

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Desenvolvimento de plantas de milho que expressam Jaburetox
visando resistência a lepidópteros-praga**

Dielli Aparecida Didoné

Passo Fundo

2019

Dielli Aparecida Didoné

Desenvolvimento de plantas de milho que expressam Jaburetox visando resistência a lepidópteros-praga

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Agronomia.

Orientador:
Ph.D. Magali Ferrari Grando
Coorientador:
Dr. José Roberto Salvadori

Passo Fundo

2019

CIP – Catalogação na Publicação

- D557d Didoné, Dielli Aparecida
Desenvolvimento de plantas de milho que expressam
Jaburetox visando resistência a lepidópteros-praga / Dielli
Aparecida Didoné. – 2018.
100 f. : il. ; 30 cm.
- Orientadora: Magali Ferrari Grando.
Coorientador: José Roberto Salvadori.
Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de Passo
Fundo, 2018.
1. Milho. 2. Pragas agrícolas - Controle. 3. Engenharia
genética vegetal. I. Grando, Magali Ferrari, orientadora.
II. Salvadori, José Roberto, coorientador. III. Título.

CDU: 633.15/.17

ATA DE DEFESA DE TESE



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a tese

Desenvolvimento de plantas de milho que expressam Jaburetox visando resistência a lepidópteros-praga


Elaborada por

Dielli Aparecida Didoné

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
“Doutora em Agronomia – Área de Produção e Proteção de Plantas”

Aprovada em: 03/05/2018
Pela Comissão Examinadora


Dra. Magali Ferrarri Grando
Presidente da Comissão Examinadora
Orientadora



Dr. José Roberto Salvadori
Universidade de Passo Fundo


Dra. Maria Helena Bonadese Zanettini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul


Dra. Sandra Patussi Brammer
Embrapa Trigo


Dra. Célia Regina Carlini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul


Dr. Edson Campanholo Bortoluzzi
Coordenador PPGAgro


Dr. Hélio Carlos Rocha
Diretor da Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária, Universidade de Passo Fundo

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais com muito amor.

AGRADECIMENTO

Aos meus pais, Osmar João Didoné e Ivânia Zanella Didoné, meu irmão Tiago Didoné e minha cunhada Gisele Santos de Lima, meu infinito agradecimento, por serem meus exemplos e por me proporcionarem todas as oportunidades para que eu chegasse até aqui, por todo o amor e atenção durante esse período e durante toda a minha vida, que apesar das dificuldades, nunca me deixaram desistir. Amo vocês!

À minha amiga e orientadora, professora Ph.D. Magali Ferrari Grando pelos sábios ensinamentos de vida e profissão, pela dedicação, amizade, palavras de conforto e conselhos. És uma referência profissional e pessoal. Obrigada por estar ao meu lado, acreditar em mim e pela excelente orientação!

Ao meu coorientador, professor Dr. José Roberto Salvadori por todos os ensinamentos e contribuições durante essa etapa da minha formação. Tenho grande admiração pelo seu profissionalismo.

Ao Dr. Robert George Shatters Jr. (USDA-EUA), pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e todo o ensinamento transmitido.

À grande família de amigos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal da FAMV-UPF, pelas experiências trocadas, pelos bons momentos vividos, pelos cafês, apoio e colaboração nessa jornada.

À equipe do Laboratório de Entomologia da FAMV-UPF, pela ajuda e disponibilidade, especialmente a colega Crislaine pela amizade e contribuição.

Aos meus amigos que tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividirem comigo as angústias e alegrias. É bom poder contar com vocês!

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

E, por fim, a todos que estiveram próximos durante esta etapa da minha vida e que, da sua maneira, contribuíram para a realização e a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci.

RESUMO

DIDONÉ, Dielli Aparecida. Desenvolvimento de plantas de milho que expressam Jaburetox visando resistência a lepidópteros-praga. 2018. 100 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

A cultura do milho (*Zea mays* L.) tem grande importância no cenário mundial, por ser uma fonte rica em carboidratos, proteínas e óleo, servindo de alimento para humanos e animais. Um dos principais fatores que comprometem o rendimento e a qualidade da produção desta cultura é a incidência de pragas. Dentre as pragas destacam-se os lepidópteros como a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e a *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Nas últimas décadas, com o advento da biotecnologia foi desenvolvida uma nova tática de controle de pragas, que consiste nas plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos, principalmente lepidópteros. Um novo peptídeo derivado de Urease de planta, denominado Jaburetox (JBTX), tem demonstrado toxicidade contra alguns insetos-praga demonstrando ser um bom candidato para produção de plantas de milho resistentes a esses lepidópteros-praga. Porém, para se chegar a plantas com essas características, além da transferência do DNA para a planta, são necessários vários estudos de expressão gênica, toxicidade das plantas aos insetos e a transferência do gene para as próximas gerações de forma estável. Para tanto, esse trabalho teve como objetivo verificar, primeiramente, se o peptídeo JBTX é tóxico para *H. armigera*, já que é uma praga recentemente introduzida no Brasil e altamente polífaga e após verificar se é possível produzir plantas de milho que expressem estavelmente o gene *Jbtx* e que sejam resistentes à *S. frugiperda*. No primeiro trabalho foram utilizadas duas versões do peptídeo JBTX, uma completa e outra deletada, e dois instares da lagarta (primeiro e terceiro). Os resultados sugerem que as duas formas de JBTX testadas são eficientes no controle de *H. armigera*, porém a forma completa do JBTX resultou em redução significativa do consumo. As lagartas neonatas apresentaram 69% de mortalidade e redução de 70% do consumo e lagartas de terceiro instar apresentaram 70% de mortalidade quando tratadas com esse peptídeo. Para produzir plantas de milho geneticamente modificadas foi utilizado o gene referente à versão completa do JBTX e o método de *Agrobacterium tumefaciens* como vetor para integração do gene no genoma da planta. Foram obtidos diferentes eventos, os quais transferiram o gene de forma estável para as próximas gerações. Na geração T2 foram selecionadas as plantas dos eventos com maior expressão gênica para realizar o bioensaio com *S. frugiperda*. Foram selecionadas 18 plantas de 4 eventos diferentes, as quais determinaram de 10 a 39% de mortalidade dos insetos, redução significativa de 65% de peso comparada com o controle, redução de 36% de consumo e redução na fertilidade das mariposas. Duas plantas não deixaram descendentes de *S. frugiperda*, ou seja, nenhum ovo foi viável. Estes resultados mostram que o *Jbtx* expresso em plantas de milho apresenta efeito subletal nessa espécie de lepidóptero. Neste sentido, plantas transgênicas de milho expressando *Jbtx* poderão representar uma importante ferramenta dentro do MIP, pois com menor biomassa e consumo alimentar, será menor o potencial dano do inseto à produção.

Palavras-chave: 1. Controle de pragas. 2. Engenharia genética. 3. Peptídeo entomotóxico derivado de urease de planta. 4. *Helicoverpa armigera*. 5. *Spodoptera frugiperda*.

ABSTRACT

DIDONÉ, Dielli Aparecida. Development of maize plants expressing Jaburetox for resistance to lepidopteran pests. 2018. 100 f. Thesis (Doctor in Agronomy) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2018.

The maize crop (*Zea mays* L.) is of great importance on the world stage, as it is a source rich in carbohydrates, proteins and oil, serving as food for humans and animals. One of the main factors that compromises the yield and the quality of this crop is the damage incurred by pest insects. Two of the most serious pests are Lepidopterans: the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* and the old world bollworm, *Helicoverpa armigera*. In recent decades, with the advent of biotechnology, a new pest control tactic has been developed consisting of genetically modified plants resistant to insects through the use of a single class of insect toxin proteins (BT-toxins), mainly used against. These have proven very successful, but broad reliance on a single class of toxins has created concern and demonstrations of insect resistance. A new peptide derived from plant urease, called Jaburetox (JBTX), has shown toxicity against some pest insects, suggesting it may be a good candidate as an alternative to the BT-toxins for producing maize plants resistant to the above described lepidopteran pests. However, research on demonstrating toxicity to the chosen pest insect, producing the transgenic plants, identifying those transgenic lines with high levels of gene expression, demonstrating economically viable control of the insect and stable gene transfer and expression into subsequent plant generations are required. To this end, this research first demonstrated that the purified JBTX peptide toxic to *H. armigera* when applied to leaves on which the larvae fed. Subsequently transgenic plants were constructed and show to provide stable resistance to what is currently the most economically important maize pest, *S. frugiperda*. In the first work two versions of the JBTX peptide were used, one complete and one truncated, and feeding was initiated with two instar stages of the larvae (neonate and third). The results suggest that the two forms of JBTX tested are efficient in the control of *H. armigera*, but the complete form of the JBTX resulted in a significant reduction in consumption. The toxin induced 69% neonate larvae mortality and 70% reduction in consumption and 70% mortality in third instar larvae. To produce genetically modified maize plants, the gene encoding full-length version of JBTX was introduced using the *Agrobacterium tumefaciens* transformation method for gene integration into the plant genome. Multiple gene insertion events were obtained, with stable gene transfer to subsequent generations. In the T2 generation the plants of the events with the highest gene expression were selected to perform the bioassay with *S. frugiperda*. We selected 18 plants from 4 different events, which induced 10 to 39% insect mortality, a significant reduction of 65% in weight compared with control, a reduction of 36% in consumption and a reduction in moth fertility in the adults that emerged from larvae that survived the feeding challenge. These results show that the *Jbtx* expressed in maize plants present both a lethal and a sublethal effect in this species of lepidopteran that taken together strongly indicate the potential for the use of this toxin in economically viable transgenic strategies to introduce resistance to *S. frugiperda* in maize.

Key words: 1. Pest control. 2. Genetic engineering. 3. Plant-derived urease-derived entomotoxic peptide. 4. *Helicoverpa armigera*. 5. *Spodoptera frugiperda*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	<i>Lepidópteros-praga</i>	15
2.1.1	<i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)	15
2.1.2	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)	18
2.2	<i>Milho geneticamente modificado</i>	20
2.3	<i>Milho resistente a insetos</i>	21
2.4	<i>Ureases de feijão-de-porco (Canavalia ensiformis)</i>	23
2.4.1	Jaburetox	24
3	Capítulo I	28
	Toxicidade do peptídeo Jaburetox para lagartas do inseto-praga de múltiplos hospedeiros <i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	28
3.1	<i>Resumo</i>	28
3.2	<i>Introdução</i>	28
3.3	<i>Material e Métodos</i>	30
3.3.1	Toxicidade de duas versões do peptídeo Jaburetox em lagartas neonatas de <i>H. armigera</i>	32
3.3.2	Toxicidade da versão completa do Jaburetox a lagartas de 3º instar de <i>H. armigera</i>	32
3.3.3	Avaliações realizadas e análise dos dados	33
3.4	<i>Resultados</i>	33
3.4.1	Toxicidade de duas versões do peptídeo Jaburetox em lagartas neonatas de <i>H. armigera</i>	33
3.4.2	Toxicidade da versão completa do Jaburetox a lagartas de 3º instar de <i>H. armigera</i>	36
3.5	<i>Discussão</i>	38
3.6	<i>Conclusão</i>	42
4	Capítulo II	43
	Produção de plantas de milho geneticamente modificadas com o gene <i>jaburetox</i> visando resistência a <i>Spodoptera frugiperda</i> (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)	43
4.1	<i>Resumo</i>	43
4.2	<i>Introdução</i>	43

4.3	<i>Material e Métodos</i>	45
4.3.1	Transformação genética de milho com <i>A. tumefaciens</i>	45
4.3.2	Seleção dos eventos transgênico do milho Hi-II com o gene <i>jbtx</i>	46
4.3.3	Análise de presença do gene por PCR	48
4.3.4	Segregação dos eventos transgênicos nas gerações T1 e T2	48
4.3.5	Análise da expressão relativa do <i>Jbtx</i> via RT-qPCR	49
4.3.6	Bioensao para avaliação do efeito das plantas transgênicas ao inseto-praga <i>S. frugiperda</i>	50
4.4	<i>Resultados</i>	52
4.4.1	Transformação genética de milho com <i>A. tumefaciens</i>	52
4.4.2	Análise da presença do gene por PCR	53
4.4.3	Segregação dos eventos nas gerações T1 e T2 e expressão relativa do transgene	54
4.4.4	Análise da expressão relativa do <i>Jbtx</i> via RT-qPCR	56
4.4.5	Bioensaio para avaliação do efeito das plantas transgênicas ao inseto-praga <i>S. frugiperda</i>	61
4.5	<i>Discussão</i>	72
4.6	<i>Conclusões</i>	80
5	Considerações Finais	81
6	Conclusão geral	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICES	99
	<i>Apêndice I - Relação das avaliações realizadas nas plantas dos diferentes eventos em cada geração</i>	<i>100</i>

1 INTRODUÇÃO

O ataque de pragas se destaca nos sistemas de produção, visto que as mesmas, muitas vezes, são polífitas, migram de uma cultura para a outra, ou ainda, para onde haja oferta de alimento. Entre as pragas de milho estão as lagartas *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e a *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). O controle dessas pragas restringe-se, de maneira principal, aos inseticidas e a tecnologia Bt. Porém, os inseticidas podem causar problemas à saúde humana e ao meio ambiente, além de elevar o custo de produção e propiciar o surgimento de insetos resistentes pela sua intensiva utilização.

A tecnologia Bt, em milho, é proveniente da transformação genética de plantas com genes que codificam proteínas entomotóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis*, que agem no intestino dos insetos a partir da ingestão dessas plantas, controlando desta forma as pragas. Porém, como ocorre naturalmente nas populações, existem alguns indivíduos que são resistentes a essas toxinas e conseguem sobreviver, se reproduzir e transferir para a sua prole a característica genética de resistência.

Para tanto, o uso de refúgio no campo é uma das estratégias para se manejar a resistência desses insetos. O refúgio tem como objetivo manter, por meio do cultivo de plantas não Bt, uma população de indivíduos que são suscetíveis e que podem se acasalar com insetos resistentes eventualmente presentes nas áreas de cultivo de plantas Bt. Dessa forma, a velocidade de desenvolvimento de populações de insetos resistentes às plantas Bt é reduzida.

Entretanto, há uma evolução da resistência nas populações de insetos-praga alvo dessa tecnologia, devido à pressão de seleção exercida pela expressão contínua das proteínas pelas plantas Bt e pelo descaso às recomendações em relação ao uso do refúgio. Assim, há necessidade de outros genes e outras alternativas de controle de insetos

para prevenir ou retardar a seleção de indivíduos resistentes. Uma alternativa seria o uso do peptídeo entomotóxico Jaburetox (JBTX), isolado de uma urease de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), o qual se mostrou tóxico para muitas espécies de insetos, inclusive *S. frugiperda*. Porém, não se tem conhecimento da sua expressão e toxicidade a insetos quando inserido geneticamente em plantas de milho, e nem se este peptídeo é tóxico para *H. armigera*, já que é uma praga recentemente introduzida na América, altamente polífaga, causando danos nas produções por consumir partes reprodutivas e folhas jovens.

O sucesso para obter uma planta de milho expressando esse peptídeo, não depende somente da capacidade de fornecer DNA funcional para a célula da planta, mas também da capacidade de produzir plantas transgênicas que herdem estávelmente e expressem os genes exógenos. Existem possíveis mecanismos envolvidos na eliminação dos transgenes de uma geração para outra, assim como na sua expressão transcricional e pós transcricional. Exemplo disso é a ocorrência de recombinação intracromossomal, co-eliminação dos transgenes ativada por algum processo de defesa do genoma vegetal e instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido, processo pelo qual passam os explantes de milho transformados por *Agrobacterium tumefaciens*.

Nesse contexto o presente trabalho se configura em verificar: 1) se o peptídeo JBTX é tóxico para *H. armigera*; 2) se é possível transformar plantas de milho com a sequência gênica que codifica o peptídeo, transferindo-a de forma estável para as próximas gerações; 3) e verificar se as plantas de milho geneticamente transformadas expressando *Jbtx* são tóxicas à *S. frugiperda*.

Para isso, como componentes desse trabalho tem-se: Revisão da literatura; a qual irá abordar os aspectos conceituais e as principais descobertas nos últimos anos sobre os lepidópteros-praga (*S. frugiperda* e *H. armigera*), milho geneticamente modificado resistente a insetos e ureases de feijão-de-porco com um enfoque principal no JBTX. Nos

Capítulos I e II serão apresentados e discutidos os resultados de dois experimentos. O primeiro versa sobre a toxicidade de duas versões do peptídeo JBTX em dois estádios de desenvolvimento de *H. armigera* e o outro trata da produção de plantas de milho geneticamente modificadas com a sequencia gênica *Jbtx* e da análise sobre sua toxicidade a *S. frugiperda*. Em seguida, faz-se Considerações Finais a respeito dos dois experimentos, e, por fim, apresenta-se a Conclusão Geral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lepidópteros-praga

2.1.1 *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

H. armigera é um inseto de ampla distribuição geográfica (ALI et al., 2009), sendo sua provável região de origem a costa do Mediterrâneo (GUOQING et al., 2001). É altamente polífaga e se destaca entre as pragas agrícolas, sendo considerada um sério problema em qualquer parte do mundo onde ocorre. As lagartas causam perdas significativas por atacarem as plantas, tanto na fase vegetativa quanto na reprodutiva, consumindo folhas, caules, brotos, inflorescências e frutos (FITT, 1989; SULLIVAN; MOLET, 2014).

Registros mostram sua presença em praticamente todos os continentes, podendo ser encontrada na Europa, Ásia, África, Austrália, Oceania e América (GUOKING et al., 2001; CZEPAK et al., 2013; MÚRUA et al., 2014; NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION, 2015). No continente americano, foi identificada em 2013, no Brasil, onde era considerada uma praga quarentenária, até esse ano, quando foram registrados sucessivos ataques em lavouras nos estados da Bahia, Goiás e Mato Grosso (CZEPAK et al., 2013). Nesse mesmo ano, a praga encontrava-se amplamente disseminada no país (PRATISSOLI et al., 2015) inclusive no Rio Grande do Sul (SALVADORI et al., 2013), e em outros países da América do Sul, como Paraguai e Argentina (SENAVE, 2013).

A disseminação de *H. armigera* está relacionada à sua alta capacidade de dispersão, pois os adultos são migrantes naturais e podem percorrer longas distâncias, chegando a 1.000 km (PEDGLEY, 1985). A migração é realizada no período noturno, por várias horas, a favor do vento e por centenas de quilômetros em apenas uma noite

(FITT, 1989). Além disso, o comércio internacional de plantas também contribui para o transporte de *H. armigera* para diferentes regiões (LAMMERS; MACLEOD, 2007).

Essa praga tem habilidade de sobreviver em plantas cultivadas com importância econômica em safra e entressafra, e até em plantas daninhas, que funcionam como hospedeiros alternativos para a lagarta, na ausência de seus hospedeiros principais. São descritas, como plantas hospedeiras de *H. armigera*, mais de cento e oitenta espécies vegetais cultivadas e setenta espécies silvestres, distribuídas em um total de 35 famílias, dentre elas: Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 2014).

Assim como os demais insetos do grupo dos lepidópteros, *H. armigera* passa pelo processo completo de metamorfose, constituído pelas fases de ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto. Os ovos apresentam uma coloração branco-amarelada e aspecto brilhante, são depositados de maneira isolada ou em pequenos grupos e, a medida que o embrião se desenvolve, adquirem coloração escura, próximo ao momento de eclosão das lagartas, que ocorre em média 3 dias após a postura (ALI et al., 2009). A oviposição realizada pelas fêmeas ocorre durante o período noturno sobre as folhas (geralmente na superfície adaxial) ou sobre flores, talos, brotações terminais e frutos.

O seu período larval compreende a passagem por cinco ou seis ínstaes, e dura de 14 a 24 dias, dependendo das condições ambientais e alimentares (HEMATI; NASERI; RAZMJOU, 2014). À medida que as lagartas se desenvolvem, elas podem sofrer mudança de coloração, observadas desde colorações claras como branco-amarelada até mais escuras, em tons de marrom-avermelhado (TEODORO et al., 2015) que pode ser influenciada pelo tipo de alimentação (ALI et al., 2009). Quando as lagartas atingem o quarto ínstar, apresentam uma região em forma de sela composta por tubérculos escuros bem visíveis na região dorsal do primeiro segmento abdominal, uma característica para a identificação da fase jovem (MATTHEWS, 1999).

Outra característica morfológica que se destaca nessa espécie é a textura do tegumento que apresenta aspecto coriáceo. Quando perturbadas, as lagartas de *H. armigera* têm um comportamento peculiar de curvarem a cápsula cefálica em direção ao

primeiro par de pernas abdominais, permanecendo retraídas por um curto período de tempo (CZEPAK et. al., 2013). As lagartas podem medir de 30 a 40 mm de comprimento no último ínstar (EPPO, 1981).

Antes da fase de pupa, é evidenciada uma fase distinta, chamada pré-pupa. Esta etapa do desenvolvimento se inicia exatamente no momento em que a lagarta de quinto ou sexto ínstar interrompe a sua alimentação e dura até o momento em que se inicia a fase de pupa propriamente dita (FITT, 1989; ALI et al., 2009). De acordo com Karim (2000), na fase de pré-pupa as lagartas procuram o solo, onde encontram condições ideais de temperatura, umidade e luminosidade para o desenvolvimento pupal. A pupa apresenta coloração castanha a marrom-escura. Essa fase tem uma duração média de 10 a 14 dias (ALI et al., 2009).

Na fase adulta, apresentam dimorfismo sexual mais nítido, as fêmeas possuem as asas anteriores em cor amarelo-palha, enquanto as dos machos são mais próximas de cinza-esverdeado. As asas posteriores de ambos são mais claras, com uma borda mais escura na extremidade apical (ÁVILA et al., 2013). Os machos têm uma longevidade média de 9 dias enquanto as fêmeas apresentam 12 dias, dos quais aproximadamente cinco dias correspondem ao período de oviposição (ALI et al., 2009). Cada fêmea pode ovipositar de 2.200 até 3.000 ovos durante o período de oviposição (NASERI et al., 2011).

Os danos de *H. armigera* em culturas agrícolas ocorrem em decorrência da alimentação da fase de larva, quando se alimentam de folhas, especialmente os brotos, inflorescências, frutos e vagens (MORAL-GARCIA, 2006; SULLIVAN; MOLET, 2014). Dessa forma, os danos podem ser percebidos em toda a fenologia dos hospedeiros, isso é, tanto na fase vegetativa quanto na fase reprodutiva das culturas, culminando em perdas econômicas elevadas. Nas regiões de origem da praga, o prejuízo médio anual decorrente do ataque de *H. armigera* foi de dois bilhões de dólares (TAY et al., 2013).

A dificuldade de controle de *H. armigera* em sistemas de produção deve-se a algumas características intrínsecas à praga, tais como a capacidade de adaptação em diferentes ambientes e hospedeiros e alta taxa de fecundidade, culminando em gerações curtas e elevado potencial migratório (NASERI et al., 2009; MIRONIDIS et al., 2010).

Dentre os métodos de controle, estão o método de resistência de plantas, controle cultural, controle biológico e o controle químico (CZEPAK et al., 2013).

Estudos apontam a prevalência de *H. armigera* em dicotiledôneas, (LEITE et al., 2014). Porém, larvas de *H. armigera* foram encontradas em espigas de milho, e estudos comprovaram que esse alimento fornece condições nutricionais para a sobrevivência, crescimento e desenvolvimento das larvas (SUZANA et al., 2015). Além disso, estudos demonstram que na Austrália, milho e sorgo são hospedeiros potenciais e que contribuem para o aumento das populações de *H. armigera* (MAELZER; ZALUCKI, 1999). Possivelmente, em alguns anos, essa praga poderá ser encontrada mais comumente nesses cultivos devido à adaptação da espécie às condições de cultivo brasileiras (REIGADA et al., 2015).

2.1.2 *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

A *S. frugiperda* é conhecida como lagarta-do-cartucho e lagarta-militar, sendo a principal praga da cultura do milho no Brasil. Com o aumento do cultivo de milho no país, a disponibilidade de alimento para *S. frugiperda* aumentou, o que contribuiu para seu aumento populacional, tornando-a praga não só das folhas, mas também das espigas. Quando o ataque é muito severo, nota-se uma quantidade elevada de excreções sobre as folhas, ocasionando total destruição do cartucho em plantas jovens, reduzindo a área fotossintética, causando perdas no rendimento de grãos na ordem de 30% a 60% (LIMA et al., 2010). Esse inseto é umas das principais pragas agrícolas na região Neotropical devido ao seu poder destrutivo, polifagia e resistência a diversos inseticidas (CARVALHO et al., 2013; JAKKA et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2015).

A lagarta-do-cartucho assim como a *H. armigera* é um inseto holometabólico, isto é, possui as fases de ovo, larva, pré-pupa, pupa e adulto e não apresenta diapausa. A duração da fase larval de *S. frugiperda* é de dez a trinta dias (CRUZ, 1995; ROSA et al., 2012). Quando recém-eclodidas, as lagartas são esbranquiçadas, possuem cápsula cefálica escura e mais larga do que o corpo e apresentam mais cerdas que as mais velhas.

No primeiro ínstar as lagartas medem cerca de 2 mm de comprimento. Já no último ínstar têm o corpo cilíndrico, de coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, que também apresenta manchas de coloração marrom-avermelhada (GALLO et al., 2002).

Ao final do período larval, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas. Inicialmente a pupa é de coloração verde-clara com o tegumento transparente. Nesta fase o corpo é frágil e sensível a injúrias. Depois de alguns minutos a pupa torna-se alaranjada, passando à coloração marrom-avermelhada e próximo à emergência torna-se escura, quase preta. Seu comprimento atinge de 13 a 16 mm por 4,5 mm de diâmetro (CRUZ, 1995). Essa fase tem um período de 8 dias no verão, podendo chegar a 25 dias no inverno, após o qual ocorre a emergência dos adultos (GALLO et al., 2002).

Quando adulto, são mariposas de aproximadamente 35 a 40 mm de envergadura, apresentam coloração pardo-escura nas asas anteriores e branco acinzentada nas posteriores, podendo apresentar longevidade de 12 dias. As asas anteriores do macho possuem manchas mais claras, diferenciando-o da fêmea. (ALVES et al., 1992; CRUZ, 1995).

Dependendo do tamanho das lagartas é o dano causado na cultura do milho. Logo no primeiro ínstar, iniciam sua alimentação raspando uma das faces da folha e deixando a epiderme do outro lado intacto. Por outro lado, as lagartas maiores começam a fazer orifícios na folha e quando passam para o quarto e quinto ínstars, podem destruir completamente o limbo foliar das folhas ainda novas que compõem o cartucho da planta, por isso seu nome comum (CRUZ, 1995).

Quando as plantas estão próximas do florescimento ocorre o período crítico do seu ataque, pois os danos são maiores e afetam a produtividade de grãos nas espigas. Em períodos de seca, especialmente na cultura do milho “safrinha”, suas populações aumentam, e no final do desenvolvimento das plantas podem também danificar a espiga, sendo que seu ataque ocorre preferencialmente pela lateral da espiga na região de contato desta com o colmo (GALLO et al., 2002).

Devido à ampla variedade de hospedeiros e facilidade de dispersão, o controle de *S. frugiperda* torna-se difícil. A migração das lagartas para outras plantas cultivadas pode ocorrer a partir de ervas daninhas que se desenvolvem nas bordas das culturas (HALLMAN, 1979). Algodão, alfafa, amendoim, arroz, aveia, batata, batata doce, cana-de-açúcar, milho, soja e trigo são algumas das plantas que podem ser hospedeiras de *S. frugiperda* (ANDREWS, 1988).

O controle de *S. frugiperda* precisa ser melhor desenvolvido, pois além das características citadas de elevado índice de alimentação e capacidade reprodutiva, a lagarta é tolerante a diversos inseticidas químicos (CARVALHO et al., 2013) e também aos genes Cry1Ac e Cry1F de *Bacillus thuringiensis* (Bt) (BERNARDI et al., 2015; FARIAS et al., 2014; STORER et al., 2010). Sua importância como o principal inseto-praga na cultura do milho motiva a identificação de novos genes, visando a obtenção de plantas de milho geneticamente modificadas resistentes para auxiliar no controle desta espécie.

2.2 Milho geneticamente modificado

Cultivado no mundo inteiro, o milho (*Zea mays* L.) movimenta um mercado anual de aproximadamente 40 bilhões de dólares (JAMES, 2016). É um dos principais cereais cultivados e consumidos no mundo, servindo de alimento tanto para o homem como para os animais. Esta cultura tem sido alvo de inúmeros estudos de manipulação genética e transformação de plantas. O melhoramento genético por meio de ferramentas biotecnológicas, ou seja, a introdução de genes via engenharia genética tem contribuído para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, pois plantas tolerantes a herbicidas e resistente a insetos, as quais estão sendo cultivadas no Brasil, tem causado uma redução na aplicação de defensivos agrícola, bem como na emissão de CO₂ na atmosfera (JAMES, 2010).

Em 2016, o Brasil cultivou 15,7 milhões de hectares (ha) de milho transgênico (JAMES, 2017). Conforme James (2013), o Brasil é o país que mais cresce em área para produção de transgênicos. Embora plantas transgênicas sejam intensivamente cultivadas

no Brasil, estas são produzidas por multinacionais sendo importante a produção das mesmas no país.

Inicialmente plantas de milho transformadas geneticamente foram produzidas pelo emprego da técnica de biobalística (GORDON-KAMM et al., 1990), entretanto, hoje, a transformação mediada por *A. tumefaciens* tem sido preferida para esse fim (FRAME et al., 2002, 2006, 2011; OMBORI et al., 2013; QUE et al., 2014; HIEI et al., 2014), por ser uma alternativa mais eficiente, visto que este método permite a integração do gene exógeno em regiões transcricionalmente ativas do genoma, assim como a introdução de baixo número de cópias integradas no genoma da planta com raros rearranjos (ISHIDA et al., 2007).

A. tumefaciens é uma bactéria gram negativa do solo, capaz de transferir e integrar parte do seu DNA, o T-DNA, no genoma nuclear das células. Entretanto, é um microorganismo que infecta naturalmente plantas dicotiledôneas, havendo dificuldades no estabelecimento de técnicas para a infecção de plantas monocotiledôneas, como é o caso do milho. Carvalho et al. (2004) relataram que as dificuldades do método de transformação por *A. tumefaciens* em monocotiledôneas pode ser devido à multiplicidade de fatores que influenciam a transformação.

A transformação genética possibilita a produção de plantas transgênicas com novas características e funções. As plantas transgênicas, também denominadas plantas geneticamente modificadas, são plantas que receberam um ou vários genes pela engenharia genética sem a ocorrência de fecundação ou cruzamentos sexuais (TORRES et al., 1999). Essa tecnologia tem sido empregada na produção de plantas mais produtivas, tolerantes a estresses ambientais, tolerantes a herbicidas e resistentes a insetos.

2.3 Milho resistente a insetos

No Brasil, híbridos de milho geneticamente modificados, foram inicialmente aprovadas para uso comercial em 2007, e a cada ano sua utilização tem aumentado, chegando na safra 2015/2016 a 15,7 milhões de hectares cultivados representando, cerca

de 88,4% da área total plantada, considerando-se os dois períodos de plantio de milho, verão e safrinha (CÉLERES, 2016).

Atualmente, no Brasil existem liberados comercialmente 44 eventos de milho geneticamente modificado, dos quais 34 apresentam na sua composição proteínas para o controle de insetos-praga (JAMES, 2017). Os genes *cry* utilizados para conferir esta característica são de *B. thuringiensis* (Bt), que conferem alto padrão de resistência às plantas a algumas espécies de lepidópteros-praga (ARMSTRONG et al., 1995).

O gene introduzido codifica a expressão de proteínas Cry, com ação inseticida. As lagartas, ao se alimentarem do tecido foliar do milho geneticamente modificado, ingerem essa proteína, que atua nas células epiteliais do tubo digestivo dos insetos. A proteína promove a ruptura osmótica dessas células determinando a morte dos insetos, antes que os mesmos consigam causar danos significativos à cultura (GILL et al., 1992; HUANG et al., 2002)

As principais vantagens do uso do milho geneticamente modificado, quando as populações do inseto alvo são suscetíveis às proteínas expressas são: redução na aplicação de inseticidas, principalmente inseticidas de largo espectro, e aumento na produtividade das plantas (HUANG et al., 2002). Além disso as toxinas são altamente específicas e se ligam a diferentes receptores em diversas espécies de insetos. Algumas das proteínas Cry, como por exemplo a Cry1Ab apresentam toxicidade a mais de uma ordem de insetos, como lepidópteros, dípteros e coleópteros (PRAÇA et al., 2004). Além das toxinas na forma de cristais, várias cepas de *B. thuringiensis* também produzem outras endotoxinas, como as Cyt (PEREZ et al., 2005) e VIP (SELVAPANDIYAN et al., 2001).

Entretanto, segundo Resende et al. (2014), a expressão contínua de genes *cry* em plantas transgênicas, exerce forte seleção para o surgimento de resistência em populações de pragas-alvo. Essa evolução da resistência em populações de insetos-alvo pode reduzir os benefícios econômicos e ambientais dos cultivos transgênicos à base de Bt (FARIAS et al., 2013), o que já foi verificado em Porto Rico (STORER et al., 2010) e no Brasil em alguns estados como Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, (FARIAS et al., 2013; OMOTO et al., 2016), onde as primeiras tecnologias liberadas comercialmente

estão apresentando baixa porcentagem de controle (CZEPAK et al., 2013), necessitando de programas de pulverizações de inseticidas de modo semelhante aos híbridos convencionais. No entanto, outros genes como peptídeos derivados de urease de plantas tem se mostrado eficientes como entomotoxinas, podendo ser utilizados na produção de transgênicos para a obtenção de plantas resistentes a insetos.

2.4 Ureases de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)

Existem três isoformas de ureases presentes no feijão-de-porco, a urease majoritária (JBU) (SUMNER, 1926), a Canatoxina (FOLLMER et al., 2001) e a JBURE-II (PIRES-ALVES et al., 2003; MULINARI et al., 2011). Em estudos com a JBU, foi descoberto um papel biológico do Ni^{2+} que é encontrado no seu sítio ativo, e da grande maioria das ureases, classificando-as como metaloenzimas (DIXON et al., 1975). A Canatoxina, por sua vez, foi isolada por Carlini e Guimarães (1981) e, somente 20 anos mais tarde, essa neurotoxina foi identificada como uma isoforma de urease (FOLLMER et al., 2001). Por fim, a JBURE-II teve seu cDNA clonado em *Escherichia coli* (MULINARI et al., 2011), apresentando alta identidade de aminoácidos com ureases de plantas (71 a 82 %), sendo, assim, caracterizada como uma terceira isoforma de urease de feijão-de-porco.

A Canatoxina foi a primeira isoforma de urease a ser testada contra insetos, se mostrando letal quando ingerida por bruquídeo como *Callosobruchus maculatus* (caruncho-do-feijão) e hemípteros como *Rhodnius prolixus* (barbeiro), *Dysdercus peruvianus* (percevejo-manchador-do-algodoeiro), *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae), porém não afetou outros insetos como o lepidóptero *Manduca sexta* (mandarová-do-fumo), o artóptero *Schistocerca americana* (gafanhoto-sul-americano) e os dípteros *Drosophila melanogaster* (mosca-das-frutas) e *Aedes aegypti* (mosquito-da-dengue) (CARLINI et al., 1997; FERREIRA-DASILVA et al., 2000; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANISÇUASKI et al., 2005).

A atividade inseticida de Canatoxina é em parte dependente da liberação de um

peptídeo interno de 10 kDa (Pepcanatox), liberado por hidrólise da toxina por enzimas digestivas do tipo catepsina (cisteíno e aspártico proteases) encontradas nos insetos *C. maculatus*, *R. prolixus*, *N. viridula*, *D. peruvianus* e *O. fasciatus* (FERREIRA-DASILVA et al., 2000; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANISÇUASKI et al., 2005; DEFFERRARI et al., 2011). A ativação proteolítica de canatoxina foi demonstrada pela digestão *in vitro* da proteína com enzimas obtidas de larvas de *C. maculatus*. Os peptídeos resultantes foram fracionados por gel filtração e testados contra *R. prolixus*. Da fração mais ativa foi isolado um peptídeo tóxico de 10 kDa, denominado Pepcanatox (FERREIRA-DASILVA et al., 2000).

A isoforma majoritária JBU foi testada contra *R. prolixus*, *D. peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus*, mostrando o mesmo nível de atividade inseticida da Canatoxina (FOLLMER et al., 2004; STANISÇUASKI et al., 2010; DEFFERRARI et al., 2011). JBURE-II também apresenta efeitos entomotóxicos, causando inibição de diurese em *R. prolixus* (MULINARI et al., 2011). O efeito inseticida das ureases é dependente do ciclo de vida do inseto, afetando preferencialmente ninfas quando administrado via oral (FERREIRA-DASILVA et al., 2000; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; STANISÇUASKI et al., 2005). Acredita-se que a atividade entomotóxica das isoformas de urease possam contribuir para a resistência de *C. ensiformis* contra insetos (DEFFERRARI et al., 2014).

2.4.1 Jaburetox

Baseado na sequência N-terminal do peptídeo Pepcanatox e utilizando como molde o cDNA da isoforma JBURE-II, obteve-se, por expressão heteróloga em *E. coli*, um peptídeo recombinante de 91 aminoácidos, chamado de *Jack Bean Urease Toxin* (Jaburetox-2Ec) (apresentando um epitopo viral V5 e uma cauda com seis histidinas). Jaburetox-2Ec apresentou um amplo espectro de atividade inseticida, que também incluiu insetos não susceptíveis à Canatoxina como *S. frugiperda* (MULINARI et al., 2007) e *A. aegypti* (BECHER-RITT et al., 2017). Ou seja, este peptídeo é tóxico mesmo para insetos que não apresentam as enzimas digestivas do tipo catepsina.

Com intuito de compreender o modo de ação inseticida do Jaburetox-2Ec, estudos de modelagem molecular foram realizados sugerindo a existência de um grampo β na porção C-terminal do peptídeo (MULINARI et al., 2007; BARROS et al., 2009). Este foi confirmado na estrutura cristalográfica de JBU (BALASUBRAMANIAN; PONNURAJ, 2010), sugerindo-se que este poderia ser a região do peptídeo com atividade inseticida (BALASUBRAMANIAN et al., 2013; BARROS et al., 2009). Uma variante do peptídeo recombinante Jaburetox-2Ec, sem o epítipo V5 e contendo apenas a cauda de histidina, foi clonado e expresso em *E. coli* e denominado apenas Jaburetox (JBTX) (POSTAL et al., 2012).

Visando confirmar experimentalmente a importância do grampo β , três mutantes do peptídeo JBTX foram construídos: JBTX- $\Delta\beta$ (mutante com deleção do grampo β), JBTX-N-ter (mutante correspondente à metade N-terminal do peptídeo) e JBTX-C-ter (mutante correspondente à metade C-terminal do peptídeo, e que contem o grampo β) (MARTINELLI et al., 2014). O peptídeo com deleção do grampo β apresentou todas as propriedades biológicas da forma selvagem do peptídeo, demonstrando não ser esta a porção biologicamente ativa da molécula. Já, em ensaios de injeção em *O. fasciatus* e *R. prolixus*, somente o peptídeo mutante correspondente à metade N-terminal apresentou atividade inseticida, enquanto os outros dois peptídeos foram inócuos.

Contudo, JBTX C-ter e JBTX N-ter foram ativos quando ingeridos pelos insetos, indicando diferentes modos de ação para os peptídeos, dependendo da via de administração. Ambos os peptídeos causaram o bloqueio da junção neuromuscular da barata *Phoetalia pallida*, inibiram a secreção em túbulos de Malpighi de *R. prolixus*, além de causarem ruptura de vesículas unilamelares grandes. Estes dados sugerem que a porção N-terminal é a responsável pela atividade entomotóxica. No entanto, a região C-terminal do peptídeo contribui de forma importante na interação do JBTX com membranas celulares (MARTINELLI et al., 2014).

Comprovando a capacidade do JBTX de interagir com membranas, outros estudos demonstraram que o peptídeo selvagem e seus mutantes podem se inserir em bicamadas lipídicas planares e formar canais iônicos cátions seletivos. O peptídeo JBTX N-ter é mais ativo, formando canais em membranas com potenciais negativos, enquanto que a

atividade de formar canais dos outros mutantes é voltagem independente (PIOVESAN et al., 2014).

O mecanismo da ação inseticida do JBTX não está completamente esclarecido. Apesar de já ter sido relatado que o peptídeo é letal para lagartas de *S. frugiperda* (MULINARI et al., 2007), não foram feitos estudos para investigar o mecanismo de ação em lepidópteros. Sabe-se que no hemíptero *R. prolixus* ocorre inibição da diurese e provável desequilíbrio eletrolítico, com alterações nos níveis de GMP (Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato) cíclico e no potencial transmembrana dos túbulos de Malpighi (STANISÇUASKI et al., 2009). Em outro estudo, após injeção do JBTX no hemíptero *Triatoma infestans*, os insetos apresentaram paralisia das pernas e movimentos descoordenados das antenas, sugestivos de efeitos neurotóxicos, antecedendo a morte. O peptídeo foi localizado no sistema nervoso central do inseto, no qual foi observado significativa redução do neurotransmissor óxido nítrico e da atividade da enzima responsável por sua formação, a óxido nítrico sintase (NOS) (GALVANI et al., 2015). O JBTX também afeta o sistema imune de *R. prolixus*, induzindo agregação de hemócitos e causando alterações morfológicas sugestivas de apoptose nessas células, e comprometendo, assim, a resposta dos insetos para um desafio com bactérias entomopatogênicas (FRUTTERO et al., 2016).

Em estudo com *R. prolixus* confirmou-se o efeito de JBTX no sistema nervoso central e foi demonstrado que as glândulas salivares também são um alvo para a ação tóxica do peptídeo, ampliando a extensão de órgãos afetados por JBTX *in vivo*. Além de confirmar enzimas como alvos moleculares de JBTX e identificar uma nova via enzimática alterada, a da quitina sintase. Foi observado que em glândulas salivares ocorre uma redução nos níveis de RNAm de NOS e de outras enzimas relacionadas ao sistema nervoso quando tratado com JBTX, sendo este o primeiro relato onde o JBTX modifica a expressão gênica em insetos, acrescentando ainda outro nível de complexidade ao seu mecanismo de ação entomotóxico (FRUTTERO et al., 2017).

O desenvolvimento de resistência a insetos é a razão mais importante para descobrir e caracterizar novos compostos que podem ser utilizados como inseticidas. Idealmente, essas substâncias devem ser tóxicas apenas para espécies nocivas ao meio

ambiente. Em relação a esses pontos, uma estratégia empregando plantas transgênicas expressando peptídeos inseticidas ou formulações contendo peptídeos entomotóxicos podem ser alternativas mais seguras para controle de pragas, em comparação com pesticidas químicos, devido à sua degradabilidade (FOLLMER, 2008). Além disso, resultados preliminares com culturas transgênicas de plantas de cana-de-açúcar, soja e tabaco expressando *Jbtx* mostraram maior resistência ao ataque de insetos (CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016; BECKER-RITT et al., 2017). Testes com duas espécies modelos de mamíferos (roedores) demonstraram que o JBTX é inócuo para a Classe Mammalia (MULINARI et al., 2007), indicando seu potencial de uso em plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos pela sua segurança alimentar.

3 CAPÍTULO I

Toxicidade do peptídeo Jaburetox para lagartas do inseto-praga de múltiplos hospedeiros *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

3.1 Resumo

Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) destaca-se pelos danos extensivos que pode causar às culturas. Os peptídeos entomotóxicos derivados de urease de feijão-de-porco, Jaburetox (JBTX) e JBTX Δ - β , apresentam potencial para o controle de algumas espécies de insetos e podem fornecer uma alternativa para o controle de pragas em culturas agrícolas. Este trabalho avaliou a eficácia destes dois peptídeos no comportamento e sobrevivência das larvas de *H. armigera* em dois estádios de desenvolvimento. Larvas recém-nascidas foram alimentadas com folhas por oito dias com dois tratamentos: (T1) 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de JBTX; (T2) 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de JBTX Δ - β ; e dois tratamentos controles: (T3) pH 7,5 a 20 mM de tampão fosfato e (T4) água destilada. Ambos os peptídeos induziram maior mortalidade do que os controles, o JBTX Δ - β induziu maior mortalidade durante os primeiros 6 dias, quando ambos os peptídeos foram igualmente eficazes e causaram uma mortalidade de ~70%. Ambas as versões dos peptídeos também causam um atraso no desenvolvimento das larvas, mas o peptídeo com a versão completa causou maior redução na alimentação. Em um segundo experimento, larvas de 3º instar foram submetidas a dois tratamentos por nove dias: (T1) 80 $\mu\text{g}/5\text{cm}^2$ de JBTX; e (T2) tampão fosfato de sódio como controle. O tratamento com JBTX induziu desenvolvimento mais lento e mortalidade significativamente maior do que o controle no sexto dia, com 100% de mortalidade em nove dias. Estes resultados suportam uma avaliação adicional do uso do peptídeo JBTX em estratégias de controle para *H. armigera*, incluindo a expressão transgênica deste peptídeo em plantas cultivadas.

Palavras-chave: 1. Peptídeo derivado de urease. 2. Controle de insetos-pragas. 3. Entomotoxina. 4. Fase larval.

3.2 Introdução

A *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga agressiva para diversas culturas agrícolas, incluindo soja [*Glycine max* (L.) Merr.], Milho (*Zea mays* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (MORAL-GARCIA, 2006; SPECT et al., 2013; MAMTA et al., 2016). No Brasil, foi

identificado pela primeira vez em 2013 (CZAPACK et al., 2013; SALVADORI et al., 2013) e é considerada uma das principais pragas agrícolas do mundo, causando extensas perdas anuais na produção agrícola (LIM et al., 2016).

O controle de *H. armigera* geralmente depende da aplicação de inseticidas químicos, que, se usados inadequadamente, podem levar ao desenvolvimento de resistência a esse inseto-praga e podem ser potencialmente prejudiciais ao meio ambiente (ASOKAN et al., 2014). O uso de plantas geneticamente modificadas contendo genes resistentes a insetos, como os genes que codificam as toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), é uma alternativa ambientalmente sustentável.

No entanto, no caso da tecnologia Bt, onde é amplamente utilizado em todo o mundo e muitas vezes feito com uso inadequado de áreas de refúgio, resulta em alta pressão de seleção, levando ao desenvolvimento de resistência ao longo de anos de uso (RESENDE et al., 2014). Portanto, a identificação de outros genes entomotóxicos é necessária para aliviar o uso excessivo de toxinas Bt. O gene Jaburetox (*Jbtx*), derivado de uma urease vegetal, pode ser uma alternativa efetiva à toxina Bt.

As ureases são proteínas multifuncionais que são naturalmente produzidas pelas plantas. Funções incluindo defesa e conversão de nitrogênio ambiental em compostos biodisponíveis são atribuídas a elas. Como parte de sua função de defesa, elas demonstraram ter atividade inseticida e antifúngica (STANISÇUASKI; CARLINI, 2012; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2015; BECKER-RITT et al., 2017). Os peptídeos de sequência interna da urease, incluindo Jaburetox (JBTX), são inseticidas com atividade demonstrada contra várias ordens de insetos, incluindo Lepidoptera, Hemiptera, Blatodea e Diptera, como relatado por Stanisçuaski et al. (2005), Mulinari et al. (2007), Tomazetto et al. (2007), Defferrari et al. (2011), Martinelli et al. (2014), Galvani et al. (2015), Fruttero et al. (2016) e Becker-Ritt et al. (2017).

JBTX representa a porção entomotóxica da urease de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) (JABURE II) e é liberada após a ação da protease digestiva do inseto. Uma versão recombinante deste peptídeo, quando produzida por *Escherichia coli* (MULINARI et al., 2007), demonstrou ter propriedades entomotóxicas para insetos vetores de doenças

à humanos como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (BECHER-RITT et al., 2017), e pragas de plantas como *Spodoptera frugiperda* (MULINARI et al., 2007) *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Pyralidae) e *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae) (BECKER-RITT et al., 2017).

O peptídeo JBTX contém 93 aminoácidos (MULINARI et al., 2007). Em estudos para estabelecer relações de estrutura versus atividade biológica, o peptídeo JBTX Δ - β , com 79 aminoácidos, foi obtido pela remoção de uma porção C-terminal da molécula capaz de formar um β -hairpin, que poderia ser parcialmente responsável pela toxicidade para insetos. A mortalidade induzida pelo peptídeo JBTX Δ - β foi equivalente à versão completa de JBTX em *R. prolixus* e *Oncopeltus fasciatus* quando injetado nos insetos. No entanto, quando oferecido oralmente ao *R. prolixus*, os resultados de toxicidade foram menos evidentes e mais variáveis (MARTINELLI et al., 2014). Plantas de culturas transgênicas expressando JBTX podem ser uma nova estratégia para o controle de insetos (BECKER-RITT et al., 2017), incluindo *H. armigera*, se a atividade inseticida a este inseto puder ser demonstrada.

Este estudo teve como objetivo testar se os peptídeos entomotóxicos JBTX e JBTX Δ - β , quando fornecidos oralmente, afetam o comportamento e a sobrevivência das larvas de *H. armigera* e se existem diferenças na toxicidade entre as duas versões deste peptídeo.

3.3 Material e Métodos

Utilizou-se lagartas *H. armigera* provenientes da criação do Laboratório de Entomologia da Universidade de Passo Fundo (UPF) mantidas em dieta artificial.

Os peptídeos entomotóxicos, Jaburetox na versão completa (Jbtx) e sua versão truncada Jaburetox Δ - β (Jbtx Δ - β), foram produzidos pelo Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Para a produção de Jaburetox, células de *Escherichia coli* BL21(DE3)-RIL foram transformadas

por choque térmico com o plasmídeo pET23a-Jaburetox, clonado em Postal et al. (2012). As células foram cultivadas em 15 mL de caldo LB (Luria Bertani), 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol. A cultura foi realizada overnight a 37 °C e 150 rpm. Todo o conteúdo foi inoculado em 1 L de meio de autoindução (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, glicerol 5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 3.3 g/L, KH₂PO₄ 6,8 g/L, Na₂HPO₄ 7,1 g/L, glicose 0,5 g/L e lactose 2 g/L, com 100 µg/mL de ampicilina e 40 µg/mL de cloranfenicol) e cultivado a 37 °C, 150 rpm, até A_{600nm} de aproximadamente 0,7. As condições de indução foram overnight, 20 °C, 150 rpm. Após o cultivo, as células foram centrifugadas a 8.000 X g durante 10 min a 4 °C. As células foram ressuspensas em 30 mL de tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 5 mM de imidazol) e lisadas em sonicador de ponta por 20 ciclos de 1 minuto com frequência de 99 Hz. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 15.000 X g por 40 min a 4 °C e adicionado à uma coluna de afinidade Chelating Sepharose (GE Healthcare) carregada com Ni²⁺, previamente equilibrada com tampão A. As proteínas não retidas foram lavadas utilizando dez volumes de tampão A. Foi efetuada lavagem da coluna com 10 volumes de tampão B (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 50 mM de imidazol) e a eluição foi realizada com tampão C (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 500 mM de NaCl e 200 mM de imidazol). A fração rica em Jaburetox foi transferida para uma cromatografia de exclusão por tamanho em uma coluna Hiloal Superdex 200 26/60 prep grade, pré-equilibrada com tampão D (fosfato de sódio 50 mM, EDTA 1 mM e 1 mM de tris (2-carboxietil) fosfina - TCEP) montada em um sistema Akta Purifier (GE Life Technologies). A cromatografia foi realizada a um fluxo de 2,5 mL/min e frações de 5 mL foram coletadas. A pureza da amostra foi verificada através SDS-PAGE 15% e a concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford. A produção e purificação de Jbtx Δ-β foram realizadas de acordo com Martinelli et al. (2014).

Os peptídeos foram dialisados com tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,5 e aplicados sobre discos foliares de milho do genótipo Hi-II.

Foram realizados dois bioensaios conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF: (1) Toxicidade de duas versões do peptídeo Jaburetox em lagartas

neonatas de *H. armigera* e (2) Toxicidade da versão completa do Jaburetox a lagartas de 3º instar de *H. armigera*.

3.3.1 Toxicidade de duas versões do peptídeo Jaburetox em lagartas neonatas de *H. armigera*

As lagartas de *H. armigera* recém-eclodidas foram submetidas a quatro diferentes tratamentos: (T1) 16 µg/cm² de Jbtx (T2) 16 µg/cm² de Jbtx Δ-β, (T3) tampão fosfato de sódio 20 mM/pH 7,5 e (T4) água destilada, sendo os tratamentos T3 e T4 os controles. O delineamento experimental foi completamente casualizado com quatro repetições. Cada repetição constou de 15 placas de Petri (5,0 cm X 0,8 cm, forradas com papel filtro umedecido) contendo uma lagarta, onde foram fornecidos os discos foliares de milho tratados. As placas foram mantidas em câmara climatizada a 25 ± 2°C, umidade relativa de 70 ± 10% e fotoperíodo de 12 horas.

Até o quarto dia, foram oferecidos às lagartas discos foliares de 0,5 cm², contendo 8 µg dos peptídeos Jbtx e Jbtx Δ-β, diluídos em 7,3 µL de tampão fosfato de sódio e 0,01% de Silwet® (Surfactante), a cada 48 horas. Para os tratamentos controles foram oferecidos discos com 7,3 µL das respectivas soluções. Após o quarto dia, foram fornecidos discos foliares de 1 cm², sem os tratamentos, renovados a cada 48 horas, até o oitavo dia.

3.3.2 Toxicidade da versão completa do Jaburetox a lagartas de 3º instar de *H. armigera*

As lagartas de 3º instar foram submetidas a dois tratamentos: (T1) 80 µg/5cm² de Jbtx e (T2) tampão fosfato de sódio 20 mM/pH 7,5. O delineamento experimental foi completamente casualizado com três repetições. A unidade experimental foi constituída por 10 placas de Petri (5,0 cm x 0,8 cm, forradas com papel filtro umedecido) contendo uma lagarta cada.

Até o quinto dia foram oferecidos para as lagartas discos foliares de 1 cm² contendo 16 µg do peptídeo Jbtx diluído em 7,3 µL de tampão fosfato de sódio e 0,01% e Silwet® (Surfactante), totalizando 80 µg/5cm² do peptídeo. Para o T2 foi adicionado 7,3 µL de fosfato de sódio sobre os discos foliares. Após o quinto dia, os discos foliares foram renovados a cada 48 horas, durante nove dias, sem os tratamentos.

3.3.3 Avaliações realizadas e análise dos dados

Diariamente, foi avaliado o número de lagartas mortas e observada a troca de instar, através do resgate da cápsula cefálica das lagartas. O consumo de área foliar (mm) foi avaliado a cada 48 horas (quando houve renovação do disco foliar), pela diferença entre o valor inicial e a área restante. Foi avaliado o peso (mg) e o comprimento (mm) das lagartas sobreviventes ao término de cada experimento. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3.4 Resultados

3.4.1 Toxicidade de duas versões do peptídeo Jaburetox em lagartas neonatas de *H. armigera*

A mortalidade foi significativamente maior em larvas recém-nascidas alimentados com os peptídeos versus controles (Figura 1A). Durante os primeiros quatro dias de alimentação, o peptídeo JBTX Δ-β versão truncada induziu 27% a mais de mortalidade larval que a versão completa do JBTX (Fig 1A).

Dois dias após sessar a oferta da toxina (em seis dias), a mortalidade para ambos os peptídeos foi de quase 70% (69% e 67%, respectivamente para JBTX e JBTX Δ-β) em comparação com os controles e permaneceu neste nível até o final do experimento. A mortalidade dos controles sempre permaneceu abaixo de 10% durante o experimento (oito dias).

Não houve diferença estatística na mortalidade entre os dois controles utilizados (Figura 1A), indicando que o tampão fosfato de sódio (20 mM pH 7,5) e o surfactante, no qual os peptídeos são diluídos, não causam mortalidade significativa entre os insetos.

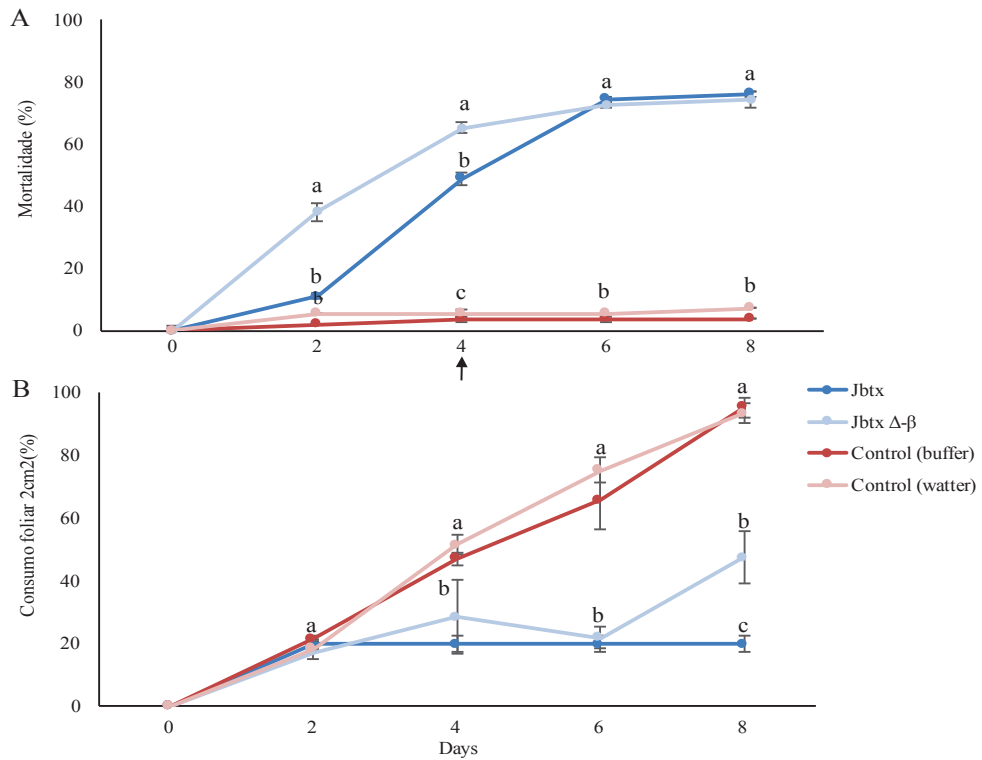
As larvas controle aumentaram continuamente seu consumo de 20% para mais de 90% durante todo o tempo do experimento (Figura 1B). O consumo de folhas pelas larvas alimentadas com o peptídeo JBTX permaneceu significativamente menor do que para os controles (20% de consumo diário quando se utilizou a versão de JBTX), mesmo quando o suprimento de peptídeo foi interrompido no quarto dia do experimento.

Considerando apenas larvas vivas no oitavo dia do experimento, as larvas que foram alimentadas com a versão completa do JBTX consumiram 70% menos que as larvas controle. Observamos também que no dia 8 (quatro dias após a interrupção da alimentação com toxina) as larvas alimentadas com a versão completa do JBTX continuaram reduzindo o consumo no mesmo nível, enquanto o peptídeo JBTX Δ - β teve um efeito diminuído do consumo alimentar. Por causa do aparente efeito mais duradouro do JBTX sobre o comportamento de alimentação, o JBTX foi selecionado para ser usado em outro ensaio.

Embora o JBTX tenha causado uma redução significativa no consumo de folhas por larva, não houve diferença significativa no peso de larvas vivas tratadas e não tratadas no dia 8 (dados não mostrados).

As larvas que sobreviveram até o oitavo dia e que foram alimentadas com os peptídeos (cerca de 30%) apresentaram atraso no desenvolvimento em relação aos controles, com nenhum chegando ao 5º instar (Figura 2).

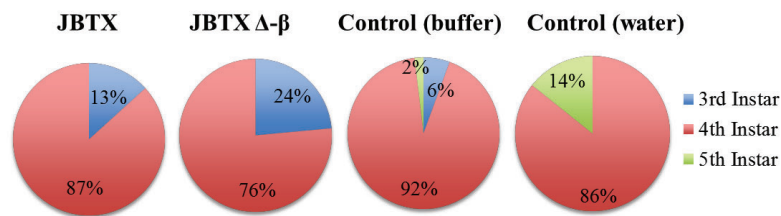
Figura 1 – Bioensaio de larvas de *Helicoverpa armigera* neonatas alimentadas com discos foliares de milho tratados com JBTX e JABTX Δ - β . A) Mortalidade acumulada; B) Consumo diário. A seta indica o dia em que a alimentação com toxina JBTX foi interrompida. Passo Fundo, 2015



Fonte: dados do autor.

Nota: Média com a mesma letra no mesmo dia não difere entre si (teste de Tukey, P <0,05).

Figura 2 - Porcentagem de larvas neonatas alimentadas com discos foliares tratados com JBTX, JBTX Δ - β ou soluções controles que atingiram o 3º, 4º e 5º instares no 8º dia de experimento. Passo Fundo, 2015



3.4.2 Toxicidade da versão completa do Jaburetox a lagartas de 3º instar de *H. armigera*

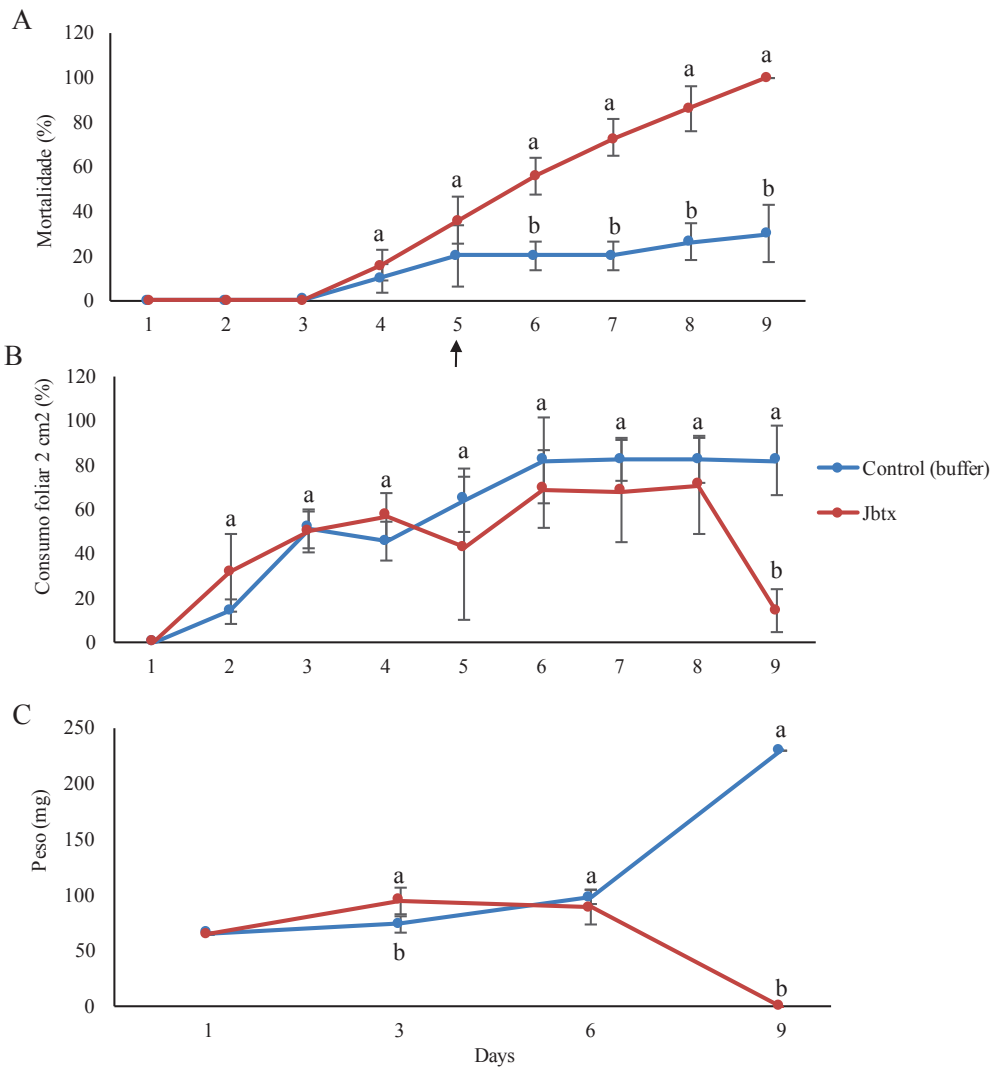
O efeito da versão completa do JBTX em *H. armigera* também foi avaliado em larvas mais velhas, 3º instar, que causam danos mais intensivos às lavouras. Avaliada em nove dias, o tratamento com JBTX causou 100% de mortalidade, enquanto nos controles (tampão fosfato) houve apenas 30% de mortalidade (Figura 3A). Além disso, a mortalidade continuou a aumentar de ~30% para 100% após a interrupção da toxina no dia cinco.

O consumo diário do disco foliar pelas larvas vivas não foi diferente entre as larvas tratadas com JBTX e os controles até o 9º dia do experimento (Figura 3B); entretanto, neste momento todas as larvas alimentadas com JBTX estavam mortas (Figura 3A), então essa redução representa mais um resultado de mortalidade e não de consumo alimentar. Portanto, embora o consumo alimentar significativo tenha sido observado em recém-nascidos alimentados com esses peptídeos, esse efeito não foi observado em larvas mais velhas. A quantidade total de peptídeo consumida pelas larvas foi de aproximadamente 40 µg dos 80 µg de peptídeo fornecidos a elas.

Houve um efeito significativo da alimentação de JBTX no ganho de peso, onde o peptídeo causou um aumento de 25% no peso em comparação com o controle no dia 3, (Figura 3C). Estes resultados sugerem que os peptídeos bloqueiam a digestão antes de causar a morte. No entanto, a perda de peso significativa observada entre os dias 6 e 9 pode ser devida à perda de peso pós-morte, uma vez que todas as larvas estavam mortas no dia 9, portanto essa perda de peso não pode ser atribuída diretamente à atividade peptídica.

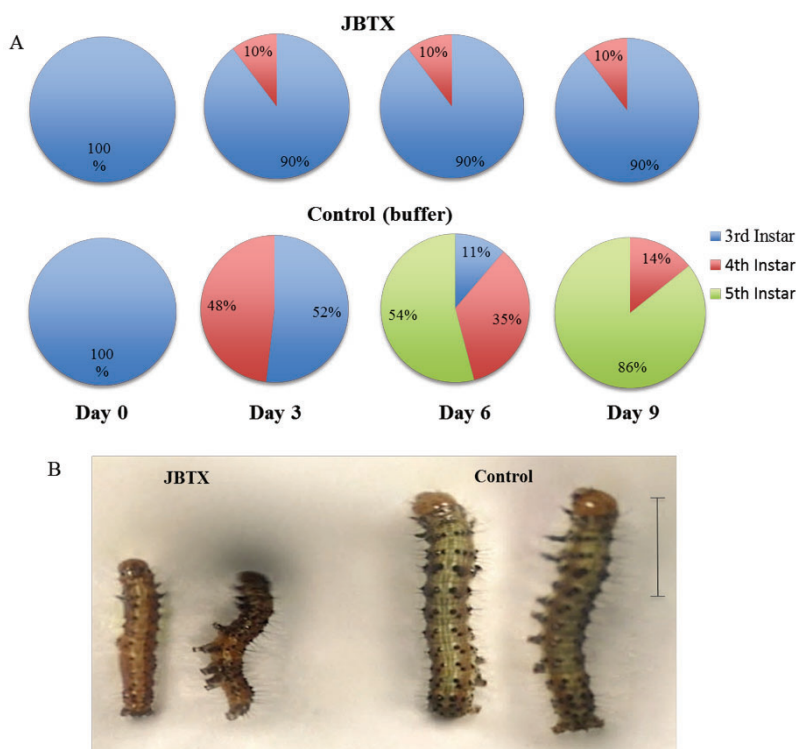
O peptídeo entomotóxico JBTX também causou um atraso no desenvolvimento. Apenas 10% das larvas alimentadas com JBTX atingiram o 4º instar e nenhuma atingiu o 5º instar. Já no controle houve um processo contínuo de desenvolvimento que levou a maioria (86%) das larvas atingirem o 5º instar ao dia 9 (Figura 4A). A Figura 4B mostra uma comparação representativa de larvas no dia 8.

Figura 3 - Bioensaio com larvas de *Helicoverpa armigera* de 3º instar alimentadas com discos foliares de milho tratados com JBTX. A) Mortalidade acumulada; B) Consumo diário; C) ganho de peso. A seta indica o dia em que a alimentação com toxina JBTX foi interrompida. Passo Fundo, 2015



Nota: Média com a mesma letra no mesmo dia não difere entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Figura 4 - A) Porcentagem de larvas de 3º instar alimentadas com discos foliares tratados com JBTX e solução controle que atingiram o 3º, 4º e 5º ínstaes ao longo do experimento; B) Larvas observadas no oitavo dia do bioensaio (1 dia antes de todos os tratados com JBTX terem morrido): as larvas de JBTX estão no 3º instar (80 µg/5cm²); As controles estão em 5º instar (Control). Passo Fundo, 2015



Nota: Barra 1 cm.

3.5 Discussão

Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que o peptídeo Jaburetox é tóxico para o inseto-praga de múltiplos hospedeiros *H. armigera*, com um alto nível de mortalidade alcançado em diferentes íntares larvais.

Quando as duas versões de peptídeos foram fornecidas para as larvas neonatas, o JBTX Δ - β induziu 27% mais mortalidade larval em comparação com a versão completa JBTX, durante os primeiros quatro dias de alimentação. No entanto, em seis dias, a mortalidade para ambos os peptídeos foi de quase 70% em comparação com os controles

e permaneceu neste nível até à avaliação final do oitavo dia, apesar da alimentação com os peptídeos ter cessado no dia 4.

A resposta rápida na mortalidade observada em larvas alimentadas com a versão curta do Jaburetox (JBTX Δ - β) pode ser devido ao seu tamanho (79 aminoácidos), que é uma forma truncada da versão completa JBTX (93 aa). Isto pode ter sido mais facilmente absorvido pelo sistema digestivo das larvas, proporcionando um efeito entomotóxico mais rápido. O tamanho menor deste peptídeo é devido à remoção de uma região proeminente, chamada β -hairpin, que anteriormente era considerada a que poderia ser parcialmente responsável pela toxicidade aos insetos (MARTINELLI et al., 2014). Foi posteriormente verificado que o domínio entomotóxico é encontrado na porção N-terminal do JBTX, e o peptídeo sem a região β -hairpin (C-terminal) causou mortalidade em ninfas de *R. prolixus* quando injetado equivalentes ao original JBTX (MARTINELLI et al., 2014). No entanto, quando oferecido oralmente ao *R. prolixus*, essa semelhança não era tão evidente em termos de mortalidade. Além disso, Martinelli et al. (2014) sugeriram que o β -hairpin está envolvido nas propriedades entomotóxicas totais, mas é a porção N-terminal que contém o principal domínio inseticida.

Nossos dados estão de acordo com o modelo acima, uma vez que mostra que as duas formas de peptídeo entomotóxico são igualmente eficazes em matar larvas neonatas, confirmando que a região com β -hairpin não é necessária para causar mortalidade quando introduzida oralmente pela *H. armigera*.

De fato, a ausência do delta- β causa mortalidