

Relação entre toxicidade de proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a receptores intestinais de lepidópteros-praga

Suzana Cristina Marucci⁽¹⁾, Camila Soares Figueiredo⁽¹⁾, Renata Izabel Dozzi Tezza⁽²⁾,
Eliane Cristina da Cunha Alves⁽¹⁾, Manoel Victor Franco Lemos⁽¹⁾ e Janete Aparecida Desidério⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, Rodovia Prof. Paulo Donato Castellane, s/nº, Zona Rural, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: suzy_marucci@yahoo.com.br, camila_sfigueiredo@hotmail.com, eliane@fcav.unesp.br, mvictor@fcav.unesp.br, janete@fcav.unesp.br

⁽²⁾Unesp, Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica, CEP 14884-900 Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: renata25@fcav.unesp.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de novas proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA) do intestino de lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Heliothis virescens*. Proteínas expressas pelos genes *vip3Aa42* e *vip3Aa43* mostraram-se tóxicas a *S. frugiperda* (CL₅₀ de 78,2 e 113 ng cm⁻², respectivamente) e *A. gemmatalis* (CL₅₀ de 239,2 e 57,5 ng cm⁻², respectivamente), e pouco tóxicas a *H. virescens* (CL₅₀>5.000 ng cm⁻²). Os ensaios de ligação às VMMA mostraram que as proteínas unem-se de forma efetiva aos receptores nas vesículas das espécies avaliadas, mas essa capacidade de ligação somente é efetiva na ativação da toxicidade para as populações avaliadas de *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*.

Termos para indexação: *Anticarsia gemmatalis*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*, manejo de resistência, proteína Cry, vesículas de membrana.

Relationship between toxicity of Vip3Aa proteins and their binding capacity to intestine receptors of lepidopteran pests

Abstract – The objective of this work was to evaluate the toxicity of new Vip3Aa proteins and their binding capacity to brush-border membrane vesicles (BBMV) in the intestine of *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis*, and *Heliothis virescens* neonate larvae. The proteins expressed by the genes *vip3Aa42* and *vip3Aa43* showed toxicity to *S. frugiperda* (LC₅₀ of 78.2 and 113 ng cm⁻², respectively) and *A. gemmatalis* (LC₅₀ of 239.2 and 57.5 ng cm⁻², respectively), but they showed low toxicity to *H. virescens* (LC₅₀>5,000 ng cm⁻²). BBMV binding assays showed that the proteins bind effectively to the receptors on vesicles of the evaluated species, but this binding capacity is only effective on the activation of toxicity to the evaluated populations of *S. frugiperda* and *A. gemmatalis*.

Index terms: *Anticarsia gemmatalis*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*, management of resistance, Cry proteins, membrane vesicles.

Introdução

A bactéria *Bacillus thuringiensis* tem sido utilizada na proteção das lavouras (Raymond et al., 2010) como alternativa ao uso de agrotóxicos. Ela é encontrada naturalmente no solo e, durante sua fase de esporulação, produz diferentes δ -endotoxinas, ou proteínas Cry, tóxicas a insetos de diversas ordens, inclusive lepidópteros, dípteros e coleópteros (Van Frankenhuyzen, 2009).

Embora ainda haja debate, de modo geral, aceita-se que as proteínas Cry são convertidas em fragmentos tóxicos pela ação de enzimas digestivas nos insetos

suscetíveis e que, posteriormente, elas se ligam a receptores específicos na borda da membrana epitelial no intestino, o que gera lesões capazes de destruir as células e matar o inseto (Vachon et al., 2012).

As proteínas Cry são eficientes no controle de insetos-praga; no entanto, estudos recentes sugerem que muitas pragas tenham evoluído com resistência a estas toxinas, como: *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae), que tem apresentado resistência à proteína Cry1Ac expressa em algodão, nos EUA (Tabashnik et al., 2008); *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), com resistência à proteína Cry1F expressa

em milho, em Porto Rico e no Brasil (Storer et al., 2010); e *Pectinophora gossypiella* (Saunders, 1844) (Lepidoptera: Gelechiidae), resistente à proteína Cry1Ac expressa em algodão, na Índia (Duhrua & Gujar, 2011). Esses casos de evolução de resistência geram grande preocupação, uma vez que colocam em risco uma tecnologia recente e promissora, como a do uso de plantas Bt (Ferré & Van Rie, 2002; Tabashnik et al., 2008).

As proteínas Vip3Aa, também produzidas pela bactéria *B. thuringiensis*, são uma alternativa promissora no manejo da resistência, em razão de sua toxicidade a insetos da ordem Lepidoptera, inclusive *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda*, *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) e *H. zea*, alguns dos quais com baixa suscetibilidade à proteína Cry (Estruch et al., 1996).

Pouco se sabe quanto ao modo de ação das proteínas Vip, além de que elas atuam por meio da formação de poros nas células epiteliais do intestino médio. Essas proteínas são ingeridas como protoxinas e processadas em toxinas pelas proteases do intestino do inseto, que se ligam a receptores específicos e causam a lise das células do intestino médio (Lee et al., 2003).

A interação proteína-receptor é necessária para que ocorra a toxicidade das proteínas (Hofmann et al., 1988), embora por si só isto não seja suficiente (Wolfersberger, 1990). Há evidências de que as proteínas Vip3Aa ligam-se a receptores diferentes dos das proteínas Cry1, na membrana epitelial do intestino médio dos insetos-praga (Sena et al., 2009; Hamadou-Charfi et al., 2013). Esta é uma informação relevante para o manejo da resistência, uma vez que alterações que diminuem a ligação das proteínas com os receptores estão associadas a elevados níveis de resistência às toxinas Cry (Ferré & Van Rie, 2002). As diferentes propriedades de ligação entre proteínas Vip e Cry sugerem que elas podem ser usadas em conjunto ou em rotação no controle de pragas. Nesse sentido, é importante a análise de toxicidade e ligação de diferentes proteínas Vip3Aa, em diferentes espécies de lepidópteros.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de novas proteínas Vip3Aa e sua capacidade de ligação a vesículas de membrana da microvilosidade

apical (VMMA) do intestino de larvas neonatas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

Material e Métodos

As linhagens bacterianas de *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 e *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, usadas no presente estudo, provieram do Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, Ohio (EUA). Essas linhagens são mantidas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA), da Unesp, em Jaboticabal, SP. A primeira linhagem é considerada, atualmente, um padrão para o gene *vip3Aa*, além de possuir também o gene *vip3Aa8* – acesso número AF399667 GenBank (2014b), identificado por Loguercio et al. (2002). A segunda linhagem é considerada padrão para vários genes *cry1A* e *cry2*, além de também possuir o gene *vip3Aa33* – acesso número GU073128 GenBank (2014a), cuja sequência foi submetida por Sauka et al. (2012).

