

# **APLICAÇÕES DIVERSAS PARÁ A INDÚSTRIA**



# **TOXINAS INSETICIDAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS***

André Ballerini Horta  
Luiz Eduardo da Rocha Pannuti  
Edson Luiz Lopes Baldin  
Edson Luiz Furtado

## **21.1 INTRODUÇÃO**

Produzir alimentos com qualidade e em quantidade suficiente para atender ao crescimento populacional tornou-se um dos maiores desafios da humanidade. Essa meta exige o desenvolvimento de tecnologias racionais que otimizem o uso de recursos naturais, ampliando a capacidade produtiva, além de estratégias para redução das perdas de produção.

Insetos, fungos, vírus e bactérias causam severas perdas à produção de alimentos em todo o mundo, e ainda hoje o controle desses agentes é comumente realizado através de defensivos sintéticos. Algumas das moléculas utilizadas no controle de insetos-praga são extremamente tóxicas para organismos não alvo e seu uso incorreto, em muitos casos, é prejudicial à saúde dos animais e seres humanos, induzindo doenças importantes, como câncer e males do sistema imunológico. Além disso, alguns desses compostos são persistentes, sendo degradados lentamente e levando à poluição do solo e da água. A evolução de populações de insetos resistentes a moléculas sintéticas

também resultou na ineficiência dos programas de controle baseados nesses produtos e na ocorrência crescente de surtos de pragas secundárias<sup>1</sup>.

Como alternativa ao controle realizado por meio dos inseticidas sintéticos, têm sido desenvolvidos programas de manejo integrado de pragas (MIP), baseados principalmente nos princípios do controle biológico, sendo a bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) um dos agentes de controle biológico de maior destaque nesse contexto. Descoberta no Japão em 1902 por Ishiwata, a bactéria foi associada à mortalidade de lagartas de *Bombyx mori* Linnaeus, recebendo primeiramente o nome de *Bacillus sotto*. Posteriormente, na região da Turíngia, na Alemanha, foi relatada por Berliner em 1915, associada à mortalidade de lagartas de *Anagasta kuehniella* Zeller, recebendo a denominação de *Bacillus thuringiensis*<sup>2,3</sup>. Sua propriedade inseticida foi descoberta quando lagartas de *A. kuehniella* foram encontradas portando esporos e cristais da bactéria. O contato direto com essas estruturas não afetou a mortalidade das lagartas; porém, quando estas ingeriram tais estruturas impregnadas às folhas, as lagartas cessaram a alimentação e posteriormente morreram. A estirpe encontrada por Berliner foi isolada posteriormente, e os resultados observados contra *Ostrinia nubilalis* Hubner foram promissores em ensaios de campo<sup>4,5</sup>. Esses resultados levaram ao desenvolvimento do produto Sporeine, um inseticida à base de Bt, utilizado para o controle de insetos da ordem Lepidoptera em 1938<sup>6,7</sup>. O sucesso desse produto resultou em inúmeros outros produzidos à base de Bt ainda comercializados hoje em dia<sup>3,6</sup>.

*B. thuringiensis* é uma bactéria de ocorrência cosmopolita, naturalmente encontrada no solo, matéria orgânica, insetos mortos, água e resíduos de grãos, e que se caracteriza pela produção de proteínas inseticidas durante seu processo de esporulação ao final do seu desenvolvimento. Essas proteínas vão sendo acumuladas sob a forma de cristais proteicos no interior das células, os quais são liberados no ambiente, juntamente com os esporos ao final da esporulação. Quando larvas de lepidópteros ingerem esses cristais, as proteínas são solubilizadas no intestino e matam as larvas devido à formação de poros na membrana das células do intestino médio dos mesmos. Essas proteínas distribuem-se principalmente em duas grandes famílias, Cry e Cyt, e há décadas têm sido empregadas com sucesso no controle de pragas agrícolas e vetores de doenças humanas, como malária e dengue. Inicialmente o Bt fazia parte de diversos bioinseticidas e atualmente está presente em culturas geneticamente modificadas (GM)<sup>8</sup>. Outras proteínas produzidas por *B. thuringiensis* continuam sendo identificadas, como é o caso da Vip (proteína inseticida vegetativa). Esse grupo de proteínas foi relatado pela

primeira vez em 1996 e se caracteriza pela atividade inseticida, sendo secreta durante o crescimento vegetativo de estirpes do Bt<sup>9,10</sup>.

Do mercado global de inseticidas, aproximadamente 2,5% correspondem aos bioinseticidas à base de bactérias, fungos e vírus. Apenas a bactéria *B. thuringiensis* é responsável por 70% desses produtos<sup>11</sup>. Entretanto, sua utilização na forma de bioinseticida sofre limitações devido ao estreito espectro de ação e à baixa persistência no ambiente. Dessa forma, outra aplicação mais recente e de maior sucesso consiste na expressão de suas proteínas em culturas geneticamente modificadas, conferindo proteção efetiva contra danos causados por insetos<sup>8</sup>.

Em 2015, a área cultivada com culturas GM foi de 179,7 milhões de hectares, distribuída em 28 países. Pelo quarto ano consecutivo os países em desenvolvimento superaram a área plantada pelos países desenvolvidos, ficando com 54% da área cultivada. Aproximadamente 18 milhões de agricultores adotaram os plantios transgênicos, graças aos benefícios socioeconômicos e ambientais. Essa área representa um aumento de cem vezes em relação à área inicial registrada em 1996, tornando a transgenia a tecnologia agrícola mais adotada na história moderna<sup>12</sup>.

Os benefícios das culturas GM ao homem e ao meio ambiente são vários, mas os principais estão relacionados ao menor volume de defensivos utilizados após sua adoção, refletindo diretamente no consumo de combustível pelas operações agrícolas, na emissão de gases do efeito estufa e na exposição do trabalhador rural a esses produtos. Até 2012, as culturas de algodão, canola, milho e soja representavam 45% da área total com culturas GM no mundo, e as principais características exploradas eram a resistência a herbicidas específicos e a resistência a insetos-praga<sup>13</sup>.

Em áreas que adotaram cultivos GM desde 1996, houve um decréscimo de 584 milhões de quilos de ingredientes ativos utilizados<sup>12</sup>. Considerando-se a adoção de culturas GM resistentes a herbicidas (principalmente glifosato e glufosinato), em algumas regiões, houve um incremento no volume total utilizado, mas o perfil de herbicidas aplicados foi alterado. Adotou-se o uso de produtos mais seletivos e com diferentes modos de ação, a fim de se evitar ou controlar o desenvolvimento de plantas daninhas resistentes. Assim, mesmo com o maior volume utilizado, o impacto ambiental foi reduzido quando comparado ao manejo convencional. Nas áreas onde culturas GM resistentes a insetos foram adotadas, houve redução no volume total de inseticidas utilizado em todas as culturas. Em 2012, a economia global em ingrediente ativo de inseticidas foi de 40% para a cultura do algodão e de 86,5% para a cultura do milho. Com o menor número de operações necessárias para aplicação

de defensivos, a exposição do trabalhador rural aos produtos e a emissão de dióxido de carbono associada ao consumo de combustível também foram reduzidos. No período de 1996 a 2012, houve economia de 6.268 milhões de litros de combustível ou 16.736 milhões de quilos de dióxido de carbono, o que equivale à retirada de 7,44 milhões de carros das estradas por um ano. As melhorias no cultivo favoreceram o manejo do solo e o sequestro de carbono. Em 2012, estimou-se que 6,707 milhões de quilos de carbono do solo foram preservados, equivalendo a 24.613 milhões de toneladas de dióxido de carbono que não foram liberadas para a atmosfera global, ou 10,9 milhões de carros retirados das estradas por um ano<sup>13</sup>.

Os ganhos em produtividade, a redução das perdas ocasionadas por pragas e a menor utilização de defensivos são os principais fatores responsáveis pelo aumento na adoção das culturas GM em todo o mundo. Para garantir a continuidade desses benefícios, é importante preservar a vida útil dessa tecnologia, visto que já existem relatos da evolução de populações de insetos resistentes ao *B. thuringiensis*, e, para isso, programas de manejo já têm sido empregados.

Muitos estudos têm mostrado que as toxinas Bt utilizadas em culturas transgênicas são seguras ao ambiente e não tóxicas a outros organismos, mas ainda existem preocupações relacionadas ao impacto de produtos Bt aos organismos não alvo. Dessa forma, é importante o completo entendimento a respeito do modo de ação das principais toxinas (Cry, Cyt e Vip) para propor estratégias que sejam efetivas na neutralização e combate da ação dessas toxinas, de modo a proteger organismos ameaçados em ecossistemas particulares. Por outro lado, é sabido que a resistência a essas toxinas é um grande problema que se tornará mais frequente em áreas de cultivo Bt, devido à grande pressão de seleção.

Diante do exposto, abordaremos os avanços na proteção de cultivos ao redor do mundo através da utilização da bactéria *B. thuringiensis*, seja através de bioinseticidas ou como fonte de proteínas inseticidas para organismos geneticamente modificados.

## **21.2 BACILLUS THURINGIENSIS E SUAS PROTEÍNAS INSETICIDAS**

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva de crescimento aeróbio, pertencente à família Bacillaceae. Como dito anteriormente, possui ocorrência cosmopolita, sendo encontrada naturalmente no solo e em outros substratos como superfície de plantas, insetos mortos e grãos armazenados.

Caracteriza-se por sua atividade inseticida relacionada principalmente à presença de cristais proteicos produzidos durante seu processo de esporulação, o qual pode ser induzido por condições adversas como ausência de nutrientes ou acúmulo de metabólitos indesejáveis no meio<sup>14,15</sup>. Esses cristais são compostos principalmente por  $\delta$ -endotoxinas conhecidas como proteínas Cry, as quais possuem ação inseticida contra insetos pertencentes a diversas ordens, mas principalmente Coleoptera, Diptera, Hymenoptera e Lepidoptera<sup>16,8</sup>. Essas proteínas são codificadas por genes *cry*, os quais são classificados de acordo com sua homologia na sequência de aminoácidos. Atualmente, são conhecidos 74 diferentes grupos de toxinas Cry com mais de 770 sequências de genes já descritos (Figura 21.1)<sup>17</sup>.

