

## CAPÍTULO 5.5

# Uso da transgenia para controle do bicudo-do-algodoeiro

**Rose Monnerat**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Roseane Cavalcanti dos Santos**

Embrapa Algodão

**Liziane Maria Lima**

Embrapa Algodão

**Morganna Pollyne Nóbrega Pinheiro**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Carliane Rebeca Coelho da Silva**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Carlos Marcelo Soares**

Instituto Mato-grossense do Algodão

## O problema bicudo

Introduzido no início da década de 1980, o bicudo (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) (Coleoptera: Curculionidae) é uma das principais pragas que atacam a cultura do algodoeiro no Brasil e nas Américas (Silvie *et al.*, 2013). Trata-se de um inseto fitófago, que apresenta metamorfose completa, elevado dinamismo

populacional e potencial de dano por usar estruturas reprodutivas para alimentação e oviposição (Santos *et al.*, 2002).

Na Região Centro-Oeste, especificamente no Estado de Mato Grosso, o controle do bicudo é realizado principalmente com inseticidas químicos, sendo necessárias entre 10 e 15 aplicações para manter as populações do inseto sob controle. O atraso na decisão de controle ou procedimentos inadequados pode comprometer até 70% da produção das fibras. Na safra 2013/2014, o custo de produção sofreu acréscimo de US\$ 100 a US\$ 150 por hectare e, em algumas zonas produtoras, foram necessárias até 25 aplicações de inseticidas (Canal Rural, 2014).

Todo esse impacto na cultura deve-se às estratégias que o inseto desenvolveu, que o tornou uma praga de difícil controle. Segundo entomologistas brasileiros e estrangeiros, trata-se de uma das pragas mais dinâmicas de que se tem conhecimento. O ataque começa pelas bordas das lavouras e é pouco perceptível. Durante um ciclo de cultivo do algodoeiro podem ocorrer de 5 a 6 ciclos do bicudo. O período de ataque ao cultivo estende-se dos 30 aos 130 dias, e o período crítico de ataque do inseto ocorre 50 a 90 dias após a emergência das plantas (Silvie *et al.*, 2013).

O bicudo tem preferência por estruturas reprodutivas, alimentando-se principalmente de botões florais jovens, por serem tenros. As brácteas servem como proteção; o orifício de alimentação é um dos sinais deixados na lavoura que denuncia a presença da praga (Gallo *et al.*, 2002). Além dos danos provocados pela alimentação, os botões florais também são usados pelas fêmeas para oviposição. Outras estruturas, como maçãs e flores, também podem ser usadas, porém, em menor escala (Santos *et al.*, 2003).

Para ovipositar, a fêmea abre uma punctura onde deposita apenas um ovo, recobrando-o com uma substância cerosa que ela mesma produz. Essa característica permite distinguir o local da postura dos orifícios de alimentação, que permanecem abertos. Usualmente, são realizadas em torno de 6 posturas por dia, e uma fêmea pode colocar até 300 ovos. Decorridos de 2 a 4 dias, ocorre a eclosão das larvas, que se alimentarão do botão por um período de 4 a 12 dias, ao fim dos quais se inicia a fase de pupa, que dura de 2 a 6 dias (Silvie *et al.*, 2013). Os

adultos emergem do botão floral ou das maçãs, copulam e dão início a um novo ciclo (*Figura 1*). Os botões florais contendo os ovos e insetos em desenvolvimento são abortados, e as maçãs novas caem no solo entre 5 a 10 dias depois da postura dos ovos ou ficam sujeitas à podridão (Ramalho & Jesus, 1996).

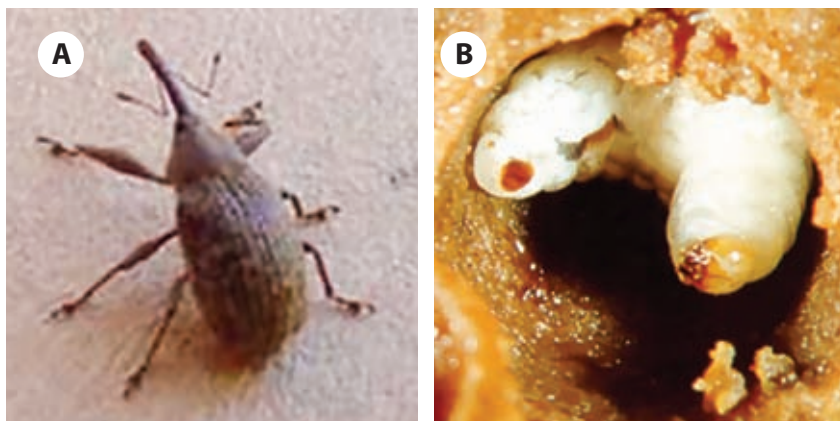


Figura 1. Bicudo-do-algodoeiro: (a) adulto, (b) larva

Levando-se em consideração os hábitos, a biologia e o potencial destrutivo do bicudo, novas abordagens devem ser estabelecidas, com objetivo de reduzir as perdas econômicas.

Neste contexto, a transgenia surge como alternativa, partindo-se da premissa de que genes exógenos poderiam ser transferidos de forma direta ou indireta para o genoma do algodão. Com relação ao bicudo-do-algodoeiro, várias pesquisas encontram-se em andamento, com resultados expressivos, demonstrando a integração de genes da família Cry em cultivares melhoradas de algodão, desenvolvidas pela Embrapa (Silva, 2014). Outros trabalhos envolvendo isolamento de biomoléculas potencialmente tóxicas contra esse coleóptero, tais como inibidores de proteases, inibidores de  $\alpha$ -amilases e colesterol oxidase, que têm demonstrado perspectivas de uso para controle do inseto pela transgenia.

## Genes disponíveis para transformação de plantas de algodão

### a) Colesterol oxidase

Colesterol oxidase (Coase) é uma enzima com propriedade inseticida, conhecida por ser potencialmente tóxica a algumas espécies de coleópteros e lepidópteros. A enzima, produzida por alguns actinomicetos, atua sobre o colesterol na posição  $3\beta$ -hidroxil para formar  $\beta$ 4-cholestenone e  $H_2O_2$ , cujos produtos são as duas possíveis causas da degradação da membrana. Segundo Gottlieb (1977), a substituição do produto da reação pelo colesterol e a reação dos componentes da membrana com o  $H_2O_2$  produzido pela reação da Coase são as duas possíveis causas da degradação da membrana.

O colesterol é um importante componente no metabolismo dos insetos. No caso do bicudo, as larvas requerem pelo menos 20 mg de colesterol /100g da dieta para terem desenvolvimento normal. A deficiência resulta em redução na postura e na eclosão seguida de morte das larvas. Purcell *et al.* (1993) estudaram o efeito da Coase em larvas neonatas do bicudo e verificaram que, em baixas doses, ocorre rompimento da membrana e posterior morte de larvas do 2º estágio. Greenplate *et al.* (1995) afirmam que a Coase afeta a fertilidade e viabilidade de ovos, podendo constituir-se em alternativa para controle do bicudo pela transgenia. Em estudos desenvolvidos por pesquisadores da Embrapa Algodão e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Santos *et al.* (2002) confirmaram o efeito da Coase na redução da oviposição, eclosão e no aumento da mortalidade das larvas do bicudo. Os autores verificaram que na dosagem de 53  $\mu$ g/ml a eclosão e viabilidade das larvas foram inibidas em 50%, com elevados danos às membranas epiteliais do intestino médio do inseto (*Figura 2*).