As linhagens de Bt foram cultivadas em placas de Petri, em meio de cultura "brain heart infusion", BHI, (HiMedia, Mumbai, India) que continha 200 g de infusão de cérebro de bezerro, 10 g de protease peptona, 5 g de cloreto de sódio, 250 g de infusão de coração bovino, 2 g de dextrose, 2,5 g de fosfato dissódico, H₂O q.s.p 1.000 mL, pH 7,4±0,2, adicionado de ágar, a 30°C, por 16 horas. As colônias isoladas foram inoculadas em 2 mL de meio BHI líquido e mantidas a 30°C, sob agitação de 200 rpm por 16 horas.

O DNA das linhagens foi extraído pelo método de fervura (Letowski et al., 2005) e submetido à amplificação do gene *vip3Aa* com os oligonucleotídeos Vip5 e Vip6, descritos por Loguercio et al. (2002) (Tabela 1). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em volume total de 25 µL, com: 150 ng de DNA; 1 U de enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP), 1 X High Fidelity PCR Buffer (Invitrogen); 1,5 mmol L⁻¹ de MgSO₄, 0,5 pmol de cada oligonucleotídeo; 0,16 mmol L⁻¹ de dNTP, e água destilada deionizada estéril (q.s.p. 25 µL). Utilizaram-se as seguintes temperaturas e tempos de incubação: 94°C, 2 min; 30 ciclos de 94°C, 1 min; 53°C, 1 min; 68°C, 2 min; 68°C, 5 min; e 4°C, até a utilização da amostra.

Os genes *vip3Aa* completos foram inseridos no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI, EUA), segundo

instruções do fabricante. Células de *Escherichia coli* DH10B foram usadas para a transformação por choque térmico e selecionadas em placas com meio LB-ágar, suplementado com ampicilina a 100 µg mL⁻¹ (Sambrook & Russell, 2001). Os clones transformantes foram selecionados e confirmados por PCR, por meio da amplificação do fragmento de interesse com os oligonucleotídeos T7 e SP6 do vetor de clonagem.

Os clones foram sequenciados com o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Para obtenção da sequência completa do gene, utilizou-se a estratégia “primer walking”, com anelamento de iniciadores específicos ao longo do gene (Tabela 1).

A sequência consenso do gene foi gerada com uso das ferramentas Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998) e comparada à de outros genes *vip3A*, por meio do programa "basic local alignment search tool" (BLAST), por meio do algoritmo BLASTx, a partir do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI). As sequências foram enviadas ao Comitê *Bacillus thuringiensis* Toxin Gene Nomenclature (Crickmore et al., 2014) para a classificação dos genes.

Para avaliação da expressão heteróloga, os genes *vip3Aa* foram subclonados em vetor pET SUMO “Champion pET SUMO Expression System” (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Células de *E. coli* BL21(DE3) One Shot (Invitrogen) foram utilizadas para a transformação, pelo método de choque térmico, e selecionadas em LB, com canamicina (50 µg mL⁻¹). Os clones

transformantes foram selecionados e confirmados por PCR pela amplificação dos genes de interesse.

Para a indução dos genes *vip3Aa*, realizou-se o cultivo dos clones em LB-ágar suplementado com canamicina (50 µg mL⁻¹). Para isso, utilizaram-se 12 µL da cultura dos clones, em células de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot, asépticamente estocadas em glicerol (30%) estéril, e armazenadas em ultra-freezer a -80°C. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Em seguida, preparou-se um pré-inóculo, em 10 mL de meio LB e canamicina (50 µg mL⁻¹), a partir de uma colônia isolada do clone, e a cultura foi incubada a 37°C e agitada a 250 rpm, por 16 horas.

Após esse período, 4 mL do pré-inóculo foram transferidos para 400 mL de LB com canamicina (50 µg mL⁻¹), e a cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 rpm, até que a densidade óptica a 600 nm estivesse entre 0,5 e 0,8. Em seguida, as culturas foram induzidas pela adição de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo), à concentração final de 0,4 mmol L⁻¹, e mantidas a 22°C sob agitação de 200 rpm por 5 horas.

Para extração das proteínas, as células foram coletadas por centrifugação, por 30 min, a 17.400 g, e os sedimentos obtidos (“pellets”) foram mantidos em gelo. Para o início da lise celular, adicionaram-se 20 mL de tampão de lise (50 mmol L⁻¹ fosfato de potássio, pH 7,8, 400 mmol L⁻¹ NaCl, 100 mmol L⁻¹ KCl, 10% glicerol, 0,5% Triton X-100, e 10 mmol L⁻¹ imidazol) aos sedimentos bacterianos, que foram então ressuspensos por agitação vigorosa em aparelho do tipo “vortex”. Adicionaram-se 600 µL de lisozima (100 mg mL⁻¹), 200 µL de DNase I (1 mg mL⁻¹) e 20 µL de PMSF (fenilmetanosulfonilfluoreto) a 0,1 mol L⁻¹ e,

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes *vip3Aa* das linhagens de *Bacillus thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 e *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1.

Iniciador ⁽¹⁾	Sequência ⁽²⁾	Posição nos genes
Vip5	5' <u>ATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGC</u> 3' (d)	1–27
Vip6	5' <u>GATCTTACTTAATAGAGACAT</u> 3' (r)	2.370–2.353
A1	5' <u>CTCTATGTTGAGTGATGTAATG</u> 3' (d)	367–388
A2	5' <u>TCCGACCTCACTGCCACTTG</u> 3' (r)	808–789
A3	5' <u>CCTCCCTACACTTTCTAATAC</u> (d)	967–987
A4	5' <u>TAAGTGCTAATGATGATGG</u> 3' (d)	1.401–1.419
A5	5' <u>CTGGGCACAATAATTTAT</u> (r)	2.000–2.018
A6	5' <u>TGATCCCGTACTCGTCC</u> 3' (r)	2.070–2.054

⁽¹⁾Iniciadores Vip5 e Vip6, obtidos de Loguerio et al. (2002); e iniciadores A1–A6, obtidos no presente trabalho. ⁽²⁾Códons ATG e TTA sublinhados representam o códon de início e o códon de terminação, respectivamente; d, direto; r, reverso.

em seguida, as amostras foram incubadas sob agitação suave, a 37°C, por 30 min.

Para o total rompimento das células, as amostras foram mantidas em gelo e submetidas à sonicação, com intensidade média, por 60 s e intervalo de 15 s, tendo-se repetido o procedimento por três vezes. Em seguida, o material foi centrifugado a 17.400 g por 30 min, a 4°C, e o sobrenadante foi coletado. A expressão das proteínas foi analisada em gel de poli(acrilamida)-SDS 12%, conforme Laemmli (1970), e a concentração foi determinada por densitometria, tendo-se utilizado o programa ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), com soroalbumina bovina (BSA) como padrão. O lisado proteico foi usado nos bioensaios e na posterior purificação das proteínas Vip3Aa.