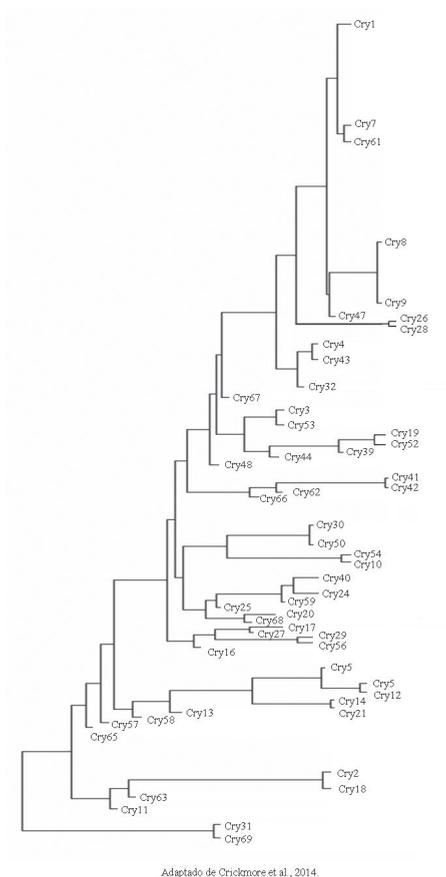


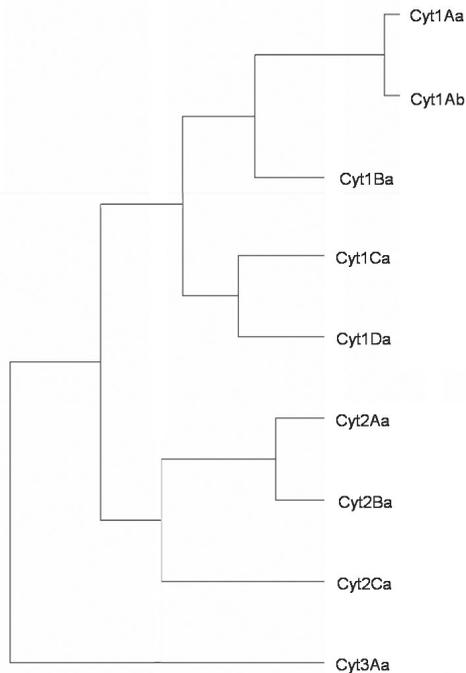
Figura 21.1 Dendrograma de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Crickmore<sup>17</sup>.

É comum uma mesma cepa de *B. thuringiensis* apresentar vários genes *cry* em sua composição genética, sem que necessariamente todos eles sejam expressos e suas proteínas estejam presentes nos cristais<sup>7</sup>.

Outras proteínas com atividade inseticida também são produzidas por *B. thuringiensis*, entretanto, em frequência inferior, sendo elas as proteínas Cyt e Vip.

Proteínas Cyt também são sintetizadas durante o processo de esporulação e podem ser acumuladas juntamente com as toxinas Cry nos cristais. Essas proteínas possuem atividade inseticida quase que exclusiva para insetos da ordem Diptera e geralmente são encontradas em cepas que possuem genes *cry* de mesma especificidade, possuindo ação sinérgica na toxicidade a larvas desses insetos. São conhecidos apenas três grupos, que compreendem menos de 40 genes conhecidos (Figura 21.2)<sup>17</sup>.

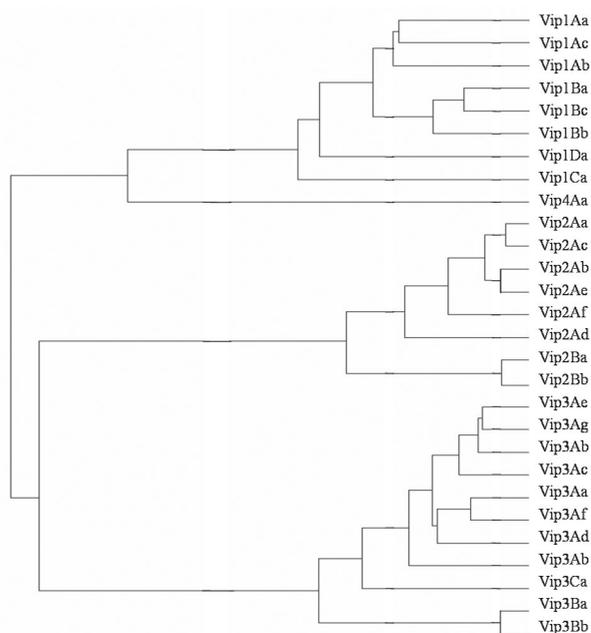
Proteínas Vip são produzidas durante a fase vegetativa de desenvolvimento do *B. thuringiensis*, sendo secretadas pela bactéria no seu meio de desenvolvimento. Quando comparadas às proteínas Cry, possuem espectro



Adaptado de Crickmore et al., 2014.

Figura 21.2 Dendrograma de proteínas Cyt de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Crickmore<sup>17</sup>.

de ação mais amplo. São conhecidas quatro subfamílias dessas proteínas (Vip1, Vip2, Vip3 e, mais recentemente, Vip4), com pouco mais de 140 genes conhecidos (Figura 21.3)<sup>10</sup>. Até o momento, as subfamílias Vip1 e Vip2 foram testadas e demonstraram eficiência contra coleópteros<sup>18</sup> e hemípteros<sup>19</sup> (especificamente pulgões), enquanto Vip3 é efetiva contra diferentes insetos da ordem Lepidoptera<sup>10,20</sup>.



Adaptado de Crickmore et al., 2014.

Figura 21.3 Dendrograma de proteínas Vip de *Bacillus thuringiensis*. Fonte: Crickmore<sup>17</sup>.

Outros genes que codificam toxinas com características diferenciadas também podem ser encontrados, mesmo que isso ocorra com frequência muito inferior à dos genes *cry*, *vip* e *cyt*.

São conhecidas  $\alpha$ -exotoxinas,  $\beta$ -exotoxinas, hemolisinas, enterotoxinas, quitinases, fosfolipases e lecitinas. Algumas dessas possuem atividade comprovada sobre mamíferos, tornando fundamentais estudos para sua detecção principalmente quando o objetivo de utilização de uma cepa é a formulação de um bioinseticida.

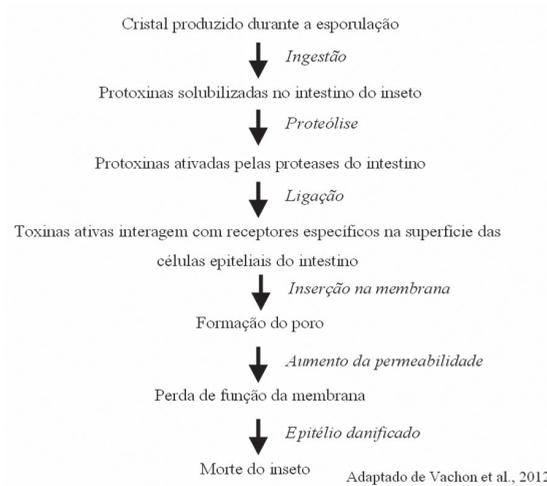
A  $\alpha$ -exotoxina e as  $\beta$ -exotoxinas tipos I e II são altamente tóxicas para insetos e alguns vertebrados. A  $\alpha$ -exotoxina em altas doses possui função enzimática citolítica, atuando sobre fosfolipídeos de membranas em diversos tipos celulares. A  $\beta$ -exotoxina (thuringiensina) é termoestável e atua através da inibição de nucleases, inibindo a síntese de RNA nas células afetadas, razão pela qual seu uso é controlado ou até proibido em alguns países, pois existem estudos que mostraram sua capacidade de criar lesões em tecidos de camundongos e galinhas e ação mutagênica em sistemas fisiológicos de mamíferos<sup>3,21</sup>. Nesse caso, a detecção de um gene que codifica uma dessas toxinas é fator proibitivo de seu uso para a produção de bioinseticidas.

### 21.3 MODO DE AÇÃO DAS PRINCIPAIS TOXINAS BT

Como já mencionado anteriormente, *B. thuringiensis* pode ser aplicado na proteção de cultivos seja através da expressão de suas toxinas em plantas transgênicas ou por meio de bioinseticidas. No primeiro caso, o inseto é exposto diretamente à fração ativa da toxina, expressa de maneira constante no vegetal. No segundo caso, com a aplicação de bioinseticidas nas culturas, esporos e cristais de toxinas são dispostos sobre a planta da qual o inseto se alimentará.

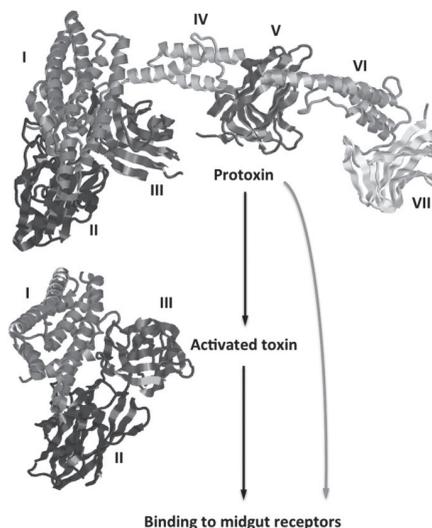
Para proteínas Cry em lepidópteros, atualmente são propostos dois modos de ação distintos. O primeiro e clássico é relacionado à fração ativada da toxina. Neste considera-se que após a ingestão dos cristais, estes são solubilizados nas condições de pH alcalino no intestino dos insetos, liberando protoxinas que em presença de proteinases são quebradas, gerando fragmentos tóxicos. Esses fragmentos atravessam a membrana peritrófica ligando-se a receptores específicos localizados na membrana apical das células do intestino médio. Essa ligação interfere no gradiente iônico e balanço osmótico da membrana pela formação de poros que aumentam a permeabilidade da membrana. O aumento na absorção de água de forma descontrolada causa lise celular e eventual ruptura e desintegração das células do intestino médio, levando o inseto à morte (Figura 21.4). O inseto também pode morrer por inanição, pois pouco tempo depois da infecção cessa sua alimentação<sup>22</sup>.

O segundo modo de ação recentemente comprovado, obtido pela análise da atividade inseticida das proteínas Cry1Ab e Cry1Ac para populações de insetos resistentes, revelou ainda outro modo de ação distinto do descrito anteriormente. Até então se pensava que a protoxina era uma forma inativa que necessitava ser clivada pelas proteinases para só então gerar fragmentos tóxicos ativos no controle de insetos. Entretanto, os dados recentemente



**Figura 21.4** Representação esquemática dos passos que levam à formação do poro e morte do inseto, de acordo com o modelo clássico do modo de ação do Bt.

levantados suportam que a protoxina pode ser inclusive mais potente contra insetos resistentes do que sua fração tóxica ativada, ajudando desse modo a aumentar e sustentar a eficácia das culturas Bt<sup>138</sup> (Figura21.5).



**Figura 21.5** Representação esquemática do modo de ação no qual a protoxina se liga diretamente ao receptor na membrana.

O intestino dos insetos suscetíveis geralmente possui pH elevado, condição desfavorável para a germinação dos esporos ingeridos, mas essencial para a atividade das toxinas. Com a lise das membranas celulares, seguida da ruptura da parede do intestino, o conteúdo do intestino é misturado à hemolinfa, reduzindo o pH e fornecendo nutrientes, favorecendo a germinação dos esporos e a disseminação da infecção pelo organismo do inseto<sup>23</sup> (Figura 21.6). Com o desenvolvimento da infecção, os sintomas observados além da perda de apetite são: paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, por fim, morte<sup>24</sup>.