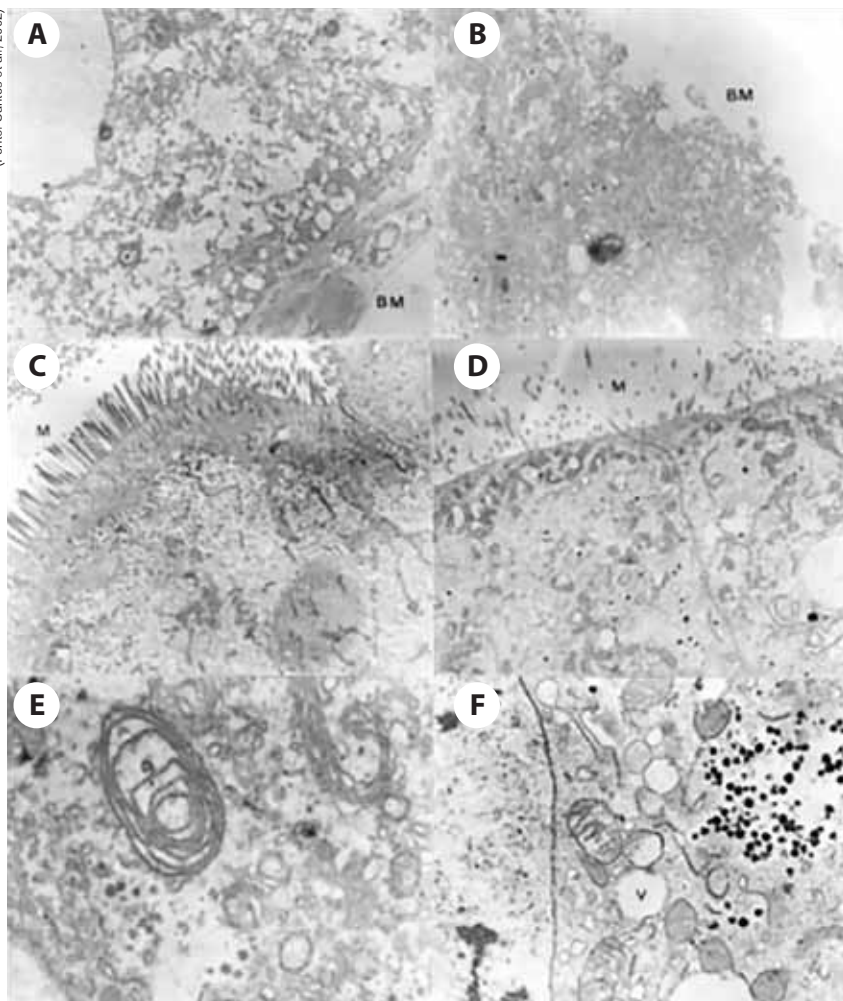


Figura 2. Seções do intestino médio do bicudo do algodoeiro vistas por microscopia eletrônica de transmissão. BM - membrana basal, M - microvilosidades, V - vacúolos. Controle: A, C e E- ampliação: 9.500X, 6.900X e 17.500X, respectivamente); tratamento: insetos alimentados com dieta artificial contendo 53 µg/ml de Coase (B, D e F: ampliação 9.200X, 7.500X e 18.500X, respectivamente)

Ainda no estudo de Santos *et al.* (2002), os autores informaram que a queda de botões florais foi reduzida em 60% quando ovos inoculados em botões jovens foram imersos em solução de Coase a 53 µg/mL. Nos adultos, a enzima provocou cerca de 50% de redução na produção de ovos, além de interferir na eclosão das larvas. Um detalhe da inibição de crescimento das larvas em função da bioatividade da enzima é encontrada na *Figura 3*.



(Fonte: Santos *et al.*, 2002)

Figura 3. Larvas do bicudo do algodoeiro (segundo e terceiro estádios) alimentadas em dieta artificial contendo Coase. Controle à esquerda; tratamento à direita. Ampliação: 49 x

Essa mesma equipe iniciou os trabalhos de isolamento do gene a partir de cepas de *Streptomyces*, para uso posterior em trabalhos visando resistência a inseto pela transgenia.

### **b) Toxinas de *Bacillus thuringiensis***

Descoberta no início do século XX, a bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) passou a ser bastante estudada por microbiologistas e entomologistas a partir de sua propriedade entomopatogênica. É um micro-organismo de ocorrência cosmopolita e que pode ser encontrado em vários substratos, tais como solo, água, superfícies de plantas, insetos mortos e grãos armazenados (Monnerat *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2014).

Essa bactéria foi isolada em 1901, no Japão, pelo bacteriologista Ishiwata, que descobriu ser ela a responsável pela mortalidade de larvas do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) (Ishiwata, 1901). Berliner (1911), na Alemanha, descreveu a mesma bactéria, isolada de larvas mortas de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), a traça-da-farinha, e a chamou *B. thuringiensis*, em homenagem ao Estado da Turíngia (Thüringen), na Alemanha, onde foram coletadas as lagartas. Em 1915, este mesmo autor notou a presença de inclusões parasporais nas células de *B. thuringiensis*, que são as responsáveis pela atividade tóxica. Essas inclusões proteicas cristalinas são produzidas durante o processo de esporulação e conhecidas por  $\delta$ -endotoxinas ou toxinas Cyt e Cry (*Figura 4*).

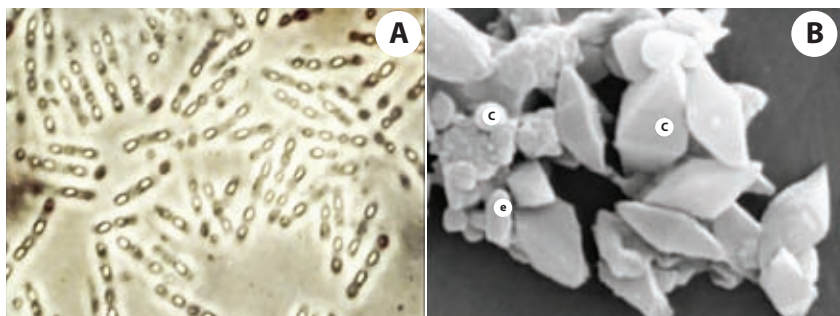


Figura 4. - Morfologia de *B. thuringiensis*. A – microscopia de contraste de fases de *B. thuringiensis* (1.000X). B – microscopia eletrônica de varredura de *B. thuringiensis* mostrando: (c) cristais; (e) esporo (15.000X)

Inicialmente, acreditava-se que esta bactéria era tóxica apenas para larvas de lepidópteros, mais tarde, nos anos 1960, foi isolada uma estirpe de *Bt* subsp. *kurstaki*, chamada HD-1 (Dulmage, 1970) que apresentou uma toxicidade de 2 a 200 vezes superior às estirpes normalmente utilizadas nos produtos comerciais. A partir de então, a procura por outras estirpes possuidoras de novas toxinas foi estimulada, e, em 1977, Goldberg e Margalit isolaram uma estirpe eficaz contra dípteros (Goldberg & Margalit, 1977) e, alguns anos mais tar-



de, em 1983, outra estirpe foi identificada como patogênica a coleópteros (Krieg *et al.*, 1983). Atualmente, são conhecidas estirpes tóxicas a insetos das ordens Diptera, Coleoptera, Himenoptera, Homoptera e Ortoptera, e ainda para algumas espécies de nematoides, protozoários e ácaros (Weiser, 1986; Edwards *et al.*, 1988).

Estima-se que existam mais de 50 mil estirpes de *B. thuringiensis* em coleções espalhadas pelo mundo e mais de 750 genes codificadores dessas toxinas estão descritos. As proteínas codificadas por eles estão classificadas em 70 grupos (Cry1, Cry2,.....Cry70), que por sua vez estão divididos em classes e subclasses de acordo com a identidade das proteínas (Cry1Aa, Cry1Ab, etc.) (Crickmore *et al.*, 2014).

Essa bactéria pode ser utilizada de duas formas: na forma selvagem, como ingrediente ativo para a síntese de biopesticidas e como fonte de genes para serem introduzidos em plantas, conhecidas popularmente como plantas Bt.

As vantagens de utilização de toxinas Bt incluem a alta especificidade aos organismos-alvo, a inocuidade aos seres humanos, vertebrados e plantas e o efeito não poluente ao meio ambiente (Whiteley & Schnepf, 1986; OMS, 1987).

Os sintomas observados a partir do momento em que as larvas de insetos suscetíveis ingerem os cristais e esporos de *B. thuringiensis* são: perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte (Aronson *et al.*, 1986). As larvas infectadas por *B. thuringiensis* perdem sua agilidade, e o tegumento adquire tonalidade marrom-escuro. Após a morte, a larva apresenta cor negra característica das infecções provocadas por este microrganismo (Habib & Andrade, 1998).