Nos bioensaios com as neonatas de *A. gemmatilis*, *S. frugiperda* e *H. virescens*, a estimativa das concentrações letais de 50 e 90% (CL_{50} e CL_{90}) foi feita com diferentes concentrações das protoxinas Vip3Aa42 e Vip3Aa43, diluídas em tampão de lise. Utilizaram-se as seguintes concentrações: 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 ng cm⁻² para *S. frugiperda* e *A. gemmatilis*. Para *H. virescens*, utilizaram-se as concentrações de 100, 500, 1.500, 2.000, 5.000 e 10.000 ng cm⁻². Essas concentrações foram definidas em bioensaios preliminares.

Para a criação das espécies avaliadas, utilizou-se a dieta artificial proposta por Greene et al. (1976). A dieta foi individualizada nas células de placas de poliestireno, com 128 poços de 2 cm², tendo-se utilizado 1 mL de dieta por poço (Bio-serv, Frenchtown, NJ, USA).

Os bioensaios consistiram de tratamentos da superfície da dieta com as proteínas Vip3Aa42 ou Vip3Aa43. Após a completa secagem da dieta, adicionaram-se 50 µL do lisado proteico em cada poço da placa. Dois controles negativos foram utilizados: dieta artificial tratada com 50 µL de extrato proteico de *E. coli* BL21 (DE3) One Shot; e dieta artificial tratada com 50 µL de tampão de lise.

As placas foram mantidas em fluxo laminar e, após a absorção do lisado proteico pela dieta, uma neonata foi infestada em cada célula com o auxílio de um pincel fino. As placas foram seladas com plásticos auto-adesivos (Bio-serv, Frenchtown, NJ, USA) e transferidas para uma sala climatizada a 26±2°C, com umidade relativa do ar de 70±10% e fotoperíodo de 14:10 horas (luz: escuro) (Marçon et al., 1999).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições por concentração e 16 neonatas por repetição. A mortalidade foi avaliada aos sete dias após a infestação. A CL_{50} e a CL_{90} foram calculadas por meio da análise de Probit (Finney, 1971), com uso do programa de estatística POLO-PC (LeOra Software, Berkeley, CA).

As proteínas Vip3Aa presentes nos lisados de *E. coli* foram purificadas em colunas His-Trap HP (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra), previamente carregadas com Ni²⁺. As colunas apresentam afinidade pela cauda de histidina (6xHis) presente nas proteínas recombinantes. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 20 mmol L⁻¹ de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, 0,5 mol L⁻¹ de NaCl e 50 mmol L⁻¹ de imidazol. O lisado proteico foi eluído com o mesmo tampão fosfato de sódio, com 300 mmol L⁻¹ de imidazol. Frações de 1 mL foram coletadas em microtubos e analisadas em gel de poli(acrilamida)-SDS 12%.

A concentração das proteínas purificadas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), tendo-se utilizado soroalbumina bovina (BSA) como padrão. As proteínas purificadas foram ativadas por proteólise, com uso da tripsina pancreática bovina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), à proporção de 1:10 (tripsina:protoxina), e incubadas sob agitação de 140 rpm, a 37°C por uma hora e 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 min, e os sobrenadantes foram analisados em gel de poli(acrilamida)-SDS 12%, para verificar a eficiência da digestão.

Para os ensaios de proteólise com suco intestinal, larvas de último instar das três espécies estudadas, mantidas em dieta artificial, foram imobilizadas em gelo por 5 min e dissecadas longitudinalmente para coletar a membrana peritrófica, juntamente com o bolo alimentar. Para cada amostra, cinco membranas peritróficas foram colocadas em microtubos, centrifugadas a 13.000 g por 20 min, e o sobrenadante foi coletado. A concentração proteica do suco intestinal foi obtida pelo método de Bradford, tendo-se utilizado uma proporção de 1:10 de suco intestinal:protoxina para a proteólise. A mistura foi incubada sob agitação de 140 rpm, a 37°C por uma hora e 30 minutos e, após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 min; os sobrenadantes foram analisados em gel de poli(acrilamida)-SDS 12%.

As toxinas purificadas e ativadas com tripsina foram quantificadas pelo método de Bradford e marcadas com biotina Amersham ECL Protein Biotinylation Module (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra). Adicionaram-se 40 µL de biotina para cada 1 mg de proteína. A mistura foi incubada sob agitação constante, em temperatura ambiente por uma hora. A proteína biotinizada foi, então, purificada em colunas PD10-Desalting (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia) e eluída com tampão PBS, pH 7,4.

Frações coletadas foram aplicadas em gel de poli(acrilamida)-SDS 9% e, posteriormente, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra). A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado por uma hora e, então, incubada com Streptavidin-AP Conjugate (Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, CA, EUA) na diluição de 1:2.000 por uma hora. A revelação foi realizada com o substrato BCIP/NBT Liquid Substrate System (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA).

Larvas de último instar, alimentadas em dieta artificial, foram imobilizadas em gelo por 5 min e dissecadas longitudinalmente. Os intestinos médios (1 mg) foram lavados em tampão MET (250 mmol L⁻¹ manitol, 17 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 5 mmol L⁻¹ EGTA, pH 7,5). As vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA) foram preparadas pelo método de precipitação diferencial de magnésio (Wolfersberger et al., 1987) e quantificadas pelo método de Bradford.

Os ensaios de ligação das proteínas às VMMA foram realizados conforme Abdelkefi-Mesrati et al. (2011), com modificações, e caracterizaram-se pela ligação das proteínas Vip3Aa às VMMA extraídas do intestino médio de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

Cada proteína biotinizada (100 ng) foi incubada com 10 µg de VMMA, em 100 µL de tampão PBS (pH 7,4), a 28°C por uma hora. As proteínas não ligadas às VMMA foram removidas por centrifugação a 13.000 g, por 15 min. As VMMA foram lavadas duas vezes em PBS, e ressuspendidas em 20 µL de PBS e 10 µL de tampão de amostra (0,125 mol L⁻¹ de Tris, pH 6,8, 4% de SDS, 0,004% de azul de bromofenol, 20% de glicerol e 10% de β-mercaptoetanol).

Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min e aplicadas em gel de poli(acrilamida)-SDS 9%.

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e a imunodeteção foram realizadas conforme já descrito (marcação das proteínas ativadas com biotina).

O ensaio de competição homóloga das proteínas pelas VMMA foi realizado conforme Abdelkefi-Mesrati et al. (2011), com modificações, e caracterizou-se pela ligação e competição das proteínas Vip3Aa aos receptores extraídos do intestino médio de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

A proteína biotinizada (100 ng) foi incubada com 10 µg de VMMA, em 100 µL de tampão PBS (pH 7,4), a 28°C por uma hora, na presença da mesma proteína tripsinizada não marcada com biotina, em excesso de 500, 1.000 e 2.000 vezes.

As proteínas não ligadas às VMMA foram removidas e analisadas da mesma forma descrita acima. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e a imunodeteção também foram realizadas conforme descrição prévia (marcação das proteínas ativadas com biotina).

Resultados e Discussão

Para cada linhagem de *B. thuringiensis* (HD125 e HD1), sequenciou-se um gene *vip3Aa*. As sequências de nucleotídeos com 2.370 pb, que codificaram 789 aminoácidos, foram submetidas ao banco de dados GenBank do NCBI.

A sequência proveniente da linhagem *B. thuringiensis* var. *tolworthi* HD125 recebeu o número de acesso HQ587048, no GenBank, e foi enviada ao Comitê *Bacillus thuringiensis* Toxin Gene Nomenclature (Crickmore et al., 2014), para classificação, onde recebeu a denominação de gene *vip3Aa42*. Verificou-se que a sequência de aminoácidos apresentou 99% de identidade com a sequência do gene *vip3Aa35* – número de identificação da proteína ADE06071.1 pelo GenBank (2014c), sequenciada a partir do isolado M190 de *B. thuringiensis*. Duas substituições de bases foram detectadas quando as sequências foram alinhadas com o algoritmo BLASTx, da ferramenta BLAST. As substituições de bases resultaram na substituição dos aminoácidos treonina (*vip3Aa35*) por alanina (*vip3Aa42*), no resíduo 484, e glicina (*vip3Aa35*) por ácido glutâmico (*vip3Aa42*), no resíduo 659.

As substituições dos aminoácidos evidencia a presença de uma nova proteína: Vip3Aa.

O gene *vip3Aa42* apresentou identidade de 98% com a sequência do gene *vip3Aa1* – número de identificação da proteína AAC37036.1 no GenBank (2014d), obtida por Estruch et al. (1996) a partir do isolado AB88. As substituições das bases resultaram na substituição de 12 aminoácidos: glutamina (*vip3Aa1*) por lisina (*vip3Aa42*), no resíduo 284; isoleucina (*vip3Aa1*) por valina (*vip3Aa42*), no resíduo 358; treonina (*vip3Aa1*) por alanina (*vip3Aa42*), no resíduo 484; serina (*vip3Aa1*) por lisina (*vip3Aa42*), no resíduo 536; asparagina (*vip3Aa1*) por treonina (*vip3Aa42*), no resíduo 633; glicina (*vip3Aa1*) por ácido glutâmico (*vip3Aa42*), no resíduo 659; metionina (*vip3Aa1*) por isoleucina (*vip3Aa42*), no resíduo 755; fenilalanina (*vip3Aa1*) por leucina (*vip3Aa42*), no resíduo 760; ácido glutâmico (*vip3Aa1*) por glicina (*vip3Aa42*), no resíduo 761; tirosina (*vip3Aa1*) por asparagina (*vip3Aa42*), no resíduo 776; histidina (*vip3Aa1*) por lisina (*vip3Aa42*), no resíduo 782; e tirosina (*vip3Aa1*) por serina (*vip3Aa42*), no resíduo 784.

A sequência proveniente da linhagem *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 recebeu o número de acesso HQ594534, no GenBank, e foi enviada ao Comitê *Bacillus thuringiensis* Toxin Gene Nomenclature (Crickmore et al., 2014), para classificação, onde recebeu a denominação de gene *vip3Aa43*. Verificou-se que a sequência de aminoácidos apresentou 100% de identidade com 13 sequências classificadas no GenBank-NCBI: Vip3Aa7 – AAK95326.1; Vip3Aa10 – AAN60738.1; Vip3Aa11 – AAR36859.1; Vip3Aa12 – AAM22456; Vip3Aa13 – AAL69542; Vip3Aa15 – AAP51131.1; Vip3Aa21 – ABD84410.1; Vip3Aa33 – GU073128; Vip3Aa34 – GU073129; Vip3Aa36 – GU951510; Vip3Aa37 – HM132041; Vip3Aa44 – HQ650163; e Vip3Aa55 – KJ868172.

Entre as sequências com 100% de identidade com o gene *vip3Aa43*, encontra-se o gene *vip3Aa33*, cuja sequência também foi obtida a partir da linhagem-padrão *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD1, em 2009 (Sauka et al., 2012).

A identidade de 100% com as 13 sequências depositadas evidencia a presença de alelos iguais aos da classe Vip3Aa (Crickmore et al., 1998), indício de que as proteínas expressas por estes genes apresentariam o mesmo efeito tóxico quando testadas em uma determinada população, uma vez que são as alterações

dos aminoácidos que podem ter efeitos significativos sobre a atividade inseticida e a especificidade, conforme observado por Shen et al. (2009).

O alinhamento entre as sequências de aminoácidos das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 mostrou uma identidade de 99% entre elas. Vinte e uma substituições de bases foram detectadas no alinhamento com o algoritmo BLASTx. Essas substituições de base resultaram na substituição de 11 aminoácidos: valina (*vip3Aa42*) por isoleucina (*vip3Aa43*), no resíduo 358; alanina (*vip3Aa42*) por treonina (*vip3Aa43*), no resíduo 484; lisina (*vip3Aa42*) por serina (*vip3Aa43*), no resíduo 536; treonina (*vip3Aa42*) por asparagina (*vip3Aa43*), no resíduo 633; ácido glutâmico (*vip3Aa42*) por glicina (*vip3Aa43*), no resíduo 659; isoleucina (*vip3Aa42*) por metionina (*vip3Aa43*), no resíduo 755; leucina (*vip3Aa42*) por fenilalanina (*vip3Aa43*), no resíduo 760; glicina (*vip3Aa42*) por ácido glutâmico (*vip3Aa43*), no resíduo 761; asparagina (*vip3Aa42*) por tirosina (*vip3Aa43*), no resíduo 776; lisina (*vip3Aa42*) por histidina (*vip3Aa43*), no resíduo 782; e serina (*vip3Aa42*) por tirosina (*vip3Aa43*), no resíduo 784.

A região N-terminal das proteínas Vip3 é altamente conservada; portanto, as diferenças entre as sequências de aminoácidos encontram-se principalmente na região C-terminal (Wu et al., 2007), e isso também é observado entre as sequências de aminoácidos das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43. A diversidade encontrada na família de proteínas Vip é atribuída a mutações que ampliam o espectro de ação inseticida sobre os insetos da ordem Lepidoptera (Wu et al., 2007).

Assim, embora as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 tenham apresentado alta identidade (99%) entre si, com substituição em apenas 11 aminoácidos, são necessárias análises de sua toxicidade e especificidade para larvas de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*, visto que alterações mínimas nas sequências de aminoácidos podem alterá-la, conforme observado com a proteína Vip3Aa (Liu et al., 2007; Shen et al., 2009).

Liu et al. (2007) mostraram que a proteína Vip3Aa19 possui identidade de 97% com a proteína Vip3Aa11, com diferenças em apenas 19 resíduos de aminoácidos; no entanto, a proteína Vip3Aa19 foi tóxica a *S. exigua*, *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae), mas foi pouco tóxica a *Ostrinia furnacalis* (Guenee, 1854) (Lepidoptera: Crambidae); enquanto a proteína Vip3Aa11 foi tóxica

a *S. exigua* e *H. armigera*, mas apresentou baixa toxicidade a *P. xylostella*.

Shen et al. (2009) realizaram estudos sobre as proteínas Vip3Aa26 e Vip3Aa27, que apresentam identidade de 99%, com diferença em apenas 11 resíduos de aminoácidos, e mostraram que a proteína Vip3Aa27 é altamente tóxica a *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *S. exigua* e *H. armigera*. Em contraste, a proteína Vip3Aa26 apresentou toxicidade apenas para *T. ni*, o que confirma que alterações mínimas nas sequências de aminoácidos podem alterar o espectro inseticida das proteínas Vip3Aa.

A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada pela presença de uma banda de 101,5 kDa, com 88,5 kDa da proteína Vip3Aa e 13 kDa referentes à fusão, na região N-terminal, de um peptídeo com cauda de 6 histidinas e uma proteína Sumo (Figura 1).

Nos bioensaios com os lisados proteicos realizados com *S. frugiperda*, a CL₅₀ estimada foi de 78,2 ng cm⁻², para Vip3Aa42, e de 113 ng cm⁻² para Vip3Aa43 (Tabela 2). Como houve sobreposição dos intervalos de confiança (IC), as proteínas foram consideradas igualmente tóxicas para a espécie. Figueiredo et al. (2013) realizaram ensaios com a proteína Vip3Aa50 e a mesma população de *S. frugiperda* e obtiveram CL₅₀ de 79,6 ng cm⁻². Caccia et al. (2014) relataram toxicidade da proteína Vip3Aa16 testada em neonatas de *S. frugiperda*, com CL₅₀ de 24 ng cm⁻². Tem-se observado que a proteína Vip3Aa é altamente tóxica a *S. frugiperda*, com toxicidade superior à das proteínas Cry1. Sena et al. (2009) relataram que a proteína Vip3Aa1 apresentou CL₅₀ de 49,3 ng cm⁻² para *S. frugiperda*; enquanto as proteínas Cry1Ab e Cry1Fa apresentaram CL₅₀ de 867 e 170 ng cm⁻², respectivamente. Ao analisar a suscetibilidade de 15 populações de campo de *S. frugiperda*, de diferentes regiões do Brasil, Bernardi et al. (2014) observaram que a proteína Vip3Aa20, introduzida em plantas de milho, apresentou toxicidade entre 92,38 e 611,56 ng cm⁻² a essa praga.

Para *A. gemmatalis*, as proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 apresentaram CL₅₀ de 239,2 e 57,5 ng cm⁻², respectivamente (Tabela 2). Esse resultado mostra que a proteína Vip3Aa43 é cerca de quatro vezes mais tóxica para essa espécie. Testes realizados por Figueiredo et al. (2013), com a proteína Vip3Aa50, também mostraram que neonatas de *A. gemmatalis*

são altamente suscetíveis às proteínas Vip3Aa, que causaram CL₅₀ de 20,3 ng cm⁻². Cialesi-Legori et al. (2014) relataram que as proteínas Vip3Aa, Vip3Ae e Vip3Af têm CL₅₀ de 5,4, 5,0 e 3,6 ng cm⁻² para essa espécie, respectivamente. Os autores também relataram alta suscetibilidade da espécie às proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca e Cry1Ea.

Pela análise da toxicidade das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43, pode-se concluir que a Vip3Aa42 é cerca de três vezes mais efetiva contra *S. frugiperda* do que contra *A. gemmatalis*, em termos de CL₅₀, mas igualmente efetiva em termos de CL₉₀. A proteína Vip3Aa43 foi igualmente efetiva contra *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, independentemente da concentração letal analisada (Tabela 2).

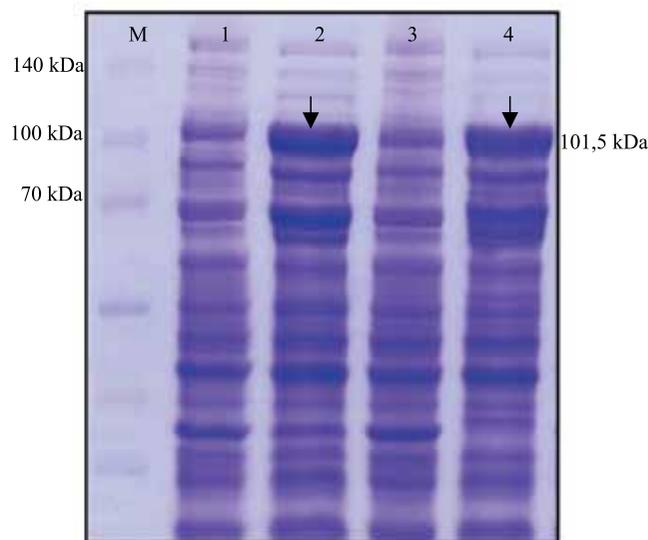


Figura 1. Análise de SDS-PAGE 12% das proteínas totais dos lisados proteicos de clones de *Escherichia coli* BL21(DE3), transformados com os genes *vip3Aa42* e *vip3Aa43*. Os genes foram clonados em vetor de expressão pET Sumo, e a expressão foi induzida. M, marcador de massa molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), em kDa; 1, gene *vip3Aa42* não induzido; 2, gene *vip3Aa42* induzido; 3, gene *vip3Aa43* não induzido; e 4, gene *vip3Aa43* induzido. As proteínas recombinantes possuem massa de 101,5 kDa (setas), da qual 88,5 kDa das proteínas Vip3Aa e 13 kDa referentes à fusão, na região N-terminal, de uma cauda com 6 histidinas e uma proteína Sumo, presentes no vetor pET Sumo.

As proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 apresentaram baixa toxicidade a *H. virescens*, uma vez que não foi possível obter a concentração letal, mesmo em concentrações acima de 5.000 ng cm⁻².

Lemes et al. (2014) testaram a toxicidade da proteína Vip3Aa para *H. virescens* e obtiveram CL₅₀ de 1.650 ng cm⁻², o que evidencia que esta lagarta de fato apresenta baixa suscetibilidade a proteínas Vip3Aa; no entanto, em comparação a Cry1Aa e Cry1Ca, a proteína Vip3Aa foi mais efetiva, pois, os autores relataram CL₅₀ estimadas de 3.500 e 3.100 ng cm⁻², respectivamente, para essas proteínas. Os autores relatam ainda que a proteína Cry1Ac, com CL₅₀ de 40 ng cm⁻², foi cerca de 41 vezes mais tóxica a *H. virescens* do que a Vip3Aa.

Diferenças entre as concentrações letais podem ocorrer também em razão de diferentes fases larvais avaliadas nos bioensaios, e de diferentes metodologias e populações. A diferença entre diferentes populações ocorre em razão da variabilidade genética natural das espécies (Bernardi et al., 2014).

Em relação à ativação proteolítica das proteínas Vip3Aa, que ocorreu pela proteólise de um fragmento com 101,5 kDa para um de aproximadamente 62 kDa, tanto com uso da tripsina pancreática bovina (Sigma-Aldrich) quanto do suco intestinal dos insetos (Figura 2). Essa ativação foi observada inclusive com o uso do suco intestinal de *H. virescens*, para a qual estas proteínas não foram tóxicas. Portanto, verifica-se que a etapa de ativação não foi a responsável pela ausência de toxicidade para o inseto. Esses resultados foram consoantes com os estudos de ativação da protoxina Vip3A realizados por Lee et al. (2003) com outras espécies de lagartas, e confirmaram que a primeira

etapa para a atividade inseticida das proteínas Vip3Aa ocorreu.

Observou-se ligação das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 às VMMA dos insetos testados (Figura 3). As proteínas Vip3Aa foram tóxicas a *S. frugiperda* e *A. gemmatalis*, mas não apresentaram toxicidade à população de *H. virescens* testada (Tabela 2). Contudo, houve a ligação de ambas as proteínas nos receptores presentes nas VMMA também desta última espécie, indício de que a ligação das proteínas aos receptores, apesar de ser um passo necessário para ativação da toxicidade, não é suficiente para garanti-la. O mesmo fato foi relatado por Chakroun & Ferré (2014), que observaram que a proteína Vip3Ad, embora não tenha sido tóxica a *S. frugiperda*, ligou-se aos receptores na VMMA.

No ensaio de competição homóloga entre as proteínas, observou-se que a ligação da proteína marcada diminuiu (redução da intensidade da banda), quando se utilizaram 1.000 vezes o excesso de proteína tripsinizada não marcada com biotina. A redução da ligação da proteína marcada tornou-se ainda mais evidente, quando se utilizaram 2.000 vezes o excesso de proteína tripsinizada não marcada, para todas as espécies estudadas. A redução da ligação da proteína marcada ocorre quando os receptores são imediatamente ocupados pelas proteínas não marcadas, utilizadas em excesso.

Análises de competições homólogas, realizadas por Abdelkefi-Mesrati et al. (2011) com a proteína Vip3Aa16, mostraram que esta proteína se liga de maneira específica aos receptores presentes nas VMMA de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833)

Tabela 2. Concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀)⁽¹⁾ das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43, em neonatas de *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Heliothis virescens*.

Proteína	N	Coeficiente angular±EP	CL ₅₀ CL ₉₀		Qui-quadrado	Graus de liberdade
			------(ng cm ⁻²)-----			
<i>Spodoptera frugiperda</i>						
Vip3Aa42	640	1,2±0,1	78,2 (51,2–128,6)	862,8 (401,6–3.563,1)	8,88	5
Vip3Aa43	512	1,3±0,1	113,0 (86,0–162,3)	977,4 (539,8–2.453,3)	3,84	4
<i>Anticarsia gemmatalis</i>						
Vip3Aa42	576	1,4 ± 0,1	239,2 (172,7–356,7)	1.725,2 (952,7–4.564,7)	6,74	5
Vip3Aa43	512	1,6 ± 0,1	57,5 (36,1–89,1)	338,0 (186,2–1.134,1)	8,62	4
<i>Heliothis virescens</i>						
Vip3Aa42	512	-	>5.000	-	-	-
Vip3Aa43	512	-	>5.000	-	-	-

⁽¹⁾Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança, com 95% de probabilidade. EP, erro-padrão da média.

(Lepidoptera: Noctuidae), visto que o aumento das quantidades de proteína não marcada (excessos de 50, 100, 400 e 1.000 vezes) reduziu significativamente a ligação da proteína marcada. Segundo Chakroun & Ferré (2014), a redução da ligação da proteína marcada, quando incubada com excesso de proteína não marcada, confirma que há um número limitado de receptores para Vip3Aa.

Aranda et al. (1996) descreveram que a proteína Cry1Ab interage de maneira inespecífica com os receptores nas VMMA de *S. frugiperda*, pois a ligação da toxina marcada não foi afetada pela presença do competidor homólogo em excesso de 300 vezes.

O resultado obtido no presente trabalho, portanto, é indicativo de que existe um grande número de receptores para as proteínas Vip3Aa presentes nas VMMA dos insetos testados, e que há necessidade de uma alta quantidade (2.000 vezes) de proteína homóloga não marcada, para saturar os sítios receptores, indício de que interações inespecíficas das proteínas Vip3Aa às VMMA de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens* podem ocorrer.

As proteínas Vip3Aa42 e Vip4Aa43 apresentam grande potencial de controle das espécies *S. frugiperda* e *A. gemmatalis* e podem ser utilizadas efetivamente em estratégias de manejo de resistência dessas pragas.

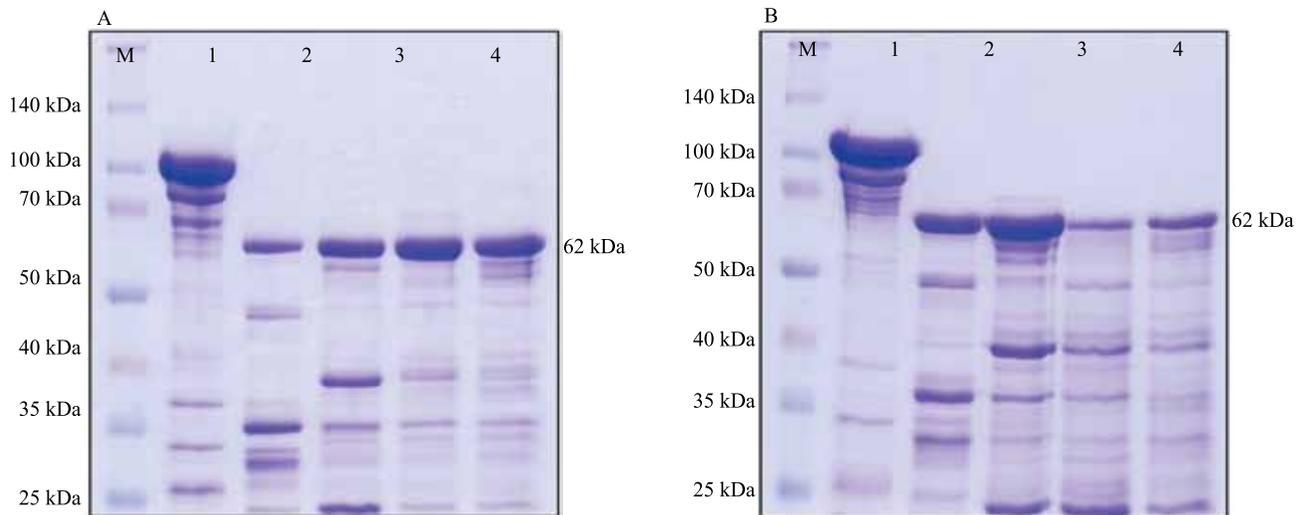


Figura 2. Análise de SDS-PAGE 12% das proteínas Vip3Aa42 (A) e Vip3Aa43 (B) ativadas. M, marcador de massa molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific), em kDa; 1, proteína purificada; 2, proteína ativada com tripsina pancreática bovina (Sigma- Aldrich); 3, proteína ativada com suco intestinal de *Spodoptera frugiperda*; 4, proteína ativada com suco intestinal de *Anticarsia gemmatalis*; e 5, proteína ativada com suco intestinal de *Heliothis virescens*.

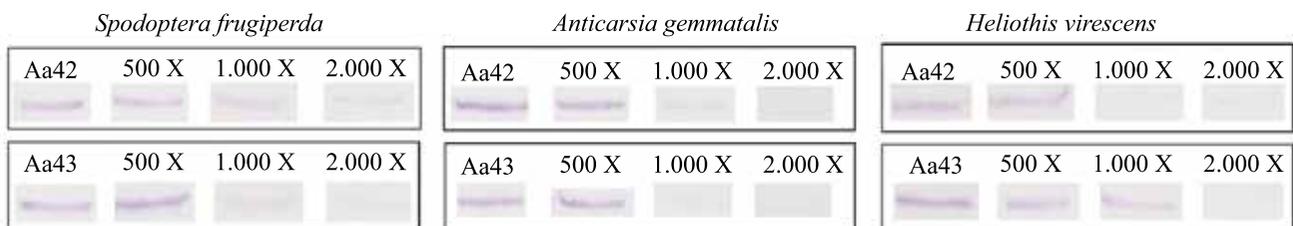


Figura 3. Ensaio de ligação e competição homóloga das proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 às vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMA) de *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Heliothis virescens*. Aa42, ligação da proteína Vip3Aa42, marcada com biotina, à VMMA; Aa43, ligação da proteína Vip3Aa43, marcada com biotina, à VMMA. Competição homóloga: 500X, 1.000X e 2.000X de proteína não marcada em excesso.

No Brasil, até o momento, existe apenas um evento transgênico de soja que expressa a proteína Cry1Ac combinada com a resistência à herbicida (BtRR2Y). Esse evento, apesar de eficiente no controle de *A. gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae), não é eficiente para o controle de espécies de *Spodoptera*, que apresentam tolerância natural à proteína Cry1Ac (Luttrell et al., 1999). Assim, um evento de soja piramidado que expressasse as proteínas Cry1Ac, juntamente com as proteínas Vip3Aa42 ou Vip3Aa43 poderia ser utilizado também para o controle de *S. frugiperda*, que é uma recente praga na cultura da soja no Brasil (Moreira & Aragão, 2009).

Além disso, os genes *vip3Aa42* e *vip3Aa43* poderiam ser introduzidos isoladamente, ou em conjunto com genes *cry*, em genótipos de milho, na busca por plantas resistentes a *S. frugiperda*. No Brasil, há vários eventos de milho-Bt aprovados que expressam diferentes proteínas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1F e Vip3Aa20); no entanto, *S. frugiperda* é capaz de evoluir resistência rapidamente, conforme o que se tem observado quanto à toxina Cry1F (Storer et al., 2010; Monnerat et al., 2015). Portanto, o uso das proteínas testadas no presente trabalho também poderia colaborar no manejo de resistência de *S. frugiperda* em milho.

Conclusões

1. Neonatas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* apresentam elevada suscetibilidade a Vip3Aa42 e Vip3Aa43, enquanto neonatas de *Heliothis virescens* não apresentam suscetibilidade a essas proteínas.

2. As proteínas Vip3Aa42 e Vip3Aa43 se ligam aos receptores presentes nas vesículas de membrana da microvilosidade apical (VMMAs) de *S. frugiperda*, *A. gemmatalis* e *H. virescens*.

3. A capacidade de ligação aos receptores nas VMMAs de *H. virescens* não garante toxicidade das proteínas à espécie.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pelo apoio financeiro; à Profa. Maria Inês Tiraboschi Ferro e ao Prof. Jesus Aparecido Ferro, Crebio (Centro de Recursos Biológico e Biologia Genômica) da Universidade Estadual Paulista

(Unesp), Campus Jaboticabal, pelo auxílio nas análises das sequências e disponibilização da infraestrutura de bioinformática; ao Prof. José Roberto Postalí Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos da Escola de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq-USP); e à SGS Gravena Ltda., pelo fornecimento dos insetos utilizados nos bioensaios.

Referências

- ABDELKEFI-MESRATI, L.; BOUKEDI, H.; DAMMAK-KARRAY, M.; SELAMI BOUDAWARA, T.; JAOUA, S.; TOUNSI, S. Study of the *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 histopathological effects and determination of its putative binding proteins in the midgut of *Spodoptera littoralis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, p.250-254, 2011. DOI: 10.1016/j.jip.2010.10.002.
- ARANDA, E.; SANCHEZ, J.; PEFEROEN, M.; GÜERECÁ, L.; BRAVO, A. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.68, p.203-212, 1996. DOI: 10.1006/jipa.1996.0087.
- BERNARDI, O.; AMADO, D.; SOUSA, R.S.; SEGATTI, F.; FATORETTO, J.; BURD, A.D.; OMOTO, C. Baseline susceptibility and monitoring of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Vip3Aa20 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, v.107, p.781-790, 2014. DOI: 10.1603/EC13374.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- CACCIA, S.; CHAKROUN, M.; VINOKUROV, K.; FERRÉ, J. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins by two *Spodoptera* species. **Journal of Insect Physiology**, v.67, p.76-84, 2014. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2014.06.008.
- CHAKROUN, M.; FERRÉ, J. In vivo and in vitro binding of Vip3Aa to *Spodoptera frugiperda* midgut and characterization of binding sites by ¹²⁵I radiolabeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.80, p.6258-6265, 2014. DOI: 10.1128/AEM.01521-14.
- CRIALES-LEGORI, P.C.B.; DAVOLOS, C.C.; LEMES, A.R.N.; MARUCCI, S.C.; LEMOS, M.V.F.; FERNANDES, O.A.; DESIDÉRIO, J.A. Interação de proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para controle de lepidópteros-praga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.49, p.79-87, 2014. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000200001.
- 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**, v.62, p.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. 2014. Available at: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Accessed on: 5 Nov. 2014.
- DUHRUA, 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**, v.67, p.898-903, 2011. DOI: 10.1002/ps.2127.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Science United States of America**, v.93, p.5389-5394, 1996. DOI: 10.1073/pnas.93.11.5389.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998. DOI: 10.1101/gr.8.3.186.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998. DOI: 10.1101/gr.8.3.175.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v.47, p.501-533, 2002. DOI: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145234.
- FIGUEIREDO, C.S.; MARUCCI, S.C.; TEZZA, R.I.D.; LEMOS, M.V.F.; DESIDÉRIO, J.A. Caracterização do gene *vip3A* e toxicidade da proteína Vip3Aa50 à lagarta-do-cartucho e à lagarta-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1220-1227, 2013. DOI: 10.1590/S0100-204X2013000900005.
- FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University, 1971. 333p.
- GENBANK. **Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain HD-1 vegetative insecticidal protein (vip3Aa) gene, complete cds**. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GU073128>>. Accessed on: 5 Nov. 2014a.
- GENBANK. **Bacillus thuringiensis strain HD125 insecticidal protein Vip3A (vip3A) gene, partial cds**. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF399667>>. Accessed on: 5 Nov. 2014b.
- GENBANK. **Vip190 [Bacillus thuringiensis]**. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/291465232>>. Accessed on: 5 Nov. 2014c.
- GENBANK. **vip3A(a) [Bacillus thuringiensis]**. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAC37036.1>>. Accessed on: 5 Nov. 2014d.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998. DOI: 10.1101/gr.8.3.195.
- GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- HAMADOU-CHARFI, D.B.; BOUKEDI, H.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S.; JAOUA, S. *Agrotis segetum* midgut putative receptor of *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa16 differs from that of Cry1Ac toxin. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.114, p.139-143, 2013. DOI: 10.1016/j.jip.2013.07.003.
- HOFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HÖFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p.7844-7848, 1988. DOI: 10.1073/pnas.85.21.7844.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-681, 1970. DOI: 10.1038/227680a0.
- 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 delta-endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.4648-4657, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4648-4657.2003.
- LEMES, A.R.N.; DAVOLOS, C.C.; CRIALESI-LEGORI, P.C.B.; FERNANDES, O.A.; FERRÉ, J.; LEMOS, M.V.F.; DESIDÉRIO, J.A. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLOS One**, v.9, p.1-8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0107196.
- LETOWSKI, J.; BRAVO, A.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L. Assessment of *cry1* gene contents of *Bacillus thuringiensis* strains by use of DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5391-5398, 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5391-5398.2005.
- LIU, J.; SONG, F.; ZHANG, J.; LIU, R.; HE, K.; TAN, J.; HUANG, D. Identification of *vip3A*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *vip3A*-type gene. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.432-438, 2007. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02217.x.
- LOGUERCIO, L.L.; BARRETO, M.L.; ROCHA, T.L.; SANTOS, C.G.; TEIXEIRA, F.F.; PAIVA, E. Combined analysis of supernatant-based feeding bioassays and PCR as a first-tier screening strategy for Vip-derived activities in *Bacillus thuringiensis* strains effective against tropical fall armyworm. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.269-277, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01694.x.
- LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v.92, p.21-32, 1999. DOI: 10.1093/jee/92.1.21.
- MARÇON, P.C.R.G.; YOUNG, L.J.; STEFFEY, K.L.; SIEGFRIED, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v.92, p.279-285, 1999.
- MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA, L.; SOARES, C.M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.;

- SOBERÓN, 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, article number e0119544, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0119544.
- MOREIRA, H.J. da C.; ARAGÃO, F.D. **Manual de pragas da soja**. Campinas: IAC, 2009. 74p.
- RAYMOND, B.; WYRES, K.L.; SHEPPARD, S.K.; ELLIS, R.J.; BONSALL, M.B. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. **PLOS Pathogens**, v.6, article number e1000905, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 250p.
- SAUKA, D.H.; RODRIGUEZ, S.E.; BENINTENDE, G.B. New variants of lepidopterical toxin genes encoding *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa proteins. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.373-380, 2012. DOI: 10.1159/000345911.
- SENA, J.A.D.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, S.; FERRÉ, J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins to *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.2236-2237, 2009. DOI: 10.1128/AEM.02342-08.
- SHEN, J.; HOU, M.; GUO, W. Identification and cloning of *vip3A* genes from isolates of *Bacillus thuringiensis* and their bioactivity analysis. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v.49, p.110-116, 2009.
- 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**, v.103, p.1031-1038, 2010. DOI: 10.1603/EC10040.
- TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v.26, p.199-202, 2008. DOI: 10.1038/nbt1382.
- VACHON, V.; LAPRADE, R.; SCHWARTZ, J.-L. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.111, p.1-12, 2012. DOI: 10.1016/j.jip.2012.05.001.
- VAN FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.101, p.1-16, 2009. DOI: 10.1016/j.jip.2009.02.009.
- WOLFERSBERGER, M.; LUETHY, P.; MAURER, A.; PARENTI, P.; SACCHI, F.V.; GIORDANA, B.; HANOZET, G.M. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicle from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology**, v.86, p.301-308, 1987. DOI: 10.1016/0300-9629(87)90334-3.
- WOLFERSBERGER, M.G. The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia**, v.46, p.475-477, 1990. DOI: 10.1007/BF01954236.
- WU, J.; ZHAO, F.; BAI, J.; DENG, G.; QIN, S.; BAO, Q. Evidence for positive Darwinian selection of *vip* gene in *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Genetics and Genomics**, v.34, p.649-660, 2007. DOI: 10.1016/S1673-8527(07)60074-5.

Recebido em 27 de fevereiro de 2015 e aprovado em 25 de junho de 2015