, A. T. Influence of adult boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) food resources on fecundity and oviposition. **J. Econ. Entomol.**, 97, 1330-1334, 2004.

SHOWLER, A. T. Longevity and egg development of adult female boll weevils fed exclusively on different parts and stages of cotton fruiting bodies. **Entomol. Exp. Appl.**, 127, 125-132, 2008.



SHOWLER, A. T. The conundrum of chemical boll weevil control in subtropical regions. In: F. Perveen (Ed.), **Insecticides: pest engineering**. Croatia: InTech, 538p. , p. 437-448 2012.

SHOWLER, A. T.; CANTÚ R. V. Intervals between boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) oviposition and square abscission, and development to adulthood in Lower Rio Grande Valley, Texas, field conditions. **Southwest. Entomol.**, 30, 161-164, 2005.

SILVA, A.G.A.; GONÇALVES, C.R.; GALVÃO, D.M.; GONÇALVES, A.J.L.; GOMES, J.; SILVA, M.N.; SIMONI, L. **Quarto catálogo de insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitoides e predadores**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v.1, part, 2, 1968.

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

SIMMONS, A.M. Oviposition on vegetables by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): temporal and leaf surface factor. **Environmental Entomology**, 23, 2, 381-389, 1994.

SORIA, M.F.; DEGRANDE, P.E.; PANIZZI, A.R. Algodoeiro invadido. **Revista Cultivar**, 131, 18-20, 2010.

SORIA, M. F., THOMAZONI, D., BATISTA, B. B., DEGRANDE, P. E. Controle químico do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*) com inseticidas alternativos ao endossulfan, organofosforados e piretroides SC. In IX Congresso Brasileiro de Algodão, Brasília, DF. **Resumos...**, CD-Rom. 2013.

SORIA, M. F.; THOMAZONI, D; MARTINS, R. R.; DEGRANDE, P. E. Stink bugs incidence on Bt cotton in Brazil. Beltwide Cotton Conferences, National Cotton Council, 2009, San Antonio, TX, EUA. **Abstracts**, p. 813-819.

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

SPARKS, A.N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, 62, 82-87, 1979.

SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 59, 343-345, 2015.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PAULAMORAES, S.V. de; YANO, A.C.S. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48, 6, 689-692, 2013.

SUAREZ, O.P.; LARSON, J.A.; ENGLISH, B.C. **Economic impacts of the boll weevil eradication program in West Tennessee**. Tennessee Agricultural Experiment Station, Knoxville, Report 00-13, 2000, 98p.

TABASHNIK, B. E.; RENSBURG, V. J. B. J.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: Definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, 102, 6, 2011-2025, 2009.

TINDALL, K. V.; SIEBERT, M. W.; LEONARD, B. R.; ALL, J.; HAILE, F.J. Efficacy of Cry1Ac:Cry1F proteins in cotton leaf tissue against fall armyworm, beet armyworm, and soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, 102, 4, 1497-1505, 2009.

TORRES, J. B. Interactions of arthropod predators and Cry1Ac-transgenic cotton. **PhD dissertation**, University of Georgia, Athens, GA. 2005.

TORRES, J.B. Controle de pragas do algodoeiro: expectativas de mudanças. **Ciência Agrícola**, 8, 1, 37-49, 2008.

VÁZQUEZ, W. R. C. Biologia comparada de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em dietas naturais e artificiais e efeito de um vírus de poliedrose nuclear na sua mortalidade e no consumo de área foliar. 1988. 164 f. **Dissertação** (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

VIANA, D. L. Dinâmica populacional, infestação natural e aspectos biológicos de *Chrysodeixis includens* (WALKER: 1857) e *Spodoptera* spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) em cultivares de soja e algodoeiro Bt que expressam proteínas Cry. 2018. 103f. **Tese** (Doutorado) Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2018.

VIANA, D. L.; CROSARIOL NETTO, J.; AGUIRREGIL, O. J.; BUSOLI, A. C. Parâmetros biológicos da lagarta falsa medeira em cultivares de algodoeiro com as proteínas Cry1Ac e Cry1F. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 49, 7, 569-572, 2014.

WAQUIL, J. M. Manejo da resistência em insetos praga. In: Pires, C. S.; Fontes, E. M. G.; Sujii, E. R. (Eds.). **Impacto ecológico de plantas geneticamente modificadas**. CNPq/Embrapa, Brasília, 2003. 237p.

ZHAO, Z. H.; OUYANG, F.; GE, F. Cropland expansion facilitated the outbreak of cereal aphids during 1951-2010 in China. **Science Bulletin**, 60, 11, 1036-1037, 2015.



## CAPÍTULO 3

# Transformação genética do algodoeiro para controle de pragas

**Leonardo Bitencourt Scoz**

IMAmt - Rondonópolis/MT

**Francisco Anghinoni**

Rondonópolis/MT

**Francisco José Lima Aragão**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília/DF

**Natália Lima de Sousa**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília/DF

**Estela Reis de Andrade**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília/DF

**Roseane Cavalcanti dos Santos**

Embrapa Algodão - Campina Grande/PB

**Carlíane Rebeca Coelho da Silva**

Embrapa Algodão - Campina Grande/PB

**Liziane Maria de Lima**

Embrapa Algodão - Campina Grande/PB

Fundamentalmente, uma planta geneticamente modificada (GM), ou transgênica, pode ser entendida como aquela que teve sua sequência de DNA alterada pelo homem através de técnicas de engenharia genética para obtenção de uma nova característica, como, por exemplo, a produção de proteínas oriundas de bactérias do solo após a introdução de alguns genes bacterianos no genoma vegetal. O desenvolvimento de plantas GM por engenharia genética teve início nos anos 1980 (Finer & McMullen, 1990; Fi-

roozabady *et al.*, 1987; Umbeck *et al.*, 1987; Davidonis & Hamilton, 1983), sendo aplicado intensamente nas décadas subsequentes às culturas de milho, soja, algodão, entre outros, dando início aos cultivos transgênicos comerciais em larga escala.

Atualmente, as plantas GM estão presentes em grande parte das lavouras de países recordistas em produção agrícola, como Brasil e Estados Unidos. Essa ampla adoção advém majoritariamente de duas características: resistência a determinados herbicidas e insetos-praga, principalmente aqueles da ordem dos Lepidópteros. Tais características facilitam significativamente o cultivo em grandes áreas, onde o controle de pragas e plantas daninhas apresenta-se como um desafio constante. Consequentemente, 78% do cultivo mundial de soja é realizado com sementes transgênicas, seguido de algodoeiro, com 64%, milho, 33%, e canola, 24% (ISAAA, 2016).

Apesar da ampla utilização, é importante salientar que a liberação comercial de cada nova tecnologia GM ocorre somente após a realização de testes extensos para a comprovação científica de sua segurança alimentar (para o consumo humano ou como ração animal) e ambiental em todos os países onde será cultivado e/ou consumido. Assim, as liberações chegam facilmente a um custo na ordem de milhões de dólares e levam cerca de dez anos.

Tratando-se exclusivamente de algodoeiro, umas das primeiras liberações comerciais voltada para o controle de pragas ocorreu em 1995, com o evento MON531, conhecido comercialmente como algodão BollgardTM, desenvolvido pela Monsanto com a introdução do gene cry1Ac da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) no genoma de algodoeiro herbáceo *Gossypium hirsutum*. Como resultado, a planta passou a produzir a proteína Cry1Ac que é tóxica somente às pragas da ordem Lepidoptera, matando as lagartas de primeiros instares de espécies como o curuquerê-do-algodão (*Alabama argillacea*), lagarta-da-maçã (*Chloridea virescens*) e a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*), antes que estas viessem a causar maiores danos.

Nessa mesma linha, em termos globais, foram desenvolvidos até o momento e liberados para comercialização 44 tecnologias de algodoeiro GM voltadas para o controle de pragas. Todos efetivos apenas contra lepidópteros e distribuídos sobre apenas três proteínas significativamente distintas: derivações de Cry1, Cry2 e VIP3A,

conforme a tabela 1. Esse número reduzido de opções deve ser levado em consideração dentro do quadro presente de seleção de pragas resistentes, tais como *Spodoptera frugiperda*, que vem se desenvolvendo sobre algumas tecnologias de algodoeiro GM.

No Brasil, as liberações comerciais de tecnologias GM para plantio e consumo ocorrem mediante o parecer favorável da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), que liberou a comercialização e o cultivo de quinze tecnologias entre 2005 e 2017, sendo nove delas voltadas para controle de lepidópteros, conforme a tabela 2.

**Tabela 1.** Tecnologias de algodoeiro GM resistentes a pragas já liberadas para comercialização em diferentes países.

Identificação do evento	Nome comercial	Genes inseridos			Praga alvo
281-24-236	não disponível	cry1F			Lepidóptera
281-24-236 x 3006-210-23 (MXB-13)	WideStrike™	cry1Ac	cry1F		Lepidóptera
281-24-236 x 3006-210-23 x COT102 x 81910	não disponível	cry1Ac	cry1F	vip3A(a)	Lepidóptera
3006-210-23	não disponível	cry1F			Lepidóptera
3006-210-23 x 281-24-236 x MON1445	WideStrike™ Roundup Ready™	cry1Ac			Lepidóptera
3006-210-23 x 281-24-236 x MON88913	Widestrike™ Roundup Ready Flex™	cry1Ac			Lepidóptera
3006-210-23 x 281-24-236 x MON88913 x COT102	Widestrike™ x Roundup Ready Flex™ x VIP-COT™	cry1Ac	cry1F	vip3A(a)	Lepidóptera
3006-210-23 x 281-24-236 x MON88913 x COT102 x 81910	não disponível	cry1Ac	cry1F	vip3A(a)	Lepidóptera

**Fonte:** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).

continua

continuação

**Tabela 1.** Tecnologias de algodoeiro GM resistentes a pragas já liberadas para comercialização em diferentes países.

Identificação do evento	Nome comercial	Genes inseridos		Praga alvo
31707	BXN™ Plus Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
31803	BXN™ Plus Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
31807 x 31808	não disponível	cry1Ac		Lepidóptera
31807	BXN™ Plus Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
31808	BXN™ Plus Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
42317	BXN™ Plus Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
BNLA-601	não disponível	cry1Ac		Lepidóptera
COT102 (IR102)	VICOT™	vip3A(a)		Lepidóptera

**Fonte:** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).

continua



**Tabela 1.** Tecnologias de algodoeiro GM resistentes a pragas já liberadas para comercialização em diferentes países.

Identificação do evento	Nome comercial	Genes inseridos			Praga alvo
COT102 x COT67B	VIPCO <sup>TM</sup>	cry1Ab		vip3A(a)	Lepidóptera
COT102 x COT67B x MON88913	VIPCO <sup>TM</sup> Roundup Ready Flex <sup>TM</sup>	cry1Ab		vip3A(a)	Lepidóptera
COT102 x MON15985	Bollgard® III	cry1Ac	cry2Ab2	vip3A(a)	Lepidóptera
COT102 x MON15985 x MON88913	Bollgard® III x Roundup Ready <sup>TM</sup> Flex <sup>TM</sup>	cry1Ac	cry2Ab2	vip3A(a)	Lepidóptera
COT102 x MON15985 x MON88913 x MON88701	não disponível	cry1Ac	cry2Ab2	vip3A(a)	Lepidóptera
COT67B (IR67B)	não disponível	cry1Ab			Lepidóptera
Event1	JK 1	cry1Ac			Lepidóptera
GFM Cry1A	não disponível	cry1Ab-Ac			Lepidóptera
GHB119	não disponível	cry2Ae			Lepidóptera

Fonte: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).

continua

continuação

**Tabela 1.** Tecnologias de algodoeiro GM resistentes a pragas já liberadas para comercialização em diferentes países.

Identificação do evento	Nome comercial	Genes inseridos		Praga alvo
GHB614 x LLCotton25 x MON15985	não disponível	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
GHB614 x MON15985	não disponível	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
GHB614 x T304-40 x GHB119	Glyto™ x Twinlink™	cry1Ab	cry2Ae	Lepidóptera
GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102	Glyto™ x Twinlink™ x VIPCOT™	cry1Ab	cry2Ae	Lepidóptera
GK12	não disponível	cry1Ab-Ac		Lepidóptera
LLCotton25 x MON15985	Fibermax™ Liberty Link™ Bollgard II™	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
MLS 9124	não disponível	cry1C		Lepidóptera
MON1076	Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera

**Fonte:** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).

continua

**Tabela 1.** Tecnologias de algodoeiro GM resistentes a pragas já liberadas para comercialização em diferentes países.

Identificação do evento	Nome comercial	Genes inseridos		Praga alvo
MON15985	Bollgard II™	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
MON15985 x MON1445	Roundup Ready™ Bollgard II™	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
MON531	Bollgard™, Ingard™	cry1Ac		Lepidóptera
MON531 x MON1445	Roundup Ready™ Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
MON757	Bollgard™	cry1Ac		Lepidóptera
MON88701 x MON88913 x MON15985	não disponível	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
MON88913 x MON15985	Roundup Ready™ Flex™ Bollgard II™	cry1Ac	cry2Ab2	Lepidóptera
SGK321	não disponível	cry1A		Lepidóptera

**Fonte:** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).

continua

continuação

**Tabela 1.** Tecnologias de algodoeiro GM resistentes a pragas já liberadas para comercialização em diferentes países.

Identificação do evento	Nome comercial	Genes inseridos		Praga alvo
T303-3	não disponível	cry1Ab		Lepidóptera
T304-40	não disponível	cry1Ab		Lepidóptera
T304-40 x GHB119	TwinLink™	cry1Ab	cry2Ae	Lepidóptera

**Fonte:** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).

Tabela 2. Tecnologias de algodoeiro GM já liberadas para comercialização no Brasil.

Nome comercial	Evento(s)	Organismo doador do(s) gene(s)	Característica Tolerante a herbicida (H) Resistência a lepidópteros (L)	Proteína(s) GM	Requerente da liberação	Ano de aprova- ção
Bollgard™	MON531	<i>Bacillus thuringiensis</i>	L	Cry1Ac	Monsanto	2005
Roundup Ready™	MON1445	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	H	CP4-EPSPS	Monsanto	2008
Liberty Link™	LLCotton25	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	H	PAT	Bayer	2008
Roundup Ready™ Bollgard™	MON531 x MON1445	<i>Bacillus thuringiensis/Agrobacterium tumefaciens</i>	H e L	Cry1Ac/ CP4-EPSPS	Monsanto	2009
WideStrike™	281-24-236 x 3006-210-23	<i>Bacillus thuringiensis/Streptomyces viridochromogenes</i>	L	Cry1Ac/ Cry1F/ PAT	Dow Agrosciences	2009

Fonte: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Última atualização: 29 ago. 2017

continua

continuação

**Tabela 2.** Tecnologias de algodoeiro GM já liberadas para comercialização no Brasil.

Nome comercial	Evento(s)	Organismo doador do(s) gene(s)	Característica Tolerante a herbicida (H) Resistência a lepidópteros (L)	Proteína(s) GM	Requerente da liberação	Ano de aprovação
Bollgard II™	MON15985	<i>Bacillus thuringiensis</i>	L	Cry2Ab2/ Cry1Ac	Monsanto	2009
Glyto™	GHB614	<i>Zea mays</i>	H	2mEPSPS	Bayer	2010
Twinlink™	T304-40 x GHB119	<i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	H e L	Cry1Ab/Cry- 2Ae/PAT	Bayer	2011
Roundup Ready™ Flex	MON88913	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	H	CP4-EPSPS	Monsanto	2011
Glyto™ x Twinlink™	GHB614 x T304-40 x GHB 119	<i>Zea mays</i> / <i>Bacillus thuringiensis</i> / <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	H e L	Cry1Ab/ Cry- 2Ae/2mepsps	Bayer	2012

Fonte: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Última atualização: 29 ago. 2017

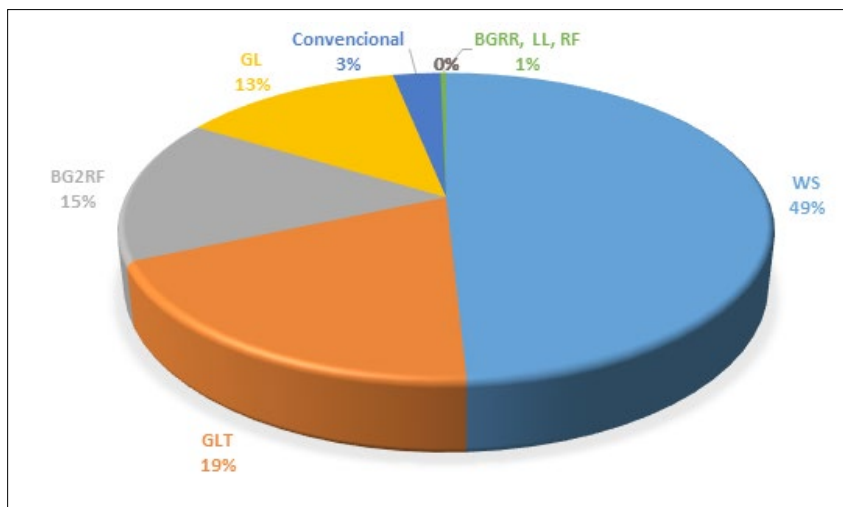
continua

Tabela 2. Tecnologias de algodoeiro GM já liberadas para comercialização no Brasil.

Nome comercial	Evento(s)	Organismo doador do(s) gene(s)	Característica Tolerante a herbicida (H) Resistência a lepidópteros (L)	Proteína(s) GM	Requerente da liberação	Ano de aprova- ção
Glyto™xLibertyLink™	GHB614 x LLCotton25	<i>Zea mays/Streptomyces viridochromogenes</i>	H	2mepsps/bar	Bayer	2012
Roundup Ready™ Flex™ Bollgard II™	MON 15985 x MON 88913	<i>Bacillus thuringiensis/Agrobacterium tumefaciens</i>	H e L	Cry1Ac/ Cry2Ab2/ CP4-EPSPS	Monsanto	2012
Roundup Ready™ Flex™ x Bollgard III™	COT102 x MON 15985 x MON 88913	<i>A. tumefaciens/B. thuringiensis, E.coli,</i>	H e L	Vip3A/CryIAc/ Cry2Ab2/ CP4 EPSPS	Monsanto	2016
Glyto™ x Twinlink™ x VIPCOT™	GHB614 x T304-40 x GHB119 x COT102	<i>Z.mays/B. thuringiensis/S. hygroscopicus</i>	H e L	2mepsps /Cry1Ab / Cry2Ae / bar / vip3A(a)	Bayer	2017
***	MON 88701	<i>Stenotrophomonas maltophilia/S. hygroscopicus</i>	H	dmo / bar	Monsanto	2017

Fonte: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Última atualização: 29 ago. 2017

Em termos de Mato Grosso, conforme levantamento realizado pelo Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAnt) na safra 2016/2017, dentro dos 629.128 ha cultivados no Estado, temos a predominância da tecnologia WideStrike™ (WS), com 49% da área plantada, seguida das tecnologias Glytol™ x Twinlink™ (GLT), com 19%, Roundup Ready™ Flex Bollgard II™ (BG2RF), com 15%, e Glytol™ (GL), com 13%. As tecnologias Roundup Ready™ Bollgard™ (BGRR), LibertyLink™ (LL) e Roundup Ready™ Flex (RF) juntas representam somente 1%, enquanto o algodoeiro convencional (não transgênico) representa 3% do total (figura 1). A divisão de mercado pode ser relativamente flutuante em relação à adoção de diferentes tecnologias de algodoeiro GM adotadas nas diferentes safras. No entanto, a grande predominância de cultivares transgênicas sobre as convencionais vem se mantendo ao longo dos anos.



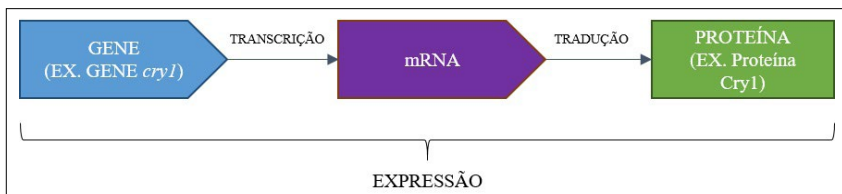
**Figura 1.** Participação de diferentes tecnologias de algodoeiro GM e convencional na safra 2016/2017 em Mato Grosso.

Contudo, antes de serem utilizadas comercialmente, cada uma dessas tecnologias de algodoeiro foi desenvolvida em um longo processo de transformação genética, da qual trataremos com maiores detalhes ao longo deste capítulo.



## TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DO ALGODOEIRO

Vários métodos de transformação genética do algodoeiro foram desenvolvidos ao longo dos últimos trinta anos. Esses métodos estão baseados em técnicas de transformação mediada por *Agrobacterium* ou por meio da inserção direta do gene de interesse no genoma vegetal, como biobalística e microinjeção. De maneira geral, tais métodos objetivam inserir um ou mais genes de interesse no genoma do algodoeiro para a obtenção de uma determinada característica, como a inserção de um gene cry para que a planta produza a proteína cry correspondente, a qual matará o inseto-praga-alvo quando este alimentar-se do tecido vegetal GM contendo grande quantidade da proteína em questão. Nesse ponto, tratando-se da relação entre gene e produção de proteína, é essencial que se compreenda o mecanismo pelo qual uma sequência de DNA, no caso o gene cry, é transcrito e processado em moléculas de RNA mensageiro, mRNA, as quais são traduzidas em proteínas (Cry), pelo processo conhecido como expressão gênica (figura 2).



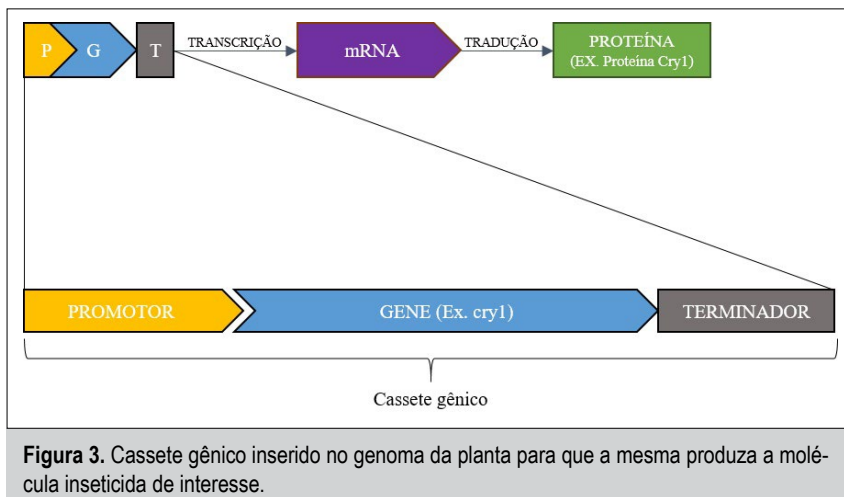
**Figura 2.** Transcrição do gene inserido e sua tradução (produção) na forma de moléculas de proteína.

Independentemente do método de transformação utilizado, é fundamental que o gene inserido seja expresso em níveis elevados nos tecidos vegetais atacados pela praga. Somente assim a molécula inseticida (proteína) estará presente em quantidade suficiente para matar o inseto antes que este ocasione danos significativos à planta.

A expressão gênica elevada depende principalmente de dois fatores: a correta composição do cassete de expressão, que comporta o (s) gene (s) de interesse, e o local da inserção deste cassete no genoma da planta no momento da transformação genética.

# 1. Cassete de expressão

O cassete de expressão é a maquinaria orgânica que fará com que o gene de interesse seja expresso nas células vegetais; ele é inserido juntamente com o gene no genoma vegetal. De forma básica, fazem parte de sua composição um promotor para ativação da expressão, o gene de interesse e uma sequência terminadora, que marca o final da transcrição do gene (figura 3). Adicionalmente, também se faz necessária a otimização dos códons genéticos (código genético), já que, muitas vezes, os genes originados de bactérias apresentam composições de bases nucleotídicas inadequadas para expressão em plantas (Perlak *et al.*, 1991).



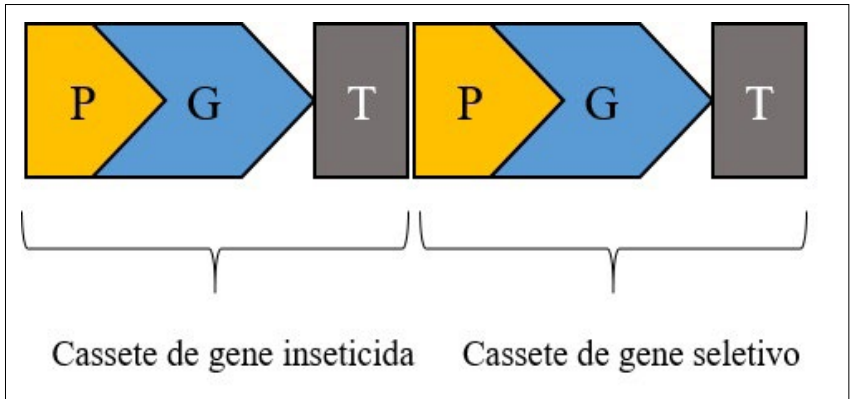
**Figura 3.** Cassete gênico inserido no genoma da planta para que a mesma produza a molécula inseticida de interesse.

Nesse contexto, é extremamente importante que o gene de interesse esteja ligado a um promotor eficiente. Promotores são sequências regulatórias que direcionam os níveis de expressão gênica de forma quantitativa, local e temporal. Essas sequências apresentam inúmeros sítios de ligação para fatores de transcrição específicos, que, por sua vez, são ativados sob diversas situações, tais como estímulos endógenos e exógenos. A ação combinatória destes determina a ativação ou a repressão da expressão gênica por meio dos promotores; portanto, os promotores são determi-

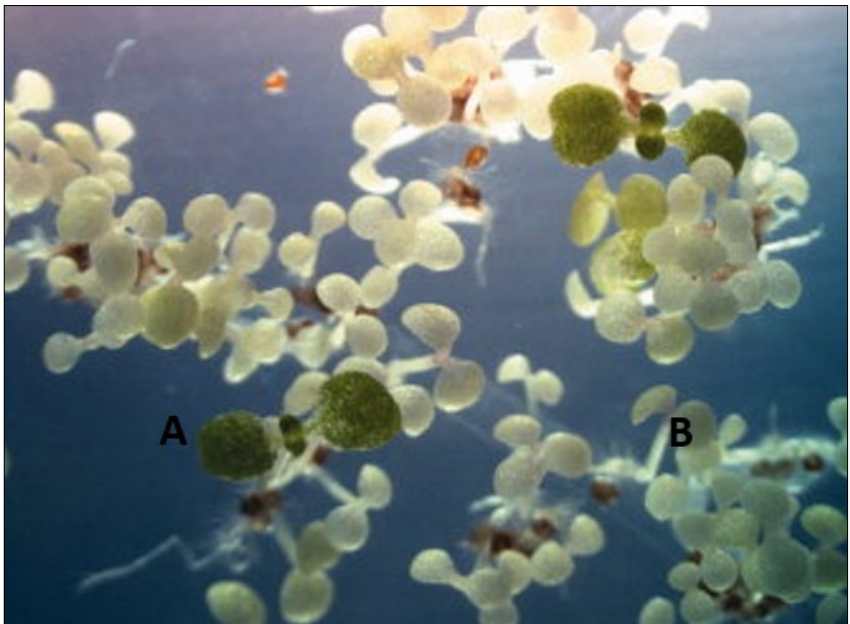
nantes para que a expressão de um gene de interesse seja efetiva.

As primeiras tecnologias de plantas GM, como algodão Bollgard™, foram desenvolvidas com o promotor CaMV35S, isolado do vírus do mosaico da couve-flor. Este promotor é constitutivo, ou constantemente ativo, com potencial para expressão gênica elevada generalizada ao longo dos tecidos vegetais em todos os estágios de desenvolvimento da planta (Odell *et al.*, 1985). Entretanto, após sua intensa utilização comercial ao longo de décadas, constatou-se que a expressão gênica dirigida pelo vetor pode decair em função da espécie vegetal, do tecido, do estágio de desenvolvimento e ambiente (Dong & Li, 2007). Não obstante, a expressão constante e inespecífica pode levar a um gasto energético desnecessário por parte da planta (Rawat *et al.*, 2011), podendo prejudicar seu desenvolvimento e sua produtividade. Logo, se vem buscando o desenvolvimento de novas tecnologias com promotores mais sofisticados e eficientes para expressão elevada em tecidos vegetais específicos, como os atacados por determinada praga, e ativos somente quando necessários. O tema será abordado novamente no item 6 deste capítulo.

Outro elemento-chave é o gene de “seleção”. Os processos de transformação possuem baixa frequência de sucesso, por isso necessitam de uma estratégia para seleção do tecido, ou planta, que recebeu o cassete em detrimento do material em que a inserção genética não ocorreu. Para tanto, juntamente com o cassete para expressão do gene inseticida também é adicionado um segundo cassete (figura 4), com um gene para tolerância ou resistência a um agente seletivo com propriedades fitotóxicas. Igualmente pode-se utilizar um gene que confira coloração ou fluorescência ao tecido transformado. Dessa forma, no primeiro caso, após a aplicação do agente seletivo, sobreviverão apenas as plantas ou tecido em que os cassetes foram inseridos (figura 5); para o segundo caso, aplica-se um agente para a coloração (figura 10) ou usam-se lâmpadas especiais. Essas estratégias possibilitam que se realize a seleção indireta, uma vez que a resistência/tolerância e/ou coloração são fortes indicativos de que o gene de interesse também foi inserido com sucesso no genoma vegetal.



**Figura 4.** Cassete de expressão do gene de inseticida fusionada ao cassete de expressão do gene seletivo. A resposta ao agente seletivo indicará que o gene inseticida foi incorporado com sucesso ao genoma vegetal



**Figura 5.** Exemplo de plantas geneticamente transformadas selecionadas por meio de agente fitotóxico. A - Planta transformada (viva); B - Planta não transformada (morta)

## **2. Efeito da inserção gênica sobre o funcionamento do cassete de expressão**

Apesar do crescente desenvolvimento de novas técnicas, os processos de transformação genética utilizados rotineiramente até então não possuem qualquer controle sobre o local onde o cassete de expressão será inserido ao longo do genoma vegetal; ele pode ser introduzido de forma truncada, em múltiplas cópias, em um local que prejudique o desenvolvimento da planta, modificando outro gene responsável por funções vitais ou até mesmo muito próximo a genes ligados às características de baixa produtividade e/ou suscetibilidade às doenças, além de outras características agronomicamente indesejadas.

Mesmo que a composição do cassete esteja muito bem otimizada, o local, o número de cópias e a integridade do cassete são determinantes para a eficiência da expressão do gene de interesse. Ainda que a expressão seja elevada, o cassete não poderá estar muito próximo a genes vegetais relacionados às características comercialmente indesejadas, que prejudicarão o desenvolvimento de novas cultivares de mercado por meio de cruzamentos. Portanto, os processos de transformação inevitavelmente demandam um grande número de tentativas, gerando centenas ou milhares de eventos de transformação até a obtenção de uma planta GM altamente eficiente.

Assim, a cada nova inserção ocorre a geração de um novo evento de transformação. Cada um dos eventos gerados precisa ser avaliado quanto aos fatores mencionados anteriormente; suas características fenotípicas desejadas, no caso o controle de determinada praga, serão definitivamente comprovadas apenas por meio de bioensaios a campo em diferentes safras e locais. Após essa etapa, um único evento selecionado entre centenas ou milhares é levado para a fase de avaliação de biossegurança e só então liberado para comercialização. Em seguida, já classificado como tecnologia, é introgridido em diferentes fundos genéticos por meio de cruzamentos convencionais, gerando inúmeras cultivares de mercado.

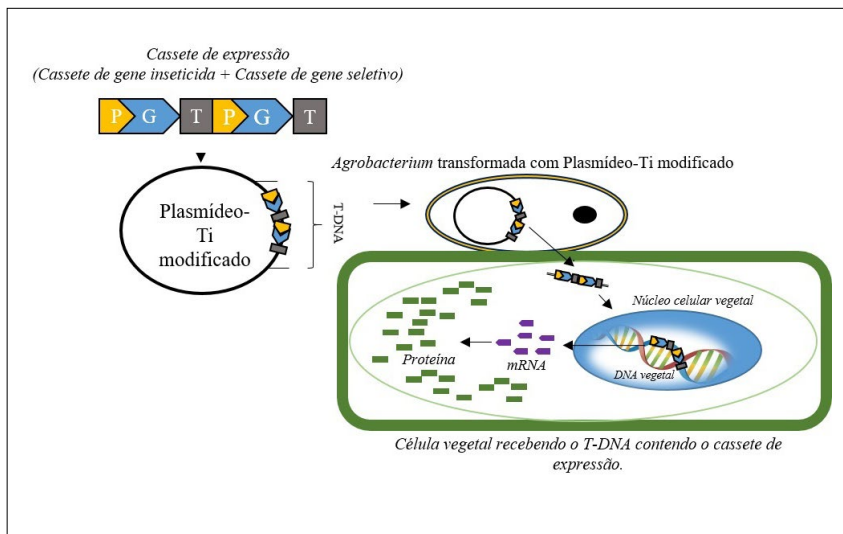
### 3. Métodos de transformação por *Agrobacterium*

Os sistemas transformação mediados por *Agrobacterium* são os mais comumente usados para transformação de algodão (<http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase>). O sucesso desses métodos depende da interação positiva bactéria-genótipo da planta e da possibilidade de obter-se plantas férteis a partir dos tecidos vegetais transformados. Os primeiros relatos de transformação de algodão foram feitos em meados dos anos 1980 por Firoozabady *et al.* (1987) e Umbeck *et al.* (1987), usando o gene nptII (que codifica para a neomicina fosfotransferase II) como marcador de seleção. Nesse processo, foram transformados os genótipos Coker 312 e Coker 210, regenerados por embriogênese somática. A partir de então, têm sido realizadas muitas tentativas para melhorar os protocolos; as modificações mais significativas incluem o uso de calos embriogênicos, o que resultou no aumento da frequência de transformação e na diminuição do tempo para obter transformantes (Wu *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2005; Leelavathi *et al.*, 2004;). Além disso, algumas modificações nos sistemas de transformação, como o uso de acetoseringona na cocultura *Agrobacterium*-tecidos, aumentaram a eficiência de transformação de Coker, genótipos derivados de Coker e de outras cultivares, como Acala, Durga e Zhongmian 12 (Juturu *et al.*, 2015; Jin *et al.*, 2005; Tohidfar *et al.*, 2005; Sunilkumar & Rathore 2001). Também se deve considerar o genótipo de *Agrobacterium*; várias cepas têm sido usadas com maior ou menor eficiência, tais como LBA4404, EHA101, EHA105, C58 e C58C3, LBA4404, AGL1, GV3101 e GV3111.

#### 3.1 *Agrobacterium* e o mecanismo de transformação genética

*Agrobacterium* é um gênero de bactérias composto por bactérias Gram-negativas do solo. Muitas bactérias desse gênero são conhecidas por causar uma série de doenças nas plantas por meio da infecção e formação de galhas. Esses microrganismos possuem dois genomas, o nuclear e o plasmidial; no momento da infecção, a bactéria insere um T-DNA oriundo de seu genoma plasmidial, contendo genes virulentos, no genoma da célula vegetal hospedeira.

deira, a qual passará a produzir metabólitos para nutrição do patógeno. Ocorre que este mecanismo natural foi manipulado pelo homem para que cepas específicas de *Agrobacterium*, citadas no item anterior, fizessem a incorporação de genes de interesse, em vez dos genes virulentos envolvidos no parasitismo. Dessa forma, os cassetes de expressão descritos no item 1 são primeiramente incorporados na forma de T-DNA em um plasmídeo-Ti modificado, que é então inserido em uma determinada cepa de *Agrobacterium* para que esta introduza o T-DNA contendo os cassetes de expressão de interesse no genoma de células de algodoeiro (figura 6).



**Figura 6.** Processo de transformação genética vegetal via *Agrobacterium*. O plasmídeo-Ti modificado é inserido em uma determinada cepa de *Agrobacterium* para que esta introduza o T-DNA contendo os cassetes de expressão de interesse no genoma de células de algodoeiro.

Após a transformação genética de uma única célula, é necessário que a mesma se regenere em diferentes tecidos vegetais dando origem a uma nova planta transformada e saudável. Esse processo ocorre através da embriogênese somática.

### 3.2 Embriogênese somática no algodão

O processo de regeneração após a transformação genética pode ocorrer por meio da embriogênese somática (ES) sob condições *in vitro* adequadas em termos de assepsia, balanço hormonal, nutrição e fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio e gás carbônico. A técnica de ES possui um bom rendimento de plantas regeneradas e não desenvolve plantas quiméricas por conta de uma única origem celular.

O processo de ES dá-se quando as células transformadas tornam-se indiferenciadas e multiplicam-se até a formação de uma massa celular conhecida como “calo”. As células do calo tornam-se células embriogênicas somáticas, que darão origem a pré-embriões, que, por sua vez, desenvolver-se-ão em embriões e, então, em plantas verdadeiras (figura 7). Portanto, para que ocorra o processo de ES, as células devem, antes de tudo, desdiferenciar-se em células de calo (lembrando que a *A. tumefaciens* transforma geneticamente uma célula vegetal já desenvolvida) para então se rediferenciem como células embriogênicas somáticas. As células somáticas adquirem características embriogênicas por meio de uma completa reorganização do estágio celular, incluindo a fisiologia, metabolismo e a expressão gênica (Fehér *et al.*, 2002; Guerra *et al.*, 1999).

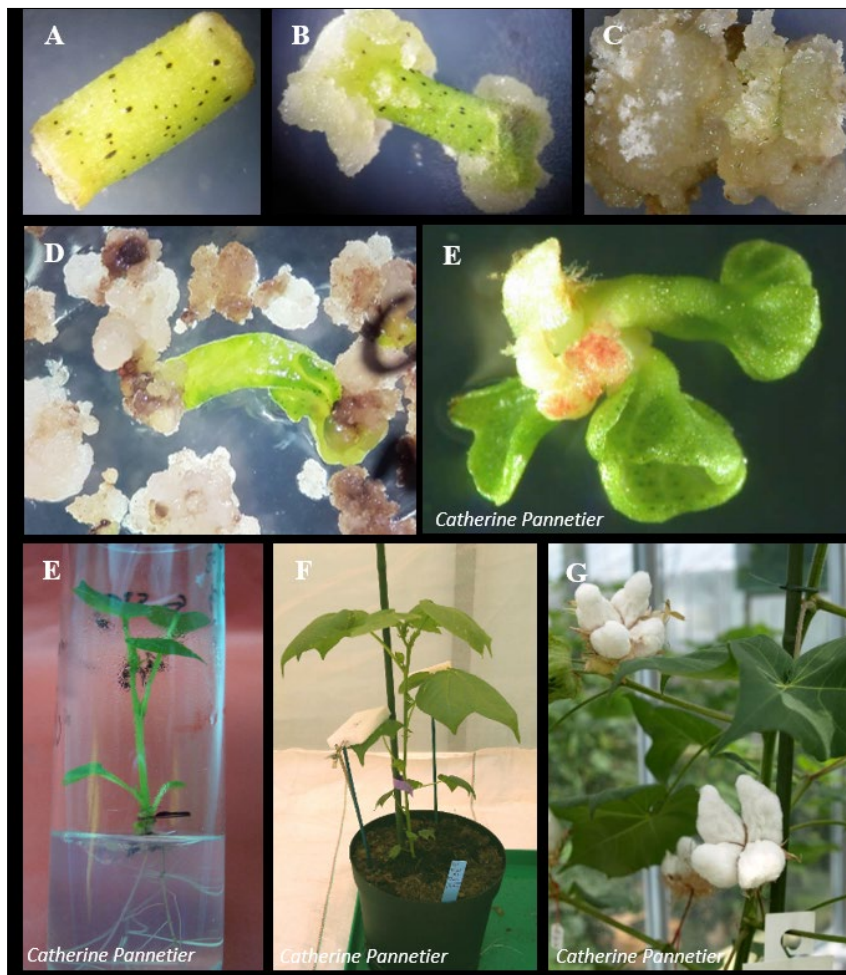
Um dos primeiros trabalhos de regeneração de *G. hirsutum* (Coker 310) foi desenvolvido por Davidonis & Hamilton (1983), que utilizaram tecido cotiledonar poliploide. Desde então, o progresso da embriogênese somática e regeneração de plantas no algodoeiro tem sido relatado por diferentes autores (Wamiq *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2013; Wilkins *et al.*, 2013; Mishra *et al.*, 2003). Como se trata de uma técnica de ampla utilização, há grandes variações entre os processos de transformação e regeneração empregados; as principais diferenças estão correlacionadas com a intensidade e o tipo de luz, temperatura, espécie e linhagem de algodoeiro escolhida para regeneração, tipo de tecido transformado, formulação do meio de cultura, incluindo estado físico líquido ou sólido, fitorreguladores, cepa de *Agrobacterium* utilizada, tempo de cultivo entre diferentes etapas, agentes seletivos para tecido transformado e metodologias de manipulação.



Em suma, para que ocorra o processo de transformação e obtenção de uma planta de algodoeiro GM, são necessárias as seguintes etapas:

- 1) Transformação genética de *A. tumefaciens* com plasmídeo-Ti modificado
- 2) Cocultivo de *A. tumefaciens*, transformada com tecido de algodoeiro, como segmentos de hipocótilos
- 3) Cultivo do tecido sobre meio de cultura seletivo composto com agente fitotóxico até a obtenção de tecido embriogênico geneticamente transformado (somente as células geneticamente transformadas sobreviverão ao agente seletivo, conforme descrito no item 2.1). A esse meio também é adicionado um antibiótico para eliminar as células de *A. tumefaciens*
- 4) Isolamento de embriões geneticamente transformados, selecionados sobre meio de cultura
- 5) Obtenção de plântulas *in vitro*
- 6) Aclimação de plantas T<sub>0</sub> em estufa com condições controladas de temperatura e umidade

São necessários cerca de quinze meses para obtenção de uma planta GM entre a transformação, a regeneração e a aclimação (etapas de 1 a 6).



**Figura 7.** Processo de regeneração via embriogênese somática de planta geneticamente transformada. A) Fragmento de hipocótilo cocultivado com *A. tumefaciens*; B) Crescimento de calo a partir de uma única célula transformada (os calos de extremidades opostas originaram-se de células diferentes); C) Calo embriogênico; D) Embrião se diferenciando a partir de células embriogênicas; E) Embrião isolado; E) Desenvolvimento de plântula a partir de um embrião; F) Aclimação de planta regenerada em estufa; G) Planta GM regenerada completando o ciclo reprodutivo;

A transformação genética via *A. tumefaciens* e embriogênese somática a partir de culturas de calos (massa de células desorganizadas), em que cada célula transformada tem o potencial de regenerar-se em uma planta, ainda se apresenta como alternativa mais sólida entre os métodos de transformação. Apesar disso, a regeneração apresenta algumas dificuldades.

Um exemplo é a variação somaclonal, uma alteração genética que ocorre por conta do longo período de tempo de cultivo *in vitro* necessário para a obtenção de novas plantas por meio dessa metodologia, que pode acarretar diversos tipos de mudanças fisiológicas, inclusive a incapacitação do tecido em gerar embriões saudáveis ou diminuindo a frequência desse evento. Em muitos casos, os embriões somáticos cultivados não se desenvolvem normalmente, não germinam nem se convertem em plantas normais, enquanto outros apresentam o desenvolvimento e a maturação do embrião, mas são interrompidos pela germinação precoce, levando à ocorrência de plântulas mal desenvolvidas. Esses percalços podem ser superados por otimizações de protocolo aumento no volume de tecido transformado.

#### **4. Transformação genética por biobalística**

A maioria dos eventos de algodão utilizados comercialmente, bem como os novos eventos em geração hoje, foram obtidos via *Agrobacterium* com protocolos baseados naqueles desenvolvidos originalmente por Firoozabady *et al.* (1987) e Umbeck *et al.* (1987). Entretanto, ainda há limitações, como uma frequência relativamente baixa de transformação, sistemas laboriosos e limitação de genótipos. Isso levou diversos grupos de pesquisa a explorar alternativas, como a possibilidade de transformação por métodos diretos (biobalística e introdução de genes mediada por fibras de sílica).

Tecnicamente, no sistema de biobalística diversas cópias do cassete de expressão são aderidas sobre a superfície micropartículas de ouro ou tungstênio com um diâmetro de 0,2  $\mu\text{m}$  a 4  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Essas partículas são bombardeadas sobre o tecido vegetal valendo-se de um acelerador de partículas (figura 8), com o intuito de perfurar a parede celular e incorporar o cassete de expressão ao genoma vegetal.



**Figura 8.** Acelerador de partículas utilizado no processo de biobalística.  
Foto por: Monalisa Sampaio Carneiro

O sistema de biobalística pode ser usado tanto em calos embriogênicos quanto em meristemas apicais de embriões zigóticos e vem sendo usado para transformação de algodão desde o início dos anos 1990 (Finer & McMullen, 1990). Se usado para bombardear meristemas apicais, torna desnecessário o uso de calos embriogênicos (Liu *et al.*, 2011; Momtaz *et al.*, 2010; Rech *et al.*, 2008; Aragão *et al.*, 2005; Keller *et al.*, 1997). Aragão *et al.* (2005) desenvolveram um sistema de seleção com uso de imidazolinonas, o que permitiu a transformação do algodão de forma muito eficiente.

Todavia, embora a frequência de obtenção de eventos primários seja maior com o sistema de biobalística, as células transformadas frequentemente têm integração de múltiplas cópias dos transgenes, o que pode levar ao silenciamento gênico e a potenciais problemas para a aprovação dos eventos durante a avaliação de biossegurança por sistemas regulatórios. Além disso, há a maior possibilidade de obtenção de transformantes quiméricos, por conta da transformação apenas de células de determinadas camadas do meristema apical (em geral, a camada L1). Dessa forma é muito comum a geração de indivíduos quiméricos com transformação epidérmica em que somente a epiderme é transformada. Nesses casos, não se observa a passagem dos transgenes para a geração F1, e o evento acaba por perder-se. Também ocorrem vários casos de segregação não mendeliana, o que dificulta ou mesmo impossibilita a utilização desses eventos em programas de melhoramento. No entanto, o método biobalístico é ideal para fazer *screening* (varredura) de funcionalidade de promotores nos distintos tecidos de algodão.

## 5. Transformação via microinjeção

Além de métodos nos quais se faz necessário o cultivo de tecido vegetal *in vitro* (*Agrobacterium* e biobalística), também há métodos de transformação alternativos, como os sistemas *in planta*, nos quais o DNA exógeno é inserido nas células da planta ou nas sementes de forma direta.

A técnica de transformação por microinjeção é um sistema *in planta*, divulgado pela primeira vez por pesquisadores chineses

(Zhou *et al.*, 1983) e, desde então, vários ajustes foram procedidos de modo a otimizar a eficiência na obtenção dos transformantes. Trata-se de uma das técnicas menos onerosas na transformação de plantas, baseando-se nas mais convencionais utilizadas rotineiramente, via *Agrobacterium* e biobalística.

A técnica da microinjeção baseia-se na introdução do DNA exógeno na planta receptora através do canal do tubo polínico (*pollen tube pathway*) ou pelo ovário (*ovary drip*), no momento posterior à fertilização. A integração ocorre porque, nessa ocasião, as células ainda não apresentam parede, mas protoplasto, que facilita a migração do transgene para o interior da célula.

A filosofia da técnica baseia-se na passagem do DNA exógeno pelo mesmo caminho que o pólen faz seu transcurso até o saco embrionário. Nessa ocasião, as células da nucela formam um canal que permite a passagem do tubo polínico até alcançar o ovário (Monnerat *et al.*, 2015). O DNA exógeno é introduzido com auxílio de uma microsseringa, integrando-se às células zigóticas, já fertilizadas, mas não divididas. Após ser integrado no genoma-alvo, o gene passa a fazer parte do patrimônio genético da planta receptora.

Na figura 9, apresenta-se uma síntese dos procedimentos da microinjeção, que têm início com a autofecundação dos botões e posterior uso das maçãs jovens que carregarão os transgenes.



**Figura 9.** Etapas dos procedimentos da microinjeção em algodão. A - Proteção do botão floral para assegurar a autofecundação das maçãs trabalhadas, B - remoção da estrutura floral após fertilização. C - detalhe da maçã jovem a ser microinjetada, D- aplicação da solução de DNA, com auxílio de microsseringa, F e G - maçã em amadurecimento e capulho microinjetado. Foto: Silva, Carliane RC & Santos, Roseane C.

As principais vantagens dessa técnica são: a) baixo custo operacional, uma vez que se necessita de apenas uma microseringa para os procedimentos da transformação; b) não são necessários de técnicos especializados para o procedimento, que é simples e rápido, geralmente realizado ao final do dia, quando a temperatura na casa de vegetação está mais amena; c) a técnica é genótipo-independente, o que elimina os problemas de recalcitrância, podendo ser aplicada em plantas mono e dicotiledôneas, e d) as sementes obtidas nos capulhos são consideradas putativamente transformadas, podendo ser diretamente utilizadas nos testes de seleção, dispensando-se etapas adicionais de regeneração de plantas (Silva, 2014).

A eficiência de transformação com essa técnica depende da espécie trabalhada e também da sensibilidade do operador, uma vez que as estruturas reprodutivas são sensíveis à manipulação. Peffley *et al.* (2003) reportam taxa de 2,5% em cebola, adicionando ácido giberélico (4 mg/mL) e ácido 1-naftalenoacético (4 mg/mL) na solução do DNA. Yang *et al.* (2009) reportam taxa de 3,38% a 6,47% em milho, essa última beneficiada pelo uso de um surfactante (Silwet L-77 a 0,05%) e sacarose (5%). Em soja, Liu *et al.* (2009) obtiveram taxa de 3,2% usando também um surfactante; Silva *et al.* (2015) obtiveram taxa de 0,34% em algodão, usando apenas água como diluente da construção gênica. Deve ressaltar-se que essas taxas enquadram-se dentro das demais técnicas adotadas nos procedimentos de transformação, já registradas na literatura. O importante a ser decidido ao iniciar-se um processo dessa natureza é analisar a disponibilidade de recursos, de pessoal e eficiência de resposta, em função da espécie utilizada.

## **6. Transformação genética para validação de promotores**

Com o intuito de controlar a população de insetos-praga da cultura, vários eventos de algodão transgênico foram desenvolvidos recentemente em várias partes do mundo. A adoção da tecnologia do DNA recombinante teve impacto importante na redução da perda de produtividade (Oliveira *et al.*, 2016). A produção de organismos transgênicos de interesse comercial baseia-se no desenvolvimento de métodos capazes de controlar a expressão do

transgene de maneira precisa. Assim, há um grande esforço no intuito de identificar e validar a funcionalidade de novos promotores — sequências de DNA — que contêm sequências regulatórias específicas reconhecidas por proteínas envolvidas no início da transcrição de um determinado gene (quando, onde, quanto e por quanto tempo) (Kuroki, 2012; Buchanan *et al.*, 2000), conforme abordado no item 1 deste capítulo, que possam ser empregadas na elaboração de cassetes de expressão para a obtenção de plantas GM.

Para a validação podem ser elaborados cassetes de promotores candidatos ligados a genes repórteres (produzem coloração ou fluorescência no tecido transformado) e então inseri-los no genoma vegetal com o intuito de dissecar a expressão e a regulação gênica. Ou seja, a transformação genética nesse modelo é utilizada para o estudo de determinada molécula e não para a geração de uma tecnologia para cultivo a campo.

Assim, ensaios com atividades de genes repórteres, como *gus* e *gfp*, são utilizados para monitorar a atividade dos promotores e, quantitativamente, determinar mudanças cinéticas no produto gênico nos diferentes estágios de desenvolvimento e/ou diferentes condições (Fleming *et al.*, 1996). A atividade do gene *gus* é visual – examinada por meio da intensidade da cor azul do tecido submetido à solução de X-Gluc (Sparkes *et al.*, 2006; Cervera, 2005; Jefferson, 1987) já a atividade do gene *gfp* pode ser observada através da emissão de fluorescência pela exposição do tecido à luz ultravioleta (Sheen *et al.*, 1995). A transformação genética utilizando os promotores associados a genes repórteres permite sua avaliação e caracterização em cada tecido da planta.

## **6.1 Validação de genes e promotores candidatos em espécies-modelo**

Plantas-modelo são plantas comumente utilizadas na pesquisa científica por apresentarem características como tamanho pequeno, facilidade no manuseio e cultivo, ciclo de vida curto, alta produção de sementes, facilidade na transformação genética e processos de biologia molecular simplificados (Chang *et al.*, 2016). O uso dessas plantas possibilita a geração de conhecimento em diversas áreas, desde detalhes de como ocorre o de-



envolvimento e processos fisiológicos de plantas até entender a função de determinados genes e promotores (Chang *et al.*, 2016; Provar *et al.*, 2016).

A planta-modelo mais utilizada na pesquisa atualmente é a *Arabidopsis thaliana* (figura 10); existem mais estudos realizados com essa planta do que com a levedura *Saccharomyces*, por exemplo (Chang *et al.*, 2016). O desenvolvimento da técnica de floral-dip (transformação genética dos gametófitos da planta através da imersão das flores em uma solução com *Agrobacterium tumefaciens*, gerando sementes transgênicas), foi o que resultou no grande aumento na utilização da espécie em estudos utilizando a transformação genética, pois é uma maneira mais rápida e barata de gerar transformantes, principalmente por não necessitar de cultura de tecidos (Provar *et al.*, 2016; Koornneef & Meinke, 2010; Clough & Bent, 1998).



Os estudos de promotores candidatos à determinada função geralmente utilizam as plantas-modelo como estratégia inicial para validar a utilização destes e, para isso, promotores associados a genes repórteres, como *gus* e *gfp*, são bastante empregados por gerarem uma característica fenotípica de fácil avaliação (Sheen *et al.*, 1995; Jefferson, 1987).

A validação de genes e promotores em algodoeiro vem sendo bastante estudada na espécie *A. thaliana*. Chen & Dai (2010) clonaram o gene Gh-MLP da proteína do látex de algodão, que está ligado ao estresse salino e à tolerância à toxina do fungo *Verticillium dahliae*, e avaliaram sua expressão em *A. thaliana* transgênica, que apresentou um aumento na tolerância a estresse salino, mas não houve diferença significativa quanto a tolerância à toxina do fungo. Em 2014, Artico *et al.* isolaram três promotores específicos da flor de algodão e avaliaram sua expressão em *A. thaliana* transformada pelo método de floral-dip; os promotores demonstraram diferentes padrões de expressão nas flores, estames e grãos de pólen da planta. Lambret-Frotté *et al.* (2016) isolaram e caracterizaram o promotor do gene GhAO-like1 em *A. thaliana* e demonstraram sua expressão em estames de flores.

A utilização de plantas-modelo como *A. thaliana* é uma ferramenta importante a ser utilizada na descoberta de novos genes e promotores de grande interesse para o desenvolvimento de novas linhagens de interesse agrônomo.

## **6.2 Validação de genes e promotores candidatos em algodoeiro**

Após a etapa de estudo de genes e promotores candidatos em espécies-modelo, a próxima etapa é a validação na espécie-alvo. No caso do algodão, as informações geradas na etapa anterior permitem validar genes previamente identificados por meio de outras tecnologias, bem como elencar novos genes que poderão ser alvo de estudos avançados, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência aos insetos-praga.

Para isso, diferentes partes da planta — folhas, raízes e, principalmente, componentes das flores (sépalas, pétalas, anteras e ovário) e do fruto (em especial as fibras) — são transformadas via

bombardeamento de micropartículas de tungstênio contendo os vetores de expressão desejados. Cada vetor é desenhado utilizando um promotor candidato e, em todos eles, é introduzido o gene *gus* — gene repórter. Exemplos dessa avaliação podem ser observados na figura 10.

O estudo de promotores e genes candidatos tem por objetivo identificar as melhores fontes para o desenvolvimento de cultivares transgênicas resistentes às mais diversas pragas e que tenham capacidade de produzir fibra de boa qualidade, mesmo em ambientes com estresses ambientais. Alguns estudos já foram feitos nesse sentido, com bons resultados. Chen & Burke (2015) estudaram o gene *gus* sob o controle do promotor da expansina e do E6; em ambos os casos, os autores observaram que houve melhor desenvolvimento da fibra em estágios iniciais. Khan *et al.* (2015) utilizaram os promotores Rep e CP de Cotton leaf curl Burewala virus (CLCuBuV) com genes *gus* e *gfp*; o promotor Rep mostrou forte e consistente expressão transiente em tabaco e folhas de algodão quando comparado ao 35S.

## **DESENVOLVIMENTO DE ALGODOEIRO TRANSGÊNICO RESISTENTE A *ANTHONOMUS GRANDIS***

Até o momento, nenhuma tecnologia comercial de algodoeiro transgênico apresenta qualquer efetividade sobre *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro), que figura como a principal praga da cotonicultura da América Latina. Os danos econômicos relacionados ao ataque do bicudo ocorrem por conta de seus hábitos reprodutivo e alimentar, que destroem botões e maçãs do algodoeiro, levando a grandes perdas na produtividade de pluma e podendo provocar perdas de até 100%. Adicionalmente, ocorre o aumento exponencial dos custos de produção em decorrência do uso de inseticidas altamente tóxicos utilizados para seu controle.

O controle químico é oneroso, danoso ao ambiente e à saúde dos operadores de campo e não é devidamente efetivo, uma vez que as larvas, cujo hábito endofítico as mantém dentro de botões e maçãs, permanecem inacessíveis às aplicações de inseticidas.

Ao final de cada safra, as populações desse inseto refugiam-se dentro da mata nativa ou continuam a reproduzir-se sobre plantas voluntárias de algodoeiro. No período de safra, reproduzem-se rapidamente nas lavouras onde não houver um programa de controle populacional ativo e eficiente. Neste contexto, plantas geneticamente transformadas, ou transgênicas, que expressam altos níveis de moléculas inseticidas em botões e maçãs figuram como a ferramenta biotecnológica mais eficaz para a solução do problema.

Logo, uma iniciativa público-privada nacional vem desenvolvendo trabalhos de cooperação através da Plataforma de Desenvolvimento de Algodoeiro Transgênico Resistente ao Bicudo. Fazem parte dessa iniciativa de cooperação a Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (Abrapa), o Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt), o qual pertence à Associação Mato-grossense dos Produtores de Algodão (Ampa), a Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), com grupos de pesquisa ligados à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Algodão, a empresa israelense Evogene, especializada na prospecção de novos genes e promotores, assim como Instituto Brasileiro do Algodão (IBA), como fundo financiador.

A Plataforma é um trabalho colaborativo e possui componentes de curto, médio e longo prazos, que permitirão o desenvolvimento de tecnologias para o combate do bicudo. Esse *pipeline* consiste em uma série de ações concatenadas e complementares, que incluem a prospecção (descoberta e validação de genes e promotores, síntese e otimização de cassetes gênicos para altos níveis de expressão), a transformação genética (prova de conceito em plantas de algodão, caracterização molecular dos eventos com potencial de uso comercial, seleção de linhagens transgênicas com uma única cópia do transgene, seleção de linhagens com altos níveis de expressão estável dos transgenes) e a fenotipagem (estudos da eficiência das plantas transgênicas no controle do bicudo em laboratório, casa de vegetação e a campo). Ao fim desse projeto, com previsão de cinco anos, prevê-se a obtenção de eventos transgênicos com potencial para a geração de uma nova tecnologia de algodoeiro GM resistente ao bicudo.

## Considerações finais

Em relação à tecnologia de algodoeiro GM em si, não restam dúvidas sobre sua efetividade no controle de pragas. Infelizmente, também é evidente que tais tecnologias, ao menos as presentes no mercado atual, estão perdendo a funcionalidade por conta da crescente pressão de seleção exercida sobre as pragas do gênero *Lepidoptera* com a utilização de um número limitado de genes de Bt, compartilhados entre três grandes culturas nacionais (soja, milho e algodão) sem o estabelecimento e/ou utilização correta de refúgios.

Até o momento, o desenvolvimento dessas tecnologias por intermédio de diferentes técnicas de transformação genética apresenta-se como um desafio, seja por dificuldades técnicas ou por entraves gerados pelos extensos e onerosos ensaios de biossegurança. Outras técnicas estão surgindo, como a edição genética através de CRISPR/Cas9 (Wang *et al.*, 2018), que prometem acelerar e reduzir enormemente os custos de geração de novas tecnologias, uma vez que não se encaixam de fato no termo “transgênico” e, por isso, teoricamente, contornariam o sistema regulatório vigente para liberação comercial. Porém, ainda é difícil imaginar como pequenas modificações pontuais de bases nucleotídicas poderão conferir resistência, ou, quem sabe, perda de atratividade, às pragas da cultura do algodoeiro.

Finalmente, é urgente a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias de algodoeiro GM com maior diversificação de genes efetivos contra as principais pragas nacionais, para que os produtores continuem a beneficiar-se dessa importante ferramenta; assim como é necessário que eles também se conscientizem sobre as grandes dificuldades envolvidas no desenvolvimento de cada tecnologia e façam uso de estratégias para conservá-las efetivas no campo pelo maior tempo possível.

## Referências

- ARAGAO, F.J.L.; VIANNA, G.R.; CARVALHEIRA, S.B.R.C.; RECH, E.L. Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. **Plant Sci.**, 168, 1227–1233, 2005.
- ARTICO, S.; LAMBRET-FROTTÉ, J.; NARDELI, S.M.; OLIVEIRA-NETO O.B.; GROSSI-DE-SA, M.F.; ALVES-FERREIRA, M. Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, 32,3, 630-643, 2014.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEIN, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CERVERA, M. Histochemical and fluorimetric assays for uidA (GUS) gene detection. **Methods in molecular biology**, 286, 203-214, 2005.
- CHANG, C.; BOWMAN, J.L.; MEYEROWITZ, E.M. Field Guide to Plant Model Systems. **Cell**, 167, 2, 325-339, 2016.
- CHEN, J.; BURKE, J.J. Developing fiber specific promoter-reporter transgenic lines to study the effect of abiotic stresses on fiber development in cotton. **Plos one**, 10, 6, 1-17, 2015.
- CHEN, J.Y.; DAI, X.F. Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, 231, 4, 861-73, 2010.
- CLOUGH, S.J.; BENT, A.F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, 16, 6, 735-43, 1998.
- DAVIDONIS, G.H.; HAMILTON, R.H. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. **Plant Sci. Lett.**, 32, 89-93, 1983.
- DONG, H.Z.; LI, W.J. Variability of endotoxin expression in Bt transgenic cotton. **Journal of Agronomy and Crop Science**, 193, 21-29, 2007.
- FEHER, A.; PASTERNAK, T.; ÖTVÖS, K.; MISKOLCZI, P.; DUDITS, D. Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. **Biologia**, 57, 5–12, 2002.
- FINER, J.J.; McMULLEN, M.D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Rep.**, 8, 586–589, 1990.

FIROOZABADY, E.L.; DEBOER, D.L.; MERLO, D.J.; HALK, E.L.; AMERSON, L.N.; RASHKA, K.E.; MURRAY, E.E. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. **Plant Mol. Biol.**, 10, 105–116, 1987.

FLEMING, A.J.; MANZARA, T.; GRUISSEM, W.; KUHLEMEIER, C. Fluorescent imaging of GUS activity and RT-PCR analysis of gene expression in the shoot apical meristem. **The Plant Journal**, 10, 745–754, 1996.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: Torres, A.C; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds). **Culturas de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-CBAB, v.2. p.533-568, 1999.

ISAAA. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/>, acessado em maio de 2018.

JEFFERSON, R.A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, 5, 4, 387-405, 1987.

JIN, S.; ZHANG, X.; LIANG, S.; NIE, Y.; GUO, X.; HUANG, C. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, 81, 229–237, 2005.

JUTURU, V. N., MEKALA, G. K., AND KIRTI, P. B. Current status of tissue culture and genetic transformation research in cotton (*Gossypium* spp.). **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, 120, 813–839, 2015.

KELLER, G.; SPATOLADENNIS, L.; MARTINELL M. C.; SWAIN, W.; MALIYAKAL, E.; JOHN, M. E. Transgenic cotton resistant to herbicide bialaphos. **Trans. Res.**, 6, 385–392, 1997.

KHAN, Z.A.; ABDIN, M.Z.; KHAN, J.A. Functional characterization of a strong bi-directional constitutive plant promoter isolated from Cotton Leaf Curl Brewala Virus. **Plos One**, 10, 3, 1-17, 2015.

KOORNNEEF, M.; MEINKE, D. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, 61, 6, 909-921, 2010.

KUMAR, M.; SINGH, H.; SHUKLA, A. K.; VERMA, P. C.; SINGH, P. K. Induction and establishment of somatic embryogenesis in elite Indian cotton cultivar (*Gossypium hirsutum* L. cv Khandwa-2), **Plant Signaling & Behavior**, 8, 10- e26762, 2013.

KUROKI, M.A. Desenvolvimento de uma estratégia de clonagem customizada de regiões promotoras do genoma da cana-de-açúcar. **Dissertação** (mestrado). Universidade de São Paulo, 2012. 137 p.

LAMBRET-FROTTÉ, J.; ARTICO, S.; NARDELI, S.M.; FONSECA, F.; OLIVEIRA-NETO O.B.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; ALVES-FERREIRA, M. Promoter isolation and characterization of GhAO-like1, a *Gossypium hirsutum* gene similar to multicopper oxidases that is highly expressed in reproductive organs. **Genome**, 59, 1, 23-36, 2016.

LEELAVATHI S, SUNNICHAN V G, KUMRIA R, VIJAYKANTH G P, BHATNAGAR R K, REDDY V. A simple and rapid Agrobacterium-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. **Plant Cell Rep.**, 22, 465–470, 2004.

LIU, J. F.; WANG, X. F.; LI, X.; LI, Q. L.; ZHANG, G. Y.; LI, M. G.; MA, Z. Y. Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the phyA gene from *Aspergillus ficuum*. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, 106, 207–214, 2011.

LIU, J.F.; SU, Q.; AN, L.J.; YANG, A.F. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free smGFP cassette into soybean via ovary-drip transformation. **Biotechnol. Lett.**, 31, 2; 295–303, 2009.

MISHRA, R.; HUAI-YU WANG, H.Y.; NEELAM R. YADAV, N. R.; WILKINS, T. A. Development of a highly regenerable elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxxa) – a step towards genotype-independent regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 73, 21–35, 2003.

MOMTAZ, O.A.; HUSSEIN, E.M.; FAHMY, E.M.; AHMED, S.E. Expression of S-adenosyl methionine decarboxylase gene for polyamine accumulation in Egyptian cotton Giza 88 and Giza 90. **GM Crops**, 1, 257–266, 2010.

MONNERAT, R.; SANTOS, R.C; LIMA L.M; PINHEIRO, M.P.N; SILVA, C. R. C; SOARES, C.M; Uso da transgenia para controle do bicudo-do-algodoeiro. Cap.5, In: Belot, J-L (Ed). **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: biologia e medidas de controle**. Cuiaba: Instituto Mato-grossense do Algodão - IMAmt 254p, p. 183-211, 2015.

ODELL J.T.; NAGY, F.; CHUA, N.H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. **Nature**, 313, 6005, 810-812, 1985.

OLIVEIRA, R.S.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MOURA, H.F.N.; MACEDO, L.L.P.; ARRAES, F.B.M.; LUCENA, W.A.; LOURENÇO-TESSUTTI, I.T.; BARBOSA,



A.A.D.; SILVA, M.C.M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Transgenic cotton plants expressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Frontiers Plant Science**, 7, 165, 2016.

PEFFLEY, E.B; ALLEN, R.; SONG, P.; SHANG, X. Texas Tech University, Lubbock TX (US). Direct transformation of higher plants through pollen tube pathway, **U. S. Patent No.** 6, 583, 335 B1, 2003.

PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; McPHERSON, S.L.; FISCHHOFF, D.A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 15, 88, 8, 3324-3328, 1991.

PROVART, N.J.; ALONSO, J.; ASSMANN, S.M.; BERGMANN, D.; BRADY, S.M.; BRKLJACIC, J.; BROWSE, J.; CHAPPLE, C.; COLOT, V.; CUTLER, S.; DANGL, J.; EHRHARDT, D.; FRIESNER, J.D.; FROMMER, W.B.; GROTEWOLD, E.; MEYEROWITZ, E.; NEMHAUSER, J.; NORDBORG, M.; PIKAARD, C.; SHANKLIN, J.; SOMERVILLE, C.; STITT, M.; TORII, K.U.; WAESE, J.; WAGNER, D.; MCCOURT, P. 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. **New Phytol.** 209, 3, 921-944, 2016.

RAWAT, P.; SINGH, A.K.; CHAUDHARY, B.; KUMAR, S.; GAUTAM, T.; KANORIA, S.; KAUR, G.; KUMAR, P.; PENTAL, D.; BURMA, P.K. Detrimental effect of expression of Bt endotoxin Cry1Ac on in vitro regeneration, in vivo growth and development of tobacco and cotton transgenics. **Journal of Biosciences**, 36, 363-376, 2011.

RECH, E. L; VIANNA, G. R; ARAGAO, F.J.L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nat. Protoc.**, 3, 3, 410-418, 2008.

SHEEN, J.; HWANG, S.; NIWA, Y.; KOBAYASHI, H.; GALBRAITH, D.W. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. **The Plant Journal**, 8, 5, 777-784, 1995.

SILVA, C.R.C. Seleção de eventos transformados de algodão resistente a insetos por meios moleculares e de imunodeteção. UFRPE: Recife, **Tese**, Renorbio, 83p, 2014.

SILVA, C.R.C; MONNERAT, R.; LIMA, L.M.; MARTINS, E.S.; MELO FILHO, P.A.; PINHEIRO, M.P.N.; SANTOS, R.C. Stable integration and expression of a cry1Ia gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. **Pest Manag. Sci.**, 72, 1549-57, 2015.

SPARKES, I.A.; RUNIONS, J.; KEARNS, A.; HAWES, G. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. **Nature Protocols**, 1, 4, 2019-2025, 2006.

SUNILKUMAR, G.; RATHORE, K.S. Transgenic cotton: Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. **Mol. Breed.**, 8, 37-52, 2001.

TOHIDFAR, M.; MOHAMMADI, M.; GHAREYAZIE, B. *Agrobacterium* -mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. **Plant Cell, Tissue Organ Cult.**, 83, 83–96, 2005.

UMBECK, P.; JOHNSON, G.; BARTON, K; SWAIN, W. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. **Biotechnology**, 5, 263–266, 1987.

WAMIQ, G.; AKHTAR, S.; KHAN, Z. A.; ALAM, P.; KHAN, J., A. Development of an efficient method for regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. HS6. **Indian Journal of Biotechnology**, 15, 39-47, 2016.

WANG, P.; ZHANG, J.; SUN, L.; MA, Y.; XU, J.; LIANG, S.; DENG, J.; TAN, J.; ZHANG, Q.; LILI TU, L.; DANIELL, H.; JIN, S.; ZHANG, X. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. **Plant Biotechnology Journal**, 16, 137–150, 2018.

WILKINS, T. A.; RAJIV M. R.; NORMA, L.; TROLINDER, N. L. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton. **Plant Tissue Cult.**, 13, 2, 211-225, 2013.

WU J. H.; LUO X. L.; WANG Z.; TIAN Y. C.; LIANG A. H.; SUN Y. Transgenic cotton expressing synthesized scorpion insect toxin aaHIT gene confers enhanced resistance to cotton bollworm (*Heliothis armigera*) larvae. **Biotechnol. Lett.**, 30, 547–554, 2008.

XIA, S.; JINXIAN, L.; ZANG, H. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell, Tissue Organ Cult**, 81, 229–237, 2005.

YANG, A. F.; SU, L. J.; AN, L. J. Ovary-drip transformation: a simple method for directly generating vector- and marker-free transgenic maize (*Zea mays* L.) with a linear GFP cassette transformation. **Planta**, 229, 793–801, 2009.

ZHOU, G.; WENG, J.; ZENG, Y.; HUANG, J.; QIAN, S.; LIU, G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Methods Enzymol.**, 101, 433-481, 1983.

# Eficiência das culturas Bt em campo e casos de resistência em insetos

**Juan Luis Jurat-Fuentes**

Departamento de Entomologia e Fitopatologia  
da Universidade do Tennessee, Knoxville (TN) EUA

## 1. Culturas Bt e seus benefícios

Plantas de culturas geneticamente modificadas que produzem proteínas inseticidas originárias da bactéria *Bacillus thuringiensis* (culturas Bt) são a contribuição mais importante da biotecnologia para o controle de pragas na agricultura. Desde a comercialização do primeiro evento Bt, em 1996, a área dedicada a esse tipo de cultura aumentou significativamente, chegando a 98,5 milhões de hectares em todo o mundo, correspondendo a mais de 53% da área cultivada global com culturas geneticamente modificadas (James, 2016). A maior parte dessa área (75,4 milhões de hectares, 76,5%) é representada por eventos múltiplos (tolerância a herbicida mais resistência a insetos); proporcionalmente, a cultura GM para algodão Bt corresponde a 84% da área total plantada, seguida da cultura GM de milho Bt (79% da área total) (James, 2016).

Dados atuais mostram que as culturas Bt são seguras para o meio ambiente e para os organismos não alvo (Koch *et al.*, 2015) e são econômica e agronomicamente superiores às alternativas não transgênicas em todo o mundo (Areal *et al.*, 2013). Os benefícios do uso de culturas Bt incluem maior rendimento, redução do uso de pesticidas, resultando no aumento da biodiversidade, e, no caso do milho Bt, também melhoria da segurança sanitária

# Current efficiency of Bt crops in the field and cases of resistance

**Juan Luis Jurat-Fuentes**

Department of Entomology and Plant Pathology  
University of Tennessee, Knoxville (TN) USA

## 1. Bt crops and their benefits

Crop plants genetically transformed to produce insecticidal proteins from the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt crops) are the most important contribution of biotechnology to pest control in agriculture. Since commercialization of the first Bt event in 1996, acreage devoted to Bt crops has increased almost linearly, to reach 98.5 million hectares worldwide, more than 53% of the global hectareage of genetically modified crops (James, 2016). Most of this acreage (75.4 million hectares, 76.5%) is represented by stacked (herbicide tolerance plus insect resistance) traits, with the highest relative adoption (insecticide resistance plus stacked traits) found for Bt cotton (84% of total area) followed by Bt maize (79% of total area) (James, 2016).

Currently available evidence supports that Bt crops are safe to the environment and non-target organisms (Koch *et al.*, 2015), and economically and agronomically superior to non-transgenic alternatives for farmers worldwide (Areal *et al.*, 2013). Benefits from the use of Bt crops include greater gross margins with higher yields, reduced pesticide usage resulting in increased biodiversity, and in the case of Bt corn also improved health safety due to lower contamination with mycotoxins (National Academies of Sciences and Medicine, 2016). On average, adoption of

por conta da menor contaminação com micotoxinas (National Academies of Sciences and Medicine, 2016). Em média, estima-se que a adoção do milho Bt em todo o mundo tenha aumentado o lucro em US\$ 78/hectare para o agricultor após a dedução dos custos de tecnologia, enquanto que para o algodão esse valor foi de US\$ 223/hectare (Brookes & Barfoot, 2017b). Esses benefícios advêm de uma combinação da redução no uso de herbicidas e inseticidas e da diminuição nos níveis de dano causado pelas pragas, resultando em maior produtividade. No caso do milho Bt, o aumento de rendimento varia de 5,6% a 24,5%, dependendo do híbrido (Pellegrino *et al.*, 2018).

Dados disponibilizados pelas National Academies of Sciences and Medicine (2016) indicam claramente uma redução significativa no uso de inseticidas em culturas Bt em comparação a culturas convencionais. Uma meta-análise da literatura disponível mostra que, em média, as culturas Bt reduziram o uso de pesticidas em 37% (Klümper & Qaim, 2014). Considerando o período da introdução das culturas Bt, desde 1996 até 2015, a redução do uso de inseticidas é particularmente mais alta em lavouras cuja prática é a aplicação mais intensiva de pulverizações como, por exemplo, a cultura do algodão (redução de 268,6 milhões de kg de ingrediente ativo no período 1996-2015), em comparação com o milho (redução de 87,1 milhões de kg de ingrediente ativo no mesmo período) (Brookes & Barfoot, 2017a). O efeito acumulado dessas reduções desde o início da comercialização das culturas Bt é estimado em uma redução de 8,1% (618,7 milhões de kg de ingrediente ativo) em comparação ao uso esperado para as culturas convencionais (Brookes & Barfoot, 2017a). A cultura Bt comercializada mais recentemente — a soja Bt — na América do Sul já resultou em uma redução acumulada de 1,4% no uso de pesticidas (3,6 milhões de kg) no Brasil, em apenas dois anos de comercialização (Brookes & Barfoot, 2017a). Estimativas de redução de pesticidas para o milho são mais difíceis de serem quantificadas, pois tipos diferentes de inseticidas são aplicados em partes diferentes da planta quando estas são afetadas por lepidópteros e coleópteros; mas, mesmo levando-se em consideração esses fatores, houve uma redução de 53,3% na quantidade esperada de uso de ingrediente ativo entre 1996 e 2015 (Brookes & Barfoot, 2017a). No Brasil, onde as principais pragas

Bt corn worldwide is estimated to result in \$78/hectare benefit to the farmer after deduction of technology costs, whereas for cotton this value increases to \$223/hectare (Brookes & Barfoot, 2017b). These benefits result from a combination of decreased reliance on herbicides and insecticides and lower pest damage levels, resulting in higher yields. In the case of Bt corn, yield increases vary from 5.6 to 24.5% depending on the hybrid (Pellegrino *et al.*, 2018).

Available data clearly support a significant reduction in insecticide use in Bt compared to conventional crops (National Academies of Sciences and Medicine, 2016). A meta-analysis of available literature supported that on average, Bt crops have reduced pesticide usage by 37% (Klümper & Qaim, 2014). Considering the period since the introduction of Bt crops in 1996 until 2015, insecticide usage reductions are particularly higher in more intensively sprayed crops such as cotton (268.6 million kg reduction from 1996-2015) compared to corn (87.1 million kg reduction for same period) (Brookes & Barfoot, 2017a). The aggregated effect of these reductions since commercialization of Bt crops is estimated to be an 8.1% (618.7 million kg of active ingredient) reduction compared to the expected usage for conventional crops (Brookes & Barfoot, 2017a). The most recently commercialized Bt crop, Bt soybean in South America, already resulted in a 1.4% aggregated pesticide usage reduction (3.6 million kg) in Brazil in only two years since commercialization (Brookes & Barfoot, 2017a). Estimations of pesticide reduction for corn are more difficult, since insecticides are applied to different parts of the plant affected by lepidopteran and coleopteran pests, but cumulatively represent a 53.3% reduction in the expected amount of active ingredient usage from 1996 to 2015 (Brookes & Barfoot, 2017a). In Brazil, where pests targeted in corn are lepidopteran larvae feeding on above ground plant parts, the number of insecticide sprays has been reduced from about five to two, resulting in 15.2 million kg of insecticide active ingredient savings since commercialization of Bt corn in 2008 until 2014 (Brookes & Barfoot, 2017a). Interestingly, in the USA insecticide use on corn has decreased among both adopters and non-adopters of Bt corn (Fernandez-Cornejo *et al.*, 2014), a phenomenon that is probably due to the area wide-level suppression

que atacam a cultura do milho são larvas de lepidópteros, que se alimentam das partes aéreas das plantas, o número de pulverizações de inseticidas foi reduzido de cinco para duas, resultando em um decréscimo de uso de 15,2 milhões de kg de inseticidas desde o início da comercialização do milho Bt, em 2008, até 2014 (Brookes & Barfoot, 2017a). Curiosamente, nos EUA, o uso de inseticida no milho diminuiu entre os agricultores que empregavam culturas convencionais e culturas geneticamente modificadas de milho Bt (Fernandez-Cornejo *et al.*, 2014). Isso ocorreu, provavelmente, por conta da supressão em larga escala da broca-do-milho (*Ostrinia nubilalis*) com a adoção do milho Bt (Bohnenblust *et al.*, 2014; Hutchison *et al.*, 2010).

Espera-se que a redução no uso de inseticidas contribua para o aumento da biodiversidade de artrópodes, incluindo insetos benéficos. Meta-análises de experimentos de campo já publicados confirmam o aumento de populações de invertebrados não alvo em culturas Bt em comparação às culturas convencionais manejadas com inseticidas (Marvier *et al.*, 2007; Wolfenbarger *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011). No caso do algodão Bt na China, encontrou-se maior abundância de insetos predadores responsáveis por biocontrole em culturas Bt em comparação a culturas convencionais (Lu *et al.*, 2012). Os resultados de um estudo de campo de três anos no Brasil constataram que os eventos de soja Bt não têm efeitos negativos sobre os artrópodes não alvo (Marques *et al.*, 2018). Tampouco há evidência de efeitos adversos dos cultivos Bt em comunidades de invertebrados e na microbiota do solo (Blackwood & Buyer, 2004; Lawhorn *et al.*, 2009; Neher *et al.*, 2014).

Em comparação ao milho convencional, o milho Bt apresenta um benefício indireto, que é a redução das micotoxinas. Estas, principalmente a fumonisina, produzida por *Fusarium* spp., e aflatoxina, produzida por *Aspergillus* spp., têm efeitos tóxicos e carcinogênicos em vertebrados. Larvas de lepidópteros, como a lagarta-do-milho (*Helicoverpa zea*) e a broca-do-milho (*O. nubilalis*), atuam como vetores de esporos fúngicos durante a alimentação (Dowd, 2003); a redução da ingestão de milho Bt por larvas de insetos reduz significativamente o risco de micotoxinas em comparação ao milho convencional. Estima-se que, por ano, a adoção de Bt por agricultores norte-americanos

of European corn borer by adoption of Bt corn (Bohnenblust *et al.*, 2014; Hutchison *et al.*, 2010).

Reduced insecticide usage is expected to contribute to increase arthropod biodiversity, including beneficial insects. Meta-analyses of published field experiments support increased populations of non-target invertebrates in Bt compared to conventional crops that are managed with the use of insecticides (Marvier *et al.*, 2007; Wolfenbarger *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2011). In the case of Bt cotton in China, higher abundance of predatory insects that provide biocontrol services was documented in Bt compared to conventional crops (Lu *et al.*, 2012). Results from a three year field study in Brazil supported that Bt soybean events do not have negative effects on non-target arthropods (Marques *et al.*, 2018). There is also no evidence of adverse effects of Bt crops on soil invertebrate and microbial communities (Blackwood & Buyer, 2004; Lawhorn *et al.*, 2009; Neher *et al.*, 2014).

An indirect benefit of Bt corn adoption is the reduction in mycotoxins compared to conventional corn. These mycotoxins, mainly fumonisin produced by *Fusarium* spp. and aflatoxin produced by *Aspergillus* spp., have toxic and carcinogenic effects in vertebrates. Lepidopteran larvae such as the corn earworm (*Helicoverpa zea*) and the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) act as vectors of fungal spores during feeding (Dowd, 2003). Reduced larval feeding on Bt corn significantly reduces the risk of mycotoxins compared to conventional corn, with an estimated \$17 million in annual benefits to Bt-adopting farmers in the USA from reduced mycotoxin levels (Wu *et al.*, 2004).

All the benefits discussed in this section have contributed to a rapid increase in Bt crop adoption rates (James, 2016), which also represents an increased pressure for the evolution of resistance in target pests, the most serious threat to the sustainability of Bt crop technology. In this Chapter we will first review the Bt crop technologies currently available, the success of these technologies in controlling targeted pests, and then we will document current cases of field-evolved resistance worldwide and the mechanisms that may be involved.



gere economia estimada de US\$ 17 milhões, por conta da redução dos níveis de micotoxinas (Wu *et al.*, 2004).

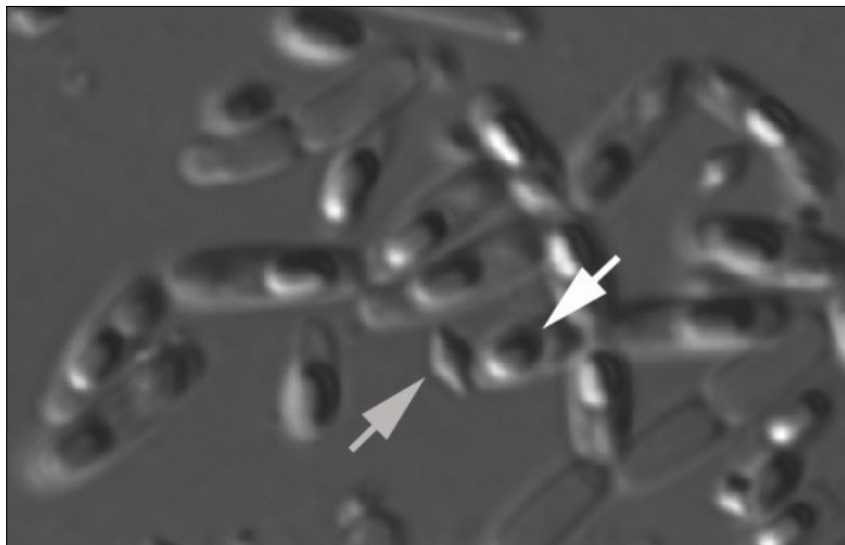
Todos os benefícios discutidos nesta seção contribuíram para um aumento rápido nas taxas de adoção de culturas Bt (James, 2016), o que também representa uma pressão crescente que contribui para a evolução da resistência em pragas-alvo, a ameaça mais séria à sustentabilidade da tecnologia. Neste capítulo, analisaremos inicialmente as tecnologias de cultura Bt atualmente disponíveis, o sucesso delas no controle de pragas-alvo e, em seguida, descreveremos os casos atuais de resistência em todo o mundo e os mecanismos que podem estar envolvidos.

## **2. Proteínas inseticidas Bt e expressão em culturas Bt disponíveis**

As culturas Bt atualmente comercializadas expressam uma ou mais toxinas Cry ou VIP (proteína inseticida vegetativa) de uma estirpe de bactéria Bt. Essa bactéria é comumente encontrada na natureza em forma de esporo, que germina em uma célula vegetativa após a ativação por estímulos e condições ambientais específicas (Raymond *et al.*, 2008). As proteínas Cry (de “Crystal”) são produzidas durante a fase de esporulação da bactéria e acumulam-se como cristais proteicos adjacentes ao esporo Bt (figura 1). Essas proteínas Cry são classificadas e nomeadas de acordo com a identidade da sequência de aminoácidos (Crickmore *et al.*, 1998). O sistema de nomenclatura consiste em quatro categorias organizadas em ordem crescente de identidade sequencial de aminoácidos: a classificação principal (algarismo arábico) agrupa proteínas Cry que compartilham < 45% de identidade de sequência, a segunda (letras maiúsculas) e terceira (letras minúsculas) classificações distinguem proteínas com < 78% e < 95% de identidade de sequência, respectivamente (Crickmore *et al.*, 1998). Toxinas com sequências idênticas (> 95% de identidade) recebem uma classificação quaternária (número arábico). Embora mais de trezentos genes codificadores de toxinas do complexo de proteínas Cry, agrupados em 75 famílias de acordo com a descrição da estrutura primária (Crickmore *et al.*, 2016), existem apenas oito genes isolados diretamente de estirpes de Bt e três toxinas Cry sintéticas que são atualmente expressas nas

## 2. Insecticidal Bt proteins and expression in available Bt crops

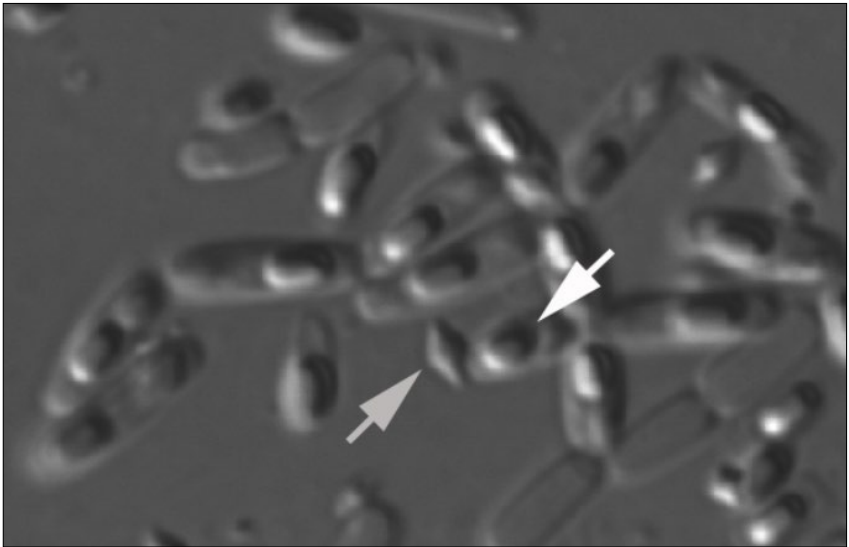
Currently commercialized Bt crops produce one or more Cry or Vip toxins from a Bt bacterium strain. This bacterium is commonly found in nature as a spore, which germinates to a vegetative cell after activation by specific environmental cues and conditions (Raymond *et al.*, 2008). The Cry (for **C**ry**s**tal) proteins are produced during the sporulation phase of the bacterium, and accumulate as protein crystals adjacent to the Bt spore (*figure 1*). These Cry proteins are classified and named according to their amino acid sequence identity (Crickmore *et al.*, 1998). The nomenclature system consists of four ranks denoting increasing sequence identity. The primary rank (Arabic numeral) groups Cry proteins that share <45% sequence identity, while the secondary (uppercase letter) and tertiary (lowercase letter) ranks distinguish proteins with <78 and <95% sequence identity, respectively (Crickmore *et al.*, 1998). Toxins with identical sequences (>95% identity) receive a quaternary rank (Arabic number). While more than 300 holotype Cry toxins grouped in 75 families at the primary rank have been described (Crickmore *et al.*, 2016), only 8 holotype and 3 engineered Cry toxins are currently expressed by commercialized Bt crops (table 1). All of these toxins have a similar three dimensional structure composed of three domains with diverse roles in binding to target cells, formation of pores in cell membranes, and toxin stability (reviewed in Adang *et al.*, 2014). Conservation of the toxin structure among the Cry toxins produced in Bt crops supports similarities in their mode of action (discussed in next section).



**Figura 1.** Imagem de microscopia de contraste diferencial por interferência (DIC) de uma cultura de *Bacillus thuringiensis* (Bt) esporulada. O esporo e o cristal da toxina de Bt são indicados com uma seta branca e cinza, respectivamente, como referência.

culturas Bt comerciais (tabela 1). Todas essas toxinas têm uma estrutura tridimensional semelhante, ou seja, são compostas por três domínios com papéis diversos na ligação às células-alvo, formação de poros nas membranas celulares e estabilidade da toxina (revisado em Adang *et al.*, 2014). A conservação da estrutura da toxina entre as toxinas Cry expressas nas culturas Bt indica as semelhanças no modo de ação. Essa parte será discutida na próxima seção.

As toxinas dos grupos Cry1 (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa2, e Cry1A.105) e Cry2 (Cry2Ab2 e Cry2Ae) têm por alvo as larvas de lepidóptero, enquanto as do grupo Cry3 (Cry3Bb1, mCry3A e eCry3.1Ab), bem como a toxina binária Cry34/35Ab1, têm por alvo larvas de coleópteros (tabela 1). A proteína Cry1A.105 é uma quimera que contém o domínio III, proveniente da estrutura tridimensional da proteína de Cry1Fa2; a outra porção é derivada da proteína Cry1Ac (EPA, 2010a). A proteína Cry3A modificada (mCry3A) é derivada da toxina Cry3Aa por engenharia do sítio de clivagem das proteases quimotripsina/catepsina G no domínio I na estrutura



**Figura 1.** Differential interference contrast (DIC) microscopy picture of a sporulated *Bacillus thuringiensis* (Bt) culture. A Bt spore and toxin crystal are indicated with a white and gray arrow, respectively, for reference.

Toxins in the Cry1 (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Fa2, and Cry1A.105) and Cry2 (Cry2Ab2 and Cry2Ae) primary ranks target lepidopteran larvae, while toxins in the Cry3 rank (Cry3Bb1, mCry3A, and eCry3.1Ab) as well as the Cry34/35Ab1 binary toxin target coleopteran larvae (table 1). The Cry1A.105 protein is a chimera containing domain III in the three-dimensional structure of the protein from Cry1Fa2 and the rest of the protein from Cry1Ac (EPA, 2010a). The modified Cry3A (mCry3A) protein was derived from Cry3Aa by engineering a chymotrypsin/cathepsin G protease recognition site in domain I in the three-dimensional structure of the protein, which renders the protein active against corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). Exchange of domain III of mCry3A with that of the lepidopteran-active Cry1Ab toxin generated the eCry3.1Ab toxin, resulting in recognition of additional receptors in the midgut while maintaining toxicity against *D. v. virgifera* (Walters *et al.*, 2010).

In contrast to Cry toxins, Vip (from vegetative insecticidal protein) toxins are produced as secreted proteins during the

tridimensional da proteína, o que a torna ativa contra a lagarta-da-raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera*). A troca do domínio III da mCry3A pelo domínio da toxina Cry1Ab ativa contra lepidópteros gerou a toxina eCry3.1Ab, resultando no reconhecimento de receptores adicionais no intestino médio, mantendo a toxicidade contra *D. v. virgifera* (Walters *et al.*, 2010).

Em contraste com as toxinas Cry, as toxinas VIP são produzidas como proteínas secretadas durante a fase vegetativa de crescimento de Bt (Warren, 1997). As proteínas VIP também são classificadas e nomeadas de acordo com sua identidade de sequência de aminoácidos, e há 33 toxinas descritas e classificadas em quatro famílias, de acordo com a classificação primária (Crickmore *et al.*, 2016). Apesar dessa diversidade, apenas Vip3Aa19 (em milho Bt) e Vip3Aa20 (em algodão Bt) são expressas nas culturas de Bt atualmente comercializadas para o controle de larvas de lepidópteros (tabela 1).

**Tabela 1.** Lista de toxinas produzidas por híbridos Bt comercialmente disponíveis nos EUA e seu respectivo inseto-alvo. CEW/BW, lagarta-da-espiga / lagarta-do-milho (*H. zea*); ECB, broca-do-milho-europeia (*O. nubilalis*); FAW, lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*); PBW, lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*); SBL, lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*); SWCB, broca-do-milho-do-sudoeste (*Diatraea grandisoella*); TBW, lagarta-da-maçã (*Chloridea virescens*); WCRW, lagarta-da-raiz-do-milho-ocidental (*Diabrotica virgifera virgifera*).

Toxina	Cultura	Pragas principais
Cry1Ab	Milho	ECB
Cry1Ac	Milho, algodão, soja	CEW, TBW, SBL
Cry1Fa2	Milho, algodão	CEW, FAW, SWCB
Cry2Ab2	Milho, algodão	CEW, FAW
Cry2Ae	Algodão	BW, TBW, PBW, FAW
aVip3Aa	Milho, algodão	CEW, FAW
Cry34/35Ab1	Milho	WCRW
Cry3Bb1	Milho	WCRW
Cry1A.105	Milho, algodão	CEW, FAW, SWCB
mCry3A	Milho	WCRW
eCry3.1Ab	Milho	WCRW

<sup>a</sup> Vip3Aa é usada para denominar as toxinas Vip3Aa19 e Vip3Aa20 porque estas têm mais de 99,9% de identidade.

vegetative phase of Bt (Warren, 1997). These Vip proteins are also classified and named according to their amino acid sequence identity, and there are 33 described holotype toxins classified into 4 families at the primary rank (Crickmore *et al.*, 2016). Despite this diversity, only Vip3Aa19 (in Bt corn) and Vip3Aa20 (in Bt cotton) are produced by currently commercialized Bt crops to control selected lepidopteran larvae (table 1).

**Table 1.** List of toxins produced by commercially available Bt hybrids in the U.S. and their target pest. CEW/BW, corn earworm/bollworm (*Helicoverpa zea*); ECB, European corn borer (*Ostrinia nubilalis*); FAW, fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*); PBW, pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*); SBL, soybean looper (*Chrysodeixis includens*); SWCB, southwestern corn borer (*Diatraea grandisoella*); TBW, tobacco budworm (*Chloridea virescens*); WCRW, western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*).

Toxin	Crops	Main Targets
Cry1Ab	Corn	ECB
Cry1Ac	Corn, cotton, soybean	CEW, TBW, SBL
Cry1Fa2	Corn, cotton	CEW, FAW, SWCB
Cry2Ab2	Corn, cotton	CEW, FAW
Cry2Ae	Cotton	BW, TBW, PBW, FAW
aVip3Aa	Corn, cotton	CEW, FAW
Cry34/35Ab1	Corn	WCRW
Cry3Bb1	Corn	WCRW
Cry1A.105	Corn, cotton	CEW, FAW, SWCB
mCry3A	Corn	WCRW
eCry3.1Ab	Corn	WCRW

<sup>a</sup> Vip3Aa is used for both Vip3Aa19 and Vip3Aa20 as these toxins are >99.9% identical

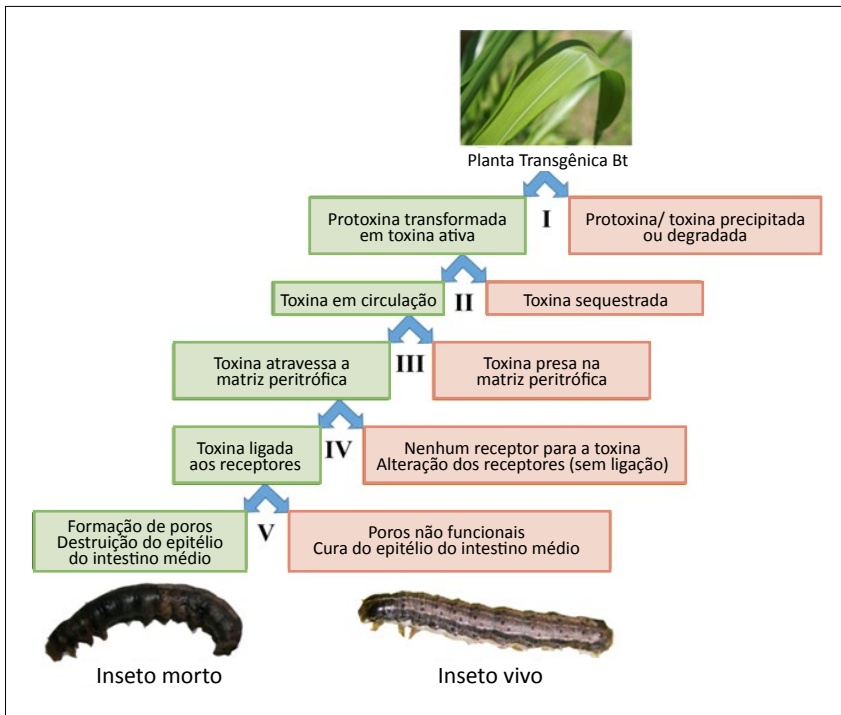
### 3. Modo de ação das proteínas inseticidas nas culturas Bt comercializadas

O modo de ação das toxinas Cry inclui vários passos sequenciais (figura 2) que determinam sua especificidade (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017). Quando produzidas pela bactéria Bt, as proteínas Cry são agrupadas em um corpo cristalino que é solubilizado em ambientes alcalinos e redutores como, por exemplo, os fluidos digestivos intestinais de hospedeiros suscetíveis. Após a solubilização, a proteína Cry é processada por proteases nos fluidos intestinais em toxina ativa. Dado que a maioria dos genes da toxina Cry produz proteínas Cry solúveis, a solubilização dos cristais não é realizada quando os insetos ingerem uma toxina Cry de uma cultura Bt. O processamento por fluidos do intestino médio pode ser mais relevante nos casos em que as plantas são transformadas para expressar a protoxina, como na soja Bt que produz as proteínas Cry1A.105 e Cry2Ab2 (EPA, 2015). No entanto, nos casos em que as plantas produzem apenas a forma truncada da toxina, como o milho produtor de Cry1Ab e Cry1Fa (EPA, 2010b), o processamento pelos fluidos do intestino médio pode não ser tão crítico. As toxinas ativadas atravessam a matriz peritrófica protetora para atingir o epitélio do intestino médio e reconhecem sítios de ligação de alta afinidade em proteínas receptoras, o que favorece a oligomerização das toxinas e a formação de poros na membrana celular, que resultam em morte celular por choque osmótico (revisado por Adang *et al.*, 2014). O modo de ação das proteínas VIP (revisado por Chakroun *et al.*, 2016) também é baseado no reconhecimento de receptores na membrana da borda em escova e na formação de poros. Quando testadas, as proteínas Cry e VIP não compartilham sítios de ligação (Jakka *et al.*, 2015a; Chakroun *et al.*, 2016).

### **3. Mode of action of insecticidal proteins in commercialized Bt crops**

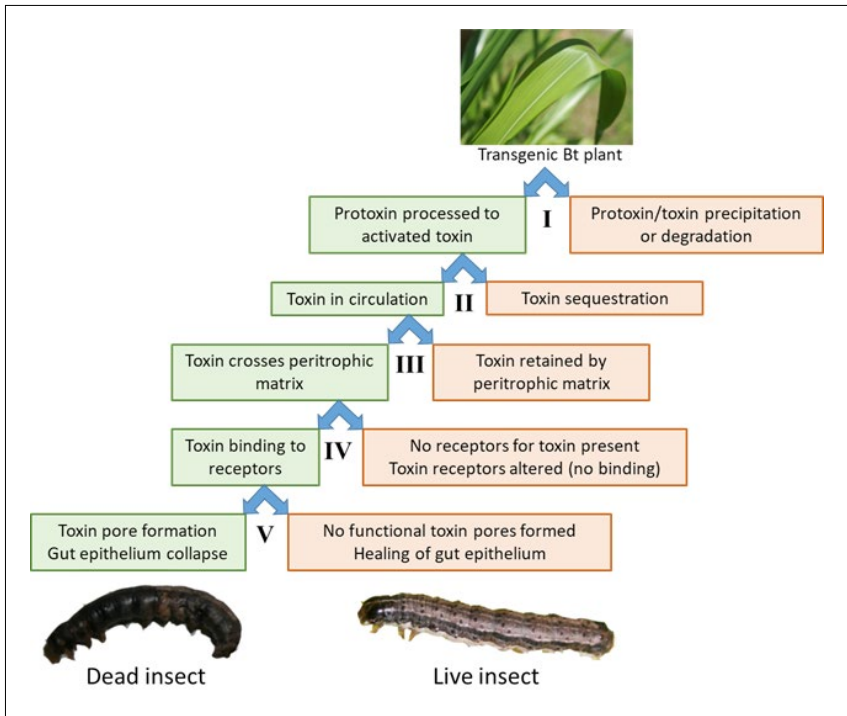
The mode of action of Cry toxins includes a number of sequential steps (figure 2) that determine specificity (Jurat-Fuentes & Crickmore, 2017). When produced by the Bt bacterium, Cry proteins are packed in a crystalline body that is solubilized in alkaline and reducing environments, such as the gut digestive fluids of susceptible hosts. Upon solubilization, the Cry protein is processed by proteases in the gut fluids to a toxin active core. Given that the most Cry toxin genes produce soluble Cry proteins, crystal solubilization is not applicable when insects ingest a Cry toxin from a Bt crop. Processing by midgut fluids may be most relevant in cases where the plants are transformed to produce the protoxin form, as in Bt soybean producing Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins (EPA, 2015). However, in cases where the plants produce only the truncated form of the toxin, like in the case of corn producing Cry1Ab and Cry1Fa (EPA, 2010b), processing by midgut fluids may not be as critical. Activated toxins cross the protective peritrophic matrix to reach the midgut epithelium and recognize high affinity binding sites in receptor proteins, which is conducive to toxin oligomerization and formation of pores on the cell membrane that result in cell death by osmotic shock (reviewed in Adang *et al.*, 2014). The mode of action of Vip proteins (reviewed by Chakroun *et al.*, 2016) is also based on recognition of receptors on the brush border membrane and pore formation. When tested, Cry and Vip proteins do not share binding sites (Jakka *et al.*, 2015a; Chakroun *et al.*, 2016).





**Figura 2.** Diagrama das etapas envolvidas no modo de ação das proteínas Cry produzidas pelas culturas Bt, uma vez ingeridas pelo inseto. Os passos (em algarismos romanos) determinam a especificidade (em caixas verdes), e os potenciais mecanismos de resistência (em caixas vermelhas) são indicados. Modificado com permissão de Jurat-Fuentes & Crickmore (2017).

Alterações em qualquer uma das etapas do modo de ação das toxinas Cry podem potencialmente resultar em resistência (figura 2); a maioria dos casos de resistência a toxinas Cry selecionadas em laboratório está ligada ou associada a alterações nos receptores e à ligação das toxinas (Ferré & Van Rie, 2002). O risco de resistência cruzada, definido como resistência a uma toxina não presente no ambiente de seleção inicial, aumenta consideravelmente quando duas toxinas Cry compartilham a maioria de seus sítios de ligação, uma vez que apenas uma alteração no receptor compartilhado pode resultar em resistência a ambas as toxinas. A piramidação de genes de toxina Cry na mesma planta reduz a taxa de evolução da resistência (Zhao *et al.*, 2005), mas



**Figure 2.** Diagram of the steps involved in the mode of action of Cry proteins produced by Bt crops once ingested by the insect. The steps (in roman numerals) determining specificity (in green boxes) and the potential resistance mechanisms (in red boxes) are indicated. Modified with permission from Jurat-Fuentes & Crickmore (2017).

While alterations in any of the steps in the mode of action of Cry toxins can potentially result in resistance (figure 2), the vast majority of laboratory-selected cases of resistance to Cry toxins are linked or associated to alterations in receptors and toxin binding (Ferré & Van Rie, 2002). The risk of cross-resistance, defined as resistance to a toxin not present in the initial selection environment, is highly increased when two Cry toxins share most of their binding sites, as a single alteration in the shared receptor can potentially result in resistance to both toxins. Pyramiding of *cry* toxin genes in the same plant reduces the rate of resistance evolution (Zhao *et al.*, 2005), but only when the toxins pyramided have unique populations of binding sites. Given

somente quando as toxinas piramidadas têm espectro diferente de locais de ligação. Dada a importância dos sítios de ligação às toxinas, considera-se geralmente que toxinas Cry que reconhecem populações diferentes de receptores exibem “modos de ação diferentes”. Foram descritos vários locais de ligação únicos e partilhados para diferentes toxinas Cry, com base em modelos de sítios de ligação derivados de ensaios de competição de ligação (Jakka *et al.*, 2015a). Esses modelos são uma ferramenta fundamental para elucidar quais genes de toxinas podem ser piramidados (combinados) na mesma planta para retardar a evolução da resistência e expandir a faixa de atividade.

#### 4. Sucessos das culturas Bt

Desde a primeira comercialização, em 1996, as culturas Bt revolucionaram o controle de pragas na agricultura. Nos EUA, o algodão e o milho Bt têm sido eficazes no controle e, em alguns casos, quase erradicaram as pragas-alvo primárias; um exemplo desse sucesso é o controle de larvas da broca-do-milho (*O. nubilalis*) pelo milho Bt. Antes da comercialização do milho Bt nos EUA, as perdas de produtividade e do controle de *O. nubilalis* foram estimadas em mais de US\$ 1 bilhão por ano (Ostlie *et al.*, 1997), e o controle era dificultado pelo fato de as larvas penetrarem no caule das plantas e escaparem das aplicações de inseticidas. A adoção de eventos de milho Bt com expressão das toxinas Cry1Ab (comercializada em 1996) e/ou Cry1Fa (introduzida em 2003) resultou em controle efetivo de *O. nubilalis*, levando à supressão de algumas populações em extensas áreas de produção agrícola (Hutchison *et al.*, 2010). Além disso, não houve relatos de suscetibilidade reduzida ou de resistência em campo (Siegfried *et al.*, 2007; Velez *et al.*, 2016), apesar de evidências relatadas demonstrarem o potencial de *O. nubilalis* em criar resistência a toxinas Cry1Ab (Crespo *et al.*, 2009) e Cry1Fa (Pereira *et al.*, 2008). Um caso semelhante é o da lagarta-da-maçã (*Chloridea virescens*), principal alvo para o algodão Bt; estima-se que a ampla adoção do algodão Bt tenha contribuído para a redução de aproximadamente 40% das áreas adequadas para o desenvolvimento de *C. virescens* (Blanco, 2012) o que diminuiu significativamente suas populações (Adamczyk Jr. & Hubbard, 2006; Micinski *et al.*, 2008).

Acredita-se que esses exemplos de sucesso das culturas Bt de-

the importance of toxin binding sites, it is generally considered that Cry toxins recognizing different populations of receptors display “different modes of action”. A number of unique and shared binding sites have been described for different Cry toxins based in binding site models derived from binding competition assays (Jakka *et al.*, 2015a). These models are a critical tool to elucidate which toxin genes may be pyramided (combined) in the same plant to delay the evolution of resistance and expand the range of activity.

#### **4. Successes of Bt crops**

Since first commercialization in 1996, Bt crops have revolutionized pest control in agriculture. In the USA, Bt cotton and Bt corn have been effective in controlling, and in some cases almost eradicating, primary targeted pests. A clear example of this success is the control of larvae of the European corn borer (*O. nubilalis*) by Bt corn. Before commercialization of Bt corn in the USA, costs resulting from yield losses and control of *O. nubilalis* were estimated in excess of \$1 billion annually (Ostlie *et al.*, 1997), and control was difficult due to larvae boring into stalks and escaping insecticide applications. Adoption of Bt corn events producing the Cry1Ab (commercialized in 1996) and/or Cry1Fa (introduced in 2003) toxins has resulted in effective control of *O. nubilalis*, leading to area wide suppression of some populations (Hutchison *et al.*, 2010). In addition, there have been no reports of reduced susceptibility or field resistance (Siegfried *et al.*, 2007; Velez *et al.*, 2016), despite reported evidence demonstrating the potential in *O. nubilalis* for evolving resistance to Cry1Ab (Crespo *et al.*, 2009) and Cry1Fa (Pereira *et al.*, 2008) toxins. A similar case is that of the main target for Bt cotton, the tobacco budworm (*Chloridea virescens*). Wide adoption of Bt cotton is estimated to have contributed to a ~40% reduction of areas suitable for development of *C. virescens* (Blanco, 2012), and has significantly reduced populations (Adamczyk Jr & Hubbard, 2006; Micinski *et al.*, 2008).

These examples of Bt crop success have been hypothesized to be due to the mandated high dose/refuge insect resistance

vam-se à estratégia de manejo da resistência dos insetos denominada “alta dose/refúgio” (Siegfried & Hellmich, 2012; Velez *et al.*, 2016). A estratégia (Gould, 1998; Roush, 1998) baseia-se na existência de alelos de resistência que são de natureza recessiva e, inicialmente, em baixa frequência no campo. As plantas Bt produzem uma dose de toxina suficiente para matar os insetos heterozigotos (levando uma cópia do alelo de resistência). Sob essas condições, um refúgio de plantas não Bt na proximidade do campo de cultivo Bt forneceria indivíduos suscetíveis capazes de acasalar com indivíduos resistentes cuja frequência seria baixa em campo, à medida que surgissem da área de cultura Bt; as larvas heterozigotas resultantes seriam efetivamente controladas pelos níveis de toxina produzida na cultura Bt, retardando em muito a evolução da resistência efetiva, de acordo com os modelos computacionais (Alstad & Andow, 1995).

Outra estratégia para retardar a evolução da resistência dos insetos-alvo às culturas Bt é o uso de plantas “piramidadas” (Gould, 1998), que expressam combinações de toxinas Bt com diferentes modos de ação. Como afirmado acima, toxinas produzidas em culturas Bt “com modo de ação distinto” têm sido sinônimo de ligação de toxinas a diferentes locais do intestino médio do inseto-alvo, como demonstrado por modelos de sítios de ligação envolvendo ensaios de competição (Jakka *et al.*, 2015a). O sucesso dessa estratégia de “piramidação” baseia-se na menor probabilidade de um inseto portar simultaneamente alelos de resistência que afetem dois genes de receptores distintos. A segunda geração de culturas Bt, com produção de duas toxinas com diferentes modos de ação contra a mesma praga, foi comercializada a partir de 2002 (por exemplo, Cry1Ac e Cry2Ab2 em algodão Bollgard II®, Cry1Ab e Cry1Fa em milho AcreMax®). Esses eventos apresentaram maior controle das pragas-alvo e ampliaram a faixa de atividade das plantas Bt para pragas adicionais que não eram efetivamente controladas por culturas Bt da primeira geração (toxina única) (Stewart *et al.*, 2001).

A introdução de proteínas VIP no protocolo de tecnologias de cultura Bt permitiu a comercialização de culturas com a produção de três toxinas com modos de ação supostamente distintos (tabela 2) como, por exemplo, o milho Bt produzindo Cry1Ab, Cry1Fa2 e Vip3Aa. No entanto, em alguns casos, algumas dessas toxinas piramida-

management strategy (Siegfried & Hellmich, 2012; Velez *et al.*, 2016). This strategy (Gould, 1998; Roush, 1998), is based on assumptions of resistance alleles being recessive and initially rare, and in Bt plants producing a high dose of toxin sufficient to kill heterozygous insects (carrying one copy of the resistance allele). Under these conditions, a refuge of non-Bt plants in proximity to the Bt crop field would provide an excess of susceptible individuals to mate with rare resistance moths emerging from the Bt crop area. The resulting heterozygous larvae would be effectively controlled by the levels of toxin produced in the Bt crop, greatly delaying the evolution of practical resistance according to computer models (Alstad & Andow, 1995).

In addition to the high dose/refuge strategy, evolution of resistance to Bt crops in targeted pests is also predicted to be delayed by the use of “pyramided” crops (Gould, 1998), expressing combinations of Bt toxins with distinct mode of action. As stated above, in the case of toxins produced in Bt crops, “distinct mode of action” has been synonymous with toxins binding to different target midgut sites as supported by binding site models from competition binding assays (Jakka *et al.*, 2015a). The success of this “pyramiding” strategy is based on the lower probability of an insect simultaneously carrying resistance alleles affecting two distinct receptor genes. The second generation of Bt crops, producing two toxins with distinct mode of action against the same pest, were commercialized in 2002 (for example Cry1Ac and Cry2Ab2 in Bollgard II™. cotton, Cry1Ab and Cry1Fa in AcreMax™. corn). These events displayed increased control of targeted pests and expanded the range of activity to additional pests not effectively controlled by first generation (single toxin) Bt crops (Stewart *et al.*, 2001). Introduction of Vip proteins to the Bt crop technology pipeline has allowed commercialization of crops producing three toxins with putative distinct modes of action (table 2), for example Bt corn producing Cry1Ab, Cry1Fa2, and Vip3Aa. However, in some cases some of these pyramided toxins do share some populations of binding sites in target pests, as in the case of Cry1Ab, Cry1A.105 and Cry1Fa in *O. nubilalis* and *Spodoptera frugiperda* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013). In this case, a plant producing combinations of any of these proteins (table 2)

das compartilham populações de sítios de ligação nas pragas-alvo, como no caso de Cry1Ab, Cry1A.105 e Cry1Fa em *O. nubilalis* e *S. frugiperda* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013). Nesse caso, uma planta que produz combinações de qualquer uma dessas proteínas (tabela 2) provavelmente representaria uma combinação de toxinas com um modo de ação semelhante, em vez de uma verdadeira piramidação de toxinas distintas, aumentando o risco de evolução da resistência cruzada.

**Tabela 2.** Lista de culturas Bt comercializadas com genes piramidados disponíveis nos EUA (adaptado de DiFonzo *et al.*, 2018; e Narva *et al.*, 2014). O sombreado de células é para facilitar a leitura, e não indicativo de uma característica particular.

As espécies-alvo incluem: BCW, lagarta-rosca (*Agrotis ipsilon*); CEW/BW, lagarta-da-espiga/lagarta-do-milho (*Helicoverpa zea*); ECB, broca-do-milho-europeia (*Ostrinia nubilalis*); FAW, lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*); PBW, lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*); SB, broca-do-caule (*Papaipema nebris*); SCB, broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*); SWCB, broca-do-milho-do-sudoeste (*Diatraea grandisoella*); TAW, verdadeira-lagarta-do-cartucho (*Pseudaletia unipuncta*); TBW, lagarta-da-maçã (*Chloridea virescens*); WBCW, lagarta-da-espiga (*Striacosta albicosta*); WCRW, lagarta-da-raiz-do-milho-ocidental (*Diabrotica virgifera virgifera*).

Cultura	Alvo	Genes piramidados	Nome comercial	Principais pragas alvo
Milho	Lepidóptera	Cry1Ab Cry1Fa2	AcreMax AcreMax TRIsect AcreMax Xtra AcreMax Xtreme Agrisure 3120 Agrisure 3122 Agrisure Duracade 5122 Intrasect QROME	BCW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB
		Cry1Ab Cry1Fa2 Vip3Aa20	AcreMax Leptra Agrisure Viptera 3220 Agrisure Duracade 5222 Leptra	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB, TAW, WBC

continua

would probably represent a stack of toxins with similar mode of action rather than a true pyramid of distinct toxins, increasing the risk for the evolution of cross-resistance.

**Tabela 2.** List of commercialized Bt crops with pyramided genes available in the USA (adapted from DiFonzo *et al.*, 2018; and Narva *et al.*, 2014). Shading of cells is to facilitate reading and not indicative of a particular feature.

Target species include: BCW, black cutworm (*Agrotis ipsilon*); CEW/BW, corn earworm/bollworm (*Helicoverpa zea*); ECB, European corn borer (*Ostrinia nubilalis*); FAW, fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*); PBW, pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*); SB, stalk borer (*Papaipema nebris*); SCB, sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*); SWCB, southwestern corn borer (*Diatraea grandisoella*); TAW, true armyworm (*Pseudaletia unipuncta*); TBW, tobacco budworm (*Chloridea virescens*); WBCW, western bean cutworm (*Striacosta albicosta*); WCRW, western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*).

Crop	Target	Pyramid Genes	Trade Name	Main Target Species
Corn	Lepidoptera	Cry1Ab Cry1Fa2	AcreMax AcreMax TRIsect AcreMax Xtra AcreMax Xtreme Agrisure 3120 Agrisure 3122 Agrisure Duracade 5122 Intrasect QROME	BCW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB
		Cry1Ab Cry1Fa2 Vip3Aa20	AcreMax Leptra Agrisure Viptera 3220 Agrisure Duracade 5222 Leptra	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB, TAW, WBC

continuing



Cultura	Alvo	Genes piramidados	Nome comercial	Principais pragas alvo	
Milho	Lepidóptera	Cry1Ab Vip3Aa20	Agrisure Viptera 3110 Agrisure Viptera 3111	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB, TAW, WBC	
		Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1Fa2	Powercore Smartstax	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB	
		Cry1A.105 Cry2Ab2 Vip3Aa20	Trecepta	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB, TAW, WBC	
		Cry1A.105 Cry2Ab2	VT Double PRO VT Triple PRO	CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB	
	Coleóptera	mCry3A Cry34/35Ab1	AcreMax Xtreme Agrisure 3122 Agrisure 3220 Intrasect Xtreme QROME	WCRW	
		mCry3A eCry3.1Ab	Agrisure Duracade 5222 Agrisure Duracade 5122	WCRW	
		Cry3Bb1 Cry34/35Ab1	Smartstax	WCRW	
	Algodão	Lepidóptera	Cry1Fa2 Cry1Ac	WideStrike	TBW, BW, FAW, PBW
			Cry1Ac Cry2Ab2	Bollgard II	TBW, BW, FAW, PBW
Cry1Fa2 Cry1Ac Vip3Aa19			WideStrike 3	TBW, BW, FAW, PBW	
Cry1Ab Cry2Ae			TwinLink	TBW, BW, FAW, PBW	
Cry1Ab Cry2Ae Vip3Aa19			TwinLink Plus	TBW, BW, FAW, PBW	

continuation

Crop	Target	Pyramid Genes	Trade Name	Main Target Species
Corn	Lepidoptera	Cry1Ab Vip3Aa20	Agrisure Viptera 3110 Agrisure Viptera 3111	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB, TAW, WBC
		Cry1A.105 Cry2Ab2 Cry1Fa2	Powercore Smartstax	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB
		Cry1A.105 Cry2Ab2 Vip3Aa20	Trecepta	BCW, CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB, TAW, WBC
		Cry1A.105 Cry2Ab2	VT Double PRO VT Triple PRO	CEW, ECB, FAW, SB, SCB, SWCB
	Coleoptera	mCry3A Cry34/35Ab1	AcreMax Xtreme Agrisure 3122 Agrisure 3220 Intrasect Xtreme QROME	WCRW
		mCry3A eCry3.1Ab	Agrisure Duracade 5222 Agrisure Duracade 5122	WCRW
		Cry3Bb1 Cry34/35Ab1	Smartstax	WCRW
Cotton	Lepidoptera	Cry1Fa2 Cry1Ac	WideStrike	TBW, BW, FAW, PBW
		Cry1Ac Cry2Ab2	Bollgard II	TBW, BW, FAW, PBW
		Cry1Fa2 Cry1Ac Vip3Aa19	WideStrike 3	TBW, BW, FAW, PBW
		Cry1Ab Cry2Ae	TwinLink	TBW, BW, FAW, PBW
		Cry1Ab Cry2Ae Vip3Aa19	TwinLink Plus	TBW, BW, FAW, PBW

## 5. Seleção da resistência em campo como ameaça à tecnologia Bt

A evolução da resistência é considerada a ameaça mais séria à sustentabilidade da tecnologia Bt; após mais de vinte anos do primeiro evento comercial, a seleção da resistência em campo foi documentada para seis espécies de lepidópteros e para uma espécie de coleóptero (tabela 3) (Tabashnik & Carriere, 2017). Pelo menos um caso de resistência em campo foi descrito para todas as toxinas produzidas em culturas Bt, exceto para Vip3Aa. É importante ressaltar que, em todos os casos de resistência documentados, a expressão da proteína Cry não representava uma dose “alta” suficiente para matar a praga, levando à seleção de insetos portadores de resistência, o que contraria um dos princípios centrais da estratégia de “alta dose/refúgio”, como explicado acima. A falta de custos adaptativos significativos associados aos alelos de resistência selecionados em campo (Gassmann, 2016; Horikoshi *et al.*, 2016; Jakka *et al.*, 2014b) é também um fator que favoreceu a evolução da resistência (Carrière *et al.*, 2010).

Quase 79% (quinze em dezenove) dos casos de resistência relatados em campo (tabela 3) foram para eventos de milho Bt. Notoriamente, a lagarta-da-raiz-do-milho (*D. virgifera virgifera*) apresentou resistência individual ou cruzada às quatro proteínas Cry (Cry3Bb1, Cry34/35Ab, mCry3A e eCry3.1Ab) expressas nesses eventos para o controle de coleópteros em milho Bt (Gassmann *et al.*, 2014; Gassmann *et al.*, 2016; Jakka *et al.*, 2016). No caso de lepidópteros, populações de diferentes espécies de pragas em locais distintos apresentaram resistência à mesma toxina Bt; por exemplo, três espécies distintas de pragas apresentaram resistência à toxina Cry1Ab em milho Bt cultivado em diferentes lugares. O primeiro caso relatado foi de *Busseola fusca*, na África do Sul (Van Rensburg, 2007), seguido de *S. frugiperda*, no Brasil (Omoto *et al.*, 2016), e *H. zea*, nos EUA (Dively *et al.*, 2016). O número elevado de espécies que apresentam resistência à mesma toxina pode indicar, ao menos em alguns casos, que o modo de ação é semelhante entre as toxinas Cry1. Assim, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105 e Cry1Fa mostraram compartilhar pelo menos alguns sítios de ligação nos receptores presentes em *S. frugiperda*

## 5. Field-evolved resistance threatens sustainability of Bt crop technology

Currently, the evolution of resistance is considered the most serious threat to the sustainability of Bt crop technology. After more than 20 years since the first commercial event, field-evolved resistance has been documented for six lepidopteran and one coleopteran species (table 3) (Tabashnik & Carriere, 2017). At least one case of field resistance has been described for all toxins produced in Bt crops, except for Vip3Aa. Importantly, in all cases of resistance documented the Cry protein produced did not represent a high dose for the pest evolving resistance, contravening one of the main tenets of the high dose/refuge strategy, as explained above. Lack of significant fitness costs associated to field-evolved resistance alleles (Gassmann, 2016; Horikoshi *et al.*, 2016; Jakka *et al.*, 2014b) also favors evolution of resistance (Carrière *et al.*, 2010).

Almost 79% (15 out of 19) cases of field-evolved resistance (table 3) have been reported for Bt corn events. Notoriously, the corn rootworm (*D. v. virgifera*) has developed resistance or cross-resistance to all four Cry proteins (Cry3Bb1, Cry34/35Ab, mCry3A, and eCry3.1Ab) targeting this coleopteran pest in Bt corn (Gassmann *et al.*, 2014; Gassmann *et al.*, 2016; Jakka *et al.*, 2016). In the case of Lepidoptera, populations of different pest species at distinct locations have developed resistance to the same Bt toxin. For instance, three distinct pest species have developed resistance to Cry1Ab in Bt corn in different geographic locations. The first reported case was *Busseola fusca* in South Africa (van Rensburg, 2007), followed by *S. frugiperda* in Brazil (Omoto *et al.*, 2016) and *H. zea* in the USA (Dively *et al.*, 2016). This high number of species developing resistance to the same toxin may be a result, at least in some cases, of a similar mode of action between Cry1 toxins. Thus, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, and Cry1Fa have been shown to share at least some binding sites in *S. frugiperda* (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013) and *H. zea* (Hernández & Ferré, 2005). Consequently, resistance to Cry1Fa2 in *S. frugiperda* in Brazil (Farias *et al.*, 2014) probably resulted in cross-resistance to Cry1Ab (Omoto *et al.*, 2016). Similarly, resistance in *H. zea* to Cry1Ab produced in Bt sweet corn

(Hernández-Rodríguez *et al.*, 2013) e *H. zea* (Hernández & Ferré, 2005). Dessa forma, a resistência a Cry1Fa2 em *S. frugiperda* no Brasil (Farias *et al.*, 2014) provavelmente resultou em resistência cruzada com a toxina Cry1Ab (Omoto *et al.*, 2016). Da mesma forma, a resistência de *H. zea* a Cry1Ab expressa em milho-doce Bt ajudaria a explicar a eficácia reduzida descrita para híbridos de milho que expressam Cry1A.105 e Cry2Ab2 (Dively *et al.*, 2016), pois esses híbridos representariam um único evento de toxina para *H. zea* resistente a Cry1Ab.

**Tabela 3.** Lista de espécies que registraram casos de resistência a culturas Bt. O sombreamento de células é para facilitar a leitura, e não indicativo de uma característica particular.

Toxina	Inseto	Local	Cultura	Primeira descrição
Cry1Ab	<i>Busseola fusca</i>	África do Sul	Milho	(Van Rensburg, 2007)
	<i>Helicoverpa zea</i>	EUA	Milho	(Dively <i>et al.</i> , 2016)
	<sup>a</sup> <i>Spodoptera frugiperda</i>	Brasil	Milho	(Omoto <i>et al.</i> , 2016)
Cry1Fa2	<i>Striacosta albicosta</i>	EUA	Milho	(Ostrem <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Striacosta albicosta</i>	Canadá	Milho	(Smith <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	EUA	Milho	(Huang <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<sup>b</sup> EUA	Milho	(Storer <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Brasil	Milho	(Farias <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Argentina	Milho	(Chandrasena <i>et al.</i> , 2018)

continua

would help explain reduced efficacy described for corn hybrids producing Cry1A.105 and Cry2Ab2 (Dively *et al.*, 2016), as these hybrids would represent a single toxin event for Cry1Ab-resistant *H. zea*.

**Table 3.** List of species that with reported cases of resistance to Bt crops. Shading of cells is to facilitate reading and not indicative of a particular feature.

Toxin	Insect	Location	Crop	First Report
Cry1Ab	<i>Busseola fusca</i>	South Africa	Corn	(Van Rensburg, 2007)
	<i>Helicoverpa zea</i>	USA	Corn	(Dively <i>et al.</i> , 2016)
	<sup>a</sup> <i>Spodoptera frugiperda</i>	Brazil	Corn	(Omoto <i>et al.</i> , 2016)
Cry1Fa2	<i>Striacosta albicosta</i>	USA	Corn	(Ostrem <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Striacosta albicosta</i>	Canada	Corn	(Smith <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	USA	Corn	(Huang <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<sup>b</sup> USA	Corn	(Storer <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Brazil	Corn	(Farias <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Argentina	Corn	(Chandrasena <i>et al.</i> , 2018)

continuing

continuação

Toxina	Inseto	Local	Cultura	Primeira descrição
Cry1Ac	<sup>c</sup> <i>Helicoverpa zea</i>	EUA	Algodão	(Ali <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Índia	Algodão	(Dhurua & Gujar, 2011)
Cry1A.105	<i>Diatraea saccharalis</i>	Argentina	Milho	(Grimi <i>et al.</i> , 2018)
	<sup>d</sup> <i>Helicoverpa zea</i>	EUA	Milho	(Dively <i>et al.</i> , 2016)
Cry2Ab	<sup>c</sup> <i>Helicoverpa zea</i>	EUA	Algodão	(Ali & Luttrell, 2007)
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	Índia	Algodão	(Kranthi, 2015)
Cry3Bb	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	EUA	Milho	(Gassmann <i>et al.</i> , 2011)
Cry34/35Ab1	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	EUA	Milho	(Gassmann <i>et al.</i> , 2016)
mCry3A	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	EUA	Milho	(Gassmann <i>et al.</i> , 2014)
eCry3.1Ab	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	EUA	Milho	(Jakka <i>et al.</i> , 2016)

<sup>a</sup> Indistinguível da resistência a Cry1Fa2

<sup>b</sup> Porto Rico

<sup>c</sup> Nenhum caso publicado de falha de controle em larga escala

<sup>d</sup> Indistinguível da resistência a Cry1Ab

continuation

Toxin	Insect	Location	Crop	First Report
Cry1Ac	<sup>c</sup> <i>Helicoverpa zea</i>	USA	Cotton	(Ali <i>et al.</i> , 2006)
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	India	Cotton	(Dhuria & Gujar, 2011)
Cry1A.105	<i>Diatraea saccharalis</i>	Argentina	Corn	(Grimi <i>et al.</i> , 2018)
	<sup>c</sup> <i>Helicoverpa zea</i>	USA	Corn	(Dively <i>et al.</i> , 2016)
Cry2Ab	<sup>c</sup> <i>Helicoverpa zea</i>	USA	Cotton	(Ali & Luttrell, 2007)
	<i>Pectinophora gossypiella</i>	India	Cotton	(Kranthi, 2015)
Cry3Bb	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	USA	Corn	(Gassmann <i>et al.</i> , 2011)
Cry34/35Ab1	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	USA	Corn	(Gassmann <i>et al.</i> , 2016)
mCry3A	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	USA	Corn	(Gassmann <i>et al.</i> , 2014)
eCry3.1Ab	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	USA	Corn	(Jakka <i>et al.</i> , 2016)

<sup>a</sup> Indistinguishable from resistance to Cry1Fa2

<sup>b</sup> Puerto Rico

<sup>c</sup> No published evidence of widespread crop failures

<sup>d</sup> Indistinguishable from resistance to Cry1Ab



Outros fatores que poderiam ter contribuído para aumentar o número de relatos de resistência às culturas Bt em Lepidoptera são o comportamento migratório de longo alcance e a polifagia da praga-alvo. Sendo assim, acredita-se que a migração de longo alcance de *S. frugiperda* possa ter contribuído para a dispersão da resistência ao milho Cry1Fa2 de Porto Rico para os EUA (Huang *et al.*, 2014). No entanto, evidências atuais baseadas em *screening* de DNA confirmam que *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa2 de Porto Rico não migrou para fora da ilha (Banerjee *et al.*, 2017). A polifagia e a alternância de hospedeiro, como relatado para *H. zea* (Gould *et al.*, 2002), sugerem que esses insetos podem ser expostos a diferentes culturas Bt que produzem toxinas similares durante seu ciclo migratório anual, aumentando a pressão para a evolução da resistência. Por outro lado, a polifagia também pode ser benéfica para retardar a resistência às culturas Bt, pois os hospedeiros alternativos podem servir, em alguns casos, como refúgio natural, mantendo adultos suscetíveis para reduzir o risco de evolução da resistência, como estimado no caso de *Helicoverpa* spp. em algodão Bt (Head *et al.*, 2010; Ravi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2002). No caso de *S. frugiperda*, a existência de diferenciação genética associada ao hospedeiro, na forma de populações/variedade em milho e arroz (Pashley *et al.*, 1992), pode dificultar os esforços para controlar e reduzir o risco de resistência, pois os alelos de resistência podem ser transmitidos entre linhagens morfológicamente indistinguíveis (Nagoshi *et al.*, 2017a) e mantidos em populações que favorecem cultivos não Bt como hospedeiros. Mais estudos são necessários para entender o impacto da diferenciação genética associada ao hospedeiro para estabelecer estratégias de manejo de resistência para as culturas Bt.

Dentro das espécies relatadas e que apresentaram mecanismo de evolução da resistência às culturas Bt, *S. frugiperda* destaca-se por ter apresentado resistência em pelo menos seis localizações geográficas distintas em três países, incluindo Porto Rico (Storer *et al.*, 2010), Flórida e Carolina do Norte (Huang *et al.*, 2014) nos EUA, nas regiões da Bahia e do cerrado, no Brasil (Monnerat *et al.*, 2015; Farias *et al.*, 2014), e na região norte da Argentina (Chandrasena *et al.*, 2018). O atual modelo de comportamento migratório e de troca genética entre populações

Other factors that could have contributed to increase the number of resistance reports to Bt crops in Lepidoptera is the long range migratory behavior and polyphagia of targeted pest species. For instance, long range migration of *S. frugiperda* was hypothesized to have contributed to dispersal of resistance to Cry1Fa2 corn from Puerto Rico into continental USA (Huang *et al.*, 2014). However, current evidence from DNA-based screening supports that Cry1Fa2 resistant *S. frugiperda* from Puerto Rico have not migrated outside of the island (Banerjee *et al.*, 2017). Polyphagia and host alternation, as reported for *H. zea* (Gould *et al.*, 2002) suggests that these insects may be exposed to different Bt crops producing similar toxins during their annual migratory cycle, increasing pressure for evolution of resistance. Alternatively, polyphagia may also be beneficial to delay resistance to Bt crops, as alternative hosts may serve in some cases as natural refuge supplying susceptible moths to reduce the risk of resistance evolution, as estimated in the case of *Helicoverpa* spp. and Bt cotton (Head *et al.*, 2010; Ravi *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2002). In the case of *S. frugiperda*, the existence of host-associated genetic differentiation in the form of corn and rice strains (Pashley *et al.*, 1992) may make efforts to control and reduce the risk of resistance more difficult, as resistance alleles may be transmitted between morphologically indistinguishable strains (Nagoshi *et al.*, 2017a) and maintained in populations that favor non-Bt crops as hosts. More information is needed to understand the impact of host-associated genetic differentiation on resistance management strategies for Bt crops.

Within the species reported to evolve resistance to Bt crops, *S. frugiperda* is notorious for developing resistance in at least six distinct geographic locations in three countries, including Puerto Rico (Storer *et al.*, 2010), Florida and North Carolina (Huang *et al.*, 2014) in the USA, the Bahia and Cerrado regions in Brazil (Farias *et al.*, 2014; Monnerat *et al.*, 2015) and the northern region of Argentina (Chandrasena *et al.*, 2018). The current model for migratory behavior and genetic exchange between populations of *S. frugiperda* (Nagoshi *et al.*, 2017b; Nagoshi *et al.*, 2012) supports that resistance in Argentina and Brazil. Moreover, in the last couple of years *S. frugiperda* has established itself as a devastating exotic pest in the African continent (Day

de *S. frugiperda* (Nagoshi *et al.*, 2017b; Nagoshi *et al.*, 2012) sustenta essa resistência na Argentina e no Brasil; além disso, estudos demonstram que, nos últimos dois anos, populações de *S. frugiperda* estabeleceram-se como praga exótica devastadora no continente africano (Day *et al.*, 2017); análises de haplótipos moleculares sugerem a introdução de indivíduos de *S. frugiperda* da população da Flórida/Porto Rico em populações estabelecidas na África (Nagoshi *et al.*, 2018), mas, quando testados, esses insetos não carregavam o alelo de resistência detectado em Porto Rico (Nagoshi *et al.*, 2017c).

O processo atual de evolução da resistência às culturas Bt coloca em evidência a necessidade de toxinas alternativas para piramidação. Por exemplo, nos EUA, tem sido relatada para populações de *H. zea* resistência a todas as toxinas Cry1 e Cry2 produzidas pelo algodão e pelo milho Bt; isso sugere que Vip3Aa é a única toxina ativa comercializada que controla a praga nos EUA. Do mesmo modo, a resistência a todas as toxinas Cry1 em populações de *S. frugiperda* sugere que apenas Cry2Ab e Vip3Aa permanecem como opções válidas para o controle de *S. frugiperda*, embora alelos de resistência a ambas as toxinas tenham sido isolados de populações de campo nos EUA (Niu *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2017). Além disso, a toxina Vip3Aa é produzida por eventos de algodão Bt e milho Bt (tabela 2), sugerindo o aumento da pressão para a evolução da resistência à toxina em *H. zea* e *S. frugiperda*. Infelizmente, no presente momento, não há eventos de algodão Bt que produzam simultaneamente Cry2Ab e Vip3Aa; essa combinação de toxinas proporcionaria o controle de insetos lepidópteros resistentes a Cry1 e representaria a junção de dois modos de ação distintos, reduzindo o risco de evolução da resistência. Em contraste, considerando os casos relatados de resistência em campo às toxinas Cry1, eventos piramidados produtores das toxinas Cry2Ab ou Vip3Aa com toxinas Cry1 podem representar um único evento de modo de ação da toxina e a possibilidade de seleção sequencial de resistência. Práticas mais eficazes de manejo da resistência e piramidação com toxinas com modos de ação diferentes são necessárias para garantir a sustentabilidade do controle dessas espécies de pragas pelas culturas Bt.

O estudo de Baum *et al.* (2007) demonstrou que *D. v. virgifera*

*et al.*, 2017). Molecular haplotype analyses suggest introduction of *S. frugiperda* from the Florida/Puerto Rico population into Africa (Nagoshi *et al.*, 2018), yet when tested these insects did not carry the resistance allele detected in Puerto Rico (Nagoshi *et al.*, 2017c).

The current status of resistance to Bt crops highlights the critical need for alternative toxins for pyramiding efforts. For example, resistance to all Cry1 and Cry2 toxins produced by Bt cotton and Bt corn has been reported for populations of *H. zea* in the USA. This observation suggests that Vip3Aa is the only remaining active commercialized toxin controlling this pest in the USA. Similarly, resistance to all Cry1 toxins in populations of *S. frugiperda* suggests that only Cry2Ab and Vip3Aa remain as valid options to control *S. frugiperda*, although resistance alleles to both toxins have been isolated from field populations in the USA (Niu *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Furthermore, the Vip3Aa toxin is produced by both Bt cotton and Bt corn events (table 2), suggesting increased pressure for evolution of resistance to this toxin in *H. zea* and *S. frugiperda*. Unfortunately, there are currently no Bt corn or Bt cotton events producing simultaneously Cry2Ab and Vip3Aa toxins. This combination of toxins would provide control of Cry1-resistant lepidopteran insects and represent a true pyramid of two distinct modes of action, reducing the risk of resistance evolution. In contrast, considering the reported cases of field resistance to Cry1 toxins, pyramided events producing Cry2Ab or Vip3Aa with Cry1 toxins may represent a single toxin event and a case for sequential selection of resistance. Clearly more effective resistance management practices and pyramiding of new modes of action are needed to secure sustainability of control for these pest species by Bt crops.

For the only coleopteran pest targeted by Bt crops, *D. v. virgifera*, localized resistance or cross-resistance has been described to all proteins produced by Bt corn events. Insecticidal gene silencing by RNA interference has been proposed as a new mode of action in pyramiding efforts with Bt toxins for control of *D. v. virgifera* (Baum *et al.*, 2007). The possibility of using RNAi in Bt cotton to control *Helicoverpa armigera* has also been suggested (Ni *et al.*, 2017), but currently insecticidal RNAi technology is not deemed

*virgifera*, única praga de coleóptero alvo das culturas Bt, apresentou resistência simples ou cruzada para todas as proteínas produzidas por eventos de milho Bt. Como alternativa tem sido proposto o silenciamento de genes por RNA de interferência (RNAi) para piramidação com toxinas Bt, objetivando o controle de *D. v. virgifera* (Baum *et al.*, 2007). A possibilidade de usar RNAi no algodão Bt para controlar *H. armigera* também foi sugerida (Ni *et al.*, 2017), mas, atualmente, a tecnologia de RNAi inseticida não é considerada eficaz no controle de lepidópteros-praga (Shukla *et al.*, 2016).

## 6. Mecanismos de resistência às culturas Bt

Apesar do número crescente de casos relatados de resistência em campo para as culturas Bt (Tabashnik & Carriere, 2017), há pouca informação disponível sobre mecanismos e genes responsáveis. Em *D. v. virgifera*, um grupo simples de padrão de herança autossômico foi associado à resistência de Cry3Bb1 em populações derivadas de campo (Flagel *et al.*, 2015). Nesse caso, a resistência foi recessiva, e os marcadores genéticos para este locus foram capazes de prever o fenótipo de resistência em indivíduos de *D. v. virgifera* coletados em campo. O locus genético em questão incluía 39 genes preditos, entre eles um gene da subfamília B do transportador ABC, um candidato a receptor de toxina Cry. No entanto, não há dados suficientes que demonstrem o papel da ligação reduzida a toxinas na evolução da resistência de *D. v. virgifera* em campo, expostas a toxinas expressas por milho Bt.

Nos casos em que as toxinas não partilham os mesmos sítios de ligação, o fenótipo que apresenta resistência cruzada pode ser altamente informativo sobre o papel potencial da alteração da ligação da toxina na resistência selecionada em campo. Na Índia, relatou-se não haver resistência cruzada à toxina Cry2Ab2 em lagartas-rosadas (*Pectinophora gossypiella*), que são resistentes à toxina Cry1Ac expressa em algodão Bt, evidenciando haver envolvimento de alterações nos sítios de ligação à toxina Cry1Ac, que não são diferentes dos sítios de ligação à toxina Cry2Ab2 (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2003). Análises moleculares mostraram que a resistência em *P. gossypiella* na Índia estava ligada à

effective in controlling lepidopteran pests (Shukla *et al.*, 2016).

## 6. Mechanisms of resistance to Bt crops

Despite the growing number of reported cases of field-evolved resistance to Bt crops (Tabashnik & Carriere, 2017), there is scarce information available on the mechanisms and genes responsible. In *D. v. virgifera*, a single autosomal linkage group was associated with field derived Cry3Bb1-resistance (Flagel *et al.*, 2015). Resistance in this case was nearly completely recessive and genetic markers at the identified locus were predictive of the resistance phenotype in field-collected *D. v. virgifera*. The genetic locus included 39 predicted genes, among them a predicted ABC transporter subfamily B gene, a putative candidate Cry toxin receptor. However, there is no available data demonstrating the role of reduced toxin binding in field-evolved resistance to toxins produced by Bt corn in *D. v. virgifera*.

In cases where toxins do not share binding sites, the cross-resistance phenotype could be highly informative on the potential role of altered toxin binding in field-evolved resistance. Thus, lack of cross-resistance to Cry2Ab2 in pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) from India resistant to Cry1Ac produced in Bt cotton would support involvement of alterations in Cry1Ac binding sites, which are not shared with Cry2Ab2 (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2003). Molecular analyses determined that resistance in *P. gossypiella* from India was linked to missplicing of transcripts for a cadherin gene (Fabrick *et al.*, 2014), a putative Cry1Ac-receptor in that insect (Fabrick & Tabashnik, 2007). Semi-quantitative evaluation of Cry1Ac binding to midgut brush border membrane vesicles (BBMV) of *P. gossypiella* determined reduced binding in the BBMV from the larvae resistant to Cry1Ac cotton compared to susceptible larvae (Ojha *et al.*, 2014).

The most complete mechanistic description of resistance to a Bt crop currently available is the case of resistance to Bt corn producing the Cry1Fa2 toxin in *S. frugiperda* from Puerto Rico. Cross-resistance phenotypes in diverse *S. frugiperda* colonies from Puerto Rico clearly supported cross-resistance to Cry1A but not to Cry1Ca, Cry2A, or Vip3Aa toxins (Jakka *et al.*, 2015b; Jakka *et al.*, 2014a; Vélez *et al.*, 2013). Considering the current mo-

excisão de transcritos para um gene da caderina (Fabrick *et al.*, 2014), um suposto receptor da toxina Cry1Ac presente no inseto (Fabrick & Tabashnik, 2007). A avaliação semiquantitativa da ligação de Cry1Ac às vesículas da membrana da borda escovada (BBMV) do intestino médio de *P. gossypiella* apontou para a redução da ligação na BBMV de larvas resistentes ao algodão Cry1Ac em comparação às larvas suscetíveis (Ojha *et al.*, 2014).

Atualmente, a melhor descrição do mecanismo de resistência a uma cultura Bt é o caso do milho Bt expressando a toxina Cry1Fa2 em *S. frugiperda*, que ocorreu em Porto Rico. Fenótipos de resistência cruzada em diversas populações de *S. frugiperda* demonstraram resistência cruzada de Cry1F com a toxina Cry1A, mas não com as toxinas Cry1Ca, Cry2A ou Vip3Aa (Jakka *et al.*, 2015b; Jakka *et al.*, 2014a; Vélez *et al.*, 2013). Considerando o modelo atual de sítio de ligação para o inseto (Jakka *et al.*, 2015a), o fenótipo observado que apresentou resistência cruzada indica a alteração no sítio de ligação Cry1A-Cry1Fa compartilhado em insetos resistentes.

Agregue-se ainda que uma caracterização de mecanismo de ação foi realizada em uma linhagem de *S. frugiperda* resistente ao milho Cry1Fa2 denominada 456, originária de uma criação em Porto Rico (Blanco *et al.*, 2010). Os resultados dos ensaios quantitativos de ligação à toxina demonstraram claramente uma ligação reduzida de Cry1Fa, Cry1Ab e Cry1Ac (mas não Cry1Ca) em BBMV da linhagem 456 em comparação com uma linhagem de *S. frugiperda* suscetível (Jakka *et al.*, 2015b). O perfil do transcrito identificou um transcrito do transportador C2 da subfamília ABC (SfABCC2) que, em larvas da linhagem 456, continham a inserção de dois pares de bases não encontrada em insetos suscetíveis (Banerjee *et al.*, 2017). Essa mutação foi denominada alelo SfABCC2mut e resultou em um códon de parada prematuro e uma proteína SfABCC2 truncada predita. Os resultados dos ensaios funcionais com células do inseto cultivadas expressando as proteínas SfABCC2 e SfABCC2mut demonstraram que SfABCC2 é um receptor funcional que serve como sítio de ligação para as proteínas Cry1Fa-Cry1A. No alelo mutado SfABCC2mut, a função foi perdida (Banerjee *et al.*, 2017); os testes de retrocruzamento demonstraram que há uma relação direta entre SfABCC2mut e a resistência ao milho Bt expressando a proteína

del of binding site for this insect (Jakka *et al.*, 2015a), the observed cross-resistance phenotype supported alteration of a shared Cry1A-Cry1Fa binding site in resistant insects. Further mechanistic characterization has been performed on a *S. frugiperda* strain resistant to Cry1Fa2 corn named 456, which was originated from collections in Puerto Rico (Blanco *et al.*, 2010). Results from quantitative toxin binding assays clearly demonstrated reduced binding of Cry1Fa, Cry1Ab, and Cry1Ac (but not Cry1Ca) in BBMV from the 456 compared to a susceptible *S. frugiperda* strain (Jakka *et al.*, 2015b). Transcriptome profiling identified an ABC subfamily C2 transporter transcript (SfABCC2) which in larvae from the 456 strain contained a two base pair insertion not found in susceptible insects (Banerjee *et al.*, 2017). This mutation was named as the *SfABCC2mut* allele and resulted in a premature stop codon and a predicted truncated SfABCC2 protein. Results from functional assays with cultured insect cells expressing *SfABCC2* and *SfABCC2mut* proteins demonstrated that *SfABCC2* is a shared functional Cry1Fa-Cry1A receptor and that this receptor functionality is eliminated in the *SfABCC2mut* allele (Banerjee *et al.*, 2017). Backcross tests supported tight linkage between *SfABCC2mut* and resistance to Bt corn producing the Cry1Fa2-protein. Moreover, a genotyping test detecting the *SfABCC2mut* allele detected increasing frequency of the allele in *S. frugiperda* collections from Puerto Rico from the earliest samples tested (2007). Currently, the estimated frequency of *SfABCC2mut* in Puerto Rico is 0.55 (Banerjee *et al.*, 2017). This high frequency is in agreement with the sustained levels of resistance to Cry1Fa2 corn observed in the island since first reported (Storer *et al.*, 2012), which would be expected from the lack of significant fitness costs associated with the *SfABCC2mut* allele (Jakka *et al.*, 2014b). Preliminary work supports that the *S. frugiperda* carrying the *SfABCC2mut* allele have not dispersed to migratory destinations in the Caribbean or into mainland USA (Banerjee *et al.*, 2017), and that it is not present in invasive *S. frugiperda* in Africa (Nagoshi *et al.*, 2017c).



Cry1Fa2. Além disso, em um teste de genotipagem que detecta o alelo SfABCC2mut, observou-se uma frequência crescente desse alelo nas populações de *S. frugiperda* coletadas em Porto Rico a partir das primeiras amostras testadas (2007).

No momento, a frequência alélica estimada de SfABCC2mut em Porto Rico é de 0,55 (Banerjee *et al.*, 2017); tais dados reforçam os resultados iniciais de resistência ao milho Cry1Fa2 observados na ilha desde o primeiro relato (Storer *et al.*, 2012), o que seria esperado, uma vez que não houve custo significativo de adaptação associado à presença do alelo SfABCC2mut (Jakka *et al.*, 2014b). Trabalhos preliminares mostraram que lagartas de *S. frugiperda* portadoras do alelo SfABCC2mut não se dispersaram para destinos migratórios no Caribe ou nos EUA continentais (Banerjee *et al.*, 2017), tampouco está presente em lagartas de *S. frugiperda* na África (Nagoshi *et al.*, 2017c).

## 7. Conclusões

Culturas transgênicas produtoras de proteínas inseticidas Bt revolucionaram o controle de pragas na agricultura; a taxa de adoção da tecnologia apresenta aumento constante desde a primeira comercialização, o que resulta em benefícios importantes para os produtores e para o meio ambiente. O controle bem-sucedido em campo tem sido observado em espécies-alvo primárias, para as quais as culturas representam uma dose elevada de toxina Bt. O controle regional dessas espécies de pragas ampliou os benefícios até mesmo para os agricultores que não adotaram a tecnologia; a estratégia de alta dose/refúgio contribuiu para retardar a resistência aos cultivos Bt, mas a violação das recomendações — baixa adesão ao refúgio obrigatório, uso simultâneo de proteínas Bt com modo de ação similar e culturas Bt não expressando uma dose alta para algumas pragas — resultou em um número crescente de casos de resistência selecionados em campo em todo o mundo. Em Lepidoptera, a resistência é mais comum em milho Bt, quando comparada ao algodão Bt, e há mais casos relatados de resistência à toxina Cry1 em comparação às toxinas Cry2, sem casos relatados de resistência a Vip3Aa.

Populações da lagarta-da-raiz do milho (*D. v. virgifera*), atualmente a única praga de coleópteros visada por culturas Bt,

## 7. Conclusions

Transgenic crops producing insecticidal proteins from Bt have revolutionized pest control in agriculture. The rate of adoption for this technology has shown a constant increase since first commercialization, and has resulted in important benefits for growers and the environment. Successful area wide control has been observed for primary targeted species for which the crops represent a high dose of Bt toxin. Regional control of these pest species extended benefits even to farmers not adopting the technology. The high dose/refuge strategy has contributed to delay resistance to Bt crops, but violation of assumptions, including low compliance with mandated refuge, simultaneous use of Bt proteins with similar mode of action, and Bt crops not representing a high dose for some pests, has resulted in an increasing number of field-evolved resistance cases worldwide. In Lepidoptera, resistance is most common in Bt corn compared to Bt cotton, and there are more reported cases of resistance to Cry1 compared to Cry2 toxins, with no reported cases of resistance to Vip3Aa.

Populations of rootworms(*D. v. virgifera*), currently the only coleopteran pest targeted by Bt crops, have developed resistance to all toxins produced by Bt corn to control them. Pyramiding of novel insecticidal proteins with truly new modes of action, and the development of insecticidal gene silencing by RNAi, will provide tools to improve sustainability and expand efficacy of Bt crop technology. Optimization of mandated resistance management strategies will also be required to increase durability of Bt crops.

tiveram resistência selecionada a todas as toxinas produzidas pelo milho Bt para controlá-las. A piramidação de novas proteínas inseticidas com modos de ação verdadeiramente novos e o desenvolvimento do silenciamento de genes inseticidas por RNAi fornecerão ferramentas para melhorar a sustentabilidade e expandir a eficácia da tecnologia de cultura Bt. A otimização de estratégias de manejo de resistência obrigatórias também será necessária para aumentar a durabilidade das culturas Bt.

## Referências | References

ADAMCZYK JR., J.; HUBBARD, D. Changes in populations of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) and *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mississippi Delta from 1986 to 2005 as indicated by adult male pheromone traps. **Journal of Cotton Science**, 10, 155–160, 2006.

ADANG, M.; CRICKMORE, N.; JURAT-FUENTES, J. L. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In: T. S. Dhadialla and S. Gill, Eds., **Advances in Insect Physiology**, Vol. 47: Insect Midgut and Insecticidal Proteins. Academic Press, San Diego, CA, 2014, p.39-87.

ALI, M. I.; LUTTRELL, R. G.; YOUNG, S. Y. 3RD Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, 99, 164-75, 2006.

ALI, M. I.; LUTTRELL, R. G. Susceptibility of bollworm and tobacco budworm (Lepidoptera : Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, 100, 921-931, 2007.

ALSTAD, D. N.; ANDOW, D. A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, 268, 1894-1896, 1995.

AREAL, F. J.; RIESGO, L.; RODRIGUEZ-CEREZO, E. Economic and agroeconomic impact of commercialized GM crops: a meta-analysis. **Journal of Agricultural Science**, 151, 7-33, 2013.

BANERJEE, R.; HASLER, J.; MEAGHER, R.; NAGOSHI, R.; HIETALA, L.; HUANG, F.; NARVA, K.; JURAT-FUENTES, J. L. Mechanism and DNA-based detection of field-evolved resistance to transgenic Bt corn in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Scientific Reports**, 7, 10877, 2017.

BAUM, J. A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G. R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, 25, 1322-1326, 2007.

BLACKWOOD, C. B.; BUYER, J. S. Soil microbial communities associated with Bt and non-Bt corn in three soils. **Journal of Environmental Quality**, 33, 832-6, 2004.

BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; JURAT-FUENTES, J. L.; SANCHEZ, J. F.; VITERI, D.; VEGA-AQUINO, P.; TERAN-VARGAS, A. P.; AZUARA-DOMINGUEZ, A.; LOPEZ, J. D. J.; ARIAS, R.; ZHU, Y.-C.; LUGO-BARRERA, D.; JACKSON, R. Susceptibility of isofamilies of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1Ac and Cry1Fa proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, 35, 409-415, 2010.

BLANCO, C. A. *Heliothis virescens* and Bt cotton in the United States. **GM Crops Food**, 3, 201-12, 2012.

BOHNENBLUST, E. W.; BREINING, J. A.; SHAFFER, J. A.; FLEISCHER, S. J.; ROTH, G. W.; TOOKER, J. F. Current European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, injury levels in the northeastern United States and the value of Bt field corn. **Pest Management Science**, 70, 1711-9, 2014.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996–2015: Impacts on pesticide use and carbon emissions. **GM Crops & Food**, 8, 117-147, 2017a.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Farm income and production impacts of using GM crop technology 1996–2015. **GM Crops & Food**, 8, 156-193, 2017b.

CARRIÈRE, Y.; CROWDER, D. W.; TABASHNIK, B. E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications**, 3, 561-573, 2010.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (VIP) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, 329-350, 2016.

CHANDRASENA, D. I.; SIGNORINI, A. M.; ABRATTI, G.; STORER, N. P.; OLACIREGUI, M. L.; ALVES, A. P.; PILCHER, C. D. Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F delta-endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest Management Science**, 74, 746-754, 2018.

CRESPO, A. L.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; HELLMICH, R. L.; BLANKENSHIP, E. E.; MAGALHAES, L. C.; SIEGFRIED, B. D. On-plant survival and inheritance of resistance to Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* in a field-derived strain of European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. **Pest Management Science**, 65, 1071-81, 2009.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 62, 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. <http://www.btnomenclature.info/> , 2016.

DAY, R.; ABRAHAMS, P.; BATEMAN, M.; BEALE, T.; CLOTTEY, V.; COCK, M.; COLMENAREZ, Y.; CORNIANI, N.; EARLY, R.; GODWIN, J.; GOMEZ, J.; MORENO, P. G.; MURPHY, S. T.; OPPONG-MENSAH, B.; PHIRI, N.; PRATT, C.; SILVESTRI, S.; WITT, A. Fall armyworm: Impacts and implications for Africa. **Outlooks on Pest Management**, 28, 196-201, 2017.

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

DIFONZO, C.; PORTER, P.; TILMON, K. **The handy Bt trait table**. <https://www.texasinsects.org/bt-corn-trait-table.html> , 2018.

DIVELY, G. P.; VENUGOPAL, P. D.; FINKENBINDER, C. Field-evolved resistance in corn earworm to Cry proteins expressed by transgenic sweet corn. **PLoS One**, 11:e0169115, 2016.

DOWD, P. F. Insect management to facilitate preharvest mycotoxin management. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, 22, 327-350, 2003.

U. S. Environmental Protection Agency (EPA). **Biopesticide Registration Action Document: *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in corn**. . [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/pip/mon-89034-brad.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/mon-89034-brad.pdf) , 2010a.

U. S. Environmental Protection Agency (EPA). **Biopesticides Registration Action Document: Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn plant-incorporated protectants**. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/current-and-previously-registered-section-3-plant-incorporated> , 2010b.

U. S. Environmental Protection Agency (EPA). **Biopesticide Registration Action Document:** *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 proteins and the genetic material necessary for their production in MON87751 soybean. <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2014-0456-0008> , 2015.

FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37, 97-106, 2007.

FABRICK, J. A.; PONNURAJ, J.; SINGH, A.; TANWAR, R. K.; UNNITHAN, G. C.; YELICH, A. J.; LI, X.; CARRIERE, Y.; TABASHNIK, B. E. Alternative splicing and highly variable cadherin transcripts associated with field-evolved resistance of pink bollworm to Bt cotton in India. **PLoS One**, 9:e97900, 2014.

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

FERNANDEZ-CORNEJO, J.; WECHSLER, S.; LIVINGSTON, M.; MITCHELL, L. **Genetically engineered crops in the United States**. ERR-162 U. S. Department of Agriculture, Economic Research Service, 2014.

FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, 47, 501-33, 2002.

FLAGEL, L. E.; SWARUP, S.; CHEN, M.; BAUER, C.; WANJUGI, H.; CARROLL, M.; HILL, P.; TUSCAN, M.; BANSAL, R.; FLANNAGAN, R.; CLARK, T. L.; MICHEL, A. P.; HEAD, G. P.; GOLDMAN, B. S. Genetic markers for Western corn rootworm resistance to Bt toxin. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, 5, 399-405, 2015.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-evolved resistance to Bt maize by Western corn rootworm. **PLoS One**, 6:e22629, 2011.

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

GASSMANN, A. J.; SHRESTHA, R. B.; JAKKA, S. R.; DUNBAR, M. W.; CLIFTON, E. H.; PAOLINO, A. R.; INGBER, D. A.; FRENCH, B. W.; MASLOSKI, K. E.; DOUNDA, J. W.; ST CLAIR, C. R. Evidence of resistance to

Cry34/35Ab1 corn by Western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): root injury in the field and larval survival in plant-based bioassays. **Journal of Economic Entomology**, 109, 1872-80, 2016.

GASSMANN, A. J. Resistance to Bt maize by western corn rootworm: Insights from the laboratory and the field. **Current Opinion in Insect Science**, 15, 111-115, 2016.

GONZALEZ-CABRERA, J.; ESCRICHE, B.; TABASHNIK, B. E.; FERRE, J. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 33, 929-935, 2003.

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

GOULD, F.; BLAIR, N.; REID, M.; RENNIE, T. L.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S. *Bacillus thuringiensis*-toxin resistance management: stable isotope assessment of alternate host use by *Helicoverpa zea*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99, 16581-6, 2002.

GRIMI, D. A.; PARODY, B.; RAMOS, M. L.; MACHADO, M.; OCAMPO, F.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. Field-evolved resistance to Bt maize in sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) in Argentina. **Pest Management Science**, 74, 905-913, 2018.

HEAD, G.; JACKSON, R. E.; ADAMCZYK, J.; BRADLEY, J. R.; DUYN, J. V.; GORE, J.; HARDEE, D. D.; LEONARD, B. R.; LUTTRELL, R.; RUBERSON, J.; MULLINS, J. W.; ORTH, R. G.; SIVASUPRAMANIAM, S.; VOTH, R. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of stable carbon isotope ratios and gossypol residues. **Journal of Applied Ecology**, 47, 583-592, 2010.

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

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

HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; OKUMA, D. M.; FARIAS, J. R.; MIRALDO, L. L.; AMARAL, F. S. A.; OMOTO, C. Near-isogenic Cry1F-resistant strain of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to investigate fitness cost associated with resistance in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 109, 854-859, 2016.

HUANG, F.; QURESHI, J. A.; MEAGHER, R. L., JR.; REISIG, D. D.; HEAD, G. P.; ANDOW, D. A.; NI, X.; KERNS, D.; BUNTIN, G. D.; NIU, Y.; YANG, F.; DANGAL, V. Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. **PLoS One**, 9:e112958, 2014.

HUTCHISON, W. D.; BURKNESS, E. C.; MITCHELL, P. D.; MOON, R. D.; LESLIE, T. W.; FLEISCHER, S. J.; ABRAHAMSON, M.; HAMILTON, K. L.; STEFFEY, K. L.; GRAY, M. E.; HELLMICH, R. L.; KASTER, L. V.; HUNT, T. E.; WRIGHT, R. J.; PECINOVSKY, K.; RABAEEY, T. L.; FLOOD, B. R.; RAUN, E. S. Areawide suppression of European corn borer with Bt maize reaps savings to non-Bt maize growers. **Science**, 330, 222-225, 2010.

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

JAKKA, S. R.; KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. Fitness costs associated with field-evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, 107, 342-51, 2014b.

JAKKA, S. R.; FERRÉ, J.; JURAT-FUENTES, J. L. Cry toxin binding sites and their use in strategies to delay resistance evolution. In: M. Soberón, Y. Gao and A. Bravo, Ed., **Bt Resistance - Characterization and Strategies for GM Crops Producing *Bacillus thuringiensis* Toxins**. CABI, Boston (MA), USA, 2015b, p.154-160.

JAKKA, S. R.; GONG, L.; HASLER, J.; BANERJEE, R.; SHEETS, J. J.; NARVA, K.; BLANCO, C. A.; JURAT-FUENTES, J. L. Field-evolved Mode 1 resistance of the fall armyworm to transgenic Cry1Fa-expressing corn associated with reduced Cry1Fa toxin binding and midgut alkaline phosphatase expression. **Applied and Environmental Microbiology**, 82, 1023-34, 2015a.

JAKKA, S. R.; SHRESTHA, R. B.; GASSMANN, A. J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins by western corn rootworm (*Diatraea virgifera virgifera*). **Scientific Reports**, 6, 27860, 2016.

JAMES, C. **Global status of commercialization of biotech/GM crops: 2016**. The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), Ithaca, NY. 2016.



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

KLÜMPER, W.; QAIM, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. **PLoS One**, 9:e111629, 2014.

KOCH, M. S.; WARD, J. M.; LEVINE, S. L.; BAUM, J. A.; VICINI, J. L.; HAMMOND, B. G. The food and environmental safety of Bt crops. **Frontiers in Plant Science**, 6, 2015.

KRANTHI, K. R. Pink bollworm straiques Bt cotton. **Cotton Statistics & News**, 35, 2015.

LAWHORN, C. N.; NEHER, D. A.; DIVELY, G. P. Impact of coleopteran targeting toxin (Cry3Bb1) of Bt corn on microbially mediated decomposition. **Applied Soil Ecology**, 41, 364-368, 2009.

LU, Y.; WU, K.; JIANG, Y.; GUO, Y.; DESNEUX, N. Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services. **Nature**, 487, 362-5, 2012.

MARQUES, L. H.; SANTOS, A. C.; CASTRO, B. A.; STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; LEPPING, M. D.; SA, V.; MOSCARDINI, V. F.; RULE, D. M.; FERNANDES, O. A. Impact of transgenic soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins on the non-target arthropod community associated with soybean in Brazil. **PLoS One**, 13, 2018.

MARVIER, M.; MCCREEDY, C.; REGETZ, J.; KAREIVA, P. A meta-analysis of effects of Bt cotton and maize on nontarget invertebrates. **Science**, 316, 1475-1477, 2007.

MICINSKI, S.; BLOUIN, D.; WALTMAN, W.; COOKSON, C. Abundance of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* in pheromone traps during the past twenty years in northwestern Louisiana. **Southwestern Entomologist**, 33, 139-149, 2008.

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

NAGOSHI, R. N.; MURUA, M. G.; HAY-ROE, M.; JUAREZ, M. L.; WILLINK, E.; MEAGHER, R. L. Genetic characterization of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Argentina. **Journal of Economic Entomology**, 105, 418-28, 2012.

NAGOSHI, R. N.; FLEISCHER, S.; MEAGHER, R. L. Demonstration and quantification of restricted mating between Fall armyworm host strains in field collections by SNP comparisons. **Journal of Economic Entomology**, 110, 2568-2575, 2017a.

NAGOSHI, R. N.; FLEISCHER, S.; MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M.; KHAN, A.; MURUA, M. G.; SILVIE, P.; VERGARA, C.; WESTBROOK, J. Fall armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations. **PLoS One**, 12:e0171743, 2017b.

NAGOSHI, R. N.; KOFFI, D.; AGBOKA, K.; TOUNOU, K. A.; BANERJEE, R.; JURAT-FUENTES, J. L.; MEAGHER, R. L. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. **PLoS One**, 12:e0181982, 2017c.

NAGOSHI, R. N.; GOERGEN, G.; TOUNOU, K. A.; AGBOKA, K.; KOFFI, D.; MEAGHER, R. L. Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. **Scientific Reports**, 8, 2018.

NARVA, K. E.; STORER, N. P.; MEADE, T. Discovery and development of insect-resistant crops using genes from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Insect Physiology**, 47, 177-247, 2014.

The National Academies Press **Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects**. <https://www.nap.edu/catalog/23395/genetically-engineered-crops-experiences-and-prospects> , 2016.

NEHER, D. A.; MUTHUMBI, A. W. N.; DIVELY, G. P. Impact of coleopteran-active Bt corn on non-target nematode communities in soil and decomposing corn roots. **Soil Biology and Biochemistry**, 76, 127-135, 2014.

NI, M.; MA, W.; WANG, X.; GAO, M.; DAI, Y.; WEI, X.; ZHANG, L.; PENG, Y.; CHEN, S.; DING, L.; TIAN, Y.; LI, J.; WANG, H.; WANG, X.; XU, G.; GUO, W.; YANG, Y.; WU, Y.; HEUBERGER, S.; TABASHNIK, B. E.; ZHANG, T.; ZHU, Z. Next-generation transgenic cotton: pyramiding RNAi and Bt counters insect resistance. **Plant Biotechnology Journal**, 15, 1204-1213, 2017.

NIU, Y.; QURESHI, J. A.; NI, X.; HEAD, G. P.; PRICE, P. A.; MEAGHER, R. L.; KERNS, D.; LEVY, R.; YANG, X.; HUANG, F. F2 screen for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab2-maize in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from the southern United States. **Journal of Invertebrate Pathology**, 138, 66-72, 2016.

OJHA, A.; SREE, K. S.; SACHDEV, B.; RASHMI, M. A.; RAVI, K. C.; SURESH, P. J.; MOHAN, K. S.; BHATNAGAR, R. K. Analysis of resistance to Cry1Ac in field-collected pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera:Gelechiidae), populations. **GM Crops Food**, 5, 280-6, 2014.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, 72, 1727-36, 2016.

OSTREM, J. S.; PAN, Z.; FLEXNER, J. L.; OWENS, E.; BINNING, R.; HIGGINS, L. S. Monitoring susceptibility of Western bean cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) field populations to *Bacillus thuringiensis* Cry1F protein. **Journal of Economic Entomology**, 109, 847-53, 2016.

OSTLIE, K. R.; HUTCHISON, W. D.; HELLMICH, R. L. **Bt corn and European corn borer.** <http://www.extension.umn.edu/agriculture/corn/pest-management/bt-corn-and-european-corn-borer/>, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA, 1997.

PASHLEY, D. P.; HAMMOND, A. M.; HARDY, T. N. Reproductive isolating mechanisms in Fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, 85, 400-405, 1992.

PELLEGRINO, E.; BEDINI, S.; NUTI, M.; ERCOLI, L. Impact of genetically engineered maize on agronomic, environmental and toxicological traits: a meta-analysis of 21 years of field data. **Scientific Reports**, 8, 3113, 2018.

PEREIRA, E. J. G.; LANG, B. A.; STORER, N. P.; SIEGFRIED, B. D. Selection for Cry1F resistance in the European corn borer and cross-resistance to other Cry toxins. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 126, 115-121, 2008.

RAVI, K. C.; MOHAN, K. S.; MANJUNATH, T. M.; HEAD, G.; PATIL, B. V.; GREBA, D. P. A.; PREMALATHA, K.; PETER, J.; RAO, N. G. V. Relative Abundance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host crops in India and the role of these crops as natural refuge for *Bacillus thuringiensis* cotton. **Environmental Entomology**, 34, 59-69, 2005.

RAYMOND, B.; ELLIOT, S. L.; ELLIS, R. J. Quantifying the reproduction of *Bacillus thuringiensis* HD1 in cadavers and live larvae of *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 98, 307-313, 2008.

ROUSH, R. T. Two-toxins strategies for management of insecticidal transgenic crops: can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences**, 353, 1777-1786, 1998.

SHUKLA, J. N.; KALSI, M.; SETHI, A.; NARVA, K. E.; FISHILEVICH, E.; SINGH, S.; MOGILICHERLA, K.; PALLI, S. R. Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. **RNA Biology**, 13, 656-69, 2016.

SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T.; CRESPO, A. L.; STORER, N. P.; HEAD, G. P.; OWENS, E. D.; GUYER, D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomologist**, 53, 208-214, 2007.

SIEGFRIED, B. D.; HELLMICH, R. L. Understanding successful resistance management: the European corn borer and Bt corn in the United States. **GM Crops Food**, 3, 184-93, 2012.

STEWART, S. D.; ADAMCZYK, J. J., JR.; KNIGHTEN, K. S.; DAVIS, F. M. Impact of Bt cottons expressing one or two insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. **Journal of Economic Entomology**, 94, 752-60, 2001.

SMITH, J. L.; LEPPING, M. D.; RULE, D. M.; FARHAN, Y.; SCHAAFSMA, A. W. Evidence for field-evolved resistance of *Striacosta albicosta* (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry1F *Bacillus thuringiensis* protein and transgenic corn hybrids in Ontario, Canada. **Journal of Economic Entomology**, 110, 2217-2228, 2017.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, 103, 1031-1038, 2010.

STORER, N. P.; KUBISZAK, M. E.; ED KING, J.; THOMPSON, G. D.; SANTOS, A. C. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, 110, 294-300, 2012.

TABASHNIK, B. E.; CARRIERE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology**, 35, 926-935, 2017.

VAN RENSBURG, J. B. J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South African Journal of Plant and Soil**, 24, 147-151, 2007.

VÉLEZ, A. M.; SPENCER, T. A.; ALVES, A. P.; MOELLENBECK, D.; MEAGHER, R. L.; CHIRAKKAL, H.; SIEGFRIED, B. D. Inheritance of Cry1F resistance, cross-resistance and frequency of resistant alleles in *Spodop-*

*tera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, 103, 700-713, 2013.

VELEZ, A. M.; VELLICHIRAMMAL, N. N.; JURAT-FUENTES, J. L.; SIEGFRIED, B. D. Cry1F resistance among lepidopteran pests: a model for improved resistance management? **Current Opinion in Insect Science**, 15, 116-24, 2016.

WALTERS, F. S.; DEFONTES, C. M.; HART, H.; WARREN, G. W.; CHEN, J. S. Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. **Applied and Environmental Microbiology**, 76, 3082-8, 2010.

WARREN, G. W. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: N. Carozzi and M. Koziel, **Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests**. Bristol, 1997, p.109-121.

WOLFENBARGER, L. L.; NARANJO, S. E.; LUNDGREN, J. G.; BITZER, R. J.; WATRUD, L. S. Bt crop effects on functional guilds of non-target arthropods: a meta-analysis. **PLoS One**, 3:e2118, 2008.

WU, K.; GUO, Y.; GAO, S. Evaluation of the natural refuge function for *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) within *Bacillus thuringiensis* transgenic cotton growing areas in north China. **Journal of Economic Entomology**, 95, 832-7, 2002.

WU, F.; MILLER, J. D.; CASMAN, E. A. The economic impact of Bt corn resulting from mycotoxin reduction. **Journal of Toxicology: Toxin Reviews**, 23, 397-424, 2004.

YANG, F.; HEAD, G. P.; SANSONE, C.; HUANG, F.; GILREATH, R. T.; KERNS, D. L. F2 screen, inheritance and cross-resistance of field-derived Vip3A resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected from Louisiana, USA. **Pest Management Science**, <https://doi.org/10.1002/ps.4805>, 2017.

YU, H. L.; LI, Y. H.; WU, K. M. Risk assessment and ecological effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* crops on non-target organisms. **Journal of Integrative Plant Biology**, 53, 520-538, 2011.

ZHAO, J. Z.; CAO, J.; COLLINS, H. L.; BATES, S. L.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D.; SHELTON, A. M. Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 102, 8426-30, 2005.

## CAPÍTULO 5

# Manejo da resistência no campo com plantas Bt

**Rose Monnerat**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF

**Bruce Tabashnik**

Departamento de Entomologia - Universidade do Arizona, EUA

Plantas geneticamente modificadas expressando genes que conferem resistência a herbicidas e a pragas têm sido utilizadas em campo desde os anos 1990. A China foi a pioneira, tendo permitido, em 1992, o comércio de plantas de tabaco resistente a vírus (James, 2016). Desde então, segundo dados do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), a área total de culturas transgênicas plantada continua a aumentar anualmente, com 185,1 milhões de hectares cultivados em 26 países em 2016, sendo 91,4 milhões de hectares de soja, 60,6 de milho e 22,3 de algodão (James, 2016). Os Estados Unidos lideram a área de cultivo de transgênicos, com 72,9 milhões de hectares, seguidos do Brasil, com 49,1 milhões de hectares, e Argentina, com 23,8 milhões (James, 2016); a liberação comercial nos vários países ocorreu de forma distinta, seguindo a legislação em vigor em cada um.

Na tabela 1 são apresentados os países que produzem transgênicos em áreas superiores a 0,1 milhão de hectares, a área plantada e as culturas (James, 2016).

**Tabela 1.** Países, área plantada e plantas transgênicas cultivadas nos países com área superior a 0,1 milhão de hectares.

País	Área (milhões de hectares)	Plantas transgênicas
Estados Unidos	72,9	Soja, milho, algodão, canola, alfafa, papaia, batata, beterraba
Brasil	49,1	Soja, milho e algodão
Argentina	23,8	Soja, milho e algodão
Canadá	11,6	Soja, milho, canola e beterraba
Índia	10,8	Algodão
Paraguai	3,6	Soja, milho e algodão
Paquistão	2,9	Algodão
China	2,8	Algodão, papaia, álamo
África do Sul	2,7	Milho, soja e algodão
Uruguai	1,3	Soja e milho
Bolívia	1,2	Soja
Austrália	0,9	Algodão e canola
Filipinas	0,8	Milho
Mianmar	0,3	Algodão
Espanha	0,1	Milho
Sudão	0,1	Algodão
México	0,1	Algodão, soja, milho
Colômbia	0,1	Algodão, milho

Dentre as tecnologias disponíveis destacam-se as plantas que sintetizam proteínas tóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt); as chamadas toxinas Bt são utilizadas em controle de insetos desde os anos 1960, na forma de bioinseticidas à base de estirpes nativas (Monnerat *et al.*, 2015a). Nesses produtos, a bactéria produz protoxinas que são ativadas ao serem ingeridas pelo inseto; o processo de ativação dá-se pela solubilização das protoxinas pelo pH intestinal do inseto e pela ativação propria-

mente dita por enzimas digestivas. Em seguida, as toxinas ativadas ligam-se a receptores presentes no intestino dos insetos, o que causa alteração na permeabilidade da membrana, desequilíbrio osmótico e ruptura do epitélio intestinal, levando o inseto à morte (Soberon *et al.*, 2016).

Com o avanço da biotecnologia, os genes codificadores de toxinas foram inseridos em plantas, que passaram a expressá-los. Diferentemente das estirpes que produzem as protoxinas, as plantas produzem a toxina já ativada, pronta para ser reconhecida pelos receptores do intestino dos insetos. As primeiras plantas Bt foram desenvolvidas para produzirem as proteínas cristalinas (Cry); já as mais recentes produzem a proteína inseticida vegetativa (VIP). Na maioria dos insetos, essas duas classes de proteínas apresentam modos de ação distintos, sendo, portanto, boas ferramentas para evitar a seleção de populações resistentes (Tabashnik & Carrière, 2017).

As vantagens da utilização de proteínas Bt incluem alta especificidade e toxicidade às pragas-alvo e ausência de efeitos tóxicos aos inimigos naturais e outros seres vivos (Soberon *et al.*, 2016).

Essas plantas têm sido utilizadas a campo no mundo desde 1996 e são uma ferramenta importante para o controle de insetos e redução da aplicação de produtos químicos (Tabashnik *et al.*, 2013). A área plantada com culturas Bt aumentou de 1,1 milhão de hectares, em 1996, para 98,5 milhões, em 2016, sendo que milho, algodão e soja representaram mais de 99% do total (Tabashnik & Carrière, 2015; 2017).

## **1. Evolução da resistência no mundo**

As plantas Bt vieram com o propósito de revolucionar o controle de pragas; entretanto, sua eficácia pode ser reduzida pela evolução de resistência em insetos-alvo, com consequente perda de eficácia. A velocidade da evolução é consistente com as previsões da teoria evolutiva; como esperado de experiências em pequena escala e modelos de computador simulando genética populacional de insetos, três fatores foram associados à resistência retardada: uma baixa frequência inicial de alelos que confere resistência, herança recessiva de resistência e áreas de refúgio de plantas hospedeiras não Bt próximas a culturas de plantas Bt. As



áreas de refúgio consistem de plantas que não produzem toxinas Bt e, portanto, permitem a sobrevivência de pragas suscetíveis que poderão acasalar com insetos expostos à toxina.

A evidência do campo sugere que as áreas de refúgio têm ajudado a atrasar a resistência da praga às culturas Bt. Por exemplo, a lagarta-rosada foi selecionada para resistência ao algodão Bt rapidamente no oeste da Índia, mas não no sudoeste dos Estados Unidos; ambos os países tinham regulamentos que exigiam refúgios de algodão não Bt plantado perto do algodão Bt. No entanto, os agricultores plantaram refúgios nos Estados Unidos, mas não na Índia. Embora outras diferenças entre os países pudessem ter também influenciado a evolução da resistência, o contraste impressionante em conformidade com os regulamentos de áreas de refúgio parece ter desempenhado um papel fundamental. Comparações entre a Austrália e os Estados Unidos entre três espécies de pragas do gênero *Helicoverpa* também apoiam a ideia de que os refúgios têm retardado a evolução da resistência das pragas às culturas Bt. Para essas pragas, os requisitos de refúgio da Austrália para o algodão Bt foram mais rigorosos do que os dos Estados Unidos, e o resultado na Austrália foi melhor (Tabashnik & Carrière, 2015; 2017).

Além do refúgio, o outro fator importante é que as plantas atendam ao padrão de “alta dose”; o padrão é cumprido quando as plantas produzem uma concentração de toxina alta o suficiente para matar todos ou quase todos os indivíduos heterozigóticos para resistência. Segundo a Environmental Protection Agency (EPA), para que as plantas Bt atendam ao padrão alta dose, elas devem matar mais de 99,99% de pragas suscetíveis no campo. A teoria e os dados relevantes mostram que se o padrão de alta dose for cumprido, a resistência pode ser adiada com refúgios limitados. Por outro lado, se o critério não for cumprido, provavelmente serão necessários refúgios abundantes para diminuir substancialmente a resistência. Portanto, a avaliação sistemática desse critério pode ser usada proativamente para melhorar o gerenciamento de resistência. Além disso, se o relatório dos resultados da avaliação do critério tornar-se uma prática padrão, os dados disponíveis para testar as previsões aumentarão de forma constante, facilitando aprimoramentos nas estratégias de gerenciamento de resistência (Tabashnik & Carrière, 2015; 2017).

Em levantamento recente realizado pela equipe liderada pelo Dr. Bruce Tabashnik, existem mais de mil trabalhos publicados sobre o tema resistência no período de 2013 a 2017; com a análise desses trabalhos, o grupo estabeleceu três categorias para a resistência: categoria 1, resistência prática; categoria 2, nenhuma diminuição na suscetibilidade; e categoria 3, aviso precoce de resistência. A resistência prática à uma cultura Bt é uma resistência selecionada no campo que reduz a eficiência da cultura Bt e tem consequências práticas para o controle de pragas. Os critérios de resistência prática são que > 50% dos indivíduos em uma população são resistentes e a eficácia da cultura Bt é reduzida no campo. Na categoria 2 encaixam-se os casos em que os dados de monitoramento não mostram diminuição estatisticamente significativa da suscetibilidade depois que as populações de campo foram expostas a uma cultura Bt. E a categoria 3, alerta precoce de resistência, inclui todos os casos de resistência selecionada em campo, em que os dados de monitoramento mostram uma diminuição estatisticamente significativa da suscetibilidade, mas a eficácia reduzida da cultura Bt não foi relatada. O grupo, ao analisar 36 casos, verificou que dezesseis eram de resistência prática, dezessete de não diminuição de susceptibilidade e três de alerta precoce de resistência. Das quinze pragas monitoradas, catorze são da ordem Lepidoptera e uma Coleoptera. Para os dezesseis casos de resistência prática, o tempo médio desde o primeiro plantio comercial de uma cultura Bt em uma região até a primeira amostragem de populações de campo na região que forneceu evidência de resistência foi de 5,2 anos; a resistência prática ao milho Bt foi documentada para algumas populações de cinco espécies de pragas (*Busseola fusca*, *Diatraea saccharalis*, *Diabrotica virgifera*, *Spodoptera frugiperda* e *Striacosta albicosta*), para algodão Bt para uma espécie (*Pectinophora gossypiella*) e tanto para o milho Bt quanto para o algodão para as demais espécies (*Helicoverpa zea*) (Tabashnik & Carrière, 2017).

Os resultados da modelagem e as evidências empíricas mostram que os requisitos de refúgio devem ser adaptados a cada combinação praga-transgênico-cultura. Para as plantas que produzem uma única toxina Bt, quando o padrão de altas doses é atingido e a resistência é rara, os refúgios que representam apenas 20% das plantas hospedeiras de uma praga podem ser suficientes

para atrasar a resistência por uma década ou mais. Por outro lado, quando o padrão de dose alta não é cumprido e a resistência não é rara, são necessários refúgios maiores (por exemplo, 50%) para retardar substancialmente a adaptação de pragas; princípios similares aplicam-se às plantas piramidadas. Modelagem e evidências empíricas sugerem que refúgios de 10% podem ser eficazes para retardar a resistência das populações de pragas altamente suscetíveis a cada uma das duas ou mais toxinas ou traços de ação independente em uma pirâmide. No entanto, os refúgios menores são arriscados, mesmo em condições ideais, e são necessários refúgios muito maiores para retardar substancialmente a resistência, se cada uma das toxinas ou evento piramidado não for altamente efetiva, inerentemente ou por resistência desenvolvida no campo (Tabashnik & Carrière, 2017).

Os insetos são notavelmente adaptáveis e espera-se uma evolução da resistência a qualquer método de controle, incluindo plantas transgênicas com combinações de características protetoras tão diferentes quanto as toxinas Bt e RNAi. Inovações como toxinas Bt geneticamente modificadas que matam pragas resistentes a toxinas Bt nativas e descoberta de proteínas inseticidas de bactérias diferentes de Bt continuarão a fornecer novas ferramentas para o controle de pragas; por sua vez, as pragas adaptar-se-ão.

As análises de padrões globais de resistência desenvolvida em campo às culturas transgênicas apresentadas aqui fornecem suporte empírico para um quadro para efetivamente gerenciar a resistência das pragas às culturas transgênicas atuais e futuras (Tabashnik & Carrière, 2017).

## **2. Evolução da resistência no Brasil**

No Brasil, a primeira liberação comercial de transgênicos para controle de insetos foi a do algodão Bt, que ocorreu em 2005. A partir de 2007, diversos eventos de milho expressando toxinas Bt foram liberados para comercialização e, em 2010, foi a vez da soja (CTNBio, 2014). Em geral as plantas sintetizam de 1 a 3 proteínas Bt (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry2Ae, Cry3Bb1, Cry34Ab1 e Cry35Ab1) (tabela 2) (CTNBio, 2014). Os principais alvos das toxinas inseridas nos eventos transgênicos

são os insetos da ordem Lepidoptera (*S. frugiperda* - lagarta-do-cartucho-do-milho, *A. argillacea* - curuquerê-do-algodoeiro, *C. virescens* e *H. zea* - lagartas-das-maçãs, *P. gossypiella* - lagarta-rosada, *A. gemmatalis* - lagarta-da-soja, *C. includens* - lagarta-medideira, *Diatraea saccharalis*, *Agrotis ipsilon*, *Elasmopalpus lignosellus*) e da ordem Coleoptera (*Diabrotica* spp.) (tabela 2). A partir da detecção da presença da *H. armigera* no Brasil, a tecnologia também tem sido utilizada para controlar esta praga (Monnerat *et al.*, 2015a).

**Tabela 2.** Toxinas de Bt presentes nos eventos transgênicos aprovados pela CTNBio (safra 2012/2013).

Eventos transgênicos	Toxinas de Bt	Alvos
Milho	Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1A.105, Cry1F, VIP3Aa	Lepidoptera
	Cry3Bb, Cry34 Ab1, Cry35Ab1	Coleoptera
Algodão	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab, Cry 2Ae, Cry1F	Lepidoptera
Soja	Cry1Ac	Lepidoptera

No Brasil, desde 2013, ataques severos de *S. frugiperda* foram registrados nas principais culturas transgênicas na região do Cerrado (Cruz *et al.*, 2013); essa lagarta é uma das pragas mais importantes do milho, do algodão e de hortaliças no Brasil (Soares & Vieira, 1998; Montesbravo, 2001), causando danos desde a emergência até a maturação das plantas, ou seja, em todos os estágios de desenvolvimento das diversas culturas (Santos, 2001; Gallo *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 1997; Fundação MT, 2001). Nesta região, os cultivos anuais de milho, soja e algodão têm início no mês de outubro e estendem-se até junho (Embrapa, 2013).

Adicionalmente, faz-se a implantação da “ponte verde”, constituída pelo cultivo adicional de sorgo, milheto e feijão (Embra-

pa, 2013); muitas das sementes utilizadas não são certificadas, assim não se sabe qual quantidade de toxina é produzida pela planta, e as áreas de refúgio, que deveriam ser de 5% a 20% da área plantada (Leite *et al.*, 2011) estão sendo implementadas abaixo do nível recomendado ou sequer o estão sendo (Grigolli & Lourenção, 2013).

Um estudo mais específico conduzido em Cabeceiras de Goiás, região do Cerrado brasileiro, demonstrou que a diminuição da eficácia de controle de *S. frugiperda* pelo milho Bt ao longo de quatro anos era causada pela resistência desses insetos à toxina Cry1F (Monnerat *et al.*, 2015). Além disso, a população resistente a Cry1F apresentou resistência cruzada às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, presentes em outros eventos transgênicos utilizados no Brasil, mas não a apresentou com a toxina Cry2Aa e Cry2Ab. Entretanto, a susceptibilidade a tais toxinas é relativamente baixa, não sendo uma boa alternativa para o controle de *S. frugiperda*. Os ensaios de competição heteróloga entre Cry1F e toxinas Cry1A mostraram que estas compartilham sítios de ligação em *S. frugiperda* e, portanto, não é recomendável o uso de plantas piramidadas com essas toxinas para o controle do inseto, nem utilizar outros cultivos geneticamente modificados que contenham uma dessas proteínas na mesma região, já que isso apenas incrementaria o nível de pressão de seleção para os organismos tolerantes a Cry1F.

Outro dado importante gerado no trabalho foi que a suscetibilidade dessa população à toxina Cry1F não foi alterada, mesmo após dez gerações sem exposição, indicando que a colônia já está posicionada como uma praga estável com fenótipo de tolerância à toxina Cry1F (Monnerat *et al.*, 2015). Um estudo paralelo mostrou também altos níveis de resistência em populações de *S. frugiperda* em outras regiões do Brasil, como Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Farias Jr., 2014). Demonstrou-se que esse fenótipo de resistência deve-se a um único locus genético recessivo e que a frequência desse alelo de resistência aumentou significativamente no campo, nos últimos anos (Farias Jr., 2014). Estudos complementares, conduzidos com lagartas coletadas em campos de milho e algodão transgênico expressando as toxinas dos grupos Cry1 e Cry2 expressos individualmente ou

piramidados, indicam que a resistência em *S. frugiperda* está ocorrendo com alta frequência na região do Cerrado brasileiro.

A adoção da tecnologia de plantas transgênicas para controle de insetos requer o cumprimento de requisitos mínimos para sua eficácia, como adoção de refúgios, alta dose, além do monitoramento constante das populações do inseto-alvo. Infelizmente, essas medidas não têm sido cumpridas no Brasil, onde os poucos agricultores que fazem o refúgio muitas vezes os tratam, matando os insetos que deveriam ser preservados para garantir a variabilidade genética da população e retardar a resistência. Além disso, poucos estudos são conduzidos para monitorar a suscetibilidade dos insetos às toxinas Bt e, quando se percebe em campo que estão ocorrendo escapes, normalmente já é tarde, e a tecnologia foi perdida.

A evolução da resistência é uma realidade e poderá acontecer em qualquer sistema biológico; as ameaças evidenciadas colocam em xeque a tecnologia representada pelas plantas Bt e tornam preponderante que as empresas provedoras da tecnologia, os produtores agrícolas, a comunidade técnico-científica e os governos organizem-se para traçar diretrizes e adotar medidas que evitem o fim precoce desse método de controle no Brasil.

## Referências

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; SANTOS, F. H.; WAQUIL, J. M.; VIANA, P. A. **Manual de Identificação de Pragas da Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 71p, 1997.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M. **Risco potencial das pragas de milho e de sorgo** - Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 40 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, 150).

CTNBio (2014) <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/2.html>; consultado em agosto 2018

EMBRAPA (2013) - <http://www.embrapa.br/alerta-helicoverpa/Manejo-Helicoverpa.pdf>

FARIAS, J. R.; ANDOW, D.; HORIKOSHI, R.; SORGATTO, R.; FRESIA, P.; SANTOS, A.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spo-*

*dooptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, 64, 150-158, 2014.

FUNDAÇÃO MT. **Boletim de pesquisa de algodão**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. 238p. (Boletim, 4).

GALLO, D. (*IN MEMORIAM*); NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. (2002) **Entomologia Agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, Piracicaba: FEALQ. 920p.

GRIGOLLI, J. F. J.; LOURENÇÃO, A. L. F. (2013). **Alta Infestação de lagartas na cultura do milho Bt. Resultados da Pesquisa**, Fundação MS, n. 2, 8p.

JAMES, C. (2016) Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. **ISAAA Brief** , 52. ISAAA: Ithaca, NY.

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

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

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M.; MARTINS, E.; PRAÇA, L. ; QUEIROZ, P. Insect resistance to Bt toxins in Brazil and Latin America. In: Soberón, M.; Gao, Y.; Bravo, A. (Eds) **Bt resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins**. 1. ed. Boston: 2015A. v. 1. 26-36.

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

SOARES, J. J.; VIEIRA, R. M. ***Spodoptera frugiperda* ameaça a cotonicultura brasileira**. Campina Grande: Embrapa: CNPA, 1998 (Comunicado Técnico).

SOBERÓN, M.; MONNERAT, R.; BRAVO, A. Mode of action of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* and resistance mechanisms. In: GOPALA-

KRISHNAKONE P. *et al.* (edts). **Microbial Toxins**. 1ed.: Springer Netherlands, 2016, p. 1-13.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nat. Biotechnol.**, 31: 510–521, 2013.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to genetically engineered crops: successes and failures. **ISB News Report**, January, 1-5, 2014.

TABASHNIK, B. E. ; CARRIÈRE, Y. Successes and failures of transgenic Bt crops: global patterns of field-evolved resistance. In: Soberón, M.; Gao, Y.; Bravo, A. (Eds) **Bt resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins**. 1. ed. Boston, 2015. v. 1, 1-15.

TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nat. Biotechnol.**, 35:10, 926-935, 2017.



# Toxinas Cry nativas e modificadas de *Bacillus thuringiensis* como ferramentas biotecnológicas para o manejo de pragas suscetíveis e resistentes

**Alejandra Bravo**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, México

**Mario Soberón**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, México

## 1. Introdução

A agricultura exige estratégias para o controle de insetos, uma vez que, insetos-pragas são responsáveis por grandes perdas na colheita. Inseticidas químicos são amplamente utilizados para o controle de pragas por conta de sua alta eficiência. No entanto, eles não são específicos, apresentando toxicidade para uma gama ampla de espécies, incluindo vertebrados, podendo causar doenças em seres humanos, como vários tipos de câncer, asma, alergias e outras doenças do sistema imunológico (Goldman, 2004). O controle de insetos com inseticidas biológicos — como vírus, fungos e bactérias — são estratégias ecologicamente corretas. *Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva que produz, durante a esporulação, inclusões proteicas cristalinas com atividade inseticida; essas toxinas são conhecidas como

# Native and modified Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* as biotechnological tools for insect management of susceptible and resistant pests

**Alejandra Bravo**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, Mexico

**Mario Soberón**

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Morelos, Mexico

## 1. Introduction

Agriculture requires strategies for insect control since insect pest are responsible for crop losses. Chemical insecticides are widely used for pest control since they are highly effective. However, they are not specific showing toxicity to a broad range of species including vertebrates causing human diseases such as several cancer types, asthma, allergies and other immune system diseases (Goldman, 2004). Insect control with biological insecticides as viruses, fungus and bacteria are environmental friendly strategies. *Bacillus thuringiensis* (Bt) is a Gram positive bacterium that produces crystal inclusions formed by insecticidal proteins during its sporulation phase of growth. These toxins are known as Cry or Cyt toxins, that have been proven to be effective against important crop pests and also against mos-

toxinas Cry ou Cyt e são eficazes contra pragas importantes de culturas diversas e contra mosquitos vetores de doenças humanas (Bravo *et al.*, 2011).

A comercialização de culturas Bt que expressam genes cry resultou em uma estratégia eficiente para o controle de pragas com a redução do uso de inseticidas químicos (Sanahuja *et al.*, 2011). Uma característica importante das toxinas Cry é sua especificidade, podendo apresentar toxicidade para um número limitado de espécies de insetos sem afetar outros organismos (Bravo *et al.*, 2011).

Diferentes estirpes de Bt com atividade patogênica para diferentes ordens de insetos têm sido isoladas e caracterizadas (Schnepf *et al.*, 1998). Além disso, estirpes de Bt ativas contra nematoides, ácaros e protozoários também foram isoladas (Schnepf *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2003). Existem muitos insetos que mostram pouca ou nenhuma suscetibilidade às toxinas Cry, e o uso de culturas Bt tem acelerado a evolução da resistência dos insetos a tais toxinas em campo (Tabashnik *et al.*, 2017). A avaliação extensiva de estirpes de Bt levou à identificação de mais de 700 sequências de genes cry (Crickmore *et al.*, 2016). Essas sequências foram classificadas de acordo com a identidade de sua sequência de aminoácidos em pelo menos 75 grupos diferentes de genes *cry* (*cry1*, *cry2*... *cry75*) nos quais, toxinas pertencentes a cada grupo Cry compartilham menos de 40% de identidade de aminoácidos com proteínas de outros grupos (Crickmore *et al.*, 1998).

Algumas estirpes de Bt produzem outras toxinas inseticidas durante o crescimento vegetativo, denominadas proteínas VIP; três delas foram caracterizadas e denominadas como VIP1 e VIP2, que, juntas, compõem uma toxina binária, e VIP3 (Estruch *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1997).

A bactéria *B. thuringiensis* produz proteínas inseticidas que se agrupam em diferentes famílias, como as Cry de três domínios (Cry-3d), as Cry do tipo Bin, as Cry do tipo Mtx, as Cyt, as VIP e outras toxinas Cry não relacionadas a esses grupos (Crickmore *et al.*, 2016). No entanto, apenas algumas dessas proteínas têm sido usadas para expressão em culturas transgênicas, sendo elas Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Fa, Cry2Ab e Cry3B (da família Cry-3d), Cry34Ab e Cry35Ab (das toxinas binárias) e, mais recentemente,

quitoes that are vectors of human diseases (Bravo *et al.*, 2011). The commercialization of Bt-crops that express the cry gene has resulted in an efficient strategy for pest control reducing the use of chemical insecticides (Sanahuja *et al.*, 2011). An interesting feature of Cry toxins is its narrow specificity showing toxicity to a limited number of insect species with no toxicity against other organisms (Bravo *et al.*, 2011).

Different Bt strains that show activity towards different insect orders have been isolated and characterized (Schnepf *et al.*, 1998). In addition, Bt strains active against nematodes, mites and protozoa have also been isolated (Schnepf *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2003). However, there are many insect pests that show no or low susceptibility to Cry toxins and the use of Bt crops has speed up the evolution of insect resistance to these toxins in the field (Tabashnik *et al.*, 2017). Extensive screening of Bt strains has led to the identification of more than 700 cry gene sequences (Crickmore *et al.*, 2016). These sequences have been classified according to their amino acid sequence identity in at least 75 different cry gene groups (Cry1, Cry2... Cry75) where toxins belonging to each Cry group share less than 40 % amino acid identity with proteins from other groups (Crickmore *et al.*, 1998). Some Bt strains produce additional insecticidal toxins named Vip during vegetative growth, Three Vip toxins have been characterized as Vip1/Vip2, that together compose a binary toxin, and Vip3 (Estruch *et al.*, 1996; Warren *et al.*, 1997). Bt produces insecticidal proteins that grouped in different families such as the three-domain Cry (3d-Cry), the Bin-like Cry, the Mtx-like Cry, Cyt, Vip and other Cry toxins not related to these groups (Crickmore *et al.*, 2016). However, only a few have been expressed in transgenic crops such as Cry1Ac, Cry1Ab, Cry1Fa, Cry2Ab, Cry3B from the 3d-Cry family, or Cry34Ab and Cry35Ab from the binary-like toxins or more recently Vip3A from the Vip family (James *et al.*, 2014).

Therefore, the search of novel insecticidal toxins from Bt or other sources is necessary to maintain the use of transgenic crops as an efficient pest control method. In addition an alternative is the *in vitro* genetic evolution of Cry toxins with the aim to enhance toxicity against specific pests, to kill novel

Vip3A (da família VIP) (James *et al.*, 2014). Portanto, a busca de novas toxinas inseticidas de Bt ou de outras fontes é necessária para manter a tecnologia de culturas transgênicas como um método eficiente de controle de pragas. Além disso, uma alternativa é a modificação genética *in vitro* de toxinas Cry com objetivo de aumentar a toxicidade contra pragas específicas, ampliar o espectro de ação das toxinas conhecidas para novos alvos ou recuperar a toxicidade no caso de resistência (Pardo-López *et al.*, 2013).

A família de toxinas Cry-3d compreende o maior grupo de toxinas Cry e, pelo menos, nove delas já foram cristalizadas e suas estruturas tridimensionais determinadas, sendo Cry1Aa, Cry1Ac, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Ca, Cry3Da, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry5Ba e Cry8Ea (Pardo-López *et al.*, 2013). Todas as proteínas Cry-3d são compostas de três domínios, e algumas dessas compartilham menos de 20% de identidade de sequência de aminoácidos. O domínio I é composto de sete  $\alpha$ -hélices, sendo seis hélices anfipáticas que circundam a  $\alpha$ -hélice de número cinco, que é hidrofóbica. Este domínio está envolvido na oligomerização de toxinas, inserção em membranas e formação de poros. O domínio II é composto de onze folhas beta com regiões de *loop* expostas, envolvidas na ligação às proteínas específicas do intestino larval, enquanto o domínio III é um “sanduíche” de folhas beta e também está envolvido no reconhecimento do receptor. Assim, os domínios II e III são os determinantes da especificidade das toxinas Cry (Bravo *et al.*, 2011) (figura 1).

Proteínas do grupo Cry-3d são produzidas durante a fase de esporulação do crescimento bacteriano na forma de protoxinas. A maioria das toxinas desta família é produzida como protoxinas grandes, de 130 kDa, por exemplo, a protoxina Cry1Aa, enquanto outras são sintetizadas como protoxinas curtas, de 65 a 70 kDa, por exemplo, a protoxina Cry2Ab. A ativação proteolítica das protoxinas Cry, grandes ou curtas, resulta em um fragmento resistente à ação de proteases de aproximadamente 60 kDa com atividade biológica e que corresponde a estrutura tridimensional já resolvida (De Maagd *et al.*, 2001).

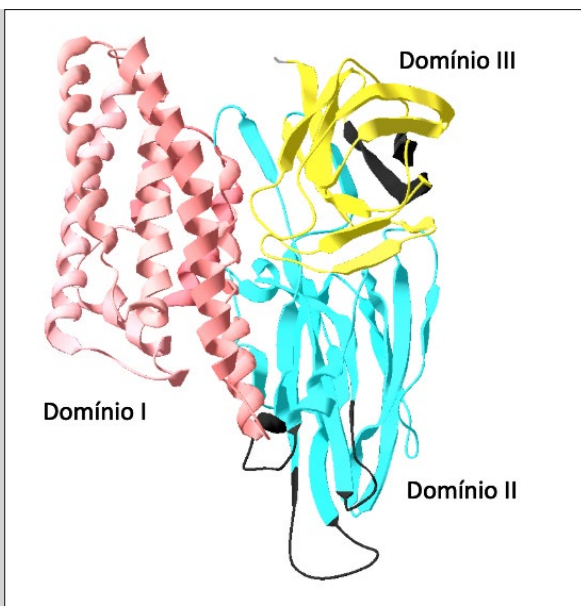
A estrutura da protoxina Cry1Ac foi descoberta recentemente, mostrando que a metade C-terminal da protoxina Cry1Ac, que é removida durante a ativação, organiza-se em quatro domínios estruturais distintos (Evdokimov *et al.*, 2014). Os domínios V e

targets or to recover toxicity in the case of resistance (Pardo-López *et al.*, 2013).

The 3d-Cry family group is the largest group of Cry toxins and at least nine 3d-Cry proteins have been crystallized and their three dimensional structures were solved, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Ba, Cry4Aa, Cry4Ba, Cry5Ba and Cry8Ea (reviewed in Pardo-López *et al.*, 2013). All 3d-Cry proteins are composed of three domains despite the fact that some of these proteins share less than 20 % amino acid sequence identity. Domain I is a seven  $\alpha$ -helix bundle comprised by six amphipathic helices surrounding the hydrophobic helix  $\alpha$ -5. This domain is involved in toxin oligomerization, membrane insertion and pore formation. Domain II is composed of eleven beta sheets with exposed loop regions involved in binding to specific larval midgut proteins while domain III is a beta sandwich that is also involved in receptor recognition. Thus domains II and III are the specificity determinant domains of Cry toxins (Bravo *et al.*, 2011) (figure 1). This group of 3d-Cry proteins is produced during sporulation phase of growth of the bacteria as protoxins, with most of the members of this family produced as large protoxins of 130 kDa, such as the Cry1Aa protoxin, while some other members are synthesized as short protoxins of 65 to 70 kDa, such as the Cry2Ab protoxin. The proteolytical activation of both, large or short Cry protoxins resulted in a protease resistant core fragment of approximately 60 kDa that is biological active and is comprised by the three-dimensional structure (de Maagd *et al.*, 2001). The structure of the Cry1Ac protoxin was recently resolved showing that the C-terminal half of Cry1Ac protoxin that is removed during activation is organized into four distinct structural domains (Evdokimov *et al.*, 2014). Domains V and VII of the C-terminal portion of Cry1Ac protoxin resemble carbohydrate-binding modules and are structurally related to domains II and III of the activated Cry toxin (Evdokimov *et al.*, 2014), which mediate binding to midgut receptors. Few years ago, it was shown that the Cry1Ab protoxin binds also to receptors such as cadherin receptor, leading to the formation of pores that have distinct characteristics from the pore formed by activated toxins suggesting a dual mode of action of these toxins (Gómez *et al.*,

VII da porção C-terminal da protoxina Cry1Ac lembram os módulos de ligação a carboidratos e são estruturalmente relacionados aos domínios II e III da toxina Cry ativada (Evdokimov *et al.*, 2014), que medeiam a ligação aos receptores do intestino médio. Há alguns anos, demonstrou-se que a protoxina Cry1Ab também se liga a receptores como o da caderina, levando à formação de poros que possuem características distintas do poro formado por toxinas ativadas, sugerindo um modo de ação dual dessas toxinas (Gómez *et al.*, 2014; Tabashnik *et al.*, 2015). Bioensaios com dez linhagens diferentes de insetos das quatro principais pragas de lepidópteros que apresentaram resistência a toxinas Cry ativadas mostraram que a protoxina Cry foi de cinco a cinquenta vezes mais potente que a toxina Cry ativada correspondente, mostrando que, no modo de ação dual, a protoxina completa apresenta um mecanismo adicional de ação que ainda precisa ser totalmente compreendido.

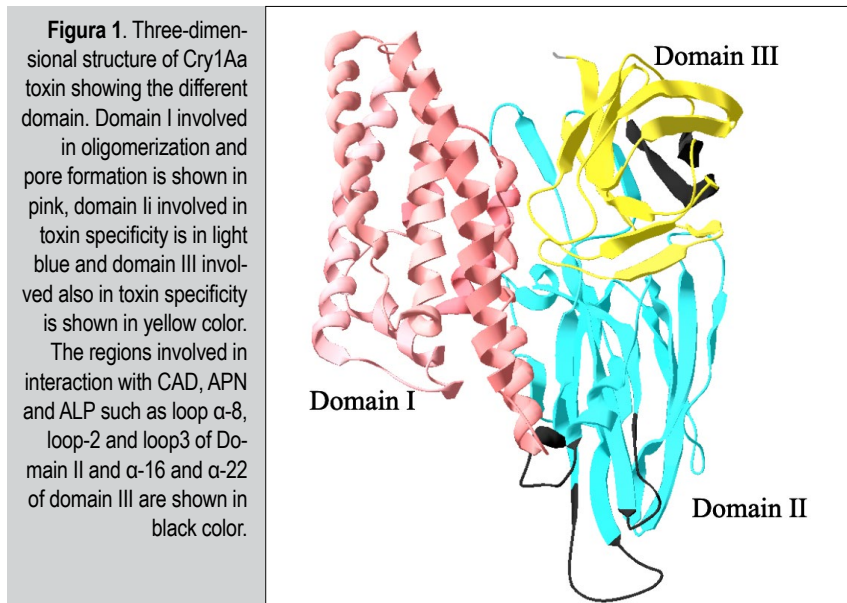
**Figura 1.** Estrutura tridimensional da toxina Cry1Ac mostrando os diferentes domínios. Em cor rosa, o domínio I, que está envolvido na oligomerização e formação dos poros; em azul-claro, o domínio II, ligado à especificidade da toxina, como o domínio III, em cor amarela. As regiões envolvidas nas interações com CAD, APN e ALP, como os anéis  $\alpha$ -8,  $\alpha$ -2 e 3 do domínio II e  $\beta$ -16 e  $\beta$ -22 do domínio III, que estão em preto.



Construções que resultaram em melhoria na atividade das toxinas: 1 - Domínio I: deleção do N-terminal da protoxina (Cry2Aa), deleção da hélices  $\alpha$ -1 e parte da  $\alpha$ -hélice 2 (Cry1A-Mod), adição de um sítio de protease no loop entre as hélices  $\alpha$ -3 e  $\alpha$ -4 e diversos pontos de mutação feitos nas toxinas Cry1Ab, Cry2Aa; 2 - Domínio II: pontos de mutação no loop 2 (Cry1Ab), pontos de mutação no loop 1 (Cry3Aa), e troca de loops entre diversas toxinas, como da Cry4Ba para Cry1Aa; 3 - Domínio III: troca de domínio entre diversas toxinas Cry, como Cry1Ab, Cry1C, Cry3Aa etc., e pontos de mutação.

2014, Tabashnik *et al.*, 2015). Bioassays with at least 10 different insect strains of four major lepidopteran pests that have evolved resistance to activated Cry toxins showed that Cry-protoxin was 5 to 50 times more potent than the corresponding activated Cry toxin. Supporting the dual mode of action that indicates that the complete protoxin displays an additional mechanism of action that remains to be fully understood.

It was proposed that the diversity of Cry toxins found in nature is the result of two fundamental evolutionary processes, the independent evolution of the three structural domains with domain II and domain III regions under positive selection for insect receptor recognition and domain III swapping. These evolutionary processes had led to the selection of proteins with similar mode of action but with different insect specificity (Bravo *et al.*, 2013).



Constructions that have resulted in improved toxins that are: 1. Domain I: deletion of N-terminal protoxin (Cry2Aa), deletion of helix  $\alpha$ -1 and part of helix  $\alpha$ -2a (Cry1AMod), addition of a protease site located in the loop between helices  $\alpha$ -3 and  $\alpha$ -4 and several point mutants done in Cry1Ab, Cry2Aa 2. Domain II: point mutations in loop 2 (Cry1Ab), point mutations in loop 1 (Cry3Aa), and loops swapping among different toxins such as Cry4Ba in Cry1Aa. 3. Domain III: Domain swapping among different Cry toxins such as Cry1Ab, Cry1C, Cry3Aa etc., and point mutations.



Foi proposto que a diversidade de toxinas Cry encontradas na natureza é o resultado de dois processos evolutivos fundamentais: (i) a evolução independente dos três domínios estruturais com regiões do domínio II e (ii) domínio III sob seleção positiva para reconhecimento do receptor do inseto e troca do domínio III. Esses processos evolutivos teriam levado à seleção de proteínas com modo de ação semelhante, mas com especificidade a insetos diferente (Bravo *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, membros diferentes das toxinas do Cry-3d compartilham uma estrutura tridimensional similar, sugerindo que eles compartilham um modo de ação semelhante. As toxinas Cry-3d são toxinas formadoras de poros que matam as células epiteliais do intestino médio da larva, causando um choque osmótico que leva à lise celular. No caso das toxinas Cry1A, que são ativas contra insetos lepidópteros, foi demonstrado que elas sofrem um mecanismo de ligação sequencial a proteínas ancoradas a glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), tais como fosfatase alcalina (ALP) ou aminopeptidase-N (APN) e proteína do tipo caderina (CAD), resultando na formação de uma estrutura oligomérica denominada pré-poro, que é capaz de inserir-se nas membranas e formar os poros (Bravo *et al.*, 2011; Pardo López *et al.*, 2013). O reconhecimento do receptor pelas toxinas Cry tem sido considerado um passo-chave para toxicidade das proteínas Cry, sendo fundamental para a especificidade ao inseto (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2011).

As regiões envolvidas na ligação das formas monoméricas e oligoméricas de Cry1Ab a essas moléculas receptoras foram mapeadas e incluem as regiões de *loop* do domínio II e a superfície do domínio III (Gómez *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). A toxina Cry1Ab em sua forma monomérica liga-se à ALP ou à APN por meio da alça 3 do domínio II e da folha  $\beta$ 16 do domínio III. Em contraste, a forma oligomérica da toxina Cry1AB liga-se a ALP ou APN pelo *loop* 2 do domínio II (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). A ligação a CAD é mediada por três sítios de ligação que incluem o domínio II (*loop* 8, *loop* 2 e *loop* 3) (Gómez *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2006) que reconhecem três sítios diferentes de ligação na proteína CAD. A figura 1 mostra os epitopos de ligação da toxina Cry1Ab envolvidos no reconhecimento do receptor.

As mentioned previously, different members of the 3d-Cry toxins share a similar three-dimensional fold suggesting that they share a similar mode of action. 3d-Cry toxins are recognized as pore forming toxins that kill larval epithelium midgut cells by causing an osmotic shock leading to cell lysis. In the case of Cry1A toxins that are active against lepidopteran insects, it has been shown that Cry1A toxins undergo a sequential binding mechanism with glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchored proteins such as alkaline phosphatase (ALP) or aminopeptidase-N (APN) and cadherin-like (CAD) protein resulting in the formation of a pre-pore oligomeric structure that is proficient in membrane insertion and pore-formation (Bravo *et al.*, 2011; Pardo López *et al.*, 2013). Receptor recognition by Cry toxins has been recognized as a key step of Cry toxicity that is fundamental for insect specificity (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2011).

The regions involved in the binding of Cry1Ab monomeric and oligomeric forms to these receptor molecules were mapped and shown to include domain II loop regions and exposed surface of domain III (Gómez *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). Cry1Ab monomeric toxin binds to ALP or APN through domain II loop 3 and domain III  $\beta$ 16. In contrast the oligomeric form of the Cry1Ab toxin binds ALP or APN through domain II loop 2 (Pacheco *et al.*, 2009; Arenas *et al.*, 2010). Binding to CAD is mediated by three binding sites that include domain II loop  $\alpha$ 8, loop 2 and loop 3 (Gómez *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2006) that recognize three different binding sites in the CAD protein. figure 1 shows the binding epitopes of Cry1Ab toxin that are involved in receptor recognition.

## 2. Novas proteínas inseticidas de outras bactérias

Apesar do grande potencial das estirpes de Bt para novas toxinas com novas especificidades e modo de ação, a busca de novas proteínas inseticidas de outros organismos foi relatada recentemente. É provável que novas toxinas inseticidas não relacionadas em sequência e estrutura às proteínas Cry e VIP conhecidas levarão à descoberta de toxinas que poderiam ser úteis para manejar a resistência às toxinas Bt usadas em cultivos transgênicos. Em particular, o controle de *Diabrotica v. virgifera* com milho transgênico expressando proteínas relacionadas a Cry3 ou Cry34/35 diminuiu por conta da evolução rápida da resistência do inseto (Gassmann *et al.*, 2011; 2016). Novas proteínas inseticidas, recentemente descritas, matam *D. v. virgifera* e provêm de *Pseudomonas chlororaphis* ou de *P. mosselii*, as proteínas IPD072Aa e PIP-47Aa, respectivamente (Schellenberger *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017); essas novas toxinas não têm similaridades de sequência com quaisquer outras toxinas Cry-3d e Vip de Bt e, portanto, não compartilham receptores com Cry3A ou Cry34/35Ab1 e tampouco mostraram resistência cruzada em insetos selecionados para resistência a Cry3A (Schellenberger *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017); a proteína IPD072Aa também não apresentou resistência cruzada a insetos resistentes a Cry34/35Ab1 (Schellenberger *et al.*, 2016). Além disso, uma toxina binária, AflP-1A/1B de *Alcaligenes faecalis*, mostrou ser tóxica contra *D. v. virgifera*, embora compartilhe um modo de ação semelhante ao das toxinas Cry34/35Ab1, uma vez que a população de *D. v. virgifera* resistente a Cry34/35Ab1 apresentou resistência cruzada a AflP-1A/1B (Yalpani *et al.*, 2017). Encontrar na natureza novas toxinas que tenham atividade específica contra uma praga em particular, mas nenhum outro efeito em insetos benéficos ou mamíferos, não é uma tarefa fácil e exige grande esforço, sendo um processo demorado, altamente ineficiente e dispendioso.

## 2. New insecticidal proteins from other bacteria

Despite the great potential of Bt strains for searching novel toxins with novel specificities and mode of action, the search of novel insecticidal proteins from other organisms has been reported recently. It is likely that novel insecticidal toxins not related in sequence and structure with the known Cry and Vip proteins will lead to the discovery of toxins that could be useful for overcoming resistance to the Bt toxins used in transgenic crops. Particularly the control of *Diabrotica virgifera virgifera* with transgenic corn expressing Cry3 related proteins or Cry34/35 has decreased due to the rapid evolution of insect resistance (Gassmann *et al.*, 2011; Gassmann *et al.*, 2016). New insecticidal proteins that kill *D. v. virgifera* from *Pseudomonas chlororaphis* or from *P. mosselii*, the small IPD072Aa protein and the PIP-47Aa respectively, have been recently described (Schellenberger *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017). These novel toxins have no-sequence similarities to any other 3d-Cry and Vip toxins from Bt and thus do not share receptors with Cry3A or Cry34/35Ab1 and neither showed cross-resistance in Cry3A-selected insects (Schellenberger *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2017), while IPD072Aa also showed no cross-resistance to Cry34/35Ab1-resistant insects (Schellenberger *et al.*, 2016). In addition, a binary toxin, AflP-1A/1B from *Alcaligenes faecalis* was shown to be toxic against *D. v. virgifera* although it shares a similar mode of action as the Cry34/35Ab1 toxin since *D. v. virgifera* population resistant to Cry34/35Ab1 showed cross-resistance to AflP-1A/1B (Yalpani *et al.*, 2017). However, finding novel toxin in nature that have specific activity against a particular pest but no other effect in beneficial insects or mammals is not an easy task and required high effort being time consuming, highly inefficient and expensive.

### 3. Atividade inseticida de toxinas Cry modificadas geneticamente

Como mencionado acima, uma opção à descoberta de novas toxinas inseticidas é a evolução genética *in vitro* de toxinas Cry com o objetivo de aumentar sua toxicidade contra pragas específicas, para matar novos alvos ou para recuperar toxicidade no caso de resistência a insetos. Abaixo, estão resumidas algumas modificações em certas toxinas Cry que resultaram em aumento da toxicidade contra pragas suscetíveis e resistentes a toxinas Cry.

A ativação de toxinas Cry por proteases do intestino médio pode ser um passo limitante em diferentes espécies de insetos; a proteína Cry3Aa, que possui atividade inseticida contra larvas de coleópteros, apresenta toxicidade muito baixa contra *D. v. virgifera*. Uma hipótese da baixa toxicidade de Cry3Aa para esse inseto é a baixa solubilidade da proteína Cry3Aa, que é ativada por proteases em um fragmento de 67 kDa. Contudo, a ativação dessa proteína com quimiotripsina mostrou aumentar a produção de um fragmento ativo de 55 kDa da proteína Cry3A com solubilidade e toxicidade aumentadas e, essa forma, de 55 kDa, foi cortada na região do *loop*  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 do domínio I (Carroll *et al.*, 1997). A introdução de um sítio proteolítico G quimiotripsina/catepsina no *loop*  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 da proteína Cry3Aa (denominada mCry3Aa) resultou em aumento da toxicidade contra *D. v. virgifera* (Walters *et al.*, 2008). Curiosamente, mCry3Aa (Cry3A modificada) conservou a mesma toxicidade para larvas de *Leptinotarsa decemlineata* que a Cry3Aa selvagem, indicando que mCry3Aa ampliou a atividade inseticida em vez de alterar sua especificidade ao inseto. A proteína mCry3Aa foi expressa em milho transgênico e mostrou-se eficaz no controle de *D. v. virgifera* (Hibbard *et al.*, 2011).

A seleção de resistência a insetos ameaça o uso de toxinas Cry em plantas transgênicas (Tabashnik *et al.*, 2017). Em algumas colônias de lepidópteros, a resistência às toxinas Cry1Ac está ligada a mutações no gene CAD (revisado em Bravo & Soberón, 2008). A ligação à proteína CAD facilita o processamento proteolítico adicional removendo a hélice  $\alpha$ 1 necessária para a oligomerização da toxina. Toxinas Cry1AbMod ou Cry1AcMod que foram geneticamente modificadas por remoção da hélice  $\alpha$ 1 são capazes de controlar larvas de lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella*) prove-

### 3. Engineering Cry toxin insecticidal activity

As mentioned above, an alternative for the screening of novel insecticidal toxins is the *in vitro* genetic evolution of Cry toxins with the aim to enhance toxicity against specific pests, to kill novel targets or to recover toxicity in the case of insect resistance. Below we will summarize some modifications to certain Cry toxins that have resulted in increased toxicity against certain susceptible and resistant pests.

Activation of Cry toxins by insect midgut proteases could be a limiting step in different insect species. In the case of Cry3Aa that has insecticidal activity against coleopteran larvae shows very low toxicity against *D. v. virgifera*. The low toxicity of Cry3Aa against *D. v. virgifera* was proposed to be due to the low solubility of the protease activated Cry3Aa that yield a 67 kDa fragment. However, activation with chymotrypsin was shown to increase the yield of a fully processed 55 kDa Cry3A fragment with increased solubility and toxicity and the 55 kDa form was shown to be nicked at the  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 domain I loop region (Carrol *et al.*, 1997). The introduction of a chymotrypsin/cathepsin G proteolytic site in the Cry3Aa  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4 loop (named mCry3Aa) resulted in increased toxicity against *D. v. virgifera* (Walters *et al.*, 2008). Interestingly, mCry3Aa retained similar toxicity towards *Leptinotarsa decemlineata* larvae as Cry3Aa indicating that mCry3Aa broadened the insecticidal activity rather than changing its insect specificity. The mCry3Aa has been expressed in transgenic maize and shown to be effective in controlling *D. v. virgifera* (Hibbard *et al.*, 2011).

Appearance of insect resistance threatens the use of Cry toxins in transgenic plants (Tabashnik *et al.*, 2017). In some lepidopteran insect colonies resistance to Cry1Ac toxins is linked to mutations in the CAD gene (reviewed in Bravo and Soberón, 2008). CAD binding facilitates further proteolytic processing of the toxin removing helix  $\alpha$ 1 necessary for toxin oligomerization. Cry1AbMod or Cry1AcMod toxins that were genetically modified to delete helix  $\alpha$ 1 counter resistance of the Pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) Cry1Ac resistant colony linked to CAD mutations showing that Cry1AMod toxins have the potential to counter insect resistance when resistance

nientes de uma colônia resistente à proteína Cry1Ac associada a mutações na proteína CAD, mostrando que as toxinas Cry1AMod têm o potencial para manejar a resistência de insetos quando a resistência está ligada a mutações que afetam a expressão da proteína CAD (Soberón *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que Cry1AbMod e Cry1AcMod contiveram a resistência em sete colônias diferentes de insetos lepidópteros resistentes que, em alguns casos, não estavam ligadas a mutações em CAD (Tabashnik *et al.*, 2011). Curiosamente, a proteína Cry1Amod foi eficaz contra uma colônia de lagarta-da-maçã (*Chloridea virescens*), selecionada em laboratório, resistente à proteína Cry1Ac, cuja resistência está ligada geneticamente a um alelo mutante de um transportador do tipo ABC (ABCC2) (Gahan *et al.*, 2010). Foi demonstrado que a proteína ABCC2 facilita a formação de oligômeros e a inserção na membrana (Ocelotl *et al.*, 2017). O potencial das toxinas Cry1AMod para combater a resistência é alto, uma vez que as toxinas Cry1AMod apresentam toxicidade para populações resistentes a insetos com diferentes mecanismos de resistência.

A permuta do domínio III foi reconhecida como um mecanismo natural envolvido na evolução das toxinas Cry; tal permuta entre diferentes toxinas Cry resultou em toxinas híbridas com toxicidades melhoradas contra certas espécies de insetos, como a toxina híbrida contendo os domínios I e II da toxina Cry1Ab e o domínio III de Cry1C, que apresentou toxicidade seis vezes maior contra a lagarta-da-beterraba (*Spodoptera exigua*) (Bosh *et al.*, 1994; de Maagd *et al.*, 2000). Outros exemplos são o caso das toxinas Cry1Ba e Cry1Ia, que individualmente mostraram baixa toxicidade contra *L. decemlineata*, enquanto a toxina híbrida, consistindo dos domínios I e II de Cry1Ia e do domínio III de Cry1Ba, mostrou toxicidade sete vezes maior para esse inseto, ou, a toxina híbrida contendo os domínios I e II de Cry3Aa e o domínio III de Cry1Ab (eCry3.1Ab), que mostrou ser tóxica para *D. v. virgifera*, uma vez que as toxinas Cry3Aa e Cry1Ab não apresentam toxicidade contra o inseto (Naimov *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2010). A toxina eCry3.1Ab expressa em milho transgênico mostrou-se eficaz no controle de *D. v. virgifera* (Hibbard *et al.*, 2011).

Todos esses resultados mostram que a permuta do domínio III pode ser uma estratégia interessante para melhorar a toxicidade das toxinas Cry ou para criar novas toxinas híbridas com toxicidade

is linked to mutations affecting *CAD* expression (Soberón *et al.*, 2007). In addition, it was shown that Cry1AbMod and Cry1AcMod counter resistance in 7 different lepidopteran insect resistant colonies that in some cases were not linked to *CAD* mutations (Tabashnik *et al.*, 2011). Interestingly, Cry1Amod were effective against a laboratory selected tobacco budworm (*Chloridea virescens*) Cry1Ac resistant colony whose resistance was recently shown to be genetically linked to a mutant allele of an ABC transporter (*ABCC2*) (Gahan *et al.*, 2010). It was shown that the *ABCC2* protein facilitates oligomer formation and membrane insertion (Ocelotl *et al.*, 2017). The potential of Cry1AMod toxins for countering resistance is high since Cry1AMod toxins show toxicity to insect resistant populations with different mechanisms of resistance.

Domain III swapping has been recognized as a natural mechanism involved in the evolution of Cry toxins. Domain III swapping among different Cry toxins has resulted in hybrid toxins with improved toxicities against certain insect species like hybrid toxin containing domains I and II from Cry1Ab toxin and domain III of Cry1C that showed more than six-fold higher toxicity against beet armyworm (*Spodoptera exigua*) (Bosh *et al.*, 1994; de Maagd *et al.*, 2000). Other examples are the case both Cry1Ba and Cry1Ia toxins that showed low toxicity against *L. decemlineata* while the hybrid toxin consisting of domains I and II of Cry1Ia and domain III of Cry1Ba showed seven fold higher toxicity or the hybrid toxin containing domains I and II from Cry3Aa and domain III from Cry1Ab (eCry3.1Ab) that was shown to be toxic to *D. v. virgifera* in contrast to Cry3Aa and Cry1Ab toxins that showed no toxicity against this insect (Naimov *et al.*, 2001; Walters *et al.*, 2010). Toxin eCry3.1Ab expressed in transgenic maize was shown to be effective in controlling *D. v. virgifera* (Hibbard *et al.*, 2011). Over all these results show that domain III swapping could be an interesting strategy to improve toxicity of Cry toxins or to create novel hybrid toxins with toxicity against pests that show no susceptibility to the parental Cry toxins. Strategies for shuffling the three different domains among large numbers of cry genes (Knight *et al.*, 2004) and high through output bioassay screening methods are likely to provide novel Cry toxins with improved or novel toxicities.



dade contra as pragas que não apresentam suscetibilidade às toxinas Cry parentais. Estratégias para combinar os três domínios diferentes entre um grande número de genes cry (Knight *et al.*, 2004) e métodos de *screening* em bioensaios de alto rendimento são capazes de fornecer novas toxinas Cry com toxicidades novas ou melhoradas.

Um exemplo interessante de troca de domínio foi a construção de uma toxina híbrida entre Vip3Aa e Vip3Ac, criando um híbrido contendo os primeiros seiscentos aminoácidos da região N-terminal de Vip3Ac e 190 aminoácidos da Vip3Aa (Vip3AcAa). Não há estrutura tridimensional resolvida para as toxinas Vip3, no entanto, as regiões de 190 aminoácidos do terminal C são as mais variáveis, compartilhando apenas 54% de identidade de sequência entre as toxinas, enquanto o resto do fragmento N-terminal é altamente conservado (Fang *et al.*, 2007). Vip3AcAa teve sua toxicidade aumentada contra a broca-do-milho-europeia, ao contrário das toxinas parentais, e matou uma população de lagartas-falsa-medideira (*Tricoplusia ni*) resistente a Cry1Ac (Fang *et al.*, 2017).

A mutagênese sítio dirigida do domínio II resultou, em alguns casos, em toxinas mutantes com aumento da atividade inseticida. Uma única mutação no *loop 2* da proteína Cry1Ab, N372A, ou uma mutação tripla no *loop 2* nos resíduos N372A, A282G e L283S apresentaram toxicidade respectivamente de oito e 36 vezes maior para as larvas de *Lymantria dispar* (Rajamohan *et al.*, 1996). Além disso, para larvas de coleópteros, um mutante R345 no *loop 1* do domínio três da toxina Cry3Aa, Y350F, Y351F apresentou toxicidade dez vezes maior para *Tenebrio molitor* do que Cry3Aa e duas vezes maior contra *L. decemlineata* (Wu *et al.*, 2000). Esses resultados mostram que as regiões de *loop* do domínio II são regiões de ligação de toxinas Cry que são alvos adequados para mutagênese e seleção de toxinas Cry com propriedades inseticidas melhoradas.

O domínio III da toxina Cry1A foi reconhecido como envolvido na ligação do receptor, sendo que as estruturas secundárias  $\beta 16$  e  $\beta 22$  foram identificadas como as regiões de ligação para que ocorra a interação com fosfatase alcalina (ALP) e aminopetidase N (APN) que estão localizadas na superfície da membrana da célula do intestino do inseto (Atsumi *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2006;

An interesting example of domain swapping was the construction of a hybrid toxin between Vip3Aa and Vip3Ac creating a hybrid containing the first N-terminal 600 amino acids of VipAc and 190 amino acid region from VipAa (Vip3AcAa). There is no three-dimensional structure for Vip3 toxins, however, the C-terminal 190 amino acid regions are the most variable sharing only 54 % sequence identity between both toxins while the rest of the N-terminal fragment is highly conserved (Fang *et al.*, 2007). Vip3AcAa was shown to gain toxicity against European corn borer in contrast to the parental toxins and to kill Cry1Ac resistant population of cabbage looper (Fang *et al.*, 2017)

Site directed mutagenesis of domain II loop sequences has in some cases resulted in mutant toxins with increased insecticidal activity. A single Cry1Ab mutation in loop 2, N372A, or a triple loop 2 mutant in residues N372A, A282G and L283S showed eight- and 36-fold higher toxicity to *Lymantria dispar* larvae respectively (Rajamohan *et al.*, 1996). Also, for coleopteran larvae it was shown a Cry3Aa triple domain II loop 1 mutant R345, Y350F, Y351F showed ten-fold higher toxicity to *Tenebrio molitor* than Cry3Aa and two fold higher toxicity against *L. decemlineata* (Wu *et al.*, 2000). These results show that domain II loop regions are key binding regions of Cry toxins that are suitable targets for mutagenesis and selection of Cry toxins with improved insecticidal properties.

Cry1A domain III has been recognized to be involved in receptor binding where  $\beta$ 16 and  $\beta$ 22 were identified as the binding regions for interaction with alkaline phosphatase (ALP) and aminopeptidase N (APN) (Atsumi *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2006; Arenas *et al.*, 2010). Recently, alanine-scanning mutagenesis of Cry1Ab and Cry1Fa  $\beta$ 16 residues showed that certain mutations like Cry1AbN514A or Cry1FaN507A enhanced the toxicity of Cry1Ab or Cry1Fa from 3 to 18-fold to different populations of *S. frugiperda* from México and Brazil without affecting the toxicity to *M. sexta* (Gómez *et al.*, 2018). Enhancement of Cry1AbN514A toxicity correlated with enhanced binding to ALP, APN and CAD receptors and also to higher stability to treatment with *S. frugiperda* midgut proteases (Gómez *et al.*, 2018).

Other domain I mutations have shown enhanced toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa toxins like the Cry1Ac helix  $\alpha$ 5 mutant V171C

Arenas *et al.*, 2010). Observou-se que a mutagênese para o mapeamento da função do resíduo de alanina na estrutura secundária  $\beta$ 16 localizada nas toxinas Cry1Ab e Cry1Fa16 mostrou que certas mutações, como N514A na toxina Cry1Ab, ou a mutação N507A na toxina Cry1Fa, aumentaram a toxicidade de Cry1Ab ou Cry1Fa de três a dezoito vezes para diferentes populações de *S. frugiperda* presentes tanto no México como no Brasil sem afetar a toxicidade para *M. sexta* (Gómez *et al.*, 2018). O aumento da toxicidade provocada pela mutação N514A na toxina Cry1Ab é correlacionada à ligação de maior afinidade aos receptores ALP, APN e CAD e, também, com a maior estabilidade ao tratamento com proteases naturalmente presentes no intestino médio de *S. frugiperda* (Gómez *et al.*, 2018).

Outras mutações no domínio I mostraram aumento de toxicidade de Cry1Ac e Cry2Aa. Por exemplo, a mutação V171C, localizada na hélice  $\alpha$ 5 na toxina Cry1Ac, apresentou atividade inseticida 25 vezes maior contra *Lymantria dispar* sem afetar sua toxicidade a *M. sexta*. Isso se deve, provavelmente, a uma inserção mais eficiente da toxina na membrana da célula do intestino do inseto (Alzate *et al.*, 2010). No caso de Cry2Aa, as mutações nos resíduos K63F e K64P, localizados na hélice  $\alpha$ 1, resultaram no aumento da natureza hidrofóbica da região transmembrana da toxina, que foi determinada por análises *in silico*, visando aumentar a eficiência da inserção da toxina na membrana da célula do intestino do inseto (Mandal *et al.*, 2007).

#### **4. Sistemas de evolução *in vitro* para aumentar a toxicidade de Cry**

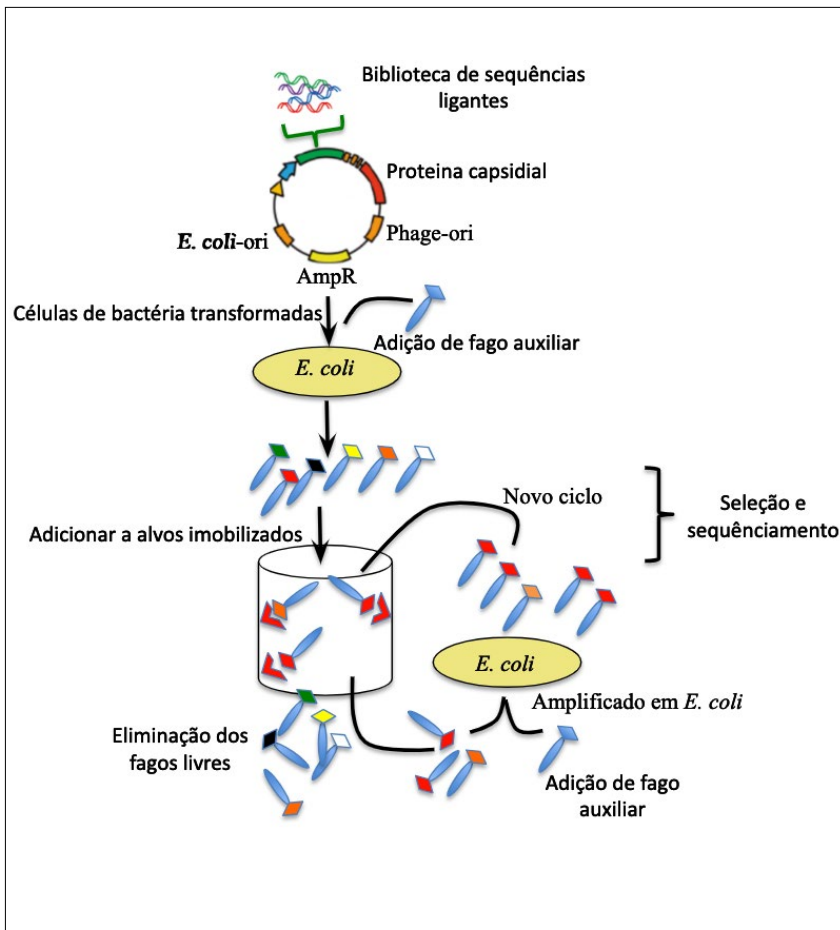
Os procedimentos moleculares visando o aumento da atividade inseticida por mutagênese sítio dirigida têm sido o resultado da análise de poucos estudos empregando toxinas mutantes contra diferentes espécies de insetos. Contudo, será mais eficiente analisar um grande número de variantes para detectar toxinas Cry com maior toxicidade. Dentro desse contexto, os sistemas de alto rendimento, tais como *phage display* (apresentação em fago) ou *ribosome display* (apresentação em ribossomo), são sistemas eficientes que podem detectar mutantes de maior toxicidade a partir de um grande número de variantes gerado por mutagênese sítio dirigida (figura 2).

O sistema de *phage display* permite a seleção de variações de

that had 25-fold higher insecticidal activity against *Lymantria dispar* without affecting its toxicity to the *M. sexta* probably due to more efficient membrane insertion (Alzate *et al.*, 2010). In the case of Cry2Aa, helix  $\alpha 1$  residues K63F and K64P were introduced based on enhancing the hydrophobic nature of a putative transmembrane region identified in silico probably also enhancing membrane insertion (Mandal *et al.*, 2007).

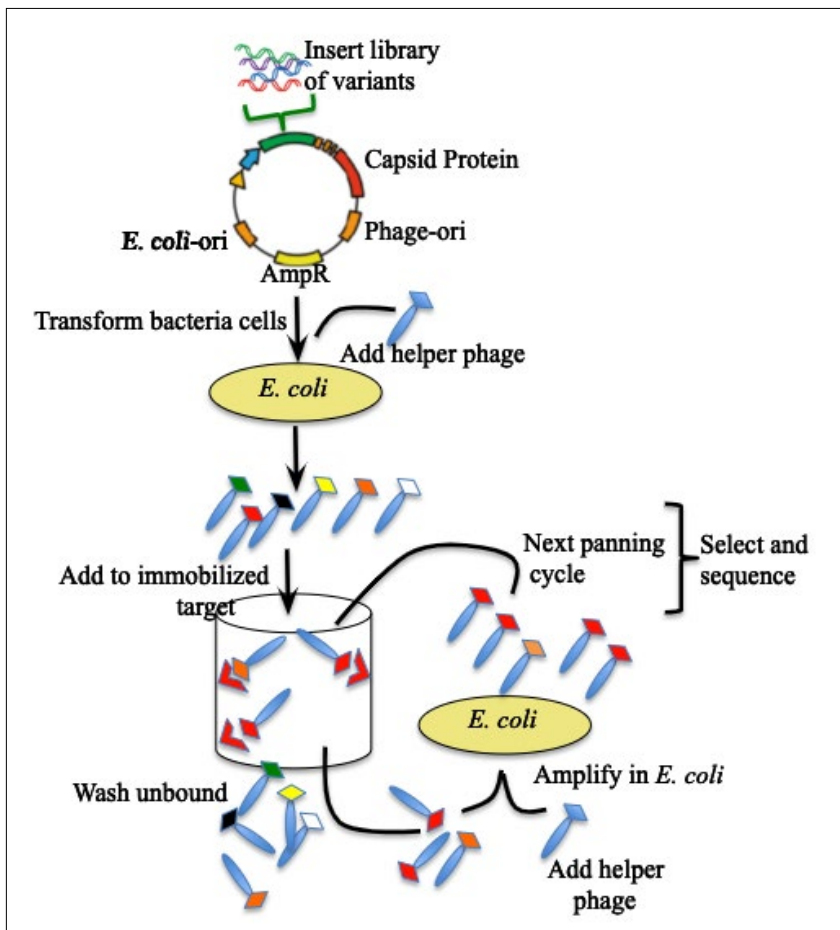
#### **4. In vitro evolution systems for enhancing Cry toxicity.**

The improvement of the insecticidal activity by site directed mutagenesis has been the result of analyzing few mutants in different insect species. However, it is more efficient to analyze a large number of variants to detect Cry toxins with higher toxicity. High through output systems like phage display or ribosome display are efficient systems that could detect improved mutants from a large pool of variants (figure 2).



**Figura 2.** Representação esquemática do sistema phage display.

toxinas Cry com afinidade de ligação ao receptor aumentada (Azzazy *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2006). Para a seleção de ligantes de maior afinidade, a seqüência de DNA do ligante é fundida com a seqüência de DNA de um gene da proteína do revestimento do fago para gerar uma proteína híbrida, que será exibida na superfície do fago. Se uma biblioteca de seqüências ligantes for fundida ao gene da proteína de revestimento do fago, um grande número de variantes será exibido na superfície, e algumas dessas variantes podem ter maior afinidade de ligação a um ligante específico que pode ser selecionado por procedimentos de triagem



**Figure 2.** Schematic representation of the phage display

Phage display system allows selection of protein variants with improved binding characteristics (Azzazy *et al.*, 2002; Mullen *et al.* 2006). For selection of binders with higher affinity, the DNA sequence of the binder is fused to the DNA sequence of a phage coat protein gene to generate a hybrid protein that will be displayed on the surface of the phage. If a library of binder sequences is fused to the phage coat protein gene, a high number of variants will be displayed in the phage surface, some of these variants may have increased binding affinity to a specific ligand that could be selected by screening procedures

para recuperar os fagos que interagem com alta afinidade a um ligante específico (Droge *et al.*, 2003; Mullen *et al.*, 2006). Para apresentar a proteína de fusão na superfície do fago, esta necessita ser translocada para o periplasma da bactéria hospedeira por meio de uma sequência de peptídio sinal e um fago auxiliar, que fornecerá todos os componentes necessários para a montagem desse fago.

Já o sistema de *ribosome display* (figura 3) consiste na tradução *in vitro* da proteína, usando uma construção específica de RNAm que possui um promotor T7, uma sequência canônica Shine-Delgarno para a ligação do ribossomo, seguida por uma sequência do ligante e, finalmente, fundida ao espaçador Tola, que irá bloquear a tradução da proteína remanescente ancorada no túnel ribossômico no complexo ternário composto pelo mRNA-ribossomo-proteína.

Se uma biblioteca de variantes do ligante for incorporada a esse RNAm, a proteína recém-sintetizada e o RNAm codificador não deixam o ribossomo, e todos esses complexos ternários poderiam ser utilizados para a seleção de ligantes com afinidades aumentadas para uma proteína ou ligante específico (Hanes & Plückthun, 1997). Já que o sistema de *ribosome display* não requer células vivas para sua seleção, permitindo a construção de grandes bibliotecas (tamanhos até 10<sup>14</sup>), enquanto que, com o sistema *phage display*, somente bibliotecas menores podem ser construídas (tamanhos até 10<sup>9</sup>), uma vez que a eficiência de transformação de *E. coli* é um fator limitante (Dreier & Plückthun, 2011). Sistemas otimizados de exibição de fagos e de ribossomo para a exibição de toxinas Cry e Cyt têm sido relatados e, provavelmente, serão ferramentas úteis para a seleção de toxinas Cry com capacidade de ligação e potencial de toxicidade melhorados (Pacheco *et al.*, 2015).

in order to recover the phages that interact with high affinity to a specific ligand, (Droge *et al.*, 2003; Mullen *et al.*, 2006). To display the fusion protein in the surface of the phage, the fusion protein need to be translocated to the bacterial-host periplasm by a peptide leader sequence and a helper phage will provide all the necessary components for phage assembly.

The ribosome display system consists in the *in vitro* translation of the protein, using a particular mRNA construction that has a T7 promoter, a canonical Shine-Delgarno sequence for ribosome binding followed by a sequence of the binder and finally fused to TolA spacer, which will block the protein traduction remaining anchored into the ribosomal tunnel at the ternary complex of mRNA-Ribosome-protein (figure 3). If a library of variants of the binder are incorporated in such mRNA. The newly synthesized protein and the codifying mRNA do not leave the ribosome and all these ternary complexes could be used for selection of binders with improved affinities to a specific protein or ligand (Hanes & Plückthun, 1997). Since Ribosome-display does not requires living cells for selection, it allows construction of large libraries (sizes up to  $10^{14}$ ) while with the phage display system only smaller libraries can be constructed (sizes up to  $10^9$ ) since the *E. coli* transformation efficiency is a limiting factor (Dreier & Plückthun, 2011). Improved phage display and ribosome display systems for displaying Cry and Cyt toxins have been reported that are likely to be useful tools for selection of Cry toxins with improved binding and toxicity (Pacheco *et al.*, 2015).



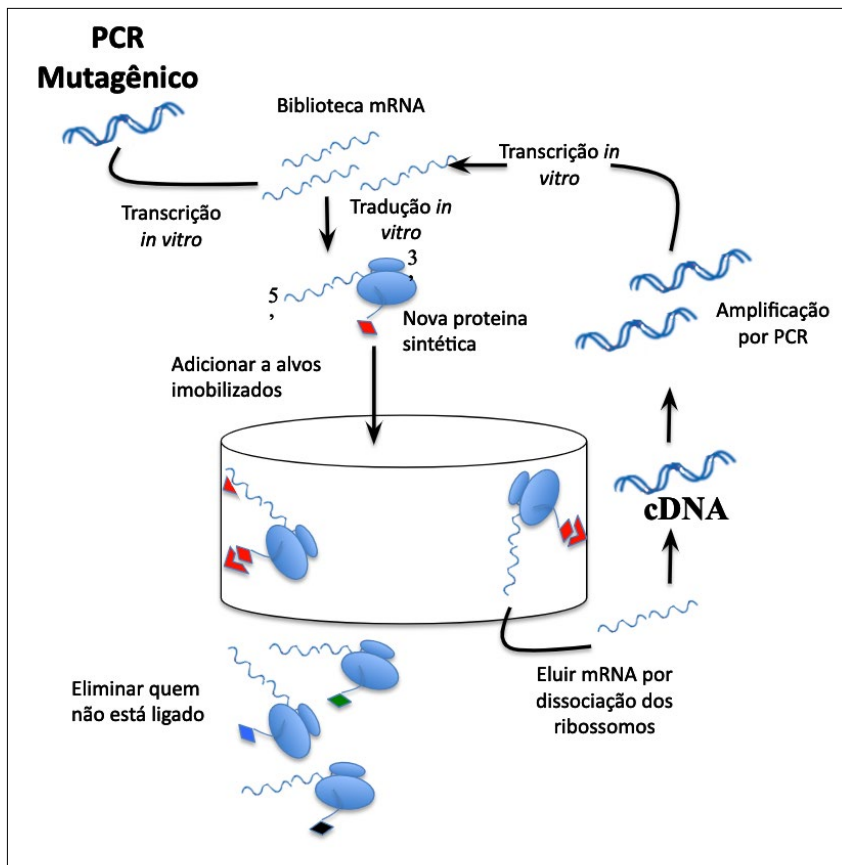
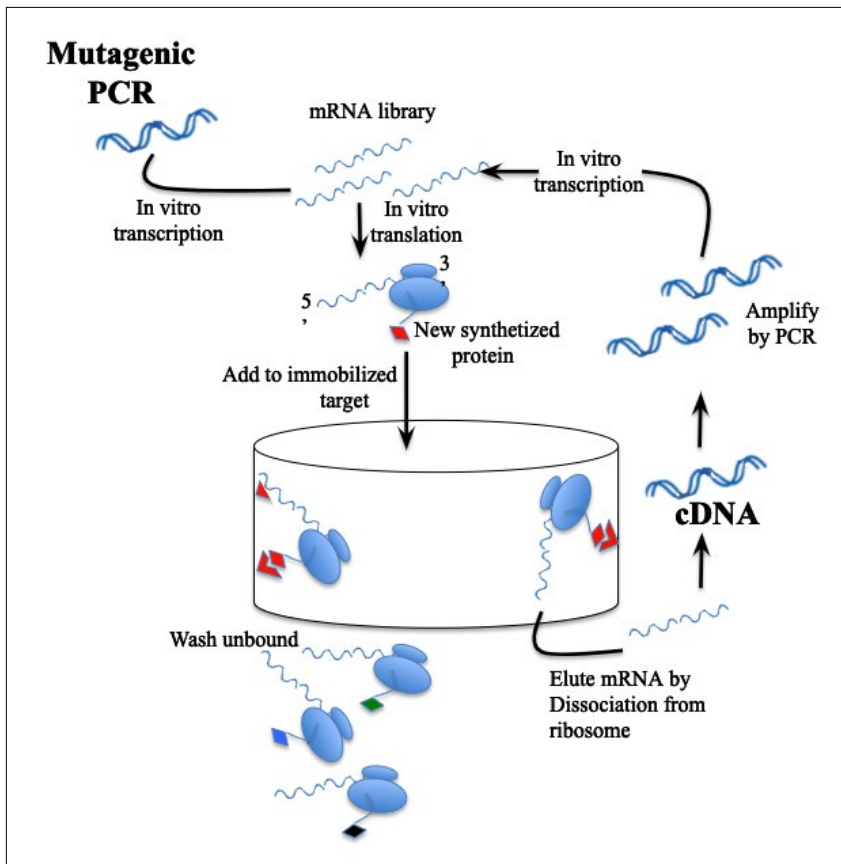


Figura 3. Representação esquemática da estratégia do Ribosome display.

Os fagos M13, T7 e  $\lambda$  foram utilizados para a exibição de toxinas Cry1A, mas os resultados mostraram baixa eficiência do método (Marzari *et al.*, 1997; Kasman *et al.*, 1998; Vilchez *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2006; Dominguez-Flores *et al.*, 2017). No entanto, embora essa eficiência tenha sido baixa, a seleção bem-sucedida de variantes melhoradas de Cry foi relatada para esses três fagos. No caso do sistema de apresentação utilizando o fago M-13, construiu-se a biblioteca de variantes da toxina Cry por rearranjo genético e selecionaram-se variantes melhoradas de Cry1Ia ou Cry8Ka contra BBMV de *Telchin licus licus* ou *Anthonomus grandis*, respectivamente (Craveiro *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). No caso



**Figure 3.** Schematic representation of the Ribosome display strategies.

Phages M13, T7 and  $\lambda$  have been used for the display of Cry1A toxins with low efficacy (Marzari *et al.*, 1997; Kasman *et al.*, 1998; Vilchez *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2006; Dominguez-Flores *et al.*, 2017). However, even though that efficiency was low the successful selection of improved Cry variants has been reported for those three phages. In the case of phage display system using M-13 phage the Cry toxin library of variants was constructed by gene shuffling and improved variants of Cry1Ia or Cry8Ka were selected against BBMV from *Telchin licus licus* or *Anthonomus grandis* respectively (Craveiro *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011). In the case of Cry1Ia, four toxin variants showed toxicity against *Telchin licus licus* and shown to con-

de Cry1Ia, quatro variantes de toxinas mostraram toxicidade contra *T. licus licus* e mostraram conter mutações pontuais nos domínios I e III (Craveiro *et al.*, 2010). No caso de Cry8Ka, um mutante com toxicidade três vezes maior foi identificado, mostrando uma deleção de dezesseis aminoácidos na extremidade N terminal da toxina e seis mudanças adicionais de aminoácidos, uma localizada no domínio II do *loop 3* (Oliveira *et al.*, 2011). No caso do fago T7, construiu-se uma biblioteca de mutantes na região do *loop II* do domínio II e utilizou-se para recuperar variantes de toxinas com maior afinidade de ligação a um fragmento de CAD de *Bombyx mori*, resultando na identificação de um mutante do *loop 2* do domínio II, com atividade inseticida quatro vezes maior (Ishikawa *et al.*, 2007). A exibição de uma biblioteca de variantes de Cry1Ac mostrando mutações no *loop 2* do domínio II foi feita no fago  $\lambda$ , e as toxinas otimizadas foram selecionadas para se ligarem a vesículas de membrana de borda em escova isoladas de intestinos de *Aedes aegypti*. Essa estratégia levou à identificação de duas variantes do *loop 2* da toxina Cry1Aa13 com toxicidade significativa contra *A. aegypti* (Dominguez-Flores *et al.*, 2017).

Finalmente, desenvolveu-se um elegante sistema de evolução contínua denominado Pace (*Phage Assisted Continuous Evolution* - Evolução Contínua Assistida por Fago) para isolar as variantes Cry1Ac com alta afinidade de ligação a uma proteína CAD de *Tricoplusia ni*, que, neste inseto, não está envolvida como receptor de Cry1Ac. O sistema Pace aproveita a afinidade de ligação melhorada de Cry1Ac e um fragmento de CAD, que é acoplado a um sistema de dois híbridos para reconstituir uma proteína de fago necessária para a infecção bacteriana (Badran *et al.*, 2016). Utilizando uma célula hospedeira de *E. coli* com taxa mutagênica aumentada para acelerar a evolução da interação proteína-proteína, o sistema Pace produziu variantes da toxina Cry1Ac com afinidade melhorada à CAD de *T. ni*. É interessante observar que essas variantes Cry1Ac mostraram toxicidade para uma população de *T. ni* resistente a Cry1Ac, cuja resistência estava ligada a mutações em outro receptor de Cry1Ac, o transportador ABCC2 (Badran *et al.*, 2016).

tain single point mutations in domains I and III (Craveiro *et al.*, 2010). In the case of Cry8Ka, a mutant with three-fold higher toxicity was identified showing a sixteen amino acid deletion in the N-terminal end and six additional amino acid changes, one located in domain II loop 3 (Oliveira *et al.*, 2011). In the case of T7 phage, a library of mutants in domain II loop 2 region was constructed and used to recover toxin variants with increased binding affinity to a *Bombyx mori* CAD fragment resulted in the identification of a domain II loop 2 mutant with a four-fold higher insecticidal activity (Ishikawa *et al.*, 2007). Finally, the display of a Cry1Ac library of variants showing mutations in domain II loop 2 was done in the phage  $\lambda$  and the optimized toxins were selected to bind to isolated brush border membrane vesicles from *Aedes aegypti* midguts. This strategy led to the identification of two loop 2 variants of Cry1Aa13 toxin with significant toxicity against *A. aegypti* (Dominguez-Flores *et al.*, 2017).

Finally, an elegant continuous evolution system called phage-assisted continuous evolution (PACE) was developed to isolate Cry1Ac variants with high affinity in the binding interaction with a *Tricoplusia ni* CAD protein that in this insect is not involved as receptor of Cry1Ac. The PACE system takes advantage of the improved binding affinity of Cry1Ac and a fragment of CAD that is coupled to a two-hybrid system to reconstitute a phage protein necessary for bacterial infection (Badran *et al.*, 2016). Using an *E. coli* host with enhanced mutagenic rate to speed up protein-protein interaction evolution, PACE system yielded different Cry1Ac toxin variants with high binding affinity to *T. ni* CAD. Interestingly these Cry1Ac variants showed toxicity to a *T. ni* Cry1Ac-resistant population whose resistance was linked to mutations in another Cry1Ac receptor, ABCC2 transporter (Badran *et al.*, 2016).

## 5. Conclusão

A identificação de novos genes inseticidas para expressão em culturas é necessária para o desenvolvimento da tecnologia de plantas resistentes a insetos; a evolução da resistência às toxinas Cry utilizadas em cultivos transgênicos em insetos coloca em risco a tecnologia. Além disso, a emergência de pragas secundárias que não suscetíveis às toxinas expressas nas culturas requer novas moléculas para controlar as pragas. É provável que a busca de proteínas inseticidas em Bt ou outros organismos forneça novas toxinas para lidar com a resistência ou controlar novas pragas. No entanto, a estratégia é altamente complexa e cara; a alternativa seria modificar as toxinas conhecidas para aumentar a toxicidade contra pragas resistentes ou novas, modificando regiões tóxicas específicas envolvidas no modo de ação ou por mutagênese aleatória e triagem de variantes melhoradas por sistemas de alto rendimento. Ao todo, essas diferentes estratégias provavelmente fornecerão novas características inseticidas que poderão ser usadas em culturas transgênicas visando o controle da evolução da resistência e o combate a novas pragas que possam aparecer.

## **5. Concluding remarks**

The identification of novel insecticidal genes for expression in crops is necessary to sustain the technology of insect resistant plants. Evolution of insect resistance to the Cry toxins currently used in transgenic crops endangers this technology. Also, the merge of secondary pests that are not susceptible to the toxins expressed in crops require novel activities to control these pests. Screening Bt or other organisms for insecticidal proteins is likely to provide new toxins to cope with resistance or target novel insect pests. However, this strategy is highly demanding an expensive. The alternative is to modify the known toxins to increase the toxicity against resistant and novel pests either by modifying specific toxic regions involved in the mode of action or by random mutagenesis and screening of improved variants by high through output systems. Altogether these different strategies are likely to provide new insecticidal traits that could be used in transgenic crops to counter resistance and target novel pests.

## Referências | References

ALZATE, O.; OSORIO, C.; FLOREZ, A. M.; DEAN, D. H. Participation of valine 171 in alpha-Helix 5 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin in translocation of toxin into *Lymantria dispar* midgut membranes. **Appl. Environ. Microbiol.**, 76: 7878-7880, 2010.

ARENAS, I.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; GOMEZ, I. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **J. Biol. Chem.**, 285: 12497-503, 2010.

ATSUMI, S.; MIZUNO, E.; HARA, H.; NAKANISHI, K.; KITAMI, M.; MIURA, N.; TABUNOKI, H.; WATANABE, A.; SATO, R. Location of the *Bombyx mori* aminopeptidase N type I binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71: 3966-3977, 2005.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH, J.W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clin. Biochem.**, 35: 425-445, 2002.

BADRAN, A. H.; GUZOV, V. M.; HUAL, Q.; KEMP, M. M.; VISHWANATH, P.; KAIN, W.; NANCE, A. M.; EVDOKIMOV, A.; MOSHIRI, F.; TURNER, K. H.; WANG, P.; MALVAR, T.; LIU, D. R. Continuous evolution of *Bacillus thuringiensis* toxins overcomes insect resistance. **Nature**, 533: 58-63, 2016.

BOSCH, D.; SCHIPPER, B.; VAN DER KLEIJ, H.; DE MAAGD, R. A.; STIEKEMA, J. Recombinant *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins with new properties for resistance management. **Biotechnol.**, 12: 915-918, 1994.

BRAVO, A.; SOBERÓN, M. How to cope with resistance to Bt toxins? **Trends in Bioetchnol.**, 26: 573-579, 2008.

BRAVO, A.; LIKITVIVATANAVONG, S.; GILL, S. S.; SOBERÓN, M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect. Biochem. Mol. Biol.**, 41: 423-431, 2011.

BRAVO, A.; GÓMEZ, I.; PORTA, H.; GARCÍA-GÓMEZ, B. I.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; PARDO, L.; SOBERÓN, M. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. **Microb. Biotech.** 6: 17-26, 2013.

CARROL, J.; CONVENTS, D.; VAN DAMME, J.; BOETS, A.; VAN RIE, J.; ELLAR D. J. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. **J. Invertebr. Pathol.**, 70: 41-49, 1997.

CRAVEIRO, K. I.; GOMES JR., J. E.; SILVA, M. C.; MACEDO, L. L.; LUCENA, W. A.; SILVA, M. S.; DE SOUZA JR., J. D.; OLIVEIRA, G. R.; DE MAGALHÃES, M. T.; SANTIAGO, A. D.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Variant Cry1Ia toxins generated by DNA shuffling are active against sugarcane giant borer. **J. Biotechnol.**, 145: 215-21, 2010.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; R FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62: 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: <<http://www.btnomenclature.info>>; 2016.

DE MAAGD, R. A.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; STIEKEMA, W.; BOSCH, D. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specific determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. **Appl. Environ. Microbiol.**, 66: 1559-1563, 2000.

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

DOMINGUEZ-FLORES, T.; ROMERO-BOSQUET, M. D.; GANTIVA-DIAZ, D. M.; LUQUE-VAVAS, M. J.; BERRY, C.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. Using phage display technology to obtain Cry bodies active against non-target insects. **Sci. Rep.**, 7: 14922, 2017.

DREIER, B.; PLÜCKTHUN, A. Ribosome display: a technology for selecting and evolving proteins from large libraries. **Methods Mol. Biol.**, 687: 283-306, 2011.

DROGE, M. J.; RUGGEBERG, C. J.; VAN DER SLOOT, A. M.; SCHIMMEL, J.; DIJKSTRA, D.W.; VERHAERT, R. M. D.; REETZ, M. T.; QUAX, W. J. Binding of phage display *Bacillus subtilis* lipase A to a phosphonate suicide inhibitor. **J. Biotechnol.**, 101: 19-28, 2003.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proc. Natl. Sci. USA**, 93: 5389-5394, 1996.



EVDOKIMOV, A. G.; MOSHIRI, F.; STURMAN, E. J.; RYDEL, T. J.; ZHENG, M.; SEALE, J. W.; FRANKLIN, S. Structure of the full length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing details of toxin packaging into *in vivo* formed crystal. **Prot. Sci.**, 23: 1491-1497, 2014.

FANG J.; XU X.; EANG, P.; ZHAO J-Z.; SHELTON, A. M.; CHENG, J.; FENG M-G.; SHEN, Z. Characterization of chimeric *Bacillus thuringiensis* Vip3 toxins. **Appl. Environ. Microbiol.**, 73: 956-961, 2007.

GAHAN, L. J.; PAUCHET, Y.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. An ABC transporter mutation is correlated with insect resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **PLoS Genet.**, 6: e1001248, 2010.

GASSMANN, A. J.; PETZOLD-MAXWELL, J. L.; KEWESHAN, R. S.; DUNBAR, M. W. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn root-worm. **PLoS One**, 6: e22629, 2011.

GASSMANN, A. J.; SCHRESTHA, R. B.; JAKKA, S. R.; DUNBAR, M. W.; CLIFTON, E. H.; POLINO, A. R.; INGBER, D. A.; FRENCH, B. W.; MAS-LOSKI, K. E.; DOUNDA, J. W.; ST CLAIR, C. R. Evidence of resistance to Cry34/35Ab1 corn by western worn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae): Root injury in the field and larval survival in plant-based bioassays. **J. Econ. Entomol.** , 109: 1872-1880, 2016.

GOLDMANN, L. (2004) **Childhood Pesticide poisoning, Information for advocacy and action.** UNEP Switzerland GE 04-00690-May 2004. Disponible em: <[www.who.int/publications/poisoning.pdf](http://www.who.int/publications/poisoning.pdf)>.

GÓMEZ, I.; DEAN, D. H.; BRAVO, A.; SOBERÓN M. Molecular basis for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R1 receptor interact with loops 8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. **Biochem.**, 42: 10482-10489, 2003.

GÓMEZ, I.; ARENAS, I.; BENITEZ, I.; MIRANDA-RÍOS, J.; BECERRIL, B.; GRANDE, G.; ALMAGRO, J. C.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Specific epitopes of Domains II and III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin involved in the sequential interaction with cadherin and aminopeptidase-N receptors in *Manduca sexta*. **J. Biol. Chem.** , 281: 34032-34039, 2006.

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

GÓMEZ, I.; OCELOTL, J.; SÁNCHEZ, J.; LIMA, C.; MARTINS, E.; ROSALES-JUAREZ, A.; AGUILAR-MEDEL, S.; MONNERAT, R.; PEÑA, G.; ZHANG, J.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Enhancement of *Bacillus thurin-*

*giensis* Cry1Ab and Cry1Fa toxicity to *Spodoptera frugiperda* by domain III mutations indicates two distinct limiting steps for toxicity. **Appl. Environ. Microbiol.**, Submitted for publication. 2018.

GUO C.H.; ZHAO S.T.; MA Y.; HU J.J.; HAN X.J.; CHEN J.; LU M.Z. *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa fused to a cellulase-binding peptide shows increased toxicity against the longhorned beetle. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 93: 1249-1256, 2012.

HANES, J.; PLÜCKTHUN, A. *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 4937-42, 1997.

HIBBARD, B. E.; FRANK, D. L.; KURTZ, R.; BOUDREAU, E.; ELLERSIECK, M. R.; ODHIAMBO, J. F. Mortality impact of Bt transgenic maize roots expressing eCry3.1Ab, mCry3A, and eCry3.1Ab plus mCry3A on western corn rootworm larvae in the field. **J. Econ. Entomol.**, 104: 1584-1591, 2011.

ISHIKAWA, H.; HOSHINO, Y.; MOTOKI, Y.; KAWAHARA, T.; KITAJIMA, M.; KITAMI, M.; WATANABE, A.; BRAVO, A.; SOBERON, M.; HONDA, A.; YAOI, K.; SATO, R. A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Biotechnol.**, 36: 90-101, 2007.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010. **ISAAA Brief**, No. 42. ISAAA: Ithaca, NY. 2014.

KASMAN, L. M.; LUKOWIAK, A. A.; GARCYNYSKI, S. F.; McNALL, R. J.; YOUNGMAN, P.; ADANG, M. J. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 2995-3003, 1998.

KNIGHT, J. S.; BROADWELL, A. H.; GRANT, W. N.; SHOEMAKER, C. B. A strategy for shuffling numerous *Bacillus thuringiensis* crystal protein domains. **J. Econ. Entomol.**, 97:1805-13, 2004.

MANDAL, C. C.; GAYEN, S.; BASU, A.; GHOSH, K. S.; DASGUPTA, S.; MAITI, M. K.; SEN, S. K. Prediction-based protein engineering of domain I of Cry2A entomocidal toxin of *Bacillus thuringiensis* for the enhancement of toxicity against lepidopteran insects. **Protein Eng. Des. Sel.**, 20: 599-606, 2007.

MARZARI, R.; EDOMI, P.; BHATNAGAR, R. K.; AHMAD, S.; SELVAPANDIYAN, A.; BRADBURY, A. Phage display of *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin. **FEBS Lett.**, 411: 27-31, 1997.

MULLEN, L. M.; NAIR, S. P.; WARD, J. M.; RYCROFT, A.; HENDERSON, N. Phage display in the study of infectious diseases. **Trends in Microbiol.**, 14: 141-147, 2006.

NAIMOV, S.; WEEMEN-HENDRIKS, M.; DUKIANDJIEV, S.; DE MAAGD, R.A. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado potato beetle. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 5328-5330, 2001.

OCELOTL, J.; SANCHEZ, J.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK B. E.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. ABCC2 is associated with *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin oligomerization and membrane insertion in diamondback moth. **Scient. Rep.**, 7: 2386, 2017.

OLIVEIRA, G. R.; SILVA, M. C.; LUCENA, W. A.; NAKASU, E. Y.; FIRMINO, A. A.; BENEVENTI, M. A.; SOUZA, D. S.; GOMES JR., J. E.; DE SOUZA JR., J. D.; RIGDEN, D. J.; RAMOS, H. B.; SOCCOL, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **BMC Biotechnol.**, 9: 11-85, 2011.

PACHECO, S.; GÓMEZ, I.; SATO, R.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Functional display of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on T7 phage. **J. Invertebr. Pathol.**, 92: 45-49, 2006.

PACHECO, S.; GOMEZ, I.; ARENAS, I.; SAAB-RINCON, G.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; GILL, S. S.; BRAVO, A.; AND SOBERON, M. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a “ping-pong” binding mechanism with *Manduca sexta* aminopetidase-N and cadherin receptors. **J. Biol. Chem.**, 284: 32750-32757, 2009.

PACHECO, S.; CANTÓN, E.; ZUÑIGA-NAVARRETE, F.; PECORARI, F.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Improvement and efficient display of *Bacillus thuringiensis* toxins on M13 phages and ribosomes. **AMB express.** , 5: 73, 2015.

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

RAJAMOHAN, F.; ALZATE, O.; COTRILL, J. A.; CURTISS, A.; DEAN, D. H. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 14338-14343, 1996.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research development and commercial applications. **Plant Biotechnol. J.**, 9: 283-300, 2011.

SCHELLENBERGER, U.; ORAL, J.; ROSEN, B. A.; WEI, J. Z.; ZHU, G.; XIE, W.; McDONALD, M. J.; CERF, D. C.; DIENH, S. H.; CRANE, V. C.; SANDAHI, G. A.; ZHAO, J. Z.; NOWATZKI, T. M.; SETHI, A.; LIU, L.; PAN,

Z.; WANG, Y.; LU, A. L.; WU, G.; LIU, L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. **Sci.**, 354: 634-637, 2016.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. R.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62: 705-806, 1998.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B.; BRAVO A. Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. **Sci.**, 318: 1640-1642, 2007.

TABASHNIK, B. E.; HUANG, F.; GHIMIRE, M. N.; LEONARD, B. R.; SIEGFRIED, B. D.; RANDASAMY, M.; YANG, Y.; WU, Y.; GAHAN, L.; HECKEL, D. G.; BRAVO, A.; SOBERÓN, M. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different mechanism of resistance. **Nat. Biotechnol.**, 29:1128-1131, 2011.

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

TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nat. Biotechnol.**, 35: 926-935, 2017.

VÍLCHEZ, S.; JACOBY, J.; ELLAR, D. J. Display of biologically functional insecticidal toxin on the surface of  $\phi$  phage. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70: 6587-6594, 2004.

WALTERS, F.S.; DEFONTES, C.M.; HART, H.; WARREN, G.W.; CHEN, J.S. Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab, an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. **Appl. Environ. Microbiol.**, 76: 3082-3088, 2010.

WALTERS, F. S.; STACY, C. M.; LEE, M. K.; PALEKAR, N.; CHEN, J. S. An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against Western corn rootworm larvae. **Appl. Environ. Microbiol.**, 74 :367-374, 2008.

WARREN G. Vegetative insecticidal proteins: novel proteins for control of corn pests. In: Carozzi, N., and Koziel, M.(eds). **Advances in Insect control: the role of transgenic plants**. Taylor & Francis Ltd. pp. 109- 120, 1997.

WEI, J.-Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S.-CH.; ARIOAN R. V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proc. Natl. Sci. USA**, 100: 2760-2765, 2003.

WEI, J.-Z.; O'REAR, J.; SCHELLENBERGER, U.; ROSEN, B. A.; PARK, Y. J.; McDONALD, M. J.; ZHU, G.; XIE, W.; KASSA, A.; PROCYK, L.; PEREZ-ORTEGA, C.; ZHAO, J. Z.; YALPANI, N.; CRANE, V. C.; DIENH, S. H.; SANDAHI, G. A.; NELSON, M. E.; LU, A. L.; WU, G.; LIU, L. A selective insecticidal protein from *Pseudomonas mosselii* for corn rootworm control. **Plant Biotech. J.**, 16: 649-659, 2018.

## CAPÍTULO 7

# Uso de bioinseticidas à base de Bt em culturas GM-Bt

**Rose Monnerat**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF

**Erica Martins Queiroz**

IMAmt - Brasília/DF

**Lilian Praça**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF

*Bacillus thuringiensis* (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, de ampla distribuição, podendo ser encontrada nos mais diferentes ambientes e substratos, como solo, água, superfície de plantas, insetos mortos etc. (Krywunczyk & Fast, 1980; Bravo *et al.*, 1988). Essa bactéria produz diversas toxinas nos diferentes momentos de seu crescimento, dentre elas as  $\delta$ -endotoxinas (Cry e Cyt), durante a fase de esporulação, e as VIP e SIP, durante a fase de crescimento vegetativo (Monnerat & Bravo, 2000; Bravo *et al.*, 2005). Tais toxinas são altamente específicas a seus insetos-alvo, inócuas ao ser humano, vertebrados e plantas e têm efeito não poluente ao meio ambiente por serem completamente biodegradáveis (Whiteley & Schnepf, 1986; Bravo *et al.*, 2005).

A bactéria pode ser utilizada tanto em sua forma nativa, para a produção de bioinseticidas, como doadora de genes para a síntese de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos.

Bioinseticidas à base de estirpes nativas têm sido utilizados para o controle de insetos desde 1938, quando a França começou a produzir o produto Sporeine, para controle de lagartas. Nos anos 1950, teve início a produção em larga escala do produto Thuricide e, a partir de então, outros países — como Rússia, Tchecoslováquia e Estados Unidos — deram início à produção e à comercialização de bioinseticidas Bt (De Maag *et al.*, 1999). Já as plantas transgênicas expressando genes de *B. thuringiensis* são utilizadas em campo desde 1996 e têm a capacidade de controlar insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera (Tabashnik *et al.*, 2013). As principais culturas transgênicas são milho, soja e algodão.

## 1. Toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt)

A variabilidade genética das toxinas de *B. thuringiensis* é muito alta; são conhecidos mais de 840 genes (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2018). As toxinas receberam denominações com base na identidade de aminoácidos das toxinas previamente nomeadas; há quatro subcategorias cuja identidade varia de inferior a 45% até superior a 95% de identidade (*vide* capítulo 1).

O mecanismo de ação das proteínas Bt é bastante complexo e tem sido bastante estudado, sobretudo em relação às toxinas Cry, formadoras do cristal proteico. O processo se inicia quando o inseto ingere o cristal da bactéria; este contém as protoxinas, que são solubilizadas pelo pH intestinal e, em seguida, ativadas pela clivagem pelas enzimas digestivas (proteases) presentes no intestino dos insetos. A toxina ativada é reconhecida e liga-se a receptores presentes no intestino do inseto, alterando a permeabilidade da membrana e causando um desequilíbrio osmótico que destrói as células do epitélio intestinal, levando o inseto à morte (Knowles & Dow, 1993; Bravo *et al.*, 2005). No caso das plantas transgênicas, o gene nelas inserido expressa a toxina já em sua forma ativada, ou seja, pronta para ser reconhecida e ligar-se aos receptores presentes no intestino dos insetos.

Até 2014, acreditava-se que apenas a toxina ativada ligava-se aos receptores, entretanto, Gómez *et al.* (2014) demonstraram que a toxina Cry1Ab, tanto em sua forma de protoxina quanto na de toxina ativada, é capaz de ligar-se à caderina com afinidade semelhante e que dois diferentes pré-poros foram observados in-

teragindo com a caderina na presença de proteases intestinais do inseto. Esses pré-poros diferiram em seu tamanho, sensibilidade à temperatura, capacidade de inserir-se em membranas sintéticas e características de poro, sugerindo que a região da protoxina (que, neste caso, não foi clivada) de toxinas formadoras de poro (TFP) podem ter um papel funcional, permitindo um mecanismo de ação alternativo que, em 2015, foi denominado de “modelo dual” por Tabashnik *et al.* (2015). Esses autores demonstraram que a atividade de protoxinas inicialmente proposta por Gómez *et al.* (2014) foi muito importante para o controle de insetos resistentes a toxinas Cry. Eles testaram tanto a toxina como a protoxina de Cry1A para *Helicoverpa armigera*, *H. zea* e *Diatraea saccharalis*, e os resultados mostram que as protoxinas foram mais potentes que as toxinas ativas, contradizendo o modelo clássico e dando suporte ao modelo dual.

## 2. Bioinseticidas à base de Bt

No Brasil, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa - AGROFIT, 2018), há vinte produtos à base de *B. thuringiensis* no mercado para o controle de pragas agrícolas: Able, Agree, Bac-Control Max WP, Bac-Control WP, BTControl, COSTAR, Crystal, Dipel, Dipel ES-NT, Dipel WG, Dipel WP, Helymax EC, Helymax WP, Javelin WG, Ponto Final, Tarik WP, Thuricide, Thuricide SC, Winner Max EC e Xentari. Esses produtos comerciais têm como princípios ativos as linhagens *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* e *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* e ainda uma estirpe recombinante de *B. thuringiensis kurstaki* e *B. thuringiensis azaiwai*, que são utilizados no controle de lagartas como: *H. armigera* (lagarta-do-algodão), *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja) e *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tuta absoluta* (traça-do-tomateiro) (Lepidoptera: Gelechiidae), *P. xylostella* (traça-das-crucíferas) (Lepidoptera: Plutellidae), entre outras espécies pertencentes à ordem Lepidoptera (tabela 1).



**Tabela 1.** Composição de protoxinas presentes nas estirpes de *B. thuringiensis* utilizadas nas formulações comerciais no Brasil

Princípio ativo	Composição de protoxinas
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1D
<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C, Cry1D
<i>B. thuringiensis</i> <i>kurstaki</i> e <i>B. thuringiensis</i> <i>aizawai</i>	Cry1Ac, Cry1C, Cry1D

No caso das plantas transgênicas, no Brasil estão liberadas plantas de milho, soja e algodão, que sintetizam de uma a três proteínas Bt (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry2Ae, Cry3Bb1, Cry34Ab1 e Cry35Ab1) (tabela 2) (CTNBio, 2014). Os principais alvos das toxinas inseridas nos eventos transgênicos são os insetos da ordem Lepidoptera (*S. frugiperda*, *A. argillacea*, *C. virescens* e *H. zea*, *P. gossypiella* - lagarta rosada, *A. gemmatalis*, *C. includens* - lagarta medideira, *Diatraea saccharalis*, *Agrotis ipsilon*, *Elasmopalpus lignosellus*) e da ordem Coleoptera (*Diabrotica* spp.) (tabela 2). A partir da detecção da presença da *H. armigera* no Brasil, a tecnologia também tem sido utilizada para controlar a praga (Monnerat *et al.*, 2015a).

**Tabela 2.** Toxinas de Bt presentes nos eventos transgênicos aprovados pela CTNBio (safra 2012/2013).

Eventos transgênicos	Toxinas de Bt	Alvos
Milho	Cry1Ab, Cry2Ab, Cry1A.105, Cry1F, VIP3Aa	Lepidoptera
	Cry3Bb, Cry34 Ab1, Cry35Ab1	Coleoptera
Algodão	Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry1F	Lepidoptera
Soja	Cry1AcCry2Ae, Cry1F	Lepidoptera

Desde 2013, muitos relatos de ataques severos de *S. frugiperda* foram registrados nas principais culturas transgênicas na região do Cerrado (Cruz *et al.*, 2013), e, em 2014, a resistência foi cientificamente documentada (Farias Jr., 2014; Monnerat *et al.*, 2015). Um fato muito preocupante foi a confirmação de que larvas de *S. frugiperda* resistentes à toxina Cry1F eram resistentes também às toxinas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, presentes nos bioinseticidas comerciais. Esse dado comprometeria o uso dos bioinseticidas Bt para controle das lagartas resistentes ao milho Bt.

Para confirmar a teoria, foram conduzidos ensaios de toxicidade das estirpes de Bt subespécies *kurstaki*, *aizawai* e *kurstaki* + *aizawai*, tanto na população de *S. frugiperda* suscetível às toxinas Bt quanto na população resistente ao milho Bt. Os resultados das CL<sub>50</sub> (concentração letal necessária para matar 50% das larvas testadas) obtidas nos bioensaios realizados com as populações de *S. frugiperda* resistente e suscetível a toxinas Bt indicaram que a estirpe mais eficaz é a conjugante Bt *kurstaki*+*aizawai*, que apresentou CL<sub>50</sub> de 15 ng e 31 ng de produto por cm<sup>2</sup> de dieta para as populações resistente e suscetível, respectivamente (tabela 3). A segunda estirpe mais eficaz foi *B. thuringiensis kurstaki*, que apresentou CL<sub>50</sub> de 395 ng/cm<sup>2</sup> para a população suscetível e 335 ng/cm<sup>2</sup> para a população resistente. A estirpe pertencente ao sorotipo *aizawai* causou mortalidade (CL<sub>50</sub>) de 2.175 ng/cm<sup>2</sup> e de 2.283 ng/cm<sup>2</sup> para as populações suscetível e resistente, respectivamente. A análise dos valores de CL<sub>50</sub> e seus respectivos intervalos de confiança mostraram que a suscetibilidade das populações suscetível e resistente a cada um dos produtos é semelhante (tabela 3).

**Tabela 3.** Toxicidade das diferentes estirpes de Bt para larvas de *S. frugiperda* das populações resistentes e suscetível a toxinas Bt.

Sorotipo	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> ng/cm <sup>2</sup>	
	Suscetível	Resistente
Bt <i>kurstaki</i> + <i>aizawai</i>	31 (26 - 62)	15 (9 - 53)
Bt <i>kurstaki</i>	395 (206 - 632)	335 (145 - 889)
Bt <i>aizawai</i>	2175 (1518 - 2923)	2.283 (1.172 – 3.486)

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

A variação de valores de CL<sub>50</sub> obtidas com cada estirpe pertencente a cada sorotipo deve estar relacionada à composição de toxinas presentes nas mesmas. É possível que haja uma ação sinérgica entre as toxinas de algumas estirpes, ou seja, a ação se torne potencializada quando duas ou mais proteínas Cry agem em conjunto (Schnepf *et al.*, 1998; Praça *et al.*, 2004).

Por outro lado, a semelhança de resultados da atuação dos produtos nas populações suscetível e resistente deve estar relacionada à ação da protoxina presente nas estirpes. É importante mencionar que a planta transgênica está expressando a toxina ativada Bt e, no produto, é a protoxina que está presente. Esse dado corrobora os dados publicados por Tabashnik *et al.* (2015), que demonstram que o modo de ação da protoxina e da toxina são diferentes (Tabashnik *et al.*, 2015), assim como a população de *S. frugiperda* que estava resistente às toxinas Cry1F, Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac, provavelmente continuava suscetível às protoxinas Cry1F, Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac.

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

### 3. Considerações finais

Esses resultados indicam que o uso de bioinseticidas à base de Bt para o controle de lagartas que sobrevivam à ação da toxina de Bt expressa em plantas transgênicas deve ser considerado no manejo integrado de pragas (MIP) de diversas culturas, tanto nas variedades transgênicas como nas não transgênicas, aumentando o número de ferramentas de controle disponíveis ao produtor.

#### Referências

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLA-LOBOS, F. J.; GUADALUPE, P. NUNEZ-VALDEZ, M.E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. Characterization of Cry genes in Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, 64, 12, 4965-4972, 1998.

BRAVO, A., GILL, S. S.; SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis* mechanisms and use. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, Vol. 6, Elsevier, New York, NY, USA. 2005, p. 175-206.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. and Molec. Biol. Rev.**, 62, 807-813, 1998.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; BRAVO, A.; DEAN, D. H. **Bacillus thuringiensis toxin nomenclature**. Disponível em: [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acesso em: 02 maio 2018.

CRUZ, I.; VALICENTE, F. H.; VIANA, P. A.; MENDES, S. M. **Risco potencial das pragas de milho e de sorgo** - Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2013. 40 p. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, 150).

CTNBio (2014) - <http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/2.html>

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

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

GÓMEZ, I.; SANCHEZ, J.; MUNOZ-GARAY, C.; MATUS, V.; GILL, S.S.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins are versatile-proteins with multiple modes of action: two distinct pre-pores are involved in toxicity. **Biochem J.**, 459, 383-396, 2014.

JAKKA, S. R., KNIGHT, V. R.; JURAT-FUENTES, J. L. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **J. Invertebr. Pathol.** 122, 52-54, 2014.

KNOWLES, B. H.; DOW, J. A. T. The crystal  $\delta$ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut - **BioEssays**, 15, 7, 439-497, 1993.

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

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

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA, L.; SOARES, C. M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Evidence of Field-Evolved Resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt Corn Expressing Cry1F in Brazil That Is Still Sensitive to Modified Bt Toxins. **Plos One**, v. 10, p. e0119544, 2015.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; QUEIROZ, P. Insect resistance to Bt toxins in Brazil and Latin America. In: SOBERÓN, M.; GAO, Y.; BRAVO, A. (eds). **Bt resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins**. 1. ed. Boston., 2015A. v. 1. 26-36.

PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R., MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepdoptera, Coleoptera e Díptera. **PAB**, 39, 1, 11-16, 2004.

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

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nat. Biotechnol.**, 31: 510–521, 2013.

TABASHNIK, B. E. ; CARRIÈRE, Y. Successes and failures of transgenic Bt crops: global patterns of field-evolved resistance. In: Soberón, M.; Gao, Y.; Bravo, A. (eds.) **Bt resistance: characterization and strategies for GM crops producing *Bacillus thuringiensis* toxins**. 1. ed. Boston, 2015. v. 1, 1-15.

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



## CAPÍTULO 8

# O IMAmt e o algodão transgênico resistente a pragas

**Jean-Louis Bélot**

IMAmt - Primavera do Leste/MT

**Leonardo Bitencourt Scoz**

IMAmt - Rondonópolis/MT

**Jacob Crosariol Netto**

IMAmt - Primavera do Leste/MT

**Patricia M. C. A. Vilela**

IMAmt - Primavera do Leste/MT

**Edson Andrade Jr.**

IMAmt - Primavera do Leste/MT

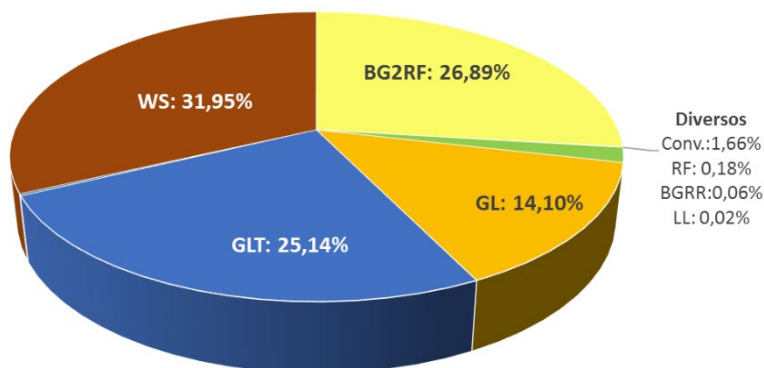
Desde a liberação no Brasil da primeira variedade comercial de algodão transgênica resistente a lepidópteros, em 2005 (CTNBio, 2005), tanto as empresas detentoras das tecnologias Bt (Bayer, Basf, Corteva) como as obtentoras de variedades comerciais (BASF, Bayer, TMG, IMAmt e Embrapa) apresentaram ao mercado várias cultivares transgênicas de algodão.

A adoção dessas tecnologias foi muito grande, pois essas variedades transgênicas trouxeram vantagens ao agricultor, seja do ponto de vista econômico ou do operacional, durante o manejo da cultura, razão pela qual na safra de 2017/18 mais de 98% da superfície de Mato Grosso foi cultivada com essas variedades (figura 1).



## Tecnologias usadas em algodão- Mato Grosso (2017/18)

Fonte: Ampa, 2018



**Figura 1.** Participação das diversas tecnologias no cultivo algodoeiro em Mato Grosso. Safra 2017/ 18 (fonte: Ampa, 2018).

Do total, 31,95% é com a tecnologia WideStrike®, da Corteva; 25,14% com a GLT®, da Basf, e 26,89% com a BG2RF®, da Bayer, sendo todas essas tecnologias Bt associadas ou não à resistência a herbicidas. O restante (14,10%) é semeado com variedades transgênicas unicamente resistentes a herbicidas, usadas como refúgios para manejar o surgimento de resistência das pragas-alvo às tecnologias Bt ou pela qualidade da variedade (qualidade da fibra).

O estado de Mato Grosso vem financiando projetos com algodão Bt desde o início dos anos 2000 por meio do Facual (Fundo de Apoio à Cultura do Algodão) e, a partir de 2007, pelo IMAmt. Estamos apresentando a seguir os principais trabalhos financiados pelo estado e os resultados gerados ao longo desses anos.

## 1. Projetos com algodão transgênico financiados por Mato Grosso e outros estados

Desde 2002, avaliando que o cotonicultor precisaria de mais ferramentas para o controle integrado da praga, o Facual de Mato Grosso financiou trabalhos de diversas equipes da Embrapa Cenargen, a fim de identificar novas toxinas de *Bacillus thuringiensis* eficientes sobre o bicudo, visando sua clonagem e sua

introgressão em plantas de algodoeiro. Parte dos recursos foi direcionada ao projeto de “Estratégias moleculares para controle do Bicudo do algodoeiro e de Lepidópteros”, coordenado pela dra. Grossi-de-Sá, do Cenargen.

No marco desses projetos e dos demais financiados por recursos da Embrapa, do CNPq ou de outros fundos algodoeiros, como o Fialgo (Fundo de Incentivo ao Cultivo Algodoeiro do Estado de Goiás), essa equipe desenvolveu muitos trabalhos, usando diferentes estratégias moleculares na prospecção de genes que codificassem proteínas com capacidade para controlar especificamente as pragas-alvo (nesse caso *Spodoptera frugiperda* e *Anthonomus grandis*), para posterior desenvolvimento de variedades comerciais de algodão resistentes a essas pragas.

Vários trabalhos resultantes desse projeto ou de outros foram publicados em congressos ou revistas científicas, sendo muitos deles relativos ao controle do bicudo com inibidores de proteinase (Franco *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2003; Oliveira Neto *et al.*, 2003; Figueira *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2004; Grossi-de-Sá *et al.*, 2004d; Oliveira Neto *et al.*, 2004a; Oliveira Neto *et al.*, 2004b; Treitler *et al.*, 2004; Calderon *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2013) ou com toxinas de Bt (Dias *et al.*, 2000; Grossi-de-Sá *et al.*, 2004a; Grossi-de-Sá *et al.*, 2004b; Grossi-de-Sá *et al.*, 2004c; Grossi-de-Sá *et al.*, 2007; Nakasu *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2011).

Um pesquisador dessa equipe, Oliveira Neto, trabalhou muito com transformação do algodoeiro via tubo polínico (Oliveira Neto *et al.*, 2005a; Oliveira Neto *et al.*, 2005b; Oliveira Neto *et al.*, 2005c; Oliveira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2009), método usado inicialmente com sucesso pelas equipes chinesas. Essa equipe realizou também transformação com biobalística (Basso *et al.*, 2009; Lourenço *et al.*, 2010) e por fim, ela iniciou trabalhos com outras vias de modificações genéticas do algodoeiro, com uso de RNA interferência (Firmino *et al.*, 2013), método usado com êxito para a resistência do feijoeiro a uma virose.

A equipe da dra. Monnerat, da Embrapa Cenargen, envolveu-se nesses trabalhos sobre o bicudo-do-algodoeiro com a equipe da dra. Grossi-de-Sá, ou em projetos diferentes. A ampla experiência da dra. Monnerat sobre a biologia e a criação em meio artificial do bicudo-do-algodoeiro foi a base para o desenvolvimento

de metodologias de realização de bioensaios e *screening* de estirpes e toxinas de *Bacillus thuringiensis* sobre o bicudo (Dias *et al.*, 1999; Dias *et al.*, 2000; Monnerat *et al.*, 2000; Nobre *et al.*, 2000; Monnerat, 2002; Santos *et al.*, 2003c; Martins *et al.*, 2004). Mas o foco principal dos trabalhos dessa equipe, em parte financiados por recursos dos fundos dos produtores de Mato Grosso (Projeto Facual “Identificação, caracterização e disponibilização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes ao controle de lepidópteros desfolhadores da cultura do algodão”) e de Goiás (Fialgo), foi a identificação de estirpes de *Bacillus thuringiensis* (provenientes do Banco de Germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos da Embrapa Cenargen) tóxicas para o bicudo-do-algodoeiro.

Várias estirpes foram identificadas (Martins *et al.*, 2000; Monnerat *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002b; Monnerat *et al.*, 2003a e b; Praça *et al.*, 2003; Praça *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2005a; Martins *et al.*, 2007; Teixeira Corrêa *et al.*, 2012).

Em projeto diferente, também financiado pelo Facual e intitulado “Utilização de *Bacillus thuringiensis* endofíticos para controle de insetos-praga do algodoeiro”, tentou-se desenvolver tecnologia para utilização de *Bt* como inoculante para proteger a planta do algodoeiro do ataque de insetos (Monnerat *et al.*, 2009a). Por enquanto, esses trabalhos não resultaram em tecnologia utilizável pelos cotonicultores.

A partir das estirpes tóxicas para o bicudo-do-algodoeiro, foram isoladas diversas toxinas cujas toxicidade e caracterização biológica e molecular foram realizadas (Martins *et al.*, 2002a; Bartz & Monnerat, 2003); foi o caso das proteínas Cry1I (Martins *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2005b) e Cry10Aa (Monnerat, 2012), que foram sequenciadas, clonadas e tiveram vetores construídos e usados por equipes da dra. Santos e da dra. Grossi-de-Sá para transformar plantas de algodoeiro.

Os trabalhos ainda estão em andamento, e levará tempo para o eventual uso comercial dessas plantas.

Vale lembrar que, anteriormente, equipes da Embrapa Algodão iniciaram trabalhos em Campina Grande/PB para obtenção de plantas transgênicas resistentes ao bicudo. Com financiamento do Facual em 2003-2004, uma equipe coordenada pela dra. Vidal tentou transformar geneticamente o algodoeiro via *Agrobacterium tumefaciens*; foram usadas construções genéticas com

genes de inibidores de proteases potencialmente eficientes sobre o bicudo. Porém, esses trabalhos não tiveram prosseguimento (Vidal, 2004).

Ao mesmo tempo, a dra. dos Santos, da Embrapa Algodão, trabalhou na linha dos projetos da dra. Grossi-de-Sá e da dra. Monnerat, da Embrapa Cenargen. Ela coordenou novos projetos financiados pelo Fialgo, como os projetos “Isolamento, introdução e expressão do colesterol oxidase em plantas transgênicas de algodão para controle do bicudo do algodoeiro - 2003/2006” e “Obtenção de eventos elite de algodão contendo o gene *cry1Ia* para resistência a lagartas e ao bicudo-do-algodoeiro - 2006/2009”.

Com esses recursos e financiamentos de outras instituições, ela desenvolveu também trabalhos sobre a transformação genética do algodoeiro, em particular via tubo polínico (Santos *et al.*, 2004c; Santos *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2006a; Pinheiro *et al.*, 2006b; Carvalho & Santos, 2007a; Carvalho *et al.*, 2007b; Medeiros *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2007; Pinheiro *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2009b), trabalhando inicialmente com genes de inibidores de protease e genes de Bt (Monnerat *et al.*, 2003a; Monnerat *et al.*, 2003b; Monnerat *et al.*, 2009b).

Os últimos trabalhos foram realizados com o gene *cry1Ia*, visando o controle de *Spodoptera frugiperda* e de *Anthonomus grandis* (Silva *et al.*, 2008a; Silva *et al.*, 2008b; Monnerat *et al.*, 2009b; Santos *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2014a; Silva *et al.*, 2014b). Algumas plantas possivelmente transformadas foram obtidas, e a sua avaliação do ponto de vista molecular e de sua eficiência biológica e toxicidade sobre pragas-alvo ainda está em andamento. Atualmente, a dra. dos Santos segue com pesquisas sobre transformação genética do algodoeiro via tubo polínico com um novo gene *cry10Aa*, promissor para o controle do bicudo-do-algodoeiro.

Durante esse período, ela trabalhou também com proteínas e genes expressos especificamente nos botões florais do algodoeiro, visando identificar promotores e construções que permitirão, no futuro, a obtenção de plantas geneticamente transformadas com expressão da toxina unicamente nos botões florais, onde o bicudo se alimenta e oviposita (Batista *et al.*, 2008; Batista *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009a; Queiroz *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012; Batista *et al.*, 2014).

Em 2007, o dr. Alves- Ferreira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, conduziu um projeto a fim de identificar genes expressos exclusivamente em tecidos florais (projeto: “Desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas para o controle do bicudo-do-algodoeiro: Identificação de gene expresso exclusivamente em tecidos florais para clonagem e caracterização preliminar de promotores específicos de flor”, financiamento do Facual). Esse trabalho visa desenvolver promotores tecido-específicos para serem usados em construções genéticas com genes letais identificados pelas equipes da Embrapa Cenargen. Com pesquisadores da Embrapa Cenargen, publicou resultados sobre esses promotores específicos, visando construções genéticas para expressar genes de utilidade (sejam genes de inibidores de protease ou genes cry de Bt) unicamente nos órgãos frutíferos do algodoeiro (Viana *et al.*, 2011; Artico *et al.*, 2013; Artico *et al.*, 2014), para o controle do bicudo-do-algodoeiro.

Finalmente, nesses últimos dezessete anos, muitos trabalhos foram conduzidos, com apoio financeiro dos produtores (pelos fundos Facual e do IMAmt, do Fialgo) ou de outras fontes financiadoras, como CNPq, ou mesmo fundos próprios da Embrapa, para obtenção de plantas de algodão geneticamente modificadas resistentes ao bicudo. Muitos “ativos” foram gerados; muitos trabalhos técnicos e científicos foram publicados.

Porém, até agora, nenhuma equipe conseguiu produzir uma planta de algodão comprovadamente transformada, com alta eficiência para o controle do bicudo-do-algodoeiro e suscetível de originar variedades comerciais resistentes a esse inseto.

Mais investimentos serão necessários para alcançar esse objetivo, em particular para dispor de uma plataforma de transformação eficiente, de alta capacidade, capaz de transformar em rotina um número elevado de plantas, com diversas construções genéticas.

O caminho ainda é longo para dispor aos produtores de algodão variedades transgênicas resistentes ao bicudo; a união dos esforços de todas as equipes de pesquisa nacionais e internacionais e investimentos importantes serão necessários para alcançar esse objetivo.

## 2. Variedades de algodão Bt desenvolvidas para Mato Grosso

Desde sua criação em 2007, o IMAmt vem trabalhando para apresentar a seus associados, os produtores de algodão de Mato Grosso, variedades competitivas com as mais modernas tecnologias. As tecnologias Bt incorporadas nas variedades atuais do IMAmt são de propriedade das empresas globais Basf, Bayer, Corteva e Syngenta, porém, recentemente, foi iniciado um programa nacional de busca por novos genes para controle do bicudo (*Anthonomus grandis*) e de lepidópteros resistentes às tecnologias atuais (*Spodoptera* spp.), do qual o IMAmt participa ativamente.

### 2.1 Melhoramento genético do algodoeiro do IMAmt

O programa de melhoramento genético do algodoeiro do IMAmt teve início em 2008, com a integração de diversos germoplasmas — da Coodetec, da LD Sementes e Salles Sementes — a germoplasmas comerciais americanos e australianos. Ao longo dos anos, o nível geral de tolerância e resistência a doenças e nematoides vem evoluindo significativamente.

O programa é estruturado em duas plataformas de trabalho: uma para gerar linhas convencionais elites, com resistência e/ ou tolerância a doenças e nematoides, e outra para introgridir nessas linhas as diversas tecnologias que o IMAmt licencia, Bollgard II-RF, Bollgard III-RF, WS, WS-P, GL, GLT, GLTP etc. O programa trabalha em rotina, realizando pelo menos três retrocruzamentos com as linhas elites, usando ferramentas de marcadores moleculares para identificar tanto os *traits* transgênicos incorporados, como *traits* convencionais de resistência a doenças e nematoides.

Ao longo dos anos, o IMAmt comercializou diversas variedades de algodão transgênicas (tabela 1); dessas, IMA 5801B2RF é a mais promissora para o IMAmt participar significativamente do mercado do algodão de Mato Grosso.

**Tabela 1.** Variedades GM comercializadas pelo IMAmt

Nome	Início da comercialização	Principais tecnologias incorporadas
IMA 6001LL	2010	Liberty Link/ R. a glufosinato
IMA 7501WS	2014	WideStrike/ R. a lagartas; tolerância a doenças foliares e nematoides
IMA 5675B2RF	2015	Bollgard II-RF/ R. a glifosato e lagartas
IMA 2106 GL*	2015	GL/ R. a glifosato e glufosinato
IMA 8401GLT*	2015	GLT/ R. a glifosato e glufosinato e a lagartas
IMA 5801B2RF	2018	Bollgard II-RF/ R. a glifosato e lagartas; Resistência a nematoides-das-galhas e ramulária
IMA 8001WS	2019	WideStrike/ R. a lagartas; tolerância ao nematoide reniforme
IMA 6801B2RF	2019	Bollgard II-RF/ R. a glifosato e lagartas

\* Variedades licenciadas

## 2.2 Algodão Bt resistente ao bicudo e a lagartas

Até o momento, todas as variedades Bt têm por praga-alvo lepidópteros, e nenhuma tecnologia transgênica atualmente disponível apresenta qualquer efetividade sobre *Anthonomus grandis* (bicudo-do-algodoeiro), que figura como a principal praga da cotonicultura da América Latina.

Os danos econômicos relacionados ao ataque do bicudo ocorrem por conta de seus hábitos reprodutivo e alimentar, que destroem botões e maçãs do algodoeiro, levando a grandes perdas na produtividade de pluma e podendo provocar perdas de até 100%. Adicionalmente, ocorre o aumento exponencial dos custos de

produção em decorrência do uso de inseticidas altamente tóxicos para seu controle. Dados publicados falam de perdas anuais de cerca de USD 200 milhões para o setor produtivo brasileiro em decorrência dessa praga (Belot *et al.*, 2016).

O controle químico é oneroso, danoso ao ambiente e à saúde dos operadores de campo e não é devidamente efetivo, uma vez que as larvas, cujo hábito endofítico as mantém dentro de botões e maçãs, permanecem inacessíveis às aplicações de inseticidas. Ao final de cada safra, as populações desse inseto refugiam-se dentro da mata nativa ou continuam a reproduzir-se sobre plantas voluntárias de algodoeiro. No período de safra, reproduzem-se rapidamente nas lavouras em que não houver um programa de controle populacional ativo e eficiente. Nesse contexto, podemos imaginar que plantas geneticamente transformadas que expressariam altos níveis de moléculas inseticidas em botões e maçãs figuram como a ferramenta biotecnológica mais eficaz para a solução do problema.

Como relatado anteriormente, muitos trabalhos de pesquisa já foram conduzidos por instituições diversas (Embrapa, universidades etc.) visando identificar toxinas candidatas para transformar o algodoeiro e controlar o bicudo. Porém, até agora, nenhum resultado significativo que poderia ser usado para a obtenção de uma variedade comercial foi alcançado.

Logo, uma iniciativa público-privada nacional vem desenvolvendo trabalhos de cooperação por meio da Plataforma de Desenvolvimento de Algodoeiro Transgênico Resistente ao Bicudo. Fazem parte dessa iniciativa de cooperação a Associação Brasileira dos Produtores de Algodão (Abrapa), o Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt) — pertencente à Associação Mato-grossense dos Produtores de Algodão (Ampa) —, a Empresa Nacional de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) — com grupos de pesquisa ligados à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e Embrapa Algodão —, a empresa israelense Evogene, especializada na prospecção de novos genes e promotores, assim como o Instituto Brasileiro do Algodão (IBA), como fundo financiador.

A Plataforma é um trabalho colaborativo e possui componentes de curto, médio e longo prazos, que permitirão o desenvolvimento de tecnologias para combater o bicudo. Esse *pipeline* consiste em uma série de ações concatenadas e complementa-



res, que incluem a prospecção (descoberta e validação de genes e promotores, síntese e otimização de cassetes gênicos para altos níveis de expressão), a transformação genética (prova de conceito em plantas de algodão, caracterização molecular dos eventos com potencial de uso comercial, seleção de linhagens transgênicas com uma única cópia do transgene, seleção de linhagens com altos níveis de expressão estável dos transgenes) e a fenotipagem (estudos da eficiência das plantas transgênicas no controle do bicudo em laboratório, casa de vegetação e a campo). Ao fim desse projeto, cuja duração prevista é de cinco anos, prevê-se a obtenção de eventos transgênicos com potencial para a geração de uma nova tecnologia de algodoeiro GM resistente ao bicudo. Claro que será necessário muito mais tempo para poder oferecer essa tecnologia ao produtor, pois há a necessidade de transferi-la em variedades adaptadas, associadas ou não às tecnologias atuais de resistência a herbicida e lepidópteros, e obter, junto ao CTNBio, todas as autorizações de liberação no meio ambiente.

Esse projeto visa principalmente a obtenção de plantas transformadas resistentes ao bicudo; porém, diversos elementos do projeto serão usados para transformação genética visando lagartas resistentes às tecnologias atuais. O *screening* de novas toxinas será realizado para o bicudo e para alguns lepidópteros com resistência às toxinas atuais, como *Spodoptera* spp. e *Helicoverpa* spp.

### **3. Eficiência e custos de produção das variedades de algodão Bt em Mato Grosso**

#### **3.1 Eficiência das tecnologias Bt**

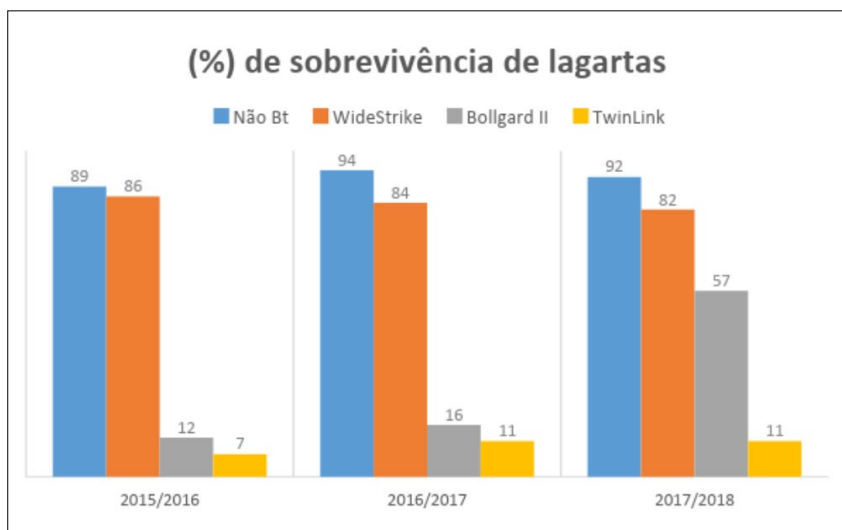
O Departamento de Entomologia do IMAmt realiza anualmente biotestes de eficiência das diversas tecnologias Bt sobre pragas-alvo. O objetivo dos biotestes é comparar ano a ano a taxa de sobrevivência de populações locais às principais cultivares Bt de algodoeiro. Esse monitoramento é de extrema importância, pois possibilita a construção de estratégias para o Manejo da Resistência de Insetos (MRI).

Os biotestes são realizados em laboratório, utilizando-se discos foliares de cultivares comerciais de algodoeiro semeados em

casa de vegetação. Para o teste, populações da praga são coletadas em lavouras comerciais e mantidas durante uma geração em salas climatizadas específicas para criação.

Com a geração F1 dá-se início aos biotestes, quando lagartas neonatas são individualizadas e mantidas em condições controladas de temperatura e umidade. Cada tratamento é composto por uma cultivar, onde discos foliares são oferecidos (*ad libitum*) e trocados diariamente, até que as lagartas completem a fase larval. Ao atingirem a fase de pupa, é realizado o cálculo da viabilidade larval e conseqüentemente o porcentual de sobrevivência para cada tratamento. Os gráficos 1 e 2 apresentam os principais resultados obtidos com *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera* (Crosariol Netto *et al.*, 2018a)

Para *Spodoptera frugiperda*, desde a safra 2015/2016, os índices de sobrevivência observados para cultivares WideStrike® (Cry1Ac + Cry1F) são muito próximos aos observados para as cultivares não Bt (cultivares sem expressão de proteína inseticida), ou seja, as proteínas Cry1Ac + Cry1F expressas por estas cultivares não apresentam efeito de controle satisfatório sobre a espécie, indicando que as populações de Mato Grosso apresentam resis-



**Gráfico 1.** Porcentual de lagartas de *S. frugiperda* que completaram a fase larval alimentando-se com folhas de cultivares de algodoeiro Bt.

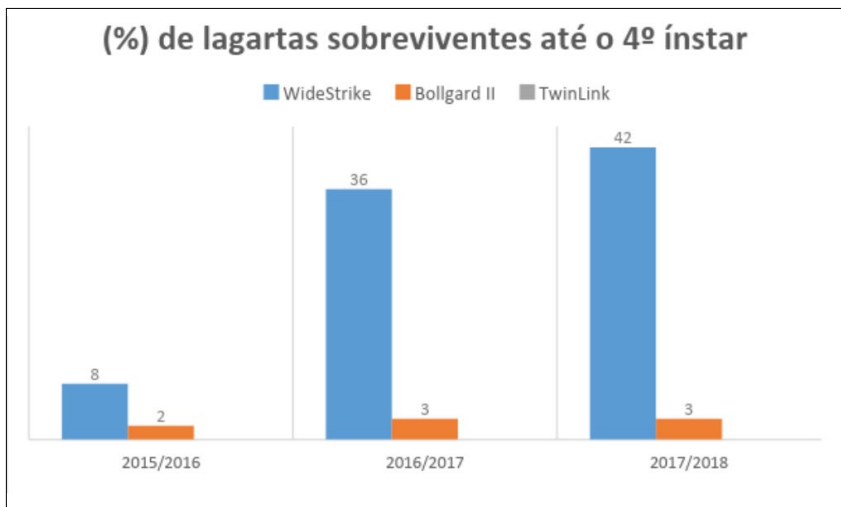
tência a essas proteínas.

Na safra 2014/2016 e 2015/2016, cerca de 65% das cultivares de algodão semeadas no Estado de Mato Grosso eram da tecnologia WideStrike®; além disso, as cultivares de soja IPRO® (Cry1Ac) e alguns híbridos de milho expressam as mesmas proteínas, implicando em forte pressão de seleção sobre as populações do lepidóptero. Nas últimas safras, em lavouras comerciais de algodão, observaram-se grandes populações de *S. frugiperda* causando danos significativos em algodão WideStrike®, para as quais se fizeram necessárias inúmeras aplicações inseticidas para o controle da praga.

Nas cultivares de algodão TwinLink® (Cry1Ab + Cry2Ae), no primeiro ano da realização do bioteste, o percentual de sobrevivência de *S. frugiperda* foi de apenas 7%. Já nas safras seguintes, observou-se um pequeno crescimento desse índice, que passou a ser de 11%. Esses resultados refletem o que se tem observado em lavouras comerciais, nos primeiros anos de adoção das cultivares TwinLink®, ou seja, alta supressão de lagartas de *S. frugiperda* na qual não havia a necessidade da realização de aplicações de inseticidas para o controle dessa espécie. Já nas últimas safras, algumas áreas semeadas com essas cultivares necessitaram de aplicações adicionais de inseticida para o controle desta espécie, dando indícios do início da seleção de populações resistentes.

Para as cultivares Bollgard II® (Cry1Ac + Cry2Ab2), na safra 2015/2016 observou-se que o percentual de sobrevivência de *S. frugiperda* era de apenas 12%, sendo que, na safra 2016/2017, esse índice atingiu 16% e, na 2017/2018, foi para 57%, demonstrando uma possível seleção de populações resistentes à combinação de proteínas. Em lavouras comerciais, nas últimas safras, observou-se a necessidade da realização de aplicações adicionais de inseticida para o controle de *S. frugiperda* nessas cultivares, corroborando os resultados obtidos no bioteste.

A pressão de seleção exercida por essas proteínas no sistema ocorre de forma mais intensa, uma vez que a proteína inseticida Cry1Ac está presente em outras cultivares de algodão (Bollgard I® e WideStrike®) e nas cultivares de soja (IPRO®); a proteína Cry2Ab2 está presente em híbridos de milho (PowerCore® e VTPro®) que contam com grandes áreas plantadas em Mato Grosso. Tal pressão constante acelera a quebra da eficiência de controle das cultivares sobre essa praga.



**Gráfico 2.** Porcentual de lagartas de *H. armigera* que atingiram o 4º ínstar de desenvolvimento alimentando-se com folhas de cultivares de algodoeiro Bt

Para verificar o efeito de controle das cultivares de algodão Bt sobre *H. armigera*, foram realizados biotestes com a mesma metodologia utilizada para *S. frugiperda*. No primeiro ano da realização do biotestes (safra 2015/2016), 92% das lagartas morreram logo no primeiro ínstar ao alimentarem-se de folhas das cultivares de algodão WideStrike®. No entanto, 8% dessas lagartas desenvolveram-se até o quarto ínstar. Na safra seguinte, constatou-se que 36% das lagartas que se alimentaram de folhas dessa cultivar atingiram o quarto ínstar de desenvolvimento.

Para as cultivares Bollgard II® na safra 2015/2016, apenas 2% das lagartas que se alimentaram de folhas conseguiram atingir o quarto ínstar de desenvolvimento. Na safra seguinte, porém, esse índice subiu para 3%. Para as cultivares TwinLink®, em ambas as safras constatou-se 100% de mortalidade das lagartas, indicando que essa apresenta alta eficiência de controle de lagartas.

Importante salientar que nessas duas safras, para todas as cultivares testadas, nenhuma lagarta conseguiu completar a fase larval de desenvolvimento, ou seja, todas morreram antes de viarem pupas, mesmo aquelas que conseguiram atingir o quarto ínstar de desenvolvimento. Esse porcentual de lagartas que con-

seguem se desenvolver até o quarto ínstar indica o início de uma possível seleção de resistência, pois observou-se, ao longo de duas safras, que houve incremento na taxa de indivíduos mais tolerantes à quantidade de proteína expressa na planta.

Na safra 2017/2018, os trabalhos realizados para *H. armigera* demonstraram que os parâmetros observados para as cultivares Bollgard II® e TwinLink® mantiveram-se, demonstrando alta eficiência de controle dessas cultivares sobre lagartas de *H. armigera*. Já para a tecnologia WideStrike®, foi constatado que 42% das lagartas atingiram o quarto ínstar de desenvolvimento e, diferentemente do observado nos primeiros anos de estudo, 23% destas lagartas chegaram à fase de pupa e, conseqüentemente, à fase adulta, estando aptas para a reprodução.

Além dos dados obtidos pelos biotestes, na safra 2017/2018, Crosariol Netto *et al.* (2018b) constataram a presença de lagartas de *H. armigera* ocasionando danos significativos a talhões de algodoeiro WideStrike® no município de Campo Verde/MT, o que indica uma possível presença de população resistente a essas proteínas inseticidas.

No atual cenário, o que se observa para *H. armigera* reflete o que já é observado para *S. frugiperda*, para a qual, inicialmente, constataram-se danos de forma mais intensa em cultivares comerciais lançadas havia mais tempo, como, por exemplo, WideStrike®, e, ao decorrer das safras, os danos foram surgindo de forma mais expressiva em cultivares com tecnologias mais recentes, como Bollgard II® e TwinLink®. Isso demonstra que, no atual sistema de cultivo adotado em Mato Grosso, há uma contínua pressão de seleção, o que contribui para a rápida perda de eficiência das proteínas inseticidas, impactando em custos adicionais por conta da necessidade de intervenções com inseticidas para o controle dessas espécies.

### **3.2 Custo e rentabilidade das tecnologias Bt**

As variedades de algodão são submetidas à Lei de Sementes, baseada na Convenção Internacional da União para a Proteção das Obtenções Vegetais (Upov) de proteção das cultivares, da qual o Brasil é signatário. A fim de preservar os direitos dos pequenos agricultores, essa legislação prevê que os agricultores têm o di-

reito de salvar sementes da sua lavoura e utilizá-las para proveito próprio. Isso é válido para qualquer tipo de variedade, protegida ou não junto ao Mapa-SNPC (Serviço Nacional de Proteção de Cultivares).

Porém, as variedades comerciais GM contêm tecnologias Bt que são protegidas pela Lei de Patentes, e não pela Lei de Cultivares. Assim sendo, nenhum agricultor tem a autorização de usá-las sem pagamento prévio de uma taxa estabelecida pelo detentor da patente; a taxa (*royalties*) é estabelecida pelo detentor com base em critérios próprios, muitas vezes sem negociação prévia com os produtores.

Assim, variedades transgênicas com tecnologias Bt ou de resistência a herbicidas, enquanto for válido o prazo de proteção da patente, são submetidas ao pagamento de *royalties* (tabela 2). Esses valores são estabelecidos pelas empresas detentoras em função de cada país.

Portanto, é de grande importância para o produtor conhecer o custo-benefício de cada tecnologia antes de definir a variedade que usará em sua lavoura.

**Tabela 2.** Valor de royalties cobrados para cada tecnologia no Brasil.

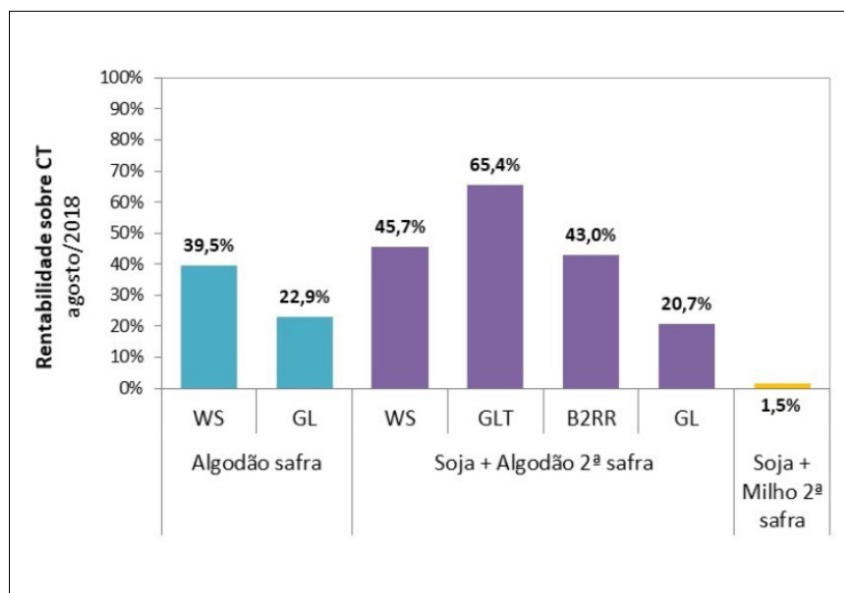
Tecnologia	Preço/hectare (em USD*)	Preço/saco (em USD*)
GlyTol LibertLink Twinlink (GLT)	240,00	408,00
Bollgard II RoundUp Ready Flex (B2RF)	240,00	408,00
WideStrike (WS)	145,00	223,07
GlyTol LibertLink (GL)	80,00	123,07
Liberty Link (LL)	40,00	53,33
RoundUp Ready Flex (RF)	80,00	123,07

\*USD = Dólar americano

## Estudos realizados pelo Cepea/Esalq

Estudo do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da Escola Superior de Agricultura “Luís de Queirós” (Cepea-Esalq), em colaboração com a Ampa (Cepea, 2018) (figura 2), sobre custos de produção e rentabilidade do cultivo (Alves *et al.*, 2015), realizado com base na metodologia dos painéis, apresenta estimativas de rentabilidade do cultivo em relação ao custo total (CT) para diversos sistemas de produção (safra e segunda safra) e diversas tecnologias (WS, GL, GLT, GLT, B2RF).

Os dados devem ser analisados com cautela quando se trata de comparar as biotecnologias. Geralmente, não representam exatamente uma diferença de rentabilidade entre as tecnologias, porque elas são “carregadas” por germoplasma diferente (variedades diferentes).



**Figura 2.** Rentabilidade sobre custo total (CT) do algodão safra e segunda safra para diversas tecnologias (Cepea, 2018).

Por exemplo, para o sistema de safra, sabe-se que as variedades FM 975WS e TMG 81WS são muito produtivas e estáveis, características que proporcionam vantagem no momento da escolha da cultivar pelo produtor, independentemente da tecnologia que ela carrega. A tecnologia GL, apesar de mostrar um custo de produção elevado (tabela 3), apresenta rentabilidade boa (20,7% a 22,9%) por conta da alta produtividade e da qualidade de fibra da cultivar GL do mercado.

Nesse mesmo estudo, é apresentada a avaliação do custo de produção em uma mesma região para diversas tecnologias (tabela 3).

Na região de Sorriso, todo o algodão é conduzido em sistema de segunda safra, após uma soja precoce. Nessa área, as variedades com tecnologias GLT<sup>®</sup> apresentam custo operacional e total significativamente inferior às variedades de tecnologias GL<sup>®</sup>, que, apesar de um custo de tecnologia inferior, precisam de um número maior de aplicação de inseticidas para controlar as pragas lepidópteras. Nessa tabela, o custo de fertilizante maior para a variedade GL<sup>®</sup> não se explica em relação à tecnologia, porém em relação às condições de manejo usadas nesse painel.



**Tabela 3.** Custos de produção na região de Sorriso, para diversas tecnologias (Cepea, 2018)

Itens	Sorriso		
	Alg. 2ª safra WS	Alg. 2ª safra GLT	Alg. 2ª safra GL
Fertilizantes	R\$ 1.225,08	R\$ 1.019,11	R\$ 1.631,95
Herbicidas	R\$ 434,36	R\$ 308,22	R\$ 705,41
Inseticidas	R\$ 1.169,11	R\$ 621,72	R\$ 1.840,11
Fungicidas	R\$ 298,55	R\$ 246,66	R\$ 369,86
DMR (Desf./Mat./Regulador)	R\$ 128,88	R\$ 245,85	R\$ 278,61
Outros químicos	R\$ 10,29	R\$ 14,45	R\$ 55,85
Semente	R\$ 545,40	R\$ 822,95	R\$ 422,34
Serviço terceirizado	R\$ 138,63	R\$ 144,69	R\$ 56,09
Diesel	R\$ 473,30	R\$ 474,86	R\$ 586,04
Manut. Maq. e Equip.	R\$ 377,32	R\$ 401,36	R\$ 440,14
Frete	R\$ 0,63	R\$ -	R\$ 0,57
M. de Obra	R\$ 664,95	R\$ 385,39	R\$ 776,98
Armaz./Benef.	R\$ 651,50	R\$ 726,49	R\$ 885,45
Tributos de comercialização	R\$ 453,17	R\$ 511,98	R\$ 447,75
Seguro	R\$ 21,48	R\$ 22,81	R\$ 22,70
Assist. Técnica	R\$ 109,32	R\$ 93,71	R\$ 143,27
Financ. de capital de giro	R\$ 424,48	R\$ 366,86	R\$ 559,76
<b>Custo Operacional</b>	<b>R\$ 7.126,44</b>	<b>R\$ 6.407,11</b>	<b>R\$ 9.222,88</b>
<b>Custo Total</b>	<b>R\$ 7.971,24</b>	<b>R\$ 7.472,73</b>	<b>R\$ 9.992,77</b>

## Levantamentos realizados pelo IMAmt

Cada ano, o IMAmt realiza junto aos produtores, gerentes de fazendas e consultores, um levantamento sobre a percepção que eles têm a respeito dos custos de controle de pragas e plantas daninhas para as diversas tecnologias (tabelas 4 a 7). Esses dados “médios” traduzem a percepção das vantagens de cada tecnologia pelos produtores em relação ao controle de lepidópteros e plantas daninhas.

Esses trabalhos ajudam a entender a percepção dos utilizadores das biotecnologias em relação ao preço cobrado pelos detentores dos *traits* transgênicos presentes nas diversas variedades. Os levantamentos tomam em conta a pressão das pragas-alvo durante a safra, que pode ser muito diferente de uma safra para outra. Ao longo dos anos, a percepção é que as tecnologias B2RF e GLT apresentam maior retorno financeiro, apesar de serem tecnologias mais caras. Um elemento importante a ser levado em conta na análise dessas tabelas é o aumento, ao longo dos anos, da pressão de certas pragas, como *Spodoptera* spp., *Helicoverpa zea* e *H. armigera*, ainda controladas de maneira satisfatória pelas tecnologias B2RF e GLT.

Vale lembrar que a adoção de tecnologias Bt e de resistência a herbicidas por parte dos produtores não é só o reflexo de uma vantagem financeira em termo de rentabilidade da cultura; fatores como redução do uso de mão de obra na lavoura ou segurança para o controle de pragas de difícil controle durante a estação chuvosa podem ser determinantes no uso dessas tecnologias GM. Esses fatores podem explicar em parte o uso importante da tecnologia WS, ainda usada em 32% de Mato Grosso, mais propiciando economias limitadas em termo de controle de pragas e plantas daninhas. É importante salientar aqui que, se as tecnologias WS e GL ainda são muito utilizadas, isso se deve à grande qualidade do germoplasma que as carregam, à rusticidade e à alta produtividade para WS, e fibra de excelente qualidade no caso do GL, além de uso como refúgio em variedades Bt.

**Tabela 4.** Levantamento de custo de manejo de pragas e plantas daninhas, para variedades contendo 'tecnologia' - safra 2013-14.

Tecnologia	Custo Manejo de Pragas (USD/ha)	Custo Manejo de Plantas Daninhas (USD/ha)	Custo Royalties (USD/ha)	Custo Total Manejo (Pragas + Plantas daninhas+ Royalties) (USD/ha)	Economia de custo comparado com o Convencional (USD/ha)
Convencional	420	220	-	640	-
WideStrike (WS)	280	220	145	645	-5
Liberty Link (LL)	420	150	40	610	30
Bollgard II RoundUp Ready Flex (B2RF)	260	130	240	630	10
RoundUp Ready Flex (RF)	420	130	80	630	10
GlyTol LibertLink (GL)	420	140	80	640	0
GlyTol LibertLink Twinlink (GLT)	260	140	240	640	0

**Custo médio (USD/ha)** estimado\* para o manejo de pragas e plantas daninhas em unidades produtoras de algodão de Mato Grosso na safra 2013/2014

Obs.: manejo de plantas daninhas: com uso de pré e pós-emergente + custo de aplicação (USD 4/ha). Caso haja necessidade de capina na área com variedade convencional, o custo é acrescido entre USD 30-50/ha.

Obs.: manejo de pragas: considerando o controle de pragas (ALVO e NÃO ALVO) + custo de aplicação (USD 4/ha).

\*USD = Dólar americano

**Tabela 5.** Levantamento de custo de manejo de pragas e plantas daninhas, para variedades contendo 'tecnologia' - safra 2014-15.

Tecnologia	Custo Manejo de Pragas (USD/ha)	Custo Manejo de Plantas Daninhas (USD/ha)	Custo Royalties (USD/ha)	Custo Total Manejo (Pragas + Plantas daninhas+ Royalties) (USD/ha)		Economia de custo comparado com o Convencional (USD/ha)
Convencional	500	180	-	680		-
WideStrike (WS)	370	160	145	675		-5
Liberty Link (LL)	500	150	40	690		10
Bollgard II RoundUp Ready Flex (B2RF)	320	120	240	680		-
RoundUp Ready Flex (RF)	500	120	80	700		20
GlyToLibertLink (GL)	500	140	80	720		40
GlyToLibertLink Twinlink (GLT)	320	140	240	700		20

**Custo médio (USD/ha)** estimado\* para o manejo de pragas e plantas daninhas em unidades produtoras de algodão de Mato Grosso na safra 2014/2015.

Obs.: manejo de plantas daninhas: com uso de pré e pós-emergente + custo de aplicação (USD 4/ha). Caso haja necessidade de capina na área com variedade convencional, o custo é acrescido entre USD 30-50/ha.

Obs.: manejo de pragas: considerando o controle de pragas (ALVO e NÃO ALVO) + custo de aplicação (USD 4/ha).

**Outros custos:** custo Manejo Bicudo – USD 135 (já incluso no custo total de manejo de pragas na tabela acima), região de Sapezal, custo médio de USD 100.

\*USD = Dólar americano

**Tabela 6.** Levantamento de custo de manejo de pragas e plantas daninhas, para variedades contendo 'tecnologia' - safra 2015-16.

Tecnologia	Custo Manejo de Pragas (USD/ha)	Custo Manejo de Plantas Daninhas (USD/ha)	Custo Royalties (USD/ha)	Custo Total Manejo (Pragas + Plantas daninhas+ Royalties) (USD/ha)	Economia de custo comparado com o Convencional (USD/ha)
Convencional	500	180	-	680	-
WideStrike (WS)	370	160	145	675	-5
Liberty Link (LL)	500	150	40	690	10
Bollgard II RoundUp Ready Flex (B2RF)	320	120	240	680	-
RoundUp Ready Flex (RF)	500	120	80	700	20
GlyToL LibertLink (GL)	500	140	80	720	40
GlyToL LibertLink Twinlink (GLT)	320	140	240	700	20

**Custo médio (USD/ha)** estimado\* para o manejo de pragas e plantas daninhas em unidades produtoras de algodão de Mato Grosso na safra 2015/2016.

*Obs.: manejo de plantas daninhas: com uso de pré e pós-emergente + custo de aplicação (USD 4,5/ha por aplicação). Caso haja necessidade de capina na área com variedade convencional, o custo é acrescido entre USD 30-50/ha.*

*Obs.: manejo de pragas: considerando o controle de pragas (ALVO e NÃO ALVO) + custo de aplicação (USD 4,5/ha por aplicação).*

\*USD = Dólar americano

**Tabela 7.** Levantamento de custo de manejo de pragas e plantas daninhas, para variedades contendo 'tecnologia' - safra 2016-17

Tecnologia	Custo Manejo de Pragas (USD/ha)	Custo Manejo de Plantas Daninhas (USD/ha)	Custo Royalties (USD/ha)	Custo Total Manejo (Pragas + Plantas daninhas+ Royalties) (USD/ha)	Economia de custo comparado com o Convencional (USD/ha)
Convencional	500	180	-	680	-
WideStrike (WS)	370	160	145	675	-5
Liberty Link (LL)	500	150	40	690	10
Bollgard II RoundUp Ready Flex (B2RF)	320	120	240	680	-
RoundUp Ready Flex (RF)	500	120	80	700	20
GlyToLibertLink (GL)	500	140	80	720	40
GlyToLibertLink Twinlink (GLT)	320	140	240	700	20

**Custo médio (USD/ha)** estimado\* para o manejo de pragas e plantas daninhas em unidades produtoras de algodão de Mato Grosso na safra 2015/2016.

*Obs.: manejo de plantas daninhas: com uso de pré e pós-emergente + custo de aplicação (USD 4,5/ha por aplicação). Caso haja necessidade de capina na área com variedade convencional, o custo é acrescido entre USD 30-50/ha.*

*Obs.: manejo de pragas: considerando o controle de pragas (ALVO e NÃO ALVO) + custo de aplicação (USD 4,5/ha por aplicação).*

\*USD = Dólar americano

## Referências

ALVES, L. R. A.; BARROS, G. S. C.; OSAKI, M. Custo de produção e gestão operacional das fazendas. In: Belot, J.-L. (Ed). **Manual de boas práticas de manejo do algodoeiro em Mato Grosso**. IMAmt. Cuiabá/MT. 2015. p. 30-45.

AMPA. Base de dados - estatísticas sobre produtores de algodão de Mato Grosso. Associação dos produtores AMPA. **Inf. Interna**. Consultada em julho de 2018.

ARTICO, S.; LAMBRET-FROTTÉ, J.; NARDELI, S. M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ALVES-FERREIRA, M. Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, 32, 630-643, 2013.

ARTICO, S.; RIBEIRO-ALVES, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; DE MACEDO, L. L.; SILVEIRA, S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MARTINELLI, A. P.; ALVES-FERREIRA, M. Transcriptome analysis of *Gossypium hirsutum* flower buds infested by cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) larvae. **BMC Genomics**, 15, 854-878, 2014.

BARTZ, S.; MONNERAT, R. G. Caracterização bioquímica e molecular de isolados brasileiros de *Bacillus thuringiensis* contra *Anthonomus grandis*. In: PIBIC, 2003, Brasília. **Anais** do PIBIC, 2003.

BASSO, A. M. M.; ALMEIDA, F. F.; LEMOS, L. C.; MEDEIROS, R. G.; MIRANDA, V. J.; OLIVEIRA NETO, O. B.; COSTA, P. H. A.; PAULA, A. W. M.; EVANGELISTA, I. B. R.; LOURENÇO, I. T.; OLIVEIRA, R. S.; ROCHA, T. L.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transformation of the SLL 705 cotton cultivar by biolistic. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Armação de Búzios. **Resumos** do II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009.

BATISTA, V. G. L.; PINHEIRO, M. P. N.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M. Estabelecimento de protocolo para extração de RNA de botão floral de algodoeiro. In: Encontro de produção científica da Embrapa Algodão, 2008, Campina Grande. **Anais** Encontro de produção científica da Embrapa Algodão. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. p. 35-35.

\_\_\_\_\_; LIMA, L. M.; SANTOS, R. C.; PINHEIRO, M. P. N.; BARROS, T. F. S. Análise in silico de sequências nucleotídicas de botão floral de algodoeiro geradas a partir de uma biblioteca substrativa de cDNA. in: Encontro de produção científica da Embrapa Algodão, 2009, Campina Grande. **Anais** Encontro de produção científica da Embrapa Algodão. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009. p. 22-22.

\_\_\_\_\_; PINHEIRO, M. P.; PINTO, F. S. L.; SANTOS, R. C. Estudo da expressão de genes relacionados ao botão floral do algodoeiro por meio de rt-PCR semiquantitativa. In: V Congresso Brasileiro de Mamona / II Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas & I Fórum Capixaba de Pinhão Manso, 2012, Guarapari - ES. Congresso Brasileiro de Mamona, 5; Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 2 & I Fórum Capixaba de Pinhão Manso, 2012, Guarapari. Desafios e Oportunidades: **Anais**, 2012. p. 35-35.

\_\_\_\_\_; PINHEIRO, M. P. N.; PORTO, M. S.; ROCHA, G. M. G.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C.; LIMA, L. M. Expressão tempo-espacial de genes presentes em botões florais de algodoeiro. In: VI Congresso Brasileiro de Mamona, 2014, Fortaleza. Energia e Segurança Alimentar na Agricultura Familiar, **Anais**, 2014. p. 17.

BELOT, J.-L.; BARROS, E. M.; MIRANDA, J. E. Riscos e oportunidades: o bicudo-do-algodoeiro. In: Ampa, Aprosoja e Embrapa (Edts): **Desafios do cerrado- Como sustentar a expansão da produção com produtividade e competitividade**. 2016. Cuiabá. Brasil. p. 77-118.

CALDERON, L. A.; TELES, R. C.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MEDRANO, F. J.; FREITAS, S. M. Purification of a 6.5 kDa protease inhibitor from amazon *Inga umbratica* seeds effective against serine proteases of the boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Protein and Peptide Letters**, USA, 12, 6, 583-587, 2005.

CARVALHO, J. M. F.; MEDEIROS, M. J. L.; SILVA, M. M. A.; SOUZA, D. M.; SANTOS, R. C. Estabelecimento de células embriogênicas para regeneração do algodoeiro. In: VI Congresso Brasileiro do Algodão, 2007, Uberlândia. **Resumos** do VI Congresso Brasileiro do Algodão. Campinas: Esphera, 2007b.

CEPEA. **Informativo Cepea**, Junho de 2018. Doc. Interno AMPA.

CROSARIOL NETTO, J.; ROLIM, G. G.; MICHELOTTO, M. D. Situação da lagarta-do-cartucho no estado de Mato Grosso. IMAmt. **Circular Técnica**, 34, 7p., 2018a.

\_\_\_\_\_; ROLIM, G.G.; SCOZ, L.; MARTINS, E., S.; PITTA, R.M.; VIANA, D.L. *Helicoverpa armigera*: ameaça a lavouras Bt de algodoeiro. IMAmt. **Circular Técnica**, 35, 8p., 2018b.

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biotecnologia. **Parecer Técnico nº 513/2005** - Liberação Comercial de Algodão Geneticamente Modificado resistente a Insetos Evento 531 - Processo 01200.001471/2003-01. 2005. Acesso em setembro 2018.



DIAS, S.; SÁ, M. F. G.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MONNERAT, R. G. Metodologia de bioensaio utilizando *Bacillus thuringiensis* contra o bicudo do algodoeiro. In: Talento Estudantil Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999, Brasília. **Anais** do Talento Estudantil Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999.

\_\_\_\_\_; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MONNERAT, R. G. Desenvolvimento de metodologia de bioensaio utilizando *Bacillus thuringiensis* contra o bicudo do algodoeiro. **Comunicado Técnico Embrapa**, Brasília, 42, 1-5, 2000.

DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; SILVA, F. B.; JAN Batista; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. A bifuncional inhibitor of rye (*Secale cereale*) with activity toward boll weevil (*Anthonomus grandis*). In: XXXII Reunião Annual da SBBq, 2003, Caxambu-MG. **Anais** XXXII Reunião Annual da SBBq, 2003. v. E-112. p.

\_\_\_\_\_; SILVA, M. C. M.; TEIXEIRA, F. R.; FIGUEIRA, E. L. Z.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; LIMA, L. A.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Investigation of insecticidal activity of rye  $\alpha$ -amylase inhibitor gene expressed in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 98, 39-44, 2010.

FIGUEIRA, E. L. Z.; SARTO, R. P.; SILVA, M. C. M.; MARANHÃO, A. Q.; BRIGIDO, M. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Selection for novel alpha-amylase Inhibitors activities against cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) by Phage Display. In: XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambu- MG. **Anais** da XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004. v. E-80.

FIRMINO, A. A. P.; FONSECA, F. C. A.; MACEDO, L. L. P.; COELHO, R. R.; ANTONINO DE SOUZA JR., J. D.; TOGAWA, R. C.; SILVA, O. B. Jr.; PAPPAS, G. J. Jr.; SILVA, M. C. M.; ENGLER, G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transcriptome analysis in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) and RNA Interference in Insect pests. **Plos One**, 8, e85079, 2013.

FRANCO, O.; SANTOS, R.; BATISTA, J.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, USA, 63, 3, 343-349, 2003.

\_\_\_\_\_; DIAS, S.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Effects of soybean kunitz trypsin inhibitor toward cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, 65, 1, 81-89, 2004.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases, structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, 269, 2, 397-412, 2002.

GOMES, A.; DIAS, S.; MELO, F.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; FRANCO, O. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **B, Biochemistry & Molecular Biology**, 140, 313-319, 2005.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CARVALHO, M. P.; MAGALHÃES, M. T. Q.; BATISTA, J.; SILVA, S. B.; FRAGOSO, R. R.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MONNERAT, R. G.; FIGUEIRA, E. L. Z. Molecular cloning of a new gene encoding a Cry protein effective towards cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. In: SIP 2004, 2004, Helsinki. Society for Invertebrate. 37th Annual Meeting, **Abstracts**, p. B26. 2004a.

\_\_\_\_\_; MAGALHÃES, M. T. Q.; BATISTA, J.; SILVA, S. M. B.; FRAGOSO, R. R.; OLIVEIRA NETO, O. B.; MONNERAT, R. G. Molecular cloning of a new crystal protein gene of a *Bacillus thuringiensis* strain highly effective against the cotton boll weevil. In: XXXIII Reunião Anual do SBBq, 2004, Caxambu/MG. **Anais** da XXXIII Reunião Anual da SBBq, v. H-37. 2004b.

\_\_\_\_\_; SILVA, M. C. M.; BRUNETTA, P. S. F.; FIGUEIRA, E. L. Z. Toxinas Cry e sua aplicação no controle do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). In: XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004, Gramado. **Anais** do XX Congresso Brasileiro de Entomologia, 2004c.

\_\_\_\_\_; SILVA, M. C. M.; DEL-SARTO, R. P.; COUTINHO, M. V.; FIGUEIRA, E. L. Z. Screening of shuffled alpha-amylase inhibitors to cotton boll weevil alpha-amylases. In: SIP 2004, Helsinki. Society for Invertebrate 37th Annual Meeting, **Abstracts**, p. MC18. 2004d.

\_\_\_\_\_; QUEZADO, M.; SILVA, M. S.; DIAS, S. C.; NAKASU, E. Y.; BRUNETTA, P. S. F.; OLIVEIRA, G. R.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z.; SIQUEIRA, H. A.; FIGUEIRA, E. L. Z. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a Cry11a-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 40, 773-782, 2007.

LIMA, L. M.; PINHEIRO, M. P.; BATISTA, V. G. L.; SOUZA, C. C. F.; SANTOS, R. C. Análise in silico do gene MADS isolado a partir de botão floral de algodoeiro. In: XII Congresso Brasileiro do Algodão, 2009, Foz de Iguaçu. XII Congresso Brasileiro do Algodão, **Anais**, 2009. p. 197-201. 2009a.

\_\_\_\_\_; SOUZA, C. C. F.; PINHEIRO, M. P.; SILVA, C. R. C.; BATISTA, V. G. L.; SANTOS, M. M. S.; DUARTE NETO, J. M. W.; SANTOS, R. C. Análise molecular de plantas de algodão BRS Araçá submetidas a transformação via ovary-drip. In: XII Congresso Brasileiro do Algodão, 2009. XII Congresso Brasileiro do Algodão, **Anais**, 2009. p. 256-261. 2009b.

LOURENÇO, I. T.; BASSO, A. M. M.; MIRANDA, V. J.; OLIVEIRA NETO, O. B.; PAULA, A. W. M.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, M. C. M.; FRAGOSO, R. R.; ROCHA, T. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transformation of SLL705 cotton cultivar by biolistics aiming for resistance to cotton boll weevil. In: International Cotton Genome Initiative, 2010, Austrália. **Proceedings** of International Cotton Genome Initiative, 2010. p. 88.

MARTINS, E.; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; MONNERAT, R. G. Desenvolvimento de metodologia de bioensaio de dose contra a bicudo-do-algodoeiro. **Comunicado Técnico** da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 108, 8, 2004.

\_\_\_\_\_; PRAÇA, L.; MONNERAT, R. G. Caracterização bioquímica, molecular e morfológica de estirpes de *Bacillus thuringiensis* eficazes contra o bicudo do algodoeiro. In: Talento estudantil, 2002, Brasília. **Anais** do Talento estudantil. Brasília: Embrapa, 2002a.

\_\_\_\_\_; PRAÇA, L.; MONNERAT, R. G. Characterization of strains of *Bacillus thuringiensis* effective against boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843). In: XXXV Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, 2002, Foz do Iguaçu. **Proceedings** of XXXV Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, 2002. p. 86. 2002b.

\_\_\_\_\_; BONFIN, K.; PRAÇA, L. B.; MONNERAT, R. G. Identificação de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra o bicudo do algodoeiro. **Embrapa-Documentos**, Brasília - DF, 05, 2000. p. 77.

\_\_\_\_\_; SONE, E. H.; PRAÇA, L. B.; DUMAS, V. F.; WAGA, I. I.; GOMES, A. C. M. M.; MONNERAT, R. G. Estudo da atividade e caracterização bioquímica e molecular de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1983). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 83, 1-19, 2005a.

\_\_\_\_\_; AGUIAR, R.; BATISTA, A. C.; MELATTI, V.; RIBEIRO, B.; MONNERAT, R. G. Estudo da atividade da proteína Cry1I expressa em células de inseto promissora para o controle do bicudo do algodoeiro e da lagarta do cartucho do milho. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), 92, 1-29, 2005b.

\_\_\_\_\_; PRAÇA, L.; DUMAS, V.; SILVAWERNECK, J. O.; SONE, E.; WAGA, I.; BERRY, C.; MONNERAT, R. G. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil. **Biological Control**, 40, 65-68, 2007.

\_\_\_\_\_; AGUIAR, R.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M.; MELATTI, V.; RIBEIRO, B.; MONNERAT, R. G. Recombinant cry11a protein is highly toxic to cotton boll weevil *Anthonomus grandis*. **Journal of Applied Microbiology**, 104, 1363-1371, 2008.

MEDEIROS, M. J. L.; CARVALHO, J. M. F.; SILVA, M. M. A.; SANTOS, R. C. Embriogênese somática do algodão nas cultivares BRS Rubi e BRS Safira. In: Encontro de produção científica da Embrapa Algodão, 2007, Campina Grande. **Anais** Encontro de produção científica da Embrapa Algodão. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. p. 19.

MIRANDA, V. J.; BASSO, A. M. M.; OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA NETO, O. B.; PAULA, A. W. M.; COSTA, P. H. A.; LOURENCO, I. T.; COUTINHO, M. V.; ROCHA, T. L.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Cotton transformation by pollen-tube pathway with the BTCl and Tarine genes for resistance to coleoptera insect-pest. In: II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009, Armação de Búzios. **Resumos** do II Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2009. p. 89.

MONNERAT, R. G. Cry10Aa Protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in brazilian cotton crop fields. **Bt Research**, 3, 20-28, 2012.

\_\_\_\_\_. Parâmetros bionômicos do bicudo-do-algodoeiro criado em dieta artificial para realização de bioensaios. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 29, 1-12, 2002.

\_\_\_\_\_; DIAS, S.; OLIVEIRA NETO, O. B.; NOBRE, S. D. N.; SILVAWERNECK, J. O.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Criação massal do bicudo do algodoeiro em laboratório. **Comunicado Técnico Embrapa**, Brasília, 46, 1-4, 2000.

\_\_\_\_\_; MARTINS, E.; BOMFIM, K.; PRAÇA, L.; SILVAWERNECK, J. O. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra o bicudo do algodoeiro. In: VII Simpósio de Controle Biológico, 2001, Poços de Caldas. **Anais** do VII Simpósio de Controle Biológico, 2001.

\_\_\_\_\_; MARTINS, E. S.; SILVA, C. R. C.; LIMA, L. M.; ALBUQUERQUE, F. A.; SANTOS, R. C. Taxa de mortalidade de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de plantas transformadas (TO) de algodão contendo o gene cry11a. In: XII Congresso Brasileiro do Algodão, 2009. **Anais** do XII Congresso Brasileiro do Algodão, 2009. p. 299-304. 2009b.

\_\_\_\_\_; SANTOS, R. C. et. al. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. **Comunicado técnico**- Série Embrapa, Brasília-DF, 98, 1-4, 2003a.

\_\_\_\_\_; SANTOS, R. C. et al. Isolamento e caracterização de estirpes de *Bacillus thuringiensis* endofíticas de algodão. In: IV Congresso Nacional de Algodão, 2003, Goiania. **Anais** do IV Congresso Nacional de Algodão, 2003b.

\_\_\_\_\_; SOARES, C. M. S.; GOMES, A. C. M.; JONES, G.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microb. Biotechnol.**, 2, 1560-1562, 2009a.

NAKASU, E. Y.; FIRMINO, A. A. P.; DIAS, S. C.; ROCHA, T. L.; RAMOS, H. B. ; OLIVEIRA, G. R.; LUCENA, W.; CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Analysis of Cry8Ka5-binding proteins from *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) midgut. **Journal of Invertebrate Pathology** (Print), 104, 227-230, 2010.

NOBRE, S. D. N.; DIAS, S.; SUJII, E.; MONNERAT, R. G. Bionomy of the boll weevil reared on artificial diet. In: XXI International Congress of Entomology, 2000, Foz do Iguaçu. **Anais** do XXI International Congress of Entomology, 2000.

OLIVEIRA, G. R.; SILVA, M. C. M.; LUCENA, W. A.; NAKASU, E. Y. T.; FIRMINO, A. A. P.; BENEVENTI, M. A.; SOUZA, D. S. L. ; GOMES, J. E.; SOUZA, J.; RIGDEN, D. J.; RAMOS, H. B.; SOCCOL, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **BMC Biotechnology** (Online), 11, 85, 2011.

OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA NETO, O. B.; EVANGELISTA, I. B. R.; VIANA, A. A. B.; PAES, N. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Otimização da técnica de transformação de plantas de algodoeiro cv. BRS Cedro via tubo polínico. In: X Talento Estudantil, 2006, Brasília. **Livro de Resumo** dos Trabalhos do X Talento Estudantil, 2006. v. 1. p. 11.

\_\_\_\_\_; OLIVEIRA NETO, O. B. ; EVANGELISTA, I. B. R.; NI, W. C. ; SILVA, M. C. M.; FRAGOSO, R. R.; PAULA, A. ; PAES, N. S.; COSTA, P. H. A. ; LOURENCO, I.; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transformation of brazilian cotton varieties by pollen tube pathway aiming pest control. In: I Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 2007, Natal. **Resumos** do I Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas. Natal, 2007. p. 111.

OLIVEIRA NETO, O. B.; BATISTA, J.; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; FALCÃO, R.; FRAGOSO, R. R.; MELLO, L. V.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Molecular cloning of alpha-amylases from cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plant inhibitors: An approach to insect resistance. **Journal of Protein Chemistry**, 22, 1, 77-87, 2003.

\_\_\_\_\_; BATISTA, J.; RIGDEN, D. J.; FRAGOSO, R. R.; SILVA, R. O.; GOMES, E. A.; FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): Implications for design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, USA, 34, 9, 903-918, 2004a.

\_\_\_\_\_; EVANGELISTA, I. B. R.; OLIVEIRA, R. S.; VIANA, A. A. B.; PAES, N. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Transformação de plantas de algodoeiro via tubo polínico visando o controle de pragas. In: V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005, Salvador. **Anais do V Congresso Brasileiro de Algodão**, 2005a.

\_\_\_\_\_; EVANGELISTA, I. B. R.; OLIVEIRA, R. S.; VIANA, A. A. B.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Efeito da técnica de microinjeção no abortamento de maçã de algodoeiro cv. Coker 310. In: V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005, Salvador. **Anais do V Congresso Brasileiro de Algodão**, 2005b.

\_\_\_\_\_; EVANGELISTA, I. B. R.; OLIVEIRA, R. S.; VIANA, A. A. B.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Otimização da técnica de transformação de plantas de algodoeiro cv. Cedro via tubo polínico. In: V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005, Salvador. **Anais do V Congresso Brasileiro de Algodão**, 2005c.

\_\_\_\_\_; JAN BATISTA; RIGDEN, D. J.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Molecular cloning of a cysteine proteinases cDNA from cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 68, 6, 1235-1242, 2004b.

PINHEIRO, M. P. N.; ROCHA, P. D.; SANTOS, R. C.; VIDAL, M. S. Transformação de plantas com o gene reporter gus via tubo polínico. In: XVII Encontro de Genética do Nordeste, 2006, Recife. **Anais do XVII Encontro de Genética do Nordeste**, 2006a.

PINHEIRO, M. P.; SANTOS, R. C.; ARIEL, N. H. C.; VIDAL, M. S. Transformação de plantas via tubo polínico. In: Encontro de Produção Científica, 2006, Campina Grande. **Anais do I Encontro de Produção Científica**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006b.

PINHEIRO, M. P. N.; SANTOS, R. C.; FILHO, P. A. M.; LIMA, L. M.; SILVA, C. R. C. Influência de fitoreguladores na eficiência de transformação de algodão via tubo polínico. In: Encontro de produção científica da Embrapa Algodão, 2007, Campina Grande. **Anais** Encontro de produção científica da Embrapa Algodão. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. p. 41.

\_\_\_\_\_; BATISTA, V. G. L.; MARTINS, N. F.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C.; LIM, L. M. Prospecção de genes regulatórios e estruturais expressos em botão floral do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: V Congresso Brasileiro de Mamona / II Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas & I Fórum Capixaba de Pinhão Manso, 2012, Guarapari - ES. **Anais**, 2012. p. 41-41.

\_\_\_\_\_; SILVA, C. R. C.; ARAÚJO, J. A.; MELO FILHO, P. A.; LIMA, L. M.; SANTOS, R. C. Utilização de reguladores de crescimento para auxiliar na transferência de genes via tubo polínico em algodão. In: I Workshop Internacional em Biotecnologia, 2008, Recife. **Resumos** do I Workshop Internacional em Biotecnologia. Recife: Ed. Universitária UFPE, 2008. p. 413-414.

PRAÇA, L.; MARTINS, E.; BATISTA, A. C.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos da ordem Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39, 1, 11-16, 2004.

QUEIROZ, C. M.; LIMA, L. M.; SANTOS, R. C.; BATISTA, V. G. L.; PINHEIRO, M. P. N. Identificação e validação da expressão de genes relacionadas com botão floral de algodoeiro. In: Encontro de produção científica da Embrapa Algodão, 2010, Campina Grande. **Anais** Encontro de produção científica da Embrapa Algodão. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 19-19.

SANTOS, R.; MONNERAT, R. G.; GANDER, E. Mechanical damage in cotton buds caused by boll weevil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38, 11, 1351-1355, 2003c.

SANTOS, R. C.; MARCELLINO, L. H.; CABRAL, G. B.; GANDER, E. S. Transformation of *Gossypium hirsutum* by use of polycati. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, 28, n.2/3, 863-867, 2004c.

\_\_\_\_\_; CABRAL, G. B.; MARCELLINO, L. H.; GANDER, E. S. Transformação de algodão através do uso de polycation. In: V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005, Salvador. **Anais** do V Congresso Brasileiro de Algodão, 2005.

\_\_\_\_\_; SILVA, C. R. C.; LIMA, L. M.; MELO FILHO, P. A.; MARTINS, E. S.; RAMOS, A. R.; MONNERAT, R. G. Expressão do gene cry1ia em plantas T0 de algodão oriundas da cv. BRS Antares por meio da técnica de microinjeção no ovário. In: XII Congresso Brasileiro do Algodão, 2009. **Anais do XII Congresso Brasileiro do Algodão**, 2009. p. 168-175.

SILVA, C. R. C.; MONNERAT, R. G.; MELO FILHO, P. A.; MARTINS, E.; LIMA, L. M.; RAMOS, A. R.; SANTOS, R. C. Indexação via Dot-ELISA de plantas de algodão contendo o gene cry1la. In: VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2008, Recife. **Anais da VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE**, 2008a.

\_\_\_\_\_; MELO FILHO, P. A.; LIMA, L. M.; MONNERAT, R. G.; MARTINS, E. S.; LUCENA, W. A.; SANTOS, R. C. Inserção do gene cry1la no algodoeiro para controle de inseto via microinjeção. In: VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 2008, Recife. **Anais da VIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE**, 2008b.

\_\_\_\_\_; MELO FILHO, P. A.; LIMA, L. M.; MONNERAT, R. G.; MARTINS, E. S.; SANTOS, R. C. Análise molecular e de expressão em transgenes (T0) de algodão contendo o gene cry1ia. In: XII Congresso Brasileiro do Algodão, 2009, Foz de Iguaçu. **Anais do XII Congresso Brasileiro do Algodão**, 2009. p. 221-227.

\_\_\_\_\_; MONNERAT, R.; MARTINS, É. S.; LIMA, L. M.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Toxicidade e imunodeteção de eventos de algodão-cry1la resistentes ao bicudo do algodoeiro e a lagarta militar. In: XX Engene - Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande. Genética, Evolução e Melhoramento de Plantas, **Anais**, 2014. p. 97. 2014a.

\_\_\_\_\_; MONNERAT, R. G.; LIMA, L. M.; MARTINS, E. S.; PINHEIRO, M. P. N.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. Inserção e expressão de um cassete linear mínimo contendo o gene cry1la em algodoeiro via microinjeção. In: XX Engene - Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande. Genética, Evolução e Melhoramento de Plantas, **Anais**, 2014. p. 98. 2014b.

SILVA, M. C. M.; SARTO, R. P.; LUCENA, W. A.; RIGDEN, D. J.; TEIXEIRA, F. R.; BEZERRA, C. A.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Employing in vitro directed molecular evolution for the selection of  $\alpha$ -amylase variant inhibitors with activity toward cotton boll weevil enzyme. **Journal of Biotechnology**, 167, 377-385, 2013.

SILVA, S. B.; SILVAWERNECK, J. O.; FALCAO, R.; OLIVEIRA NETO, O. B.; SÁ, M. F. G.; BRAVO, A.; MONNERAT, R. G. Characterization of novel Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda* and other insect pests. **Journal of Applied Entomology**, 128, 1-6, 2004.



TEIXEIRA CORRÊA, R. F.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; MONNERAT, R. G.; RIBEIRO, B. M.; BRAVO, A. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis*  $\delta$ -Endotoxins towards Insect and Mammalian Cells. **Plos One**, 7, e46121, 2012.

TREITLER, A. M. C.; SILVA, A. J. R.; GOMES, R. B.; DUARTE, D. V.; SILVA, V. L.; BERNARDO, F. A. A. F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; BLOCH, J. R. C.; CAMARGO, J. T.; MELO, F. R. Studies of inhibitors from *Cardiopetalum calophyllum* seeds (Embira) activities against *Anthonomus grandis* (Cotton Boll Weevil) and *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm)  $\alpha$  amylases and proteinases. In: XXXIII Reunião Anual da SBBq, 2004, Caxambu-MG. **Anais da XXXIII Reunião Anual da SBBq**, 2004. v. E-10.

VIANA, A. A. B.; FRAGOSO, R. R.; GUIMARÃES, L. M.; PONTES, N.; OLIVEIRA NETO, O. B.; ARTICO, S.; NARDELI, S. M.; ALVES-FERREIRA, M.; BATISTA, J.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Isolation and functional characterization of a cotton ubiquitination-related promoter and 5'UTR that drives high levels of expression in root and flower tissues. **BMC Biotechnology**, 11, 115, 2011.

VIDAL, M. S. Transformação de genótipos de algodão com genes que sintetizam inibidores de proteases. Coordenadora do Projeto- Financiamento FACUAL. **Relatório Final**. Facual-Fundaper-Embrapa. 32pp. Nov. 2004.