As proteínas Cry possuem duas regiões distintas compostas por protoxinas: a porção aminoterminal (N-terminal) relacionada à toxina ativada após a clivagem pelas proteinases e foco do modo de ação clássico; e a porção carboxiterminal (C-terminal), anteriormente associada somente à formação do cristal<sup>16</sup>, agora está relacionada ao segundo modo de ação recentemente descoberto. A porção C-terminal é clivada no intestino do inseto e seus domínios V e VII, similares aos domínios II e III da toxina ativada, se ligam aos mesmos fragmentos de caderina, receptor chave neste processo. A porção N-terminal corresponde a toxina ativada e possui três domínios. O domínio I está associado à inserção da toxina na membrana e à formação de poros<sup>25,26</sup>. Os domínios II e III são associados à ligação com o receptor, de forma a definir o(s) inseto(s)-alvo da toxina<sup>26,27</sup>. Os estudos realizados para determinação do modo de ação das proteínas Cry foram realizados principalmente em lagartas de lepidópteros<sup>16,28</sup>.

De forma geral, os estudos realizados levam em consideração o efeito letal das proteínas Cry sobre um inseto-alvo específico, mas é importante lembrar também que o inseto suscetível, quando exposto à toxina e sofrendo os sintomas da infecção, também fica mais exposto ao ataque de inimigos naturais (predadores e parasitoides), os quais também podem sofrer algum tipo de ação da toxina ingerida pelo inseto-alvo. Além disso, é muito comum a presença de dois ou mais genes *cry* funcionais em um mesmo isolado ou linhagem bacteriana de *B. thuringiensis*, de modo que o cristal por ele produzido conterà duas ou mais proteínas Cry. Logo, a patogenicidade e a virulência conferidas ao isolado são relacionadas diretamente à forma de ação das proteínas nele presentes e à forma como elas interagem. Essa interação entre as toxinas e seus respectivos receptores pode levar a efeitos antagônicos ou sinérgicos. Em estudo conduzido com lagartas de *Lymantria dispar* Linnaeus (Lepidoptera: Lymantriidae) foi observado efeito antagônico entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ab e efeito sinérgico entre as proteínas Cry1Aa e Cry1Ac<sup>29</sup>. Os mesmos efeitos da interação entre as toxinas presentes em um

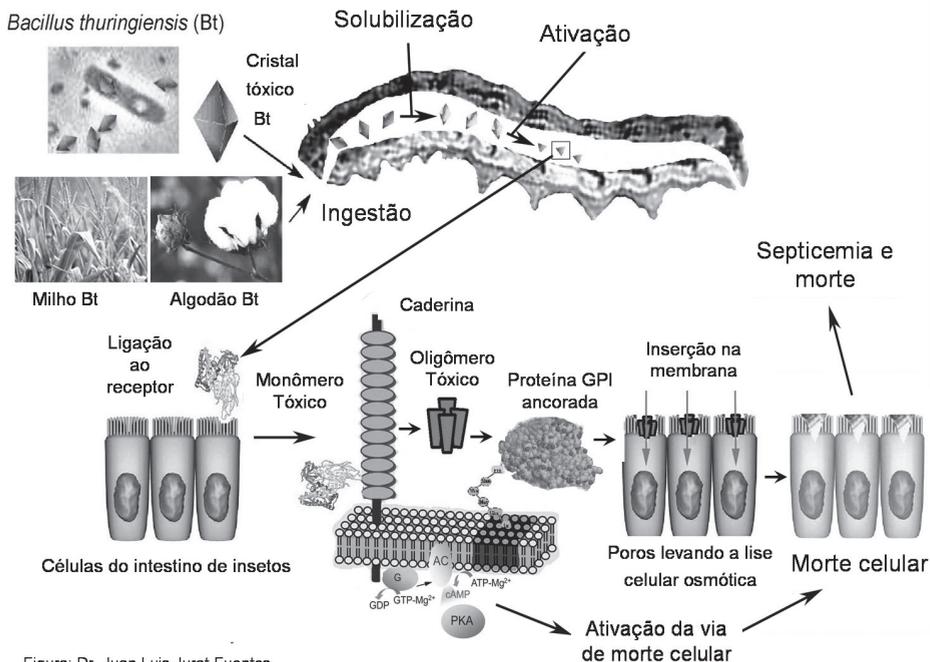
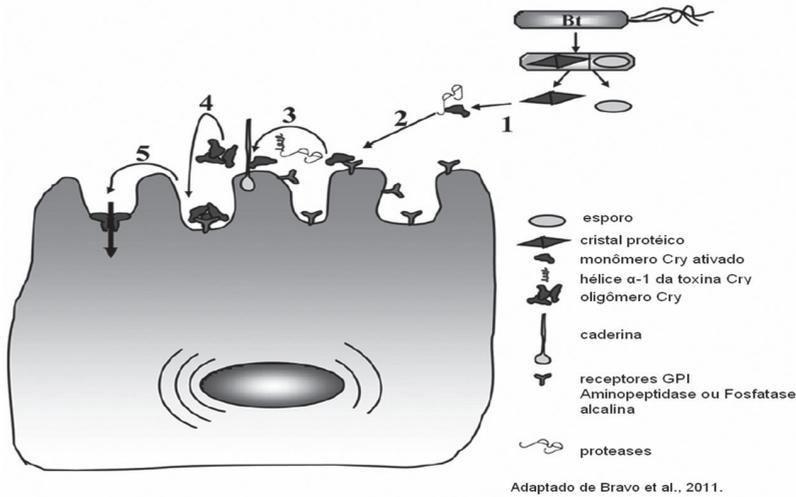


Figura: Dr. Juan Luis Jurat-Fuentes

Figura 21.6 Modo clássico de ação de *B. thuringiensis*. Fonte: Jurat-Fuentes<sup>139</sup>.

isolado podem ser observados para formulações de bioinseticidas. Em estudo conduzido avaliando-se tais interações entre Xentari® e Dipel®, foi observado efeito aditivo para *Heliothis virescens* Fabrícus (Lepidoptera: Noctuidae)<sup>30</sup>.

O modo clássico de ação das toxinas Cry ainda tem sido revisto e apresenta duas vertentes de estudo. No modelo mais difundido, os pesquisadores descrevem a função de cada um dos três domínios das proteínas Cry e mostram que o domínio I da proteína é responsável pela formação do poro no intestino das larvas e inserção da proteína no intestino das mesmas<sup>8</sup>. O domínio II está envolvido com a ligação das proteínas em receptores de membrana, e sua estrutura é similar a uma série de proteínas que ligam carboidratos. Assim como o domínio II, o domínio III apresenta estruturas similares à de outras proteínas de ligação de carboidrato, como a celulose, que se liga a 1,4  $\beta$ -glucanase C, galactose oxidase e  $\beta$ -glucoronidase, e com domínios de carboidratos, que se ligam a xylanase V e  $\beta$ -galactosidase<sup>31</sup> (Figura 21.7). Isso sugere que os carboidratos possuem importante papel na ação dos domínios II e III<sup>32</sup>.



**Figura 21.7** Modo de ação das toxinas Cry1A no lepidóptero *M. sexta*. (1) Solubilização e processamento proteolítico da protoxina Cry1A pelas proteases do intestino médio. (2) Ligação do monômero 3D-Cry1A aos abundantes receptores GPI aminopeptidase-N e fosfatase alcalina. (3) Ligação do monômero da toxina Cry1A ao receptor caderina e proteólise adicional da hélice  $\alpha$ -1 do domínio I. (4) Formação da estrutura oligomérica e ligação da mesma aos receptores GPI aminopeptidase-N e fosfatase alcalina. (5) Inserção da estrutura oligomérica de Cry1A na membrana.

Em outro modelo de atuação de proteínas Cry, os autores dividem o modelo proposto em dois tipos de interação entre as toxinas Cry e a célula-alvo. Um tipo é baseado na montagem das toxinas Cry como oligômeros que se ligam à célula, mas não a levam à morte. A ligação formada é não específica; portanto, não há interação específica entre a toxina e os componentes da membrana de lipídeos<sup>33</sup>. Os dois modelos acima citados são de extrema relevância para o estudo da suscetibilidade de larvas em relação às proteínas Cry.

Proteínas Cry e Cyt pertencem a uma mesma classe, conhecida como proteínas formadoras de poros, sofrendo os mesmos passos tóxicos de solubilização, ativação proteolítica, ligação com o receptor e inserção na membrana de seu hospedeiro, interferindo na homeostase de íons e ocasionando a destruição das células-alvo<sup>16,34,35</sup>. As toxinas produzidas pelas proteínas Cyt são sintetizadas como protoxinas e solubilizadas no intestino dos insetos suscetíveis, em grande maioria da ordem Díptera, e ativadas proteoliticamente por proteases intestinais, resultando na produção de proteínas ativadas de 25 KDa<sup>35,36</sup>. Existem dois mecanismos de ação propostos para a inserção dessas toxinas na membrana das células intestinais: uma formação de poros

estruturados em que a toxina Cyt liga-se à membrana celular, induzindo, assim, à formação de canais catiônicos seletivos nas vesículas da membrana e levando à lise coloidal-osmótica da célula<sup>37,38,35</sup>; ou um modelo de efeito detergente no qual ocorre uma agregação não específica da toxina sobre a superfície da bicamada lipídica da membrana, ocasionando desmontagem e morte das células-alvo<sup>35,39</sup>.

Acredita-se que as toxinas dessa classe possuem uma atividade sinérgica com outras toxinas contra uma série de insetos-alvo<sup>40</sup>, podendo facilitar a ligação e/ou talvez a internalização da outra toxina, além de apresentar sua toxicidade própria<sup>31</sup>.

Em adição às toxinas formadoras de poros, foi identificada uma nova família de proteínas inseticidas denominada Vip (proteína inseticida vegetativa), produzidas durante seu estágio vegetativo<sup>41,42</sup>. Vip3 é a subfamília mais difundida e a única com efeito tóxico relatado na base de dados de toxicidade para *B. thuringiensis* do Natural Resources Canada\*. Semelhantes às proteínas Cry, as toxinas dessa família ligam-se a receptores do intestino médio do inseto; porém, não compartilham dos mesmos locais (sítios) de ligação<sup>10,43,44</sup>. A morte celular (apoptose) foi sugerida inicialmente como o modo de ação; contudo, existem estudos demonstrando que, assim como as proteínas Cry, as toxinas Vip3A ativadas podem ser proteínas formadoras de poros capazes de tornar estáveis os canais iônicos na membrana<sup>45</sup>. A possibilidade de diferentes modos de ação das proteínas Vip ainda é sugerida<sup>46,47</sup>.

A elucidação do modo de ação das toxinas de Bt possibilitou o uso da combinação das toxinas Cry e Vip como uma importante ferramenta para o controle de diversas pragas na agricultura. Híbridos transgênicos de milho e algodão Bt contendo a combinação das duas proteínas (Vip3Aa e Cry1A) vêm sendo comercializados para o controle de diversos insetos da ordem Lepidoptera<sup>48</sup>. Essa alternativa tem sido considerada promissora no manejo de resistência de insetos<sup>10</sup>, uma vez que já existem casos de resistência de populações de insetos a proteínas Cry<sup>49,50</sup>, ou mesmo ineficiência desta no combate a algumas pragas de importância agrícola<sup>51</sup>.

## 21.4 MANEJO DA RESISTÊNCIA DE INSETOS ÀS TOXINAS BT

A tecnologia das plantas transgênicas resistentes a insetos baseia-se na introdução de genes na planta sem a necessidade de fecundação ou

---

\* Ver <http://cfs-scf.nrcan-rncan.gc.ca/projects/119/2>.

cruzamento, podendo ser transferidas características de plantas sexualmente incompatíveis e outros organismos<sup>52</sup>. A introdução de tais genes confere à planta atividade inseticida para uma ou mais pragas-chave da cultura. Esses genes podem ser obtidos de outros vegetais, animais, insetos e bactérias, e podem codificar a produção de inibidores de enzimas, neuro-hormônios, proteínas com ação inseticida, entre outros compostos com ação diferenciada. Dentre as formas de obtenção de genes para introdução em plantas geneticamente modificadas, a bactéria *B. thuringiensis* é a principal fonte de genes para os transgênicos comercializados atualmente.

No entanto, os benefícios das culturas transgênicas com resistência para insetos estão ameaçados pela seleção de populações de insetos resistentes às toxinas Bt. Como qualquer outra tática de controle, seu potencial de uso por um longo período pode ser limitado se não houver a implementação de estratégias de manejo de resistência apropriadas<sup>53</sup>.

É importante lembrar que os insetos têm a capacidade de se adaptar para sobreviver às novas adversidades impostas. Assim como no passado eles foram selecionados para os inseticidas sintéticos, hoje já existem relatos de casos de resistência ao modo de ação das toxinas de *B. Thuringiensis*, seja pela utilização de bioinseticidas ou de plantas transgênicas<sup>49,54,55,56,57,58,59</sup>.

Uma aplicação rápida das técnicas moleculares desenvolvidas a partir da década de 1980 foi introduzir, em plantas, genes que conferem novas características de importância agrônômica. Tolerância a pragas sempre foi um dos desafios dos melhoristas de plantas. Por essa razão, genes de Bt que codificam proteínas inseticidas têm sido transferidos para culturas agronomicamente relevantes, a fim de conferir a elas proteção para seus mais importantes insetos-praga<sup>60</sup>.

Após alguns anos de comercialização de culturas Bt, a maioria das populações de insetos continua suscetível. Os casos que a literatura registra de resistência de populações de insetos às proteínas Bt incluem *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) em milho Cry1F em Porto Rico<sup>58,59</sup>, *Busseola fusca* Fuller (Lepidoptera: Noctuidae) em milho Cry1Ab na África do Sul<sup>61</sup>, *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae) em algodão Cry1Ac e Cry1Aa nos Estados Unidos, *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae) em algodão Cry1Ac na Índia<sup>62</sup>, e *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) em milho Cry3Bb nos Estados Unidos<sup>63</sup>.

Diversas culturas, como milho, algodão, batata e arroz, têm sido transformados com genes Bt codificando para proteínas altamente ativas contra as mais importantes pragas. Assim, milho Bt tem sido transformado com Cry1Ab,

Cry1F e Vip para proteção contra *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Diatraea grandiosella* Dyar (Lepidoptera: Noctuidae), *S. frugiperda* e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae), e com Cry3Bb1, Cry3Bb e Cry34Ab e Cry35Ab para proteção contra pragas de raízes do gênero *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae). Muitos dos híbridos produzidos atualmente expressam mais de uma proteína, conferindo resistência a mais de uma ordem de insetos, sendo conhecidos como eventos piramidados<sup>64</sup>.

Muito do algodão Bt plantado comercialmente contém o gene *cry1Ac* ou uma fusão dos genes *cry1Ac* e *cry1Ab*. O gene *cry1Ac* é altamente ativo contra lepidópteros que se alimentam dos capulhos: *Heliothis virescens* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae), e razoavelmente eficaz contra *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae). Na China, o gene inibidor de tripsina em feijão (CpTi) foi combinado com um gene *cry1Ac* para produção de um produto com gene piramidado comercializado no início dos anos 2000. O gene *vip3A* também foi introduzido em algodão e também confere proteção contra as mesmas pragas<sup>65</sup>.

Os genes *cry1Ac* e *cry2Ab* foram combinados na mesma planta (Bollgard II), dando origem à segunda geração de algodão Bt, que é extensivamente plantada na Austrália. Após sua adoção nos Estados Unidos, em 2006, esta apresentou um crescimento considerável na sua área plantada<sup>66</sup>. Outra combinação de genes Bt que tem sido recentemente comercializada agrega os genes *cry1Ac* e *cry1F*, conferindo proteção adicional contra *Spodoptera* spp<sup>65</sup>. A razão para combinar duas ou mais proteínas diferentes não é somente aumentar o espectro de ação, mas também adequar-se à proposta de manejo de resistência<sup>67</sup>.

Em relação aos bioinseticidas à base de Bt, diferentes produtos foram desenvolvidos para o controle de insetos na agricultura e também contra espécies de mosquitos. A maior parte é baseada na produção de esporos de diferentes estirpes de *B. thuringiensis* que, de uma maneira geral, expressam proteínas Cry, tais como *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Btk) HD1, que expressa proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2Aa, ou HD73, que produz proteína Cry1Ac; *B. thuringiensis* var. *aizawai* HD137, que produz diferentes toxinas Cry, como Cry1Aa, Cry1B, Cry1Ca e Cry1Da; *B. thuringiensis* var. *san diego* e *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*, que produzem a toxina Cry3Aa, e *B. thuringiensis* var. *israelensis*, contendo as toxinas Cry4A, Cry4B, Cry11A e Cyt1Aa<sup>8,68</sup>.

Os primeiros relatos de amplas variações na suscetibilidade ao Dipel® foram observados em *Plodia interpunctella* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae) coletada em grãos armazenados, embora os grãos não tivessem histórico de tratamento com formulações à base de Bt<sup>69</sup>. Uma pesquisa maior sobre grãos armazenados<sup>70</sup>, tanto em material tratado com Bt como em material não tratado, confirmou a alta variabilidade natural encontrada no estudo anterior<sup>69</sup> e estimulou vários experimentos de seleção em laboratório. Um nível de resistência ao Dipel® cem vezes maior foi desenvolvido com sucesso quando populações de *P. interpunctella* foram submetidas a apenas 15 gerações de seleção em laboratório<sup>70</sup>. Outros estudos demonstraram níveis e taxas variáveis de desenvolvimento de resistência (15 a 250 vezes maior), com cinco diferentes colônias de *P. interpunctella* que foram selecionadas por 40 gerações<sup>71</sup>.

A primeira incidência de resistência em laboratório de uma praga agrícola de campo foi observada para *H. virescens*<sup>72</sup>. Após apenas três gerações de seleção em Cry1Ab, a suscetibilidade foi reduzida em três vezes. A seleção continuou usando ou uma proteína Bt isolada (Cry1Ab) ou Dipel®, que empurrou o nível de resistência para mais de 70 vezes para Cry1Ab purificada e 57 vezes para Dipel® após 22 gerações de pressão de seleção.

Durante algum tempo, muitos concluíram que a resistência a biopesticidas à base de Bt era improvável, pois não havia relatos de resistência de campo documentados, apesar dos mais de 20 anos de uso da tecnologia. Experimentos de seleção em laboratório mostravam o potencial para resistência; contudo, representavam circunstâncias que raramente imitam condições de campo, especialmente devido ao pequeno número de insetos nas colônias selecionadas com diversidade genética limitada. O complexo modo de ação de Bt, envolvendo múltiplas toxinas e múltiplos sítios de ligação, foi considerado a base para a ausência de desenvolvimento de resistência<sup>73</sup>.

A primeira evidência de resistência ao Bt em campo aberto ocorreu nas Filipinas com *P. xylostella*<sup>74</sup>, seguido de casos no Havaí<sup>75</sup>, Tailândia<sup>76</sup>, Filipinas<sup>77</sup>, Coreia<sup>78</sup> e Japão<sup>79</sup>. Desde então, muitos outros casos de desenvolvimento de resistência em campo com essa espécie de inseto têm sido reportados<sup>49</sup>. Muitas dessas populações surgiram em localidades tropicais, onde *P. xylostella* pode produzir mais de 25 gerações ao ano e onde os campos são intensamente pulverizados com inseticidas à base de Bt<sup>77,80</sup>.

O estudo de populações de insetos em condições de laboratório tem mostrado que, fornecida uma variabilidade inicial suficiente, qualquer espécie de inseto pode ser selecionada para resistência a produtos formulados com base em Bt e/ou em suas proteínas Cry<sup>49</sup>. A seleção em laboratório tem mostrado que as principais pragas-alvo das culturas Bt atuais

podem desenvolver resistência às proteínas Cry. Populações resistentes de laboratório têm sido obtidas para *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae), *H. virescens*, *P. gossypiella*<sup>55,56</sup> e *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae)<sup>57</sup>.

Existem duas principais diferenças entre pulverizações com Bt e culturas Bt com relação à pressão de seleção imposta sobre populações de insetos. Uma é que a persistência dos esporos e cristais de Bt é relativamente curta quando estes são pulverizados, dependendo das condições ambientais. Os cristais inseticidas podem ser lavados durante períodos de chuva, e suas proteínas são gradualmente inativadas pela radiação UV e/ou degradadas por micro-organismos. Em contraste, as atuais culturas Bt expressam genes dos bacilos constitutivamente, e suas proteínas produzidas são estáveis dentro do ambiente da célula vegetal<sup>65</sup>. A segunda maior diferença é que pulverizações com Bt quase invariavelmente contêm uma combinação de proteínas inseticidas, já que isolados de Bt normalmente carregam vários genes de proteínas inseticidas<sup>81</sup>. Além disso, a presença do esporo tem mostrado uma ação sinérgica contra algumas pragas<sup>82</sup>. Em contraste, as culturas Bt comercializadas até pouco tempo atrás expressavam apenas um gene de proteína inseticida. No entanto, essa segunda diferença tende a mudar com o avanço da tecnologia de culturas Bt, uma vez que plantas transgênicas que expressam mais de um gene com distintos modos de ação vêm sendo comercializadas contra o mesmo grupo de insetos-praga<sup>83</sup>. Comparativamente com a primeira geração de plantas Bt, as plantas expressando genes piramidados são mais efetivas para o controle de algumas pragas<sup>84,85</sup>.

As diferenças supracitadas entre pulverizações Bt e culturas Bt podem resultar numa velocidade diferenciada na seleção de populações de insetos resistentes entre essas duas abordagens de controle de insetos. A combinação de mais de uma proteína inseticida em produtos Bt diminui a chance de se encontrar um indivíduo resistente. De fato, existem exemplos de populações de insetos que vêm se tornando resistentes a uma única proteína Cry, mas que continuam mantendo a suscetibilidade a formulações Bt contendo a mesma proteína Cry juntamente com outras proteínas desse grupo<sup>77,82</sup>. Entretanto, tem sido mostrado que insetos podem se tornar resistentes simultaneamente a várias proteínas Cry se uma alteração de sua interação com os sítios de ligação compartilhados ocorrer<sup>86</sup>. Na prática, não é raro encontrar isto em produtos Bt, visto que as proteínas Cry mais tóxicas a um inseto-praga específico compartilham o mesmo sítio de ligação<sup>87</sup>. Nesse caso, o produto Bt vai agir quase que como se uma única proteína inseticida fosse produzida, e o desenvolvimento de resistência se tornará muito mais provável.

A primeira diferença citada, que reside na persistência das proteínas inseticidas, relaciona-se com a chance de o inseto ingerir uma dose subletal da proteína. Assumindo que a dose de proteína Cry aplicada em uma planta ou produzida por uma planta GM é suficiente para matar os insetos que se alimentam dela, a chance de um inseto escapar da morte é muito mais alta em um campo pulverizado do que em um campo GM. Uma razão é que a cultura Bt supostamente expressa a proteína inseticida em um nível consistente (alto) durante todo o período de crescimento. Entretanto, não somente a persistência do produto pulverizado é responsável pelos escapes no campo pulverizado com Bt, mas também o fato de que, na prática, é quase impossível cobrir uniformemente toda a superfície da planta. O efeito disso na evolução da resistência é duplo: primeiro, os insetos que não ingerirem a dose letal do biopesticida terão o mesmo efeito como no refúgio em campos Bt em termos de diluição dos alelos de resistência. Em segundo, insetos carregando genes de resistência que não conferem total resistência a altas doses de biopesticida podem ser expostos a doses subletais e sobreviver. Mantendo-se este quadro em médio-longo prazo, poderá surgir uma combinação de diferentes genes de resistência, levando a altos níveis de resistência. Enquanto o primeiro fenômeno pode resultar em um desenvolvimento mais lento de resistência a pulverizações com Bt do que a culturas Bt, o segundo fenômeno aparentemente tem efeito contrário<sup>65</sup>.

Devido a essas preocupações, culturas Bt foram introduzidas com específicos planos de manejo de resistência, que faltam para produtos formulados à base de Bt. Esses programas de monitoramento de resistência devem ter como objetivo maximizar a eficiência da tecnologia através do tempo. A implementação de tais programas tem como foco monitorar pragas-alvo em que a perda da sensibilidade da praga afetaria diretamente o uso da tecnologia. Independentemente do método utilizado, ele precisa ser eficiente e estar inserido em um plano de ação realista, consistindo em um componente essencial para a detecção e caracterização da resistência<sup>88</sup>.

No caso de desenvolvimento de resistência a culturas Bt, mesmo com esses cuidados de manejo, deve haver apenas um impacto limitado aos produtos formulados à base de Bt, uma vez que os mercados estão quase que completamente segregados. Os maiores mercados para produtos formulados de Bt estão em frutas, hortaliças e florestas, sendo que nenhum destes atualmente possui espécies cultivadas que expressem proteínas Bt. Alternativamente, milho, algodão, batata e arroz, que têm sido transformados com genes Bt, são raramente pulverizados com formulações Bt. Atualmente, o milho-doce Bt tem crescido nos Estados Unidos, embora isso represente

menos que 5% do total do mercado de milho-doce e menos que 1% do total do mercado do milho<sup>65</sup>.

O processo de evolução da resistência é um caso típico de seleção darwiniana, no qual a constante pressão de seleção, exercida pelas estratégias de controle de pragas, eleva a frequência de detecção de indivíduos pré-adaptados já existentes dentro da população. Essas populações muitas vezes possuem variação genética natural que interfere na resposta a uma toxina. Alelos que conferem suscetibilidade e outros que conferem resistência estão presentes naturalmente dentro dessa variabilidade genética. Consequentemente, diferenças na sobrevivência ou na fecundidade de indivíduos dentro dessas populações são passíveis de serem observadas quando estas são expostas a diferentes estratégias de controle, podendo levar à seleção de indivíduos resistentes a tais práticas. Contudo, uma espécie pode apresentar baixa suscetibilidade a uma determinada toxina, sem que isso seja um processo de evolução de resistência. A simples detecção de alelos de resistência sem a demonstração da elevação na sua frequência também não corresponde a um processo evolucionário. Na prática, para populações de campo, a resistência ocorre quando o número de insetos resistentes é suficiente para causar danos econômicos semelhantes àqueles causados por indivíduos suscetíveis em uma variedade da cultura não resistente ao inseto<sup>136</sup>.

Um elemento-chave para estimar a taxa de evolução da resistência numa população exposta a um inseticida é a frequência inicial de alelos de resistência. Entretanto, estimar isso não é simples, uma vez que muitos alelos de resistência são recessivos e a frequência deles é muito baixa antes que a resistência se torne evidente<sup>89</sup>. A lei da genética das populações nos diz que, em um cenário ideal, a frequência de alelos de resistência recessivos ( $q$ ) é a raiz quadrada da frequência de indivíduos resistentes ( $q^2$ )<sup>137</sup>.

$$\text{(Equação 21.1)} \quad q = \sqrt{f(aa)}$$

O problema prático para a aplicação dessa lei na estimativa da frequência inicial dos alelos de resistência é que, em populações não previamente expostas a inseticidas, a frequência de insetos resistentes homozigotos pode ser tão baixa que na prática podemos estar inaptos a detectá-los<sup>89</sup>.

Uma estimativa indireta da frequência desses alelos pode ser obtida por meio de experimentos de seleção em laboratório que conseguiram constatar a resistência. Nesses casos, pelo menos uma cópia do alelo de resistência tem que estar presente no início da seleção (a não ser que este apareça por mutação durante a seleção, e isto é considerado um evento muito improvável).

Experimentos de seleção a partir de coletas de 100 até 700 indivíduos do campo mostraram que a frequência dos alelos de resistência nas populações originais possa ser estimada em aproximadamente<sup>90,91</sup>  $5 \times 10^{-3}$ . Entretanto, temos de ser cautelosos com as estimativas obtidas com essa abordagem, já que os valores podem ser superestimados se não considerarmos que outras tentativas de seleção nessas mesmas populações levaram a resultados mal sucedidos<sup>92</sup>, ou se as populações foram previamente expostas ao Bt inadvertidamente, como infestação natural ou devido a tratamentos com bioinseticidas<sup>93</sup>. Essa abordagem direta tem como principal desvantagem o fato de ser aplicável somente a alelos recessivos, cujo locus para colônia de laboratório é homozigótica para resistência, já que alelos recessivos em qualquer outro locus escapam da detecção.

Uma abordagem diferente baseia-se em testar para resistência a progênie F2 de insetos coletados em campo. Já que muitos alelos recessivos são carregados em heterozigose, a progênie F2 permite a detecção do alelo recessivo em homozigose. O método de busca em F2 é de longe mais sensível (mais de dez vezes) do que um ensaio de dose discriminante para detecção de traços recessivos e não requer obtenção prévia de uma colônia resistente de laboratório<sup>94</sup>.

Recentemente, devido ao conhecimento acumulado nas bases genéticas da resistência, buscas baseadas em DNA têm sido aplicadas para estimar a frequência dos alelos de resistência em populações de campo. Em contraste com as estimativas prévias, menores frequências têm sido obtidas usando a abordagem molecular. A razão para isso pode ser que a abordagem molecular detecta somente a frequência do gene testado, enquanto as estimativas por outros métodos podem ser influenciadas por outros genes de resistência<sup>95,96</sup>.

Em contraste aos alelos recessivos, alelos não recessivos (dominantes ou parcialmente dominantes) podem ser detectados tanto em indivíduos homozigotos quanto heterozigotos. Um teste de desafio de toxina é suficiente para determinar se a progênie de fêmeas coletadas no campo carrega alelos de resistência ou não<sup>97</sup>.

Insetos podem, em princípio, se tornar resistentes a proteínas Cry devido a mutações em genes que codificam proteínas envolvidas em quaisquer dos diferentes passos no modo de ação. Vários mecanismos têm sido observados em linhagens de insetos selecionados em laboratório, assim como ligações alteradas aos receptores do intestino médio, ativação de protoxina alterada, degradação da toxina, reparo ou troca mais eficiente das células do intestino médio danificadas, sequestro de esterase e elevado *status* de imunidade<sup>8,98</sup>.

A resistência de insetos a toxinas inseticidas é uma questão pré-adaptativa, e a avaliação do seu potencial de risco de evolução requer que se conheça o padrão de herança dessa característica. De acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (lei que fundamenta o estudo da genética de populações) indivíduos heterozigotos são os principais carregadores dos alelos de resistência, principalmente nas etapas iniciais do processo. Nos casos em que o padrão de herança desse caráter é recessivo, a mortalidade dos heterozigotos é semelhante à dos homozigotos suscetíveis, e como resultado temos uma baixa sobrevivência desses indivíduos. No entanto, a recessividade do caráter resistência não deve ser generalizada, havendo alguns casos nos quais ela pode ser dominante. Nesses casos, sua detecção só seria conhecida após a evolução da resistência em condições de campo ou por seleção de indivíduos resistentes em laboratório. Garantir a mortalidade dos indivíduos heterozigotos através da expressão de toxinas inseticidas em altas doses nas plantas GM é uma das estratégias mais amplamente utilizadas para retardar a evolução da resistência. Nesse caso, o padrão recessivo para herança da resistência é fundamental para o sucesso dessa estratégia<sup>99,136,137</sup>.

Conhecer o inseto-praga alvo de controle da planta GM é essencial para elaboração de estratégias de manejo eficientes. Alguns aspectos bioecológicos devem ser observados, como taxa efetiva de movimento das larvas entre as plantas da cultura, capacidade de dispersão dos adultos, hábito alimentar e frequência de utilização de hospedeiros alternativos como fonte de abrigo ou alimento<sup>99</sup>. Também é importante observar a variedade de sistemas na qual a cultura GM está inserida e suas características particulares, pois estas influenciarão o comportamento populacional da praga. No Brasil, o plantio de milho e algodão em áreas vizinhas ou de forma sucessiva é um bom exemplo. Essas duas culturas apresentam pragas em comum, o que afetará a forma de exploração de ambas as atividades<sup>99</sup>. Nos Estados Unidos, essas características influem diretamente na recomendação das áreas de refúgio<sup>100,101</sup>.

A eficiência de controle de indivíduos heterozigotos, e consequentemente a probabilidade de seleção de indivíduos resistentes, é diretamente influenciada pela dose e o número de toxinas utilizadas no controle desses insetos. Utilizar a estratégia de altas doses de inseticidas sintéticos para o manejo de resistência de insetos se mostrou inviável por problemas práticos, como elevação do custo de produção e o amplo espectro de ação, que acaba por afetar também insetos benéficos, além de colocar em risco a saúde do trabalhador e do consumidor. Plantas transgênicas expressando altas doses de toxinas Bt possibilitaram a adoção dessa estratégia nos programas de manejo da resistência, considerando-se como alta dose a expressão da toxina na planta 25

vezes acima da necessária para controlar 99% da população suscetível da praga. Além disso, o acompanhamento da atividade inseticida dos eventos transgênicos ao longo do seu desenvolvimento e da expressão das toxinas nos diferentes tecidos das plantas são pontos fundamentais que influenciarão a eficiência de controle; dessa forma, seu conhecimento é importante para a elaboração correta de um plano de manejo de resistência. Durante o desenvolvimento das plantas podem ocorrer variações na expressão de suas toxinas, acarretando uma maior probabilidade de aumento na pressão de seleção para indivíduos resistentes quando a concentração das toxinas oscilar a níveis inferiores ao necessário para matar os indivíduos heterozigotos, ponto crítico para o sucesso dessa estratégia<sup>99</sup>.

Programas de manejo da resistência são elaborados com o objetivo de se evitar, retardar, ou mesmo reverter o quadro de evolução da resistência. Para isso, algumas estratégias podem ser adotadas, como o uso de plantas expressando altas doses das toxinas simultaneamente ao plantio de áreas de refúgio, o uso de plantas com mais de um gene Bt, a exploração simultânea de diferentes toxinas Bt em vários híbridos ou variedades comerciais de plantas GM e o uso de plantas com expressão das toxinas direcionadas para determinados tecidos ou estágios fenológicos. Também existe a possibilidade de uso da estratégia de baixa dose, mesmo que pouco difundida<sup>65</sup>.

Como já mencionamos, a principal estratégia adotada é a expressão de toxinas em altas doses, o que só foi possível com o avanço da engenharia genética, que possibilitou manipulações específicas na sequência de DNA dos genes de Bt inseridos nas plantas. Conciliando a estratégia de altas doses com o plantio de áreas de refúgio, indivíduos que eventualmente possam sobreviver na cultura GM encontrarão uma quantidade maior de indivíduos provenientes das áreas de refúgio. Dos possíveis cruzamentos, qualquer alelo de resistência tende a se dissipar. No entanto, para que essa premissa seja atendida, as áreas de refúgio devem ser suficientemente atrativas para oviposição da praga, admitindo-se que o número de insetos homozigotos suscetíveis deva ultrapassar a soma do número de heterozigotos e homozigotos resistentes em uma proporção maior ou igual<sup>102</sup> a 500:1. Além disso, outros pontos importantes são: a emergência dos adultos da área de cultura GM e da área de refúgio deve estar sincronizada para garantir o acasalamento aleatório entre indivíduos da população suscetível com indivíduos resistentes e o refúgio deve ter localização, distância e disposição de forma a garantir o contato entre as duas populações. A localização das áreas de refúgio deve ser determinada pela capacidade de dispersão e locomoção da praga<sup>50,102,103,104,105</sup>.

Conforme dito anteriormente, outra estratégia mais recentemente utilizada é a adoção de plantas piramidadas expressando dois ou mais genes com ação inseticida. O modo de ação dessas toxinas deve ser bioquimicamente distinto e com baixo potencial de resistência cruzada<sup>83,85</sup>. Diversos modelos matemáticos aplicados demonstraram que a expressão de duas ou mais toxinas garante a maior durabilidade da tecnologia, em relação do emprego de plantas contendo apenas uma toxina<sup>106,107</sup>.

Programas de manejo de resistências devem ser proativos, e o monitoramento da suscetibilidade das populações de insetos-praga alvos de controle é muito importante. Primeiramente, deve-se estabelecer a resposta natural de populações geograficamente distintas dos insetos-praga às toxinas Bt, estabelecendo linhas básicas de suscetibilidade antes que a cultura GM seja liberada comercialmente no campo. Em seguida, o acompanhamento sistemático da suscetibilidade das populações nessas regiões deve ser feito, preferencialmente através de concentrações diagnósticas ou discriminatórias, sendo o método de bioensaios por concentrações diagnósticas o recomendado pela Environmental Protection Agency (EPA) para monitoramento nos Estados Unidos. Acredita-se que esse método possua eficiência de detecção da resistência quando a frequência dos alelos atingir 1%, ponto no qual já são observadas falhas de controle da tecnologia em campo<sup>108</sup>.

A detecção de alelos extremamente raros em populações de insetos-praga pode ser realizada também pela técnica do *F2 Screen*, que a partir de um número muito menor de indivíduos coletados no campo permite a detecção de alterações na suscetibilidade<sup>94</sup>.

As coletas para acompanhamento da suscetibilidade devem considerar também os diferentes regimes de seleção aos quais os insetos-praga são expostos, como as diversas culturas e sistemas de produção. Áreas que exercem maior pressão de seleção devem ser criteriosamente amostradas.

De fato, o uso dessa tecnologia influenciou diretamente o tamanho e modo de implementação das áreas de refúgio norte-americanas. O uso de mistura de sementes (*refuge in the bag*), já em estudo no Brasil, foi aprovado recentemente nos Estados Unidos, para a região conhecida como Cinturão do Milho (*Corn Belt*), onde não se planta algodão em sucessão quando é utilizado o milho Bt “piramidado” em mistura com milho convencional<sup>67,101</sup>. Antes implantada em faixas, blocos ou bordaduras, a estratégia de refúgio em mistura de sementes é considerada uma alternativa para a falta de adoção da recomendação de refúgio por parte dos agricultores. Um levantamento realizado no início dos anos 2000 indicou que 25% dos produtores de híbridos de milho Bt norte-americanos não seguiam as especificações

corretas de refúgio<sup>109</sup>. O uso correto de refúgio estruturado caiu de 85% em 2003 para 61% no ano de 2009<sup>110</sup>. Os principais fatores negativos relacionados ao refúgio foram o trabalho adicional com o plantio e menor retorno econômico para os agricultores em relação ao cultivo transgênico<sup>111,112</sup>. A situação ainda se agrava em países onde o cumprimento das especificações de refúgio e/ou infraestrutura estão sendo discutidas<sup>92</sup>. Nesse caso, com o uso da estratégia de mistura das sementes, a adoção das especificações de refúgio não é mais responsabilidade dos produtores, e sim das empresas que comercializam as sementes<sup>113</sup>.

## 21.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso de plantas transgênicas expressando genes Bt mostrou ser uma importante ferramenta para o controle de insetos-praga nas principais culturas de interesse agrícola, além de reduzir substancialmente a dependência de defensivos químicos e exercer um impacto positivo no ambiente. Apesar de existir casos de resistência a algumas toxinas comercializadas atualmente, apenas um número limitado de toxinas foram introduzidas nessa tecnologia<sup>8</sup>. Novas cepas de *Bt* são regularmente reportadas na literatura<sup>86,114,115</sup>, principalmente através do uso de métodos proteômicos, que permitem a triagem de novas toxinas em grande escala<sup>7</sup>. Em adição, a próxima geração de plantas Bt irá expressar dois ou mais genes na mesma planta, controlando insetos de diferentes ordens e/ou atuando em mais de um modo de ação da mesma espécie. Isso também reduzirá a possibilidade de desenvolvimento de resistência da praga-alvo. Um melhor entendimento do modo de ação das toxinas e também como os insetos respondem às diferentes proteínas permitirá o avanço no desenvolvimento de culturas Bt e bioinseticidas mais eficientes<sup>8</sup>.

Juntamente com o avanço do uso de genes Bt para o controle de pragas, outras abordagens vêm sendo pesquisadas, e, recentemente, a utilização de RNA de interferência (RNAi) é considerada uma alternativa promissora aos métodos atuais de controle. O uso dessa tecnologia não só se provou eficiente com insetos das ordens Diptera<sup>117</sup>, Lepidoptera<sup>118,119</sup>, Coleoptera<sup>120,121</sup> e Hymenoptera<sup>122</sup>, mas também com insetos sugadores<sup>120,123</sup>, contra os quais ainda não existem toxinas Bt eficazes<sup>127</sup>. A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, iniciado através da introdução de RNA fita dupla (dsRNA) em uma célula<sup>124,125</sup>, ou seja, é uma regulação negativa ou *knockdown* de um gene específico envolvendo a

degradação de um RNA mensageiro-alvo (mRNA)<sup>126,127</sup>. Esse dsRNA pode reduzir a transcrição de um gene-alvo quando injetado num organismo ou introduzido em células de cultura<sup>126</sup>. Inicialmente detectada em plantas<sup>127,128</sup>, essa tecnologia vem sendo continuamente estudada em invertebrados, em particular *Caenorhabditis elegans*<sup>129,130,131</sup> e células S2 de *Drosophila* sp.<sup>132,133</sup>, através da injeção do dsRNA na célula ou pela ingestão do dsRNA inserido na dieta. O uso do dsRNA no controle de insetos, através da absorção pela alimentação ou aplicação tópica, atua no silenciamento de genes essenciais para sua sobrevivência, induzindo o cessamento da alimentação e morbidade do inseto<sup>120</sup>. Seu efeito *knockdown* tornou-se uma importante ferramenta para estudar a função de genes em diversos organismos. Adicionalmente, essa técnica tem levado ao desenvolvimento de novos métodos de controle de insetos-praga em importantes culturas agrônômicas, como resultado da engenharia genética de plantas que possam expressar o dsRNA<sup>127</sup>.

Apesar das inúmeras pesquisas de sucesso do uso de RNAi em diferentes organismos e no controle de insetos, vários aspectos, como via de contaminação, riscos para organismos não alvo, disponibilidade/expressão na planta, concentração a ser aplicada e até mesmo o desenvolvimento de insetos resistentes à tecnologia ainda limitam sua praticidade em campo. Sua eficácia em longo prazo só poderá ser estabelecida após extensa experimentação no campo<sup>127</sup>.

Dentre as possíveis abordagens, a mais promissora é a utilização de plantas transgênicas expressando dsRNA com efeito *knockdown* em genes essenciais para a sobrevivência do inseto. No entanto, seu potencial promissor ainda depende da identificação de genes-alvo que possam matar ou inibir a resistência do inseto a alguma toxina. Plantas com genes piramidados consistem em outra opção de controle de insetos, uma vez que o silenciamento de um único gene pode não resultar na morte do inseto<sup>127</sup>.

Ainda que possua especificidade a uma espécie ou grupo de espécies relacionadas, seu uso como pesticida dependerá dos efeitos exercidos contra organismos não alvos, sendo possivelmente esta uma das maiores limitações dessa técnica. Diferentes métodos de aplicação podem ser considerados, como a pulverização de um ou mais tipos de dsRNAs condicionados a determinada etapa do ciclo da planta ou tecido que se encontre vulnerável a uma determinada praga, ou insetos que aparecem em sucessão<sup>127</sup>. Tais formulações de dsRNA cruas já mostraram eficiência no silenciamento de genes de vírus de plantas, além de apresentarem estabilidade residual por diversos dias<sup>134</sup>.

Até o momento, o uso de plantas Bt é um dos principais e mais eficientes métodos de controle alternativo ao controle químico. No entanto, em função dos casos de resistência a toxinas Bt já relatados na literatura, faz-se necessária a busca contínua por alternativas sustentáveis de controle de pragas.

## 21.6 CONCLUSÃO

Devido ao constante avanço na tecnologia aplicada ao controle de pragas, os insetos vivem sob contínua pressão de seleção pelos métodos empregados. Por muitos anos, o controle químico representou a principal ferramenta no controle de pragas na agricultura. No entanto, seu uso contínuo e indiscriminado ocasionou diversos efeitos prejudiciais ao produtor, consumidor e ambiente. Diante disso, a busca por alternativas sustentáveis em relação ao controle químico vem sendo estimulada, e o uso de Bt mostra-se eficiente e viável no manejo de insetos-praga.

Após várias décadas do início de sua utilização na agricultura, seja através de biopesticidas ou cultivos transgênicos, os resultados são extremamente positivos e vantajosos, principalmente em termos de segurança, eficácia e benefícios ambientais. Esses benefícios trouxeram grandes avanços econômicos tanto para os países em desenvolvimento quanto para os mais industrializados.

O grande potencial de aplicação da tecnologia de plantas Bt no Brasil traz consigo de maneira essencial a necessidade de elaboração e execução de programas de manejo de resistência efetivos para a manutenção da garantia da vida útil dessa tecnologia no país. É responsabilidade das empresas detentoras dessa tecnologia promover a conscientização de seus clientes sobre a importância das áreas de refúgio e do monitoramento da resistência. Por fim, há ainda de se pensar em planos para contenção, caso sejam detectados aumentos nos níveis de resistência em determinadas populações de insetos.

## REFERÊNCIAS

1. Devine GJ, Furlong MJ. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values*. 2007;24:281-306.
2. Milner RJ. History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1994;49:9-13.
3. Garczynski SF, Siegel JP. Bacteria. In: Lacey LA, Kaya HK, editors. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests*, 2nd edition, Dordrecht: Kluwer; 2007. p. 175-97.
4. Mattes O. Parasitäre Krankheiten der Mehlmottenlarven und Versuche über ihre Verwendbarkeit als biologisches Bekämpfungsmittel. (Zugleich ein Beitrag zur Zytologie der Bakterien). *Gesellschaft für Befreiung der Naturwissenschaften Sitzber Marburg*. 1927;62:381-417.
5. Husz B. Experiments during 1931 on the use of *Bacillus thuringiensis* Berliner in controlling the corn borer. *International Corn Borer Investigation Reports*. 1931;4:22-3.
6. Beegle CC, Yamamoto T. History of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) research and development. *Canadian Entomologist*. 1992;124:584-616.
7. Sanahuja G, Banakar R, Twyman RM, Capell T, Christou P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*. 2011;9:283-300.
8. Bravo A, Likitvatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;41:423-31.
9. Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, Nye GJ, Craig JA, Koziel MG. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1996;93:5389-94.
10. Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Van Rie J, Escriche B, Ferré J. Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2013;113:78-81.
11. Takhore Y. The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*. 2006;2:194-208.
12. James C. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Briefs 51. Ithaca: GM Crops; 2015.
13. Barfoot P, Brookes G. Key environmental impacts of global genetically modified (GM) crop use 1996-2012. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain*. 2013;5:2
14. Gill SS, Cowles EA, Pietrantoni PV. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*. 1992;37:615-36.

15. Lee MK, You TH, Gould FL, Dean DH. Identification of Residues in Domain III of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Toxin That Affect Binding and Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65:4513-20.
16. Bravo A, Gill SS, Soberon M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*. 2007;49:423-35.
17. Crickmore N, Baum J, Bravo A, Lereclus D, Narva K, Sampson K, Schnepf E, Sun M, Zeigler DR. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature [Internet] [Cited 2016 April 20]. Available from: <http://www.btnomenclature.info/>.
18. 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. *Appl Microbiol*. 2004;97:757-65.
19. Sampurna S, Maiti MK. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J Microbiol Biotechnol*. 2011;21:937-46.
20. Milne R, Liu Y, Gauthier D, Van Frankenhuyzen K. Purification of Vip3Aa from *Bacillus thuringiensis* HD-1 and its contribution to toxicity of HD-1 to spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) and gypsy moth (*Lymantria dispar*) (Lepidoptera). *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008;99:166-72.
21. Farkas J, Sebesta K, Horska K, Samek Z, Dolejs L, Sorm F. Structure of thuringiensin, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Collect Czech Chem Commun*. 1976;42:909-29.
22. Copping LG, Menn JJ. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management*. 2000;56:651-76.
23. Knowles B. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal d-endotoxins. *Advances in Insect Physiology*. 1994;24:275-308.
24. Aronson AI, Beckman W, Dunn P. *Bacillus thuringiensis* and related insects pathogens. *Microbiological Reviews*. 1986;50:1-24.
25. Von Tersch MA, Slatin SL, Kulesza CA, English LH. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:3711-7.
26. Boonserm P, Mo M, Angsuthanasombat C, Lescar J. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *Journal of Bacteriology*. 2006;188:3391-401.
27. Lee MK, Young BA, Dean DH. Domain III exchanges of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins affect binding to different gypsy moth midgut receptors. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1995;216:306-12.
28. Knowles BH, Dow JAT. The crystal d-endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays*. 1993;15:469-76.

29. Lee MK, Curtiss A, Alcantara EA, Dean DH. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:583-6.
30. Ameen AO, Fuxa JR, Richter AR. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa Zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological Science*. 1998;33:129-35.
31. Maagd RA, Bravo A, Berry C, Crickmore N, Schnepf HE. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet*. 2003;37:409-33.
32. Bravo A. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin family proteins and their functional domains. *J Bacteriol*. 1997;179:2793-801.
33. Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla Jr. LA. Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R1 expressed in insect cells. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12:1407-16.
34. Parker MW, Feil SC. Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*. 2005;88:91-142.
35. Soberón M, López-Díaz JA, Bravo A. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*. 2013;41:87-93.
36. Thomas WE, Ellar DJ. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* insecticidal-endotoxin. *FEBS Lett*. 1983;154:362-8.
37. Knowles BH, White PJ, Nicholls CN, Ellar DJ. A broad-spectrum cytolytic toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. *Proc R Soc Ser B*. 1992;248:1-7.
38. Promdonkoy B, Ellar DJ. Investigation of the pore forming mechanism of cytolytic-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem J*. 2003;374:255-9.
39. Butko P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:2415-22.
40. Sayyed AH, Crickmore N, Wright DJ. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5859-61.
41. Warren GW, Koziel MG, Mullins MA, inventors. Novel pesticidal proteins and strains. World Intellectual Property Organization 1996. Patent WO 96/10083.
42. Yu X, Zheng A, Zhu J, Wang S, Wang L, Deng Q, Li S, Liu H, Li P. Characterization of Vegetative Insecticidal Protein vip genes of *Bacillus thuringiensis* from Sichuan Basin in China. *Curr Microbiol*. 2011;62:752-757.
43. Lee MK, Miles P, Chen JS. Brush border membrane binding properties of *Bacillus thuringiensis* Vip3A toxin to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* midguts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339:1043-7.

44. Sena JA, Hernández-Rodríguez CS, Ferré J. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1 and Vip3A proteins with *Spodoptera frugiperda* midgut binding sites. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:2236-7.
45. Lee MK, Walters FS, Hart H, Palekar N, Chen JS. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3Aa differs from that of Cry1Ab delta-endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 2003;269:4648-57.
46. Selvapandiyam A, Arora N, Rajagopal R, Jalali SK, Ven Katesan T, Singh SP, Bhatnagar RK. Toxicity analysis of N- and C-terminus-deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2001;67:5855-8.
47. Rang C, Gil P, Neisner N, Van Rie J, Frutos R. Novel Vip3-related protein from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2005;71:6276-81.
48. Raybould A, Quemada H. Bt crops and food security in developing countries: realised benefits, sustainable use and lowering barriers to adoption. *Food Sec.* 2010;2:247-59.
49. Ferré J, Van Rie J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:501-33.
50. Tabashnik BE, Van Rensburg JBJ, Carrière Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. *J Econ Entomol.* 2009;102:211-25.
51. Van Frankenhuyzen K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *J Invertebr Pathol.* 2009;101:1-16.
52. Bepalhok FJC, Guerra EP, Oliveira R. Introdução ao Melhoramento de Plantas [Internet]. [Cited 2012 Mar 15]. Available from: <http://www.bespa.agrarias.ufpr.br/paginas/livro/capitulo%201.pdf>.
53. Murphy AF, Ginzler MD, Krupke CH. Evaluating western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) emergence and root damage in a seed mix refuge. *Journal of Economic Entomology.* 2010;103:147-57.
54. Liu BTB, Tabashnik BE, Dennehy TJ, Patin AL, Bartlett AC. Development time and resistance to Bt crops. *Nature.* 1999;400:519.
55. Liu BTB, Tabashnik BE, Meyer SK, Carrière BT, Bartlett AC. Genetics of pink bollworm resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Journal of Economic Entomology.* 2001;94:248-52.
56. Tabashnik BE, Liu BTB, Dennehy TJ, Sims MA, Sisterson MS, Biggs RBT, Carrière BT. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Economic Entomology.* 2002;95:1018-26.
57. Whalon ME, Miller DL, Hollingworth RM, Grafius EJ, Miller JR. Selection of a Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) strain resistant to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology.* 1993;86:226-33.
58. Matten SR, Head GP, Quemada HD. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops into IPM programs. In: Romeis J, Shelton AM,

- Kennedy GGS, editors. Integration of Insect- Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. New York: Springer; 2008. p. 27-39.
59. Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. *J Econ Entomol.* 2010;103:1031-8.
60. Shelton AM, Zhao JZ, Roush RT. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology.* 2002;47:845-81.
61. Van Rensburg JBJ. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *S African J Plant Soil.* 2007;24:147-51.
62. Dhurua S, Gujar GT. Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* Saunders (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. *Pest Manag. Sci.* 2011;67:898-903.
63. Gassmann AJ, Petzold-Maxwell J, Keweshan RS, Dunbar M. Field-evolved resistance to Bt maize by western corn rootworm. *PLoS ONE.* 2011;6:22-9.
64. Flanders KL. Corn. 2014 [Cited 2014 May 20]. In: Alabama pest management book [Internet]. Alabama A&M and Auburn Universities. Available from: <http://www.aces.edu/pubs/docs/A/ANR-0500-A/ANR-0500-A.pdf>.
65. Ferré J, Van Rie J, MacIntosh SC. Insecticidal Genetically Modified Crops and Insect Resistance Management (IRM). In: Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs. Dordrecht: Springer; 2008. p. 41-85.
66. James C. Global status of commercialized biotech. ISAAA Briefs 41. Ithaca: GM Crops; 2009.
67. Monsanto. IRM grower guide: Insect resistance management for U.S. corn and cotton-growing áreas [Internet]. 2012. Available from: <http://www.monsanto.com/products/Pages/insectresistance-management.aspx>.
68. Soberón M, Gill SS, Bravo A. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:1337-49.
69. Kinsinger RA, McGaughey WH. Susceptibility of populations of Indian meal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology.* 1979;72: 346-9.
70. McGaughey WH. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science.* 1985;229:193-5.
71. McGaughey WH, Beeman RW. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of Indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology.* 1988;81:28-33.
72. Stone TB, Sims SR, Marrone PG: Selection of tobacco budworm for resistance to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Journal of Invertebrate Pathology.* 1989;53:228-34.

73. Whalon ME, McGaughy WH. *Bacillus thuringiensis*: Use and resistance management. In: Ishaaya I, Degheele D, editors. *Insecticides with Novel Modes of Action*. New York: Springer; 1998. p. 106-37.
74. Kirsch K, Schmutterer H. Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* (Berl.) formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) in the Philippines. *Journal of Applied Entomology*. 1988;105:249-55.
75. Tabashnik BE, Cushing NL, Finson N, Johnson M. Field Development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*. 1990;83:1671-6.
76. Zobelein G. Twenty-three year surveillance of development of insecticide resistance in diamondback moth from Thailand (*Plutella xylostella* L., Lepidoptera, Plutellidae). *Mededelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit*. 1990;55:313-22.
77. Ferré J, et al. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1991;88:5119-23.
78. Song SS. Resistance of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.: Yponomeutidae: Lepidoptera) against *Bacillus thuringiensis* Berliner. *Korean Journal of Applied Entomology*. 1991;30:291-3.
79. Tanaka H, Kimura Y. Resistance to Bt formulation in diamondback moth, *Plutella xylostella* L., on watercress. *Japanese Journal of Economic Entomology and Zoology*. 1991;35:253-5.
80. Tang JD, Shelton AM, Van Rie J, De Roeck S, Moar WJ, Roush RT, Peferoen M. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* spore and crystal protein to resistant diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:564-9.
81. Iriarte J, Bel BT, Ferrandis M, Andrew R, Murillo J, Ferré J, Caballero P. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. *Systematic and Applied Microbiology*. 1998;21:97-106.
82. Moar BTJ, Pusztai-Carey M, Van Faassen BT, Frutos R, Rang C, Luo K, Adang MJ. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:2086-92.
83. Ghimire MN, Huang F, Leonard RB, Head GP, Yang Y. Susceptibility of Cry1Absusceptible and—resistant sugarcane borer to transgenic corn plants containing single or pyramided *Bacillus thuringiensis* genes. *Crop Protect*. 2011;30:74-81.
84. Burkness EC, Dively G, Patton T, Morey AC, Hutchison WD. Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions. *GM Crop*. 2010;1:1-7.
85. Niu Y, Meagher Jr. RL, Yang F, Huang F. Susceptibility of Field Populations of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Florida and Puerto Rico to Purified

Cry1f Protein and Corn Leaf Tissue Containing Single and Pyramided Bt Genes. Florida Entomologist. 2013;96:701-13.

86. Wang G, Zhang J, Song F, Gu A, Uwais A, Shao T, Huang D. Recombinant *Bacillus thuringiensis* strain shows high insecticidal activity against *Plutella xylostella* and *Leptinotarsa decemlineata* without affecting non-target species in the field. J Appl Microbiol. 2008;105:1536-43.

87. Ibargutxi MA, Estela A, Ferré J, Caballero P. Use of *Bacillus thuringiensis* toxins for control of the cotton pest *Earias insulana* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). Applied and Environmental Microbiology. 2006;72:437-42.

88. Siegfried BD, Spencer T, Crespo AL, Storer NP, Head GP, Owens ED, Guyer D. Ten years of Bt resistance monitoring in the European corn borer. Am Entomol. 2007;53:208-14.

89. Tabashnik BE, Patin AL, Dennehy TJ, Liu YB, Carrière Y, Sims MA, Antilla L. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2000;97:12980-4.

90. Gould F, Martínez-Ramírez A, Anderson A, Ferré J, Silva FJ, Moar WJ. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 1992;89:7986-90.

91. Gould F, Anderson A, Reynolds A, Bumgarner L, Moar W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Journal of Economic Entomology. 1995;88:1545-59.

92. Gould F. Deploying pesticidal engineered crops in developing countries. In: Persley GJ, editor. Biotechnology and Integrated Pest Management. Wallingford: CABI; 1996, p. 264-293.

93. Estada U, Ferré J. Binding of insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. Applied and Environmental Microbiology. 1994;60:3840-6.

94. Andow DA, Alstad DN. The F2 screen for rare resistance alleles. Journal of Economic Entomology. 1998;91:572-8.

95. Tabashnik BE, Fabrick JA, Henderson S, Biggs RW, Yafuso CM, Nyboer ME, Manhardt NM, Coughlin LA, Sollome J, Carrière Y, Dennehy TJ, Morin S. DNA screening reveals pink bollworm resistance to Bt cotton remains rare after a decade of exposure. J Econ Entomol. 2006;99:1525-30.

96. Gahan LJ, Gould F, López Jr. JD, Micinski S, Heckel DG. A polymerase chain reaction screen of field populations of *Heliothis virescens* for a retrotransposon insertion conferring resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. J Econ Entomol. 2007;100:187-94.

97. Burd AD, Gould F, Bradley JR, Van Duyn JW, Moar WJ. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. *J Econ Entomol.* 2003;96:137-42.
98. Tabashnik BE, Malvar T, Liu YB, Finson N, Borthakur D, Shin BS, Parks SH, Masson L, Maagd RA, Bosh D. Cross resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domains II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:2839-44.
99. Martinelli O, Omoto C. Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2005;34:67-77.
100. Pioneer. Insect Resistance Management for Bt Corn Borer and Corn Rootworm Products [Internet]. [Cited 2012 Feb 3]. Available from: [https://www.pioneer.com/CMRoot/pioneer/us/products/stewardship/irm\\_brochure\\_2015.pdf](https://www.pioneer.com/CMRoot/pioneer/us/products/stewardship/irm_brochure_2015.pdf).
101. Wangila DS, Leonard BR, Ghimire MN, Bai Y, Zhang L, Yang Y, Emfinger KD, Head GP, Yang F, Niu Y, Huang F. Occurrence and larval movement of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) in seed mixes of non-Bt and Bt pyramid corn. *Pest Manag. Sci.* 2013;69:1163-1172.
102. EPA (Environmental Protection Agency). FIFRA scientific advisory panel, subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant pesticides and resistance management [Internet]. [Cited 1998 Apr 28]. Available from: <http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/1998/february/finalfeb.pdf>
103. EPA (Environmental Protection Agency). Introduction to biotechnology regulation for pesticides: insect resistance management in Bt crops [Internet]. [Cited 2008 May 2]. Available from: <http://www.epa.gov/oppbpp1/biopesticides/regtools/biotech-reg-prod.html>
104. Tabashnik BE, Carrière Y, Dennehy TJ, Morin S, Sisterson MS, Roush RT, Shelton AM, Zhao JZ. Insect Resistance to transgenic Bt crops: lessons from the laboratory and field. *J Econ Entomol.* 2003;96:1031-8.
105. López C, Hernández-Escareño G, Eizaguirre M, Albajes R. Antixenosis and larval and adult dispersal in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, in relation to Bt maize. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* 2013;149:256-64.
106. Roush RT: Bt-transgenic crops: Just another pretty insecticide or a chance for a new start in resistance management? *Pesticide Science.* 1997;51:328-34.
107. Zhao JZ, Cao J, Li Y, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. *Nature Biotechnology.* 2003;21:1493-7.
108. USEPA/USDA (United States Environmental Protection Agency/ United States States Department of Agriculture). EPA/USDA Position Paper on Insect Resistance Management for Bt Crops 1999, Docket Number: D-16122A (posted 1999 Aug 26).

109. Jaffe G. Complacency on the farm: significant noncompliance with the EPA's refuge requirements threatens the future effectiveness of genetically engineered pest-protected corn [Internet]. [Cited 2014 May 1]. Washington: Center for Science in the Public Interest. Available from: <http://cspinet.org/new/pdf/complacencyonthefarm.pdf>.
110. Dunlop G. Bt Corn IRM Compliance in Canada [Internet]. [Cited 2009 May 15]. Available from: [http://www.cornpest.ca/tasks/sites/default/assets/File/2009\\_BT\\_Corn\\_IRM\\_Compliance\\_Study\\_CCPC\\_Report\\_Final.pdf](http://www.cornpest.ca/tasks/sites/default/assets/File/2009_BT_Corn_IRM_Compliance_Study_CCPC_Report_Final.pdf).
111. Mendelsohn M. *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (vector ZMIR13L) in event MON 863 corn & *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in corn (006430,006484) fact sheet [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. 2006. Available from: [http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet\\_006484.htm](http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006484.htm).
112. Hurley TM, Kangrock I, Ostlie K. Estimating the benefits of Bt corn and cost of insect resistance management ex ante. *J Agr Resour Econ*. 2006;31:355-75.
113. Qureshi JA, Buschman L, Throne JE, Ramaswamy SB. Dispersal of adult *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) and its implications for corn borer resistance management in *Bacillus thuringiensis* maize. *Ann Entomol Soc Am*. 2006;99:279-91.
114. Sun Y, Park HW. Proteomic analysis of the crystal and spore mixture from *Bacillus thuringiensis* strains to search for novel mosquitocidal proteins. NCBI database. [Internet]. [Cited 2016 Nov 3]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/292398077>.
115. Zhang L, Huang E, Lin J, Gelbic I, Zhang Q, Guan Y, Huang T, Guan X. A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudata*. *Microbiol Res*. 2010;165:133-41.
117. Walshe DP, Lehane SM, Lehane MJ, Haines LR. Prolonged gene knockdown in the tsetse fly *Glossina* by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology*. 2009;18:11-9.
118. Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*. 2006;15:383-91.
119. Bautista MAM, Miyata T, Miura K, Tanaka T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39:38-46.
120. Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*. 2007;25:1322-6.

121. Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*. 2007;25:1307-13.
122. Nunes FMF, Simões ZLP. A non-invasive method for silencing gene transcription in honeybees maintained under natural conditions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;39:157-60.
123. Hughes CL, Kaufman TC. RNAi analysis of deformed, proboscipedia and sex combs reduced in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*: novel roles for Hox genes in the hemipteran head. *Development*. 2000;127:368-9.
124. Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002;418:244-51.
125. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature*. 2004;431:356-63.
126. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391:806-11.
127. Katoch R, Sethi A, Thakur N, Murdock LL. RNAi for insect control: current perspective and future challenges. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171:847-73.
128. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*. 1990;2:279-89.
129. Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExX box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*. 2002;109:861-71.
130. Tijsterman M, May RC, Simmer F, Okihara KL, Plasterk RH. Genes required for systemic RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*. 2004;14:111-6.
131. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. 2006;441:537-41.
132. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293-6.
133. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409:363-6.
134. Tenllado F, Llave C, Diaz-Ruiz JR. RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*. 2004;102:85-96.
135. Vanchon V, Laprade R, Schwartz JL. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2012;111:1-12.
136. Bernardi O, Albernaz KC, Valicente FH, Omoto C. Resistência de Insetos-Praga às Plantas Geneticamente Modificadas. In: Borém A, Almeida GD, editors. *Plantas*

geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais. Visconde do Rio Branco: Suprema; 2011. p. 181-207.

137. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science*. 1908;78:49-50.

138. Tabashnik BE, Zhang M, Fabrick JA, Wu Y, Gao M, Huang F, Wei J, Zhang J, Yelich A, Unnithan GC, Bravo A, Soberón M, Carrière Y, Li X. Dual mode of action of Bt proteins: protoxin efficacy against resistant insects. *Scientific Reports*. 2015; 5: 15107.