O mecanismo de ação das proteínas Cry de *B. thuringiensis* envolve vários passos: ingestão da toxina, processamento das toxinas, ligação das toxinas ao receptor, inserção da membrana, agregação, formação do poro, citólise e morte do inseto (*Figura 5*).



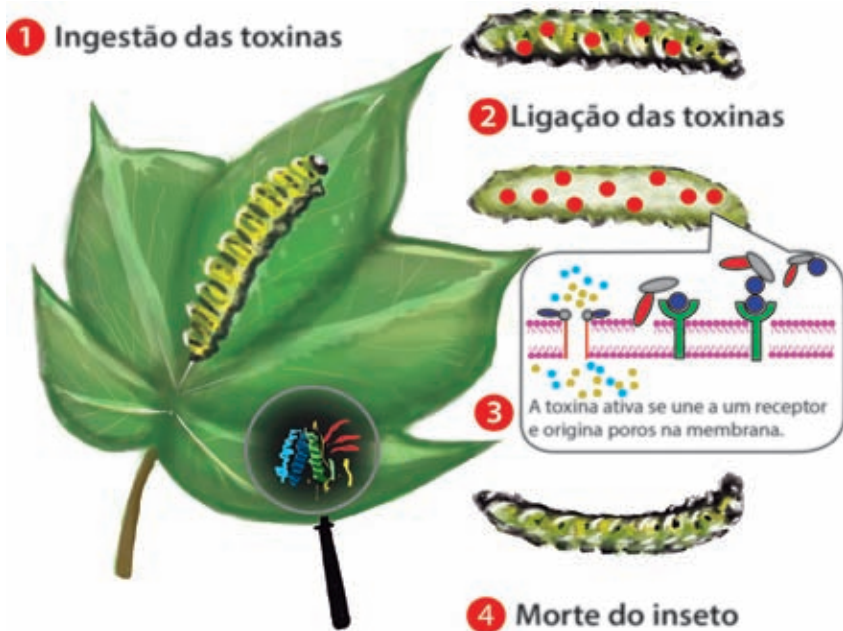


Figura 5. Modo de ação das toxinas de Bt

A união aos sítios receptores é uma etapa determinante da especificidade a  $\delta$ -endotoxinas, motivo pelo qual diversos grupos de pesquisa têm-se dedicado ao entendimento desse processo (Pietrantonio & Gill, 1996; Belfiore *et al.*, 1994; Soberón *et al.*, 2007). Em geral, quatro receptores proteicos têm sido descritos como possíveis moléculas para ligação das proteínas Cry aos intestinos dos insetos susceptíveis: uma proteína do tipo caderina (CADR), uma aminopeptidase-N ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), uma fosfatase alcalina ancorada a glicosilfosfatidil-inositol (GPI), e um glicoconjugado de 270 kDa (Gómez *et al.*, 2007; Bravo *et al.*, 2007). Outros experimentos têm mostrado que glicolípídeos também podem estar envolvidos como moléculas receptoras em alguns insetos e nematoides (Gómez *et al.*, 2007).

Produtos biológicos à base de Bt começaram a ser utilizados em controle biológico em 1938, quando uma formulação bastante rudimentar à base desta bactéria, a sporeína, foi produzi-

da na França (Weiser, 1986). A partir dos anos 1950, diversos países, como Rússia, Checoslováquia, França, Alemanha e Estados Unidos começaram a produzir industrialmente inseticidas biológicos à base de Bt (Weiser, 1986). Para controle de insetos, o uso de Bt representa uma opção de grande impacto ecológico, porquanto a bactéria não é tóxica à planta nem ao homem. Alguns insetos lepidópteros são efetivamente controlados por meio de pulverização com produtos formulados à base de estirpes de Bt, beneficiando lavouras de algodão, soja, feijão, milho entre outras. A limitação da utilização desses produtos ocorre em função do hábito do inseto, que precisa ingerir a toxina para morrer. Assim, insetos de hábito endofítico não ingerem o produto e ficam protegidos da ação da bactéria.

Uma maior abrangência dos benefícios de Bt na agricultura ocorreu a partir da década de 1980, com o advento da tecnologia das lavouras geneticamente modificadas (GM), as quais, por conter gene(s) cry inseridos no genoma, passaram a ter proteção mais duradora a insetos-alvo, mais especificamente lepidópteros.

Uma das grandes vantagens associadas às plantas GM que possuem o gene cry é que as proteínas apresentam ação seletiva a grupos de insetos, além de não serem poluentes ao meio ambiente, são inócuas aos mamíferos e vertebrados e não possuem toxicidade sobre as plantas (Beltz *et al.*, 2000; Glare & O'Callaghan, 2000). Vários trabalhos na literatura informam que lavouras GM que contêm gene cry demandam menor uso de pesticidas, que são altamente danosos ao meio ambiente (Silva, 2014; Martins *et al.*, 2008).

A vantagem da tecnologia reside no fato de a proteína ser expressa apenas em tecidos específicos da planta de interesse, ficando retida no interior deles. Dependendo da estratégia utilizada nos trabalhos de transformação, a proteína Cry pode ser produzida continuamente pela planta ou ativada quando se fizer necessário. A ação persiste durante todo ciclo, o que possibilita menor custo com inseticidas sintéticos (Jouanin *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998; Azevedo, 1998).

Em 1981, foi desenvolvido o primeiro transgene contendo o gene cry (Schnepf & Whitley, 1981). A partir daí, outras plantas transgênicas expressando proteínas de Bt (Cry1Ab e Cry1Ac) foram desenvolvidas, como tomate (Fischhoff *et al.*, 1987) e

tabaco (Vaeck *et al.*, 1987), ambas em 1987, com ação contra insetos da Ordem Lepidoptera. Em algodão, os trabalhos foram conduzidos por Perlak *et al.* (1990), nos EUA, usando os genes cry1Ab ou cry1Ac para controle de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). A primeira cultivar comercial foi desenvolvida pela Monsanto, denominada Bollgard I, e liberada para comercialização nos EUA e na Austrália em 1996/1997. A cultivar contém o gene cry1Ac (Perlak *et al.*, 1991) que controla as lagartas-do-capulho, da maçã e a rosada. Em 2002, a Monsanto liberou a Bollgard II, que contém duas toxinas (Cry1Ac e Cry2Ab), fato que confere maior proteção contra demais lagartas do algodoeiro (Olsen & Darly, 2000; Gore *et al.*, 2001). A Dow AgroSciences desenvolveu a WideStrike, comercializada no Brasil em 2009, que contém as proteínas Cry1Ac e Cry1F, tóxicas a *H. virescens*, *H. zea*, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Alabama argillacea* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectiniphora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera eridania* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). A Bayer CropScience desenvolveu a Bt TwinLink, que contém as proteínas Cry1Ab e Cry2Ae, tóxicas a *H. virescens*, *P. gossypiella*, *Helicoverpa* e *A. argillacea*. Numa combinação de dois diferentes genes oriundos de Bt, a Monsanto desenvolveu a Bollgard III que combina os genes da Bollgard II com o COT102 (Vip3Aa19) da Syngenta, protegendo as plantas contra *A. argillacea*, *H. virescens*, *P. gossypiella*, *Helicoverpa* spp., *Spodoptera* spp. e *T. ni*.

A primeira liberação comercial de plantas Bt no Brasil foi do algodão expressando a toxina Cry1Ab, em 2005. A partir de 2007, diversos eventos de milho expressando toxinas Bt foram liberados para comercialização. Essas plantas expressam de um a três genes de proteínas Bt (Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1F, Cry2Ab2, Cry3Bb1 e Cry35Ab1) (CTNBio, 2014; Monnerat *et al.*, 2015). Segundo dados do Serviço Internacional para a Aquisição de Aplicações em Agrobiotecnologia (ISAAA), uma organização pró-biotecnologia, no Brasil, a área cultivada com sementes geneticamente modificadas de soja, milho e algodão em 2013 foi de 40,3 milhões de hecta-

res, colocando-o como o segundo país no cultivo de plantas transgênicas no mundo (James, 2014).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) conta com uma coleção de 2,5 mil cepas de *B. thuringiensis*, da qual foram selecionadas estirpes altamente tóxicas aos insetos da ordem Diptera, *Culex quinquefasciatus* (Monnerat *et al.*, 2004) e *Aedes aegypti* (Monnerat *et al.*, 2005), Lepidoptera, *Plutella xylostella*, *Anticarsia gemmatalis* e *S. frugiperda* (Monnerat *et al.*, 2007) e Coleoptera, *A. grandis* (Martins *et al.*, 2007).

A empresa mantém uma criação massiça do bicudo-do-algodoeiro em laboratório para produzir insetos saudáveis que serão utilizados em ensaios (Figura 6) para prospectar novas estirpes e encontrar proteínas tóxicas, cujos genes poderão ser utilizados para a transformação do algodão, tornando-o resistente aos ataques do inseto.

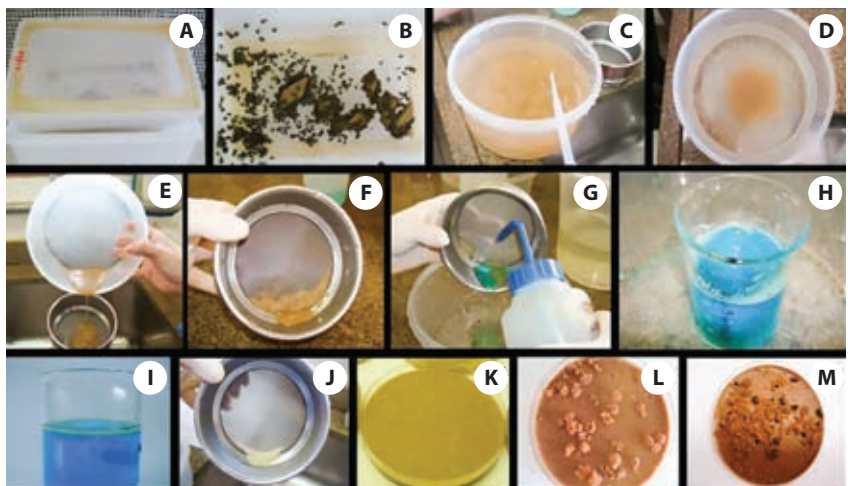


Figura 6. Ilustração da criação de *A. grandis*. A: gaiola onde os insetos adultos são criados, mostrando o compartimento superior onde ficam os insetos e o compartimento inferior onde são depositados os ovos e as fezes; B: Detalhe mostrando os adultos sendo criados em dieta artificial; C,D,E,F: Procedimento inicial de lavagem e separação dos ovos que estão misturados às fezes; G, H, I: Procedimento de lavagem dos ovos com sulfato de cobre; J: Detalhe mostrando os ovos separados das fezes prontos para serem distribuídos em placas contendo dieta artificial; K: Placa contendo dieta artificial onde os ovos são distribuídos; L: Após alguns dias é possível visualizar os casulos formados pelas larvas e pupas de *A. grandis*; M: Placa com insetos adultos

Até o momento, três genes mostraram-se altamente promissores para serem utilizados na transformação do algodão. O primeiro pertencente ao grupo Cry1Ia, é derivado da estirpe de *B. thuringiensis* S1451. Foi isolado, caracterizado e expresso em Baculovírus visando à análise da atividade inseticida da proteína recombinante expressa para o bicudo-do-algodoeiro e para lagarta-do-cartucho-do-milho. As baixas doses letais obtidas indicaram que este é um gene bastante promissor para a construção de uma nova cultivar de algodão, que poderá ser resistente a ambos os insetos (Martins *et al.*, 2008). O segundo gene, Cry10Aa, é encontrado comumente em estirpes de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* que possui várias proteínas com atividade tóxica para diversos insetos da ordem Diptera, entre elas estão a Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa e Cyt2Ba (Ben-Dov *et al.*, 1999; Guerchicoff *et al.*, 1997; Berry *et al.*, 2002; Monnerat *et al.*, 2014). Este gene codifica uma protoxina de 78 kDa que é clivada em uma toxina ativa de 60 kDa (Thorne *et al.*, 1986). A proteína Cry10 teve sua atividade relatada para insetos lepidópteros (Vassal *et al.*, 1993) e, há poucos anos, foi informada a atividade contra *Hypothenemus hampei* (broca-do-café) (Coleoptera: Scolytidae) (Méndez-López *et al.*, 2003). A proteína recombinante Cry10Aa produzida pelo baculovírus recombinante vSynCry10Aa foi descrita com atividade para larvas neonatas de *A. grandis* (Aguiar, 2007; Aguiar *et al.*, 2012), com uma dose letal inferior e estatisticamente distinta da obtida por Martins *et al.* (2008) para a proteína Cry1Ia. As construções contendo esses dois genes estão patenteadas pela Embrapa.

O gene cry1B foi clonado e sequenciado pela primeira vez em 1988 por Brizzard e Whiteley (1988), porém ainda sem descrição da atividade. Os estudos de Hofte e Whitley (1989) revelaram que esta era uma proteína de 140 kDa, possuía alta homologia com a porção C-terminal de proteínas da família Cry1 e que sua porção N-terminal (tóxica) alinhava-se com a mesma porção de proteínas da família Cry3 (Bradley *et al.*, 1995). Estes estudos comparativos sugeriram que a proteína teria atividade para insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera. Bradley *et al.* (1995) mostraram que esta proteína possui atividade contra os lepidópteros *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), *Artogeia rapae* (Lepidoptera: Pie-

ridae), *P. xylostella* e *T. ni* (alta atividade) e para os coleópteros *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (baixa atividade) e *Chrysomela scripta* (Coleoptera: Chrysomelidae) (média atividade) em ensaios seletivos. Martins *et al.* (2007) demonstraram que esta proteína é tóxica a *A. grandis* sendo bastante promissora para o seu controle.

Uma parceria recente, firmada em 2013 entre o Cenargen e o Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt), tem propiciado mais rapidez na varredura do banco, e cerca de 30 novas estirpes tóxicas ao bicudo foram identificadas e estão sendo estudadas.

## **Genes de inibidores de proteases**

Os inibidores de protease de plantas, incluindo os de proteinases serínicas (inibidores de tripsina, inibidores de quimotripsina, inibidores de elastase pancreática e os inibidores de elastase de neutrófilos) e os de proteinases cisteínicas (família fitocistatina) constituem um grupo de famílias de proteínas bastante estudado em relação a seu papel fisiológico nas plantas e é considerado como potencial bioinseticida, biofungicida e biobactericida (Lima & Morais, 2013; Kidrič *et al.*, 2014). Esses inibidores são encontrados em vários tecidos, como sementes e outros órgãos de armazenamento, e são eficazes para proteger as plantas contra ataques de insetos herbívoros, pela sua capacidade de interferir na atividade proteolítica do trato digestivo destes (Tohidfar & Khosravi, 2015), causando redução do conteúdo de aminoácidos fundamentais para seu crescimento e o desenvolvimento (Nanasahe *et al.*, 2008).

Os inibidores de proteases têm sido considerados bons candidatos para serem usados sozinhos ou piramidados com toxinas Cry para a geração de plantas transgênicas resistentes a insetos. Contudo, é importante considerar que os insetos possuem diferentes classes de enzimas proteolíticas (serino, cisteíno, ácido aspártico e metalo-proteinases) responsáveis pela digestão e quando um inibidor específico é detectado, o inseto pode ativar as outras classes de proteases. Isso depende do tipo de inseto, tendo em vista que os herbívoros possuem mecanismos de digestão diferentes (Bolter & Jongsma, 1997). Outro ponto a ser considerado é a presença de proteases em diversos processos biológicos (in-



cluindo a planta transgênica), o que pode levar a eventuais efeitos em organismos não-alvo, (Schlüter *et al.*, 2010). No entanto, vários trabalhos já demonstraram que a expressão heteróloga de inibidores de proteases não afeta significativamente as plantas, podendo ser usada para solucionar problemas na agricultura (Van der Vyver *et al.*, 2003; Michaud *et al.*, 2005; Mosolov & Valueva, 2008).

Existem vários relatos do potencial efetivo dos inibidores de proteases em plantas transgênicas para proteção contra insetos herbívoros (Schlüter *et al.*, 2010). Inibidores de proteinases serínica e cisteínica têm sido utilizados em várias culturas transgênicas, como tabaco (Charity *et al.*, 2005), batata (Gatehouse *et al.*, 1997; Khadeeva *et al.*, 2009), arroz (Alfonso-Rubí *et al.*, 2003; Vila *et al.*, 2005), banana (Atkinson *et al.*, 2004), *Arabidopsis* (Urwin *et al.*, 2000), dentre outras. Em larga escala, os chineses desenvolveram linhagens de algodão transgênico coexpressando uma toxina Cry (Cry1Ac) e um inibidor de protease de feijão-caupi (CpTI). A linhagem mais conhecida é a SGK 321 que foi adotada por longos anos naquele país (Gatehouse, 2011), além de linhagens de arroz transgênico também expressando Bt/CpTI (Qiu, 2008).

## **Métodos de transformação de plantas de algodão**

Até antes da década de 1980, os principais métodos adotados para modificar o ideotipo de uma planta eram realizados por meio do melhoramento clássico. Tal estratégia, adotada até os dias atuais, tem promovido o desenvolvimento de várias cultivares, beneficiando não apenas o agricultor, mas os vários segmentos da cadeia produtiva. O fator limitante para o uso do melhoramento clássico, contudo, é a possibilidade de ultrapassar os limites dos fatores herdáveis, os quais só podem ser utilizados se estiverem presentes no germoplasma utilizado. Tal barreira foi ultrapassada com o advento da tecnologia de DNA recombinante, que possibilitou transferir fatores genéticos endógenos ou exógenos, independentemente da hierarquia do reino a qual pertence o genoma doador, permitindo a geração de novas cultivares para atender as macrodemandas do agronegócio internacional.

Os métodos utilizados para geração de lavouras GM são



classificados como diretos — que provocam modificações nas paredes e membranas celulares para introdução de DNA exógeno, através de processos físicos (eletroporação, biobalística e eletrofusão de protoplasto) (Finer & Mc Mullen, 1990; Rajasekaran *et al.*, 2000), ou químicos (via polietileniglicol/PEG) (Gould & Magallanes-Cedeno, 1991) — e indiretos — que além de provocarem modificações, requerem a utilização de um vetor biológico para a introdução do DNA na planta (Zapata *et al.*, 1999). Nesse aspecto, o método mais conhecido é o via *Agrobacterium*, embora tenha limitação para culturas recalcitrantes, como o algodoeiro (Birch, 1997). A despeito disso, os métodos mais adotados são via *Agrobacterium* e biobalística.

A transformação por *Agrobacterium* utiliza-se da capacidade natural que este micro-organismo apresenta de transferir parte de seu DNA para plantas hospedeiras, sendo este posteriormente integrado e expresso (Hohn, 1992; Zapata *et al.*, 1999). Apresenta maior precisão de transferência, possibilitando a integração de um menor número de cópias do transgene.

A espécie mais utilizada nos procedimentos de transformação é *A. tumefaciens*, que provoca tumores nas raízes, denominados galha da coroa. A parte da bactéria utilizada na transformação é um plasmídeo indutor de tumor denominado Ti, que é incorporado às células das plantas hospedeiras por um processo infeccioso, que leva a produção de hormônios vegetais e opinas. A técnica consiste em um cocultivo com a bactéria e explantes, em que elas infectam o tecido vegetal, iniciando o processo de transferência da sequência gênica desejada. Em seguida, o tecido é regenerado em meio de cultivo, *in vitro*, contendo antibiótico para a eliminação da *Agrobacterium* e um agente seletivo para identificar as células transformadas, as quais são posteriormente aclimatadas (Jouanin *et al.*, 1993; Gelvin, 2000).

O método de biobalística é mais oneroso, porém bastante utilizado. Utiliza micropartículas (1,0 a 1,5  $\mu\text{m}$ ) de ouro ou tungstênio que são aceleradas com o auxílio de um aparelho de pressão (1.000-1.200 psi) por ar comprimido (hélio) a altas velocidades (superiores a 1.500 km/h) para carrear e introduzir ácidos nucleicos, transpondo a parede celular e a membrana citoplasmática, sem comprometer a viabilidade (Finer *et al.*, 1992). A eficiência da técnica depende do tamanho das micropartículas, da

resistência ao vácuo, da força de propulsão e da uniformidade na superfície do tecido alvo (Milki *et al.*, 1993).

Outra técnica bastante utilizada por cientistas chineses é a de microinjeção, que se baseia na introdução do DNA exógeno na planta receptora por meio do canal do tubo polínico ou pelo ovário (Zhou *et al.*, 1983). O procedimento tem início após a polinização, quando as células da nucela formam um canal que permite a passagem do tubo polínico até o saco embrionário. O DNA exógeno é introduzido com auxílio de uma microsseringa e alcança o ovário, integrando-se às células zigóticas, já fertilizadas, mas não divididas (*Figura 7*).

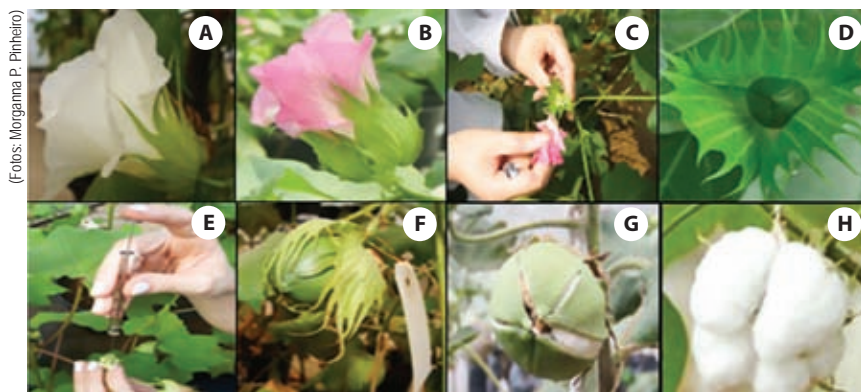


Figura 7. - A) flor do algodão antes da autofecundação; B) mudança da coloração da flor para rosa, indicando a fecundação; C) retirada das pétalas; D) maçã na fase da microinjeção; E) realização da microinjeção; F) identificação da maçã microinjetada; G) maturação da maçã; H) obtenção do capulho

O processo de transformação ocorre porque as células ainda não apresentam parede celular, apenas protoplastos. Dessa forma, o gene de interesse pode ser integrado ao genoma da cultivar receptora, gerando sementes transformadas sem a necessidade de passar por um sistema de regeneração. A grande vantagem desse método é o custo e o fato de ser desnecessária a regeneração de plantas.

## Outras tecnologias disponíveis

Uma nova abordagem ao controle de pragas envolve a liberação de insetos modificados para controlar suas contrapartes selvagens. A tecnologia transgênica tem permitido o desenvolvimento de insetos portadores de uma característica repressível e auto-limitante (Thomas *et al.*, 2000). O método consiste em criar os insetos em dieta contendo tetraciclina ou seus análogos, o que permite que apenas os machos sobrevivam. Esses machos liberados a campo irão competir com os selvagens pelo acasalamento com as fêmeas. Como a progênie deste acasalamento é dependente de tetraciclina ou de seus análogos, substâncias que não são encontradas na natureza, a prole (machos e fêmeas) não é capaz de sobreviver até a idade adulta. Essa abordagem possibilita controlar populações de pragas-alvo em níveis mais baixos do que é possível por meio de métodos convencionais. O efeito também é altamente específico em espécies, oferecendo uma ferramenta de controle de pragas ambientalmente sustentável.

O inseto transgênico mais próximo de ser posto à disposição para uso comercial é uma raça do mosquito *Aedes aegypti*, chamada 'OX513A'. *A. aegypti* é o vetor predominante de dengue e *chikungunya*. OX513A foi projetada com um traço bissexo limitante, a triagem de sexo é realizada manualmente para liberações só de machos, cuja progênie não é capaz de sobreviver até a idade adulta. Os ensaios de campo com OX513A nas ilhas Cayman (Harris *et al.*, 2011; 2012), Brasil e Panamá (N. Morrison, comunicação pessoal) demonstraram a capacidade da raça OX513A em causar reduções acentuadas das populações locais de *A. aegypti*, excedendo os níveis de supressão alcançável por abordagens convencionais.

Para as áreas agrícola e pecuária, as características autolimitantes foram desenvolvidas para *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) conhecida como a mosca-do-mediterrâneo (Gong *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2007; Schetelig *et al.*, 2007; 2009), *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), mosca-da-azeitona, (Ant *et al.*, 2012), *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae), mosca-australiana-das-ovelhas, (Li *et al.*, 2014; Scott, 2014), *P. gossypiella*, lagarta-rosada (Morrison *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2013) e *P. xylostella*, traça-das-crucíferas, (Jin *et al.*, 2013). Ensaios em casa de vegetação foram conduzidos com a mosca-do-me-

diterrâneo (Leftwich *et al.*, 2014), a mosca-da-azeitona (Ant *et al.*, 2012) e a traça-das-crucíferas (N. Morrison, comunicação pessoal). Nesses estudos, as liberações de machos de raças de transgênicas causaram rápido declínio das populações-alvo. Ensaios de campo com estas raças serão conduzidos num futuro próximo (N. Morrison, comunicação pessoal).

Entre 1971-1973, um grande experimento de campo foi realizado em mais de 20 mil acres no Mississippi, EUA (Mc Gibben *et al.*, 2001). Usando inseticidas e TIE (machos e fêmeas liberadas), a população do bicudo foi erradicada em 203 de 236 campos. Com novas liberações, essa redução poderia ter sido ainda mais acentuada, mas o experimento foi interrompido. Em experimentos posteriores, liberações de machos e fêmeas estéreis foram realizadas em campos com 48 insetos nativos por acre e a forte supressão da praga foi novamente demonstrada. Em 1978-1980, um novo experimento de erradicação do bicudo foi iniciado, que incorporou o uso de armadilhas, TIE e pulverização foliar ocasional do regulador de crescimento de insetos, diflubenzuron (Sikorowski, 1984) sobre uma área de tratamento de 20 mil acres de algodão. No final do ensaio, apenas 15 bicudos foram capturados na zona de erradicação (a maioria de um único local). Estes ensaios utilizando uma abordagem de controle com base em acasalamento demonstraram que o inseto pode ser criado em grande quantidade, e que, no campo, as populações podem ser reduzidas a níveis muito baixos. Dois grandes obstáculos para TIE foram a falta de métodos de triagem de sexo para liberar grandes grupos apenas de machos e o fato de a esterilização por radiação ter um impacto negativo sobre o desempenho do inseto (Mc Gibben *et al.*, 2001).

Visto que o controle do bicudo está baseado em inseticidas cuja efetividade é limitada e que variedades de algodão transgênico expressando proteínas inseticidas ainda estão por chegar ao mercado, as tecnologias transgênicas acima descritas apresentam-se como uma ferramenta interessante para auxiliar na mitigação dos danos, proporcionando uma opção de controle altamente eficaz, reduzindo a população do bicudo a níveis muito baixos e, ao mesmo tempo, diminuindo a dependência de pulverizações de inseticidas.

## Referências bibliográficas

AGUIAR, R. W. S. **Estudo da toxicidade de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis*, utilizando o sistema de expressão baseado em baculovírus e células de inseto**. UnB: Brasília, 2007. 130 p. Tese Doutorado.

AGUIAR, R.; SOARES, E.; MONNERAT, R. Cry10Aa Protein is Highly Toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an Important Insect Pest in Brazilian Cotton Crop Fields. **Bt Research**, vol. 3, p. 20-28, 2012.

ALFONSO-RUBÍ, J.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P.; CARBONERO, P.; DÍAZ, I. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in indica and *Japonica* rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. **Transg. Res.** 12, p. 23-31, 2003.

ANT, T.; KOUKIDOU, M.; REMPOULAKIS, P.; GONG, H. F.; ECONOMOPOULOS, A.; VONTAS, J.; ALPHEY, L. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. **BMC Biol** 10, p. 51, 2012. (doi:10.1186/1741-7007-10-51).

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

ATKINSON, H. J.; GRIMWOOD, S.; JOHNSTON, K.; GREEN, J. Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. **Transg. Res.** 13(2), p. 135-142, 2004.

AZEVEDO, J. L. Engenharia genética aplicada ao controle microbiano de insetos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. rev. aum. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 239-267.

BELFIORE, C. J.; VADLAMUDI, R. K.; OSMAN, Y. A.; BULLA JR., L. A. A specific binding protein from *Tenebrio molitor* for the insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 200, p. 359-364, 1994.

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

BEN-DOV, E.; WANG, O.; ZARITSKY, A.; MANASHEROB, R.; BARAK, Z.; SCHNEIDER, B.; KHAMRAEV, A.; BAIZHANOV, M.; GLUPOV, V.; MARGALITH, Y. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(8), p. 3714-3716, 1999.

BERLINER, E. Eber die schlafsucht der mehlmottenraupe. (Ephesis kuehniella Zell.) undihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. **Zeitschrift fuer Angewandte Entomologie**, 2, p.29-56, 1911.

BERRY, C.; O'NEIL, S.; BEN-DOV, E.; JONES, A. F.; MURPHY, L.; QUAIL, M. A.; HOLDEN, M. T.; HARRIS, D.; ZARITSKY, A.; PARKHILL, J. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 68, p. 5082–5095, 2002.

BOLTER, C.; JONGSMA, M. A. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J. Insec. Physiol** 43, p.885-895, 1997.

BRADLEY, D.; HARKEY, M. A.; KIM, M.-K.; BREVER, D.; BAUER, L. The insecticidal Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis* spp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. **J. Invertebr. Pathol** 65, p. 162-173, 1995.

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

BRIZZARD, B. L.; WHITELEY, H. R. Nucleotide sequence of an additional crystal protein gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis*. **Nucl. Acids. Res.** 16, p. 2723–2724, 1988.

CANAL RURAL, Brasil assume liderança mundial no consumo de agrotóxicos. Disponível em: <http://www.clicrbs.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&action=noticias&id=2375294>. Consultado em 2014.

CHARITY, J. A.; HUGHES, P.; ANDERSON, M. A.; BITTISNICH, D. J.; WHITERCROSS, M.; HIGGINS, T. J. V. Pest and disease protection conferred by expression of barley  $\beta$ -hordothionin and *Nicotiana alata* proteinase inhibitor genes in transgenic tobacco. **Funct. Plant Biol.** 32(1), p. 35–44, 2005.

CRICKMORE, N.; BAUM, J.; BRAVO, A.; LERECLUS, D.; NARVA, K.; SAMPSON, K.; SCHNEPF, E.; SUN, M.; ZEIGLER, D. R. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature". <http://www.btnomenclature.info/>, consultado em 2014.

CTNBio, CTNBio. Aprovações comerciais. Brasília, 2009. Disponível em: [http://www.cib.org.br/ctnbio/aprovacoes\\_CTNBio\\_jan\\_2009.pdf](http://www.cib.org.br/ctnbio/aprovacoes_CTNBio_jan_2009.pdf). Consultado em 2014.

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

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

FINER, J. J.; VAIN, P.; JONES, M. W. Development of particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. **Plant Cell Reports**, Berlin, 11, p. 323-328, 1992.

FINE, J. J.; MCMULLEN, M. D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Rep.**, 8, p.886-889, 1990.

FISCHHOFF, P. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. J.; MARRONE, P. G.; MACCORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KREZMER, K.; MEYER, E.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. Insect tolerant transgenic tomato plant. **Biotechnology**, 5, p. 807-813, 1987.

FU, G.; CONDON, K. C.; EPTON, M. J.; GONG, P.; JIN, L.; CONDON, G. C.; MORRISON, N. I.; DAFA'ALLA, T. H.; ALPHEY, L. Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. **Nat Biotechnol.** 25(3), p. 353-357, 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: Fealq, 2002. 920p.

GATEHOUSE, A. M. R.; DAVISON, G. M.; NEWELL, C. A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W. D. O.; BURGESS, E. P. J.; GILBERT, R. J. C.; GATEHOUSE, J. A. Transgenic potatoes with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: Growth room trials. **Mol. Breed.**, 3(1), p.49-63, 1997.

GATEHOUSE, J. A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, 12, p.409-416, 2011.

GELVIN, A. B. Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology**, 51, p.223-256, 2000.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAM, M. **Bacillus thuringiensis: Biology, ecology and safety**. Chicester: John Wiley, 2000. p.350.

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



GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ L.; MUÑOZ-GARAY, C.; FERNÁNDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**. 28, p.169-173, 2007.

GONG, P.; EPTON, M.; FU, G.; SCAIFE, S.; HISCOX, A.; CONDON, K.; CONDON, G.; MORRISON, N.; KELLY, D.; DAFAL'ALLA, T. *et al.* A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. **Nat Biotechnol** 23, p. 453-456, 2005.

GORE, J.; LEONARD, B. R.; ADAMCZYK, J. J. Survival of bollworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Bollgard and Bollgard II cotton flower bud and flower components. **Journal of Economic Entomology**, 94(6), p. 1445-1451, 2001.

GOTTLIEB, M. H. The reactivity of human erythrocyte membrane cholesterol with a cholesterol oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, 466, p. 422-428, 1977.

GOULD, J. H.; MAGALLANES-CEDENO, M. M. Adaptation of cotton shoot apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Mol. Biol. Rep.** p. 1-10, 1991.

GREENPLATE, J. T.; DUCK, N. B.; PERSHING, J. C.; PURCELL, J. P. Cholesterol oxidase: an oostatic and larvicidal agent active against the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, 74, p. 253-258, 1995.

GUERCHICOFF, A.; UGALDE, R. A.; RUBINSTEIN, C. P. Identification and characterization of a previously undescribed cyt gene in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62, p.2716–2721, 1997.

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

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, 53(2), p. 242-255, 1989.

HOHN, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: RUSSO, V. E. A. **Development: the molecular genetic approach**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

ISHAWATA, S. On a kind of severe flacherie (sotto disease). **Danihon Sanshi Kaiho**, v.114, p. 1-5, 1901.

HARRIS, A.F.; NIMMO, D.; MCKEMEY, A. R.; KELLY, N.; SCAIFE, S.; DONNELLY, C. A.; BEECH, C.; PETRIE, W. D.; ALPHEY, L. Field performance of engineered male mosquitoes. **Nat Biotechnol** 29(11), p. 1034-1037, 2011.

HARRIS, A. F.; MCKEMEY, A. R.; NIMMO, D.; CURTIS, Z.; BLACK, I.; MORGAN, S. A.; OVIEDO, M. N.; LACROIX, R.; NAISH, N.; MORRISON, N. I. *et al.* Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. **Nat. Biotechnol.** 30(9), p. 828-830, 2012.

JAMES, C. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: *ISAAA Brief*, n.46, 2014. Disponível em: <[http://cib.org.br/wp-content/uploads/2015/01/ISAAA\\_Executive\\_Summary\\_Briefs\\_49\\_port.pdf](http://cib.org.br/wp-content/uploads/2015/01/ISAAA_Executive_Summary_Briefs_49_port.pdf)>. Acessado em 04 de março de 2015.

JIN, L.; WALKER, A. S.; FU, G.; HARVEY-SAMUEL, T.; DAFA'ALLA, T.; MILLES, A.; MARUBBI, T.; GRANVILLE, D.; HUMPHREY-JONES, N.; O'CONNELL, S. *et al.* Engineered female-specific lethality for control of pest Lepidoptera. **ACS Syn. Biol.** 2(3), p.160-166, 2013.

JOUANIN, L.; BRASILEIRO, A. C. M.; LEPLÉ, J. C.; PILATE, G.; CORNU, D. Genetic transformation: a short review of methods and their applications, results and perspectives for forest trees. **Annual Science Forest**, 50, p. 325-336, 1993.

JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Sci.**, 131, p. 1–11, 1998.

KHADEEVA, N. V.; KOCHIEVA, E. Z.; YU, M.; TCHEREDNITCHENKO, M. Y.; YU, E.; YAKOVLEVA, E. Y.; SYDORUK, K. V.; BOGUSH, V. G.; DUNAIEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A. Use of buckwheat seed protease inhibitor gene for improvement of tobacco and potato plant resistance to biotic stress. **Biochem.** 74, p. 260–267, 2009.

KIDRIČ, M.; KOS, J.; SABOTIČ, J. Proteases and their endogenous inhibitors in the plant response to abiotic stress. **Botan. Serb.** 38 (1), p. 139-158, 2014.

KRIEG, A.; HUGER, A. M.; LANGENBROOK, G. A.; SCHNETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: ein neuer gegenuber larven von Coleopteren wirksamer pathotyp. **Zeitschrift für Angewandte Entomologie** 96, p. 500–508, 1983.

LEFTWICH, P. T.; KOUKIDOU, M.; REMPOULAKIS, P.; GONG, H. F.; ZACHAROPOULOU, A.; FU, G.; CHAPMAN, T.; ECONOMOPOULOS, A.; VONTAS, J.; ALPHEY L. Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. **Proc Biol Sci** 281, p. 1792, 2014. (doi:10.1098/rspb.2014.1372).

LI, F.; WANTUCH, H. A.; LINGER, R. J.; BELIKOFF, E. J.; SCOTT, M. J. Transgenic sexing system for genetic control of the Australian sheep blow fly *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem Mol Biol** 51, p.80-88, 2014. (doi:10.1016/j.ibmb.2014.06.001).

LIMA, L. M.; MORAIS, A. H. A. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. **O agronegócio do amendoim no Brasil**. 2 ed. Brasília: Embrapa, 2013. p. 467-497.

MARTINS, É. S.; AGUIAR, R. W. D. S.; MARTINS, N. F.; MELATTI, V. M.; FALCÃO, R.; GOMES, A. C. M. M.; RIBEIRO, B. M.; MONNERAT, R. G. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton bollweevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Applied Microbiology**, 104, p. 1363–1371, 2008.

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

MCGIBBEN, G.; VILLAVASO, E.; MCGOVERN, W.; GREFENSTETTE, W. United States Department of Agriculture - research support, methods development and program implementation. In **Boll Weevil Eradication in the United States Through 1999** (eds. DICKERSON, W.; BRASHEAR, A.; BRUMLEY, J.; CARTER, F.; GREFENSTETTE, W.; HARRIS, F.). Memphis, Tennessee, USA, 2001. The Cotton Foundation Publisher.

MICHAUD, D.; ANGUENOT, R.; BRUNELLE, F. **US Patent** No. 20050055746, 2005.

MÉNDEZ-LÓPEZ, I.; BASURTO-RÍOS, R.; IBARRA, J. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). **FEMS Microbiol Lett**. 226, p. 73-77, 2003.

MILKI, B. L.; FOBERT, P. E.; CHAREST, P. J.; IYER, V. N. Procedure for introducing foreign DNA into plants. In: GLICK, B. R.; THOMPSON, J. E. **Methods in plant molecular biology and biotechnology**. London: CRC Press, 1993. Chap. 6, 342p.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S.; DIAS, D.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; JONES, G.; SOARES, C. M.; DIAS, J. M. C. S.; BERRY, C. Screening of high toxic Brazilian *Bacillus sphaericus* strains against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Applied Entomology** 128, p. 469-473, 2004.

MONNERAT, R. G.; DIAS, D.; SILVA, S.; MARTINS, E.; BERRY, C.; FALCÃO, R.; GOMES, A. M. M.; PRAÇA, L.; SOARES, C. M. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40, p. 103-106, 2005.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P.; MARTINS, E.; MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control** 41, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G.; SOARES, C. M. S.; GOMES, A. C. M.; JONES, G.; MARTINS, E.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* bacteria living inside of plants. **Microbial Biotechnology**, 2, p.1560-1562, 2009.

MONNERAT, R. ; PEREIRA, E. ; TELES, B. ; MARTINS, E. ; PRAÇA, L. ; QUEIROZ, P. ; SOBERON, M. ; BRAVO, A. ; RAMOS, F. ; SOARES, C. M. Synergistic activity of *Bacillus thuringiensis* toxins against *Simulium* spp. larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, 121, p. 70-73, 2014.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; MACEDO, C.; QUEIROZ, P.; PRAÇA, L.; SOARES, C. M.; MOREIRA, H.; GRISI, I.; SILVA, J.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLoSOne** in press. 2015.

MORRISON, N. I.; SIMMONS, G. S.; FU, G.; O'CONNELL, S.; WALKER, A. S.; DAFA'ALLA, T.; WALTERS, M.; CLAUS, J.; TANG, G.; JIN, L.; *et al.* Engineered repressible lethality for controlling the pink bollworm, a lepidopteran pest of cotton. **PLoS ONE** 7(12), e50922. 2012. (doi:10.1371/journal.pone.0050922).

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase Inhibitors in Plant Biotechnology: A Review. **Appl. Biochem. Microb.**, 44(3), p. 233–240, 2008.

NANASAHE, P. C.; DOYLE, E.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. **J. Insect Physiol.** 54 (3), p. 563-572, 2008.

OLSEN, K. M.; DALY, J. C. Plant-toxin interaction in transgenic *Bt* cotton and their effects on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, 32(4), p. 1293-1299, 2000.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ (OMS). **Report of an Informal Consultation on the Detection, Isolation, Identification and Ecology of Biocontrol Agents of Disease Vectors**. UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in tropical Diseases, TDR/BCV/IC-GE/87.3, 1987. 41 p.

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

PERLAK, F. J.; DEATON, R. W.; ARMSTRONG, T. A.; FUCHS, R. L.; SIMS, S. R.; GREENPLATE, J. T.; FISCHHOFF, D. A. Insect resistant cotton plants. **Bio/Technology**, 8, p. 939-943, 1990.

PERLAK, F. J.; FUCHS, K. L.; DEAN, D. A.; MCFERSON, S. L.; FISCHOFF, D. A. Modification of the coding sequence enhances plants expression of insect control protein genes. **Proceedings** of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 1991, p. 3324-3328.

PIETRANTONIO, P. V.; GILL S. S. *Bacillus thuringiensis* endotoxins: action of the insect midgut. In: **Biology of the insect midgut**. LEHANE, MJ., BILLINGSLEY, PF. (Eds). London: Chapman e Hall, 1996. p. 345-372.

PURCELL, J. P.; GREENPLATE, J. T.; JENNINGS, M. G.; RYERSE, J. S.; PERSHING, J. C.; SIMS, S. R.; PRINSEN, M. J.; CORBIN, D. R.; TRAN, M.; SAMMONS, R. D.; STONARD, R. J. Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 196, p. 1406-1413, 1993.

QIU, J. Is China ready for GM rice? **Nature** 455, p. 850–852, 2008.

RAJASEKARAN, K.; HUDSPETH, R. L.; CARY, J. W.; ANDERSON, D. M.; JACKS, T. J.; STROMBERG, K.; CLEVELAND, T. E. High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. **Plant Cell Report**, 19, p. 539-545, 2000.

SANTOS, R. C.; MONNERAT, R. G.; SÁ, M. F. G.; CORDEIRO, C. M. T.; GOMES, A. C.; GANDER, E. S. Cholesterol oxidase interferes on emergence and viability of cotton boll weevil larvae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37(11), p. 1525-1530, 2002.

SANTOS, R. C.; MARCELLINO, L. H.; MONNERAT, R. G.; GANDER, E. S. Mechanical damage in cotton buds caused by the boll weevil. **Pesq. Agropec. Bras.**, 38(11), p. 1351-1356, 2003.

SCHETELIG, M.; HORN, C.; HANDLER, A.; WIMMER, E. Development of an embryonic lethality system in Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. In **Area-wide control of insect pests: from research to field implementation** (eds. VREYSEN, M.; ROBINSON, A. S.; HENDRICH, J.), 2007. pp. 85-94. Dordrecht, The Netherlands, Springer.

SCHETELIG, M.; CACERES, C.; ZACHAROPOULOU, A.; FRANZ, G.; WIMMER, E. A. Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **BMC Biol** 7, p. 4, 2009.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 775-806, 1998.

SCHNEPF, E.; WHITELEY, H. R.. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings** of the National Academy of Sciences, Washington, 78, 1981. p. 2893-2897.

SCHLÜTER, U.; BENCHABANE, M.; MUNGER, A.; KIGGUNDU, A.; VORSTER, J.; GOULET, M. C.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. **J. Exper. Bot.**, 61(15), p. 4169–4183, 2010.

SCOTT, M. J. Development and evaluation of male-only strains of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **BMC Genet** 15 Suppl 2, S3, 2014. (doi:10.1186/1471-2156-15-S2-S3).

SILVA, C. R. C. Seleção de eventos transformados de algodão resistente a insetos por meios moleculares e de imunodeteção. 2014. 97f. **Tese**, (Pós-graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2014.

SILVIE, P. J.; THOMAZONI, D.; SORIA, M. F.; SARAN, P. E.; BÉLOT, J. L. **Pragas e seus danos em algodão**. Primavera do Leste, MT, 2013. 184 p. (IMAmt Boletim de identificação n°1).

SIKOROWSKI, P. Pathogens and microbial contaminants: their occurrence and control. In **Boll Weevil Mass Rearing Technology** (eds. Sikorowski P., Griffin J., Roberson J., Lindig O.). Jackson, Mississippi, USA, 1984, University Press of Mississippi.

SOBERÓN, M.; PARDO-LÓPEZ, L.; LÓPEZ, I.; GÓMEZ, I.; TABASHNIK, B.; BRAVO, A. Engineering Modified Bt Toxins to Counter Insect Resistance. **Science** 318, p. 1640-1642, 2007.

TOHIDFAR, M.; KHOSRAVI, S. Transgenic crops with an improved resistance to biotic stresses. A review. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 19(1), p. 62-70, 2015.

THOMAS, D. D.; DONNELLY, C. A.; WOOD, R. J.; ALPHEY, L. S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. **Science** 287(5462), p. 2474-2476, 2000.

THORNE, L.; GARDUNO, F.; THOMPSON, T.; DECKER, D.; ZOUNES, M.; WILD, M.; WALFIELD, A. M.; POLLOCK, T. J. Structural similarity between the lepidoptera and diptera specific insecticidal endotoxin genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. **J. Bacteriol.** 166(3), p.801-11, 1986.

URWIN, P. E.; LEVESLEY, A.; MCPHERSON, M. J.; ATKINSON, H. J. Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *Arabidopsis thaliana* plants expressing proteinase inhibitors. **Mol. Breed.**, 6, p. 257-264, 2000.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HÖFTE, H.; JANSSENS, S.; DEBEUCKLEER, M.; DEAL, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, 328, p. 33-37, 1987.

VAN DER VYVER, C.; SCHNEIDEREIT, J.; DRISCOLL, S.; TURNER, J.; KUNERT, K.; FOYER, C. H. Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. **Plant Biotechnol. J.**, 1(2), p.101–112, 2003.

VASSAL, J. M.; BARJAC, H. D.; FRUTOS, R.; FEDERICI, B. A. Isolation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* from diseased field-collected larvae of the saturniid moth, *Hylesia metabus*, in French Guiana. **FEMS Microbiol. Lett.** 107, p.199–204, 1993.

VILA, L.; QUILIS, J.; MEYNARD, D.; BREITLER, J. C.; MARFA, V.; MURILLO, I.; VASSAL, J. M.; MESSEGUER, J.; GUIDERDONI, E.; SAN SEGUNDO, B. S. Expression of the maize proteinase inhibitor (*mpi*) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. **Plant Biotechnol. J.**, 3(2), p. 187-202, 2005.

WEISER, J. Impact of *Bacillus thuringiensis* on applied entomology in eastern Europe and in Soviet Union. In: KRIEG, A.; HUGER, A. M. **Mitteilungsorgan der Biologischen Bundesanstalt für Land undForstwirtschaft**. Berlin-DahlemHeft 233, p.37-50, 1986.

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

ZAPATA, C.; PARK S. H.; EL-ZIK, K. M.; SMITH, R. H. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and shoot apex. **Theoretical and Applied Genetics**, 2, p.252-256, 1999.

ZHOU, G.; WANG J.; ZENG Y.; HUANG J.; QIAN S.; LIU G. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. **Meth. In Enzymol.**, 101, p.433-448, 1983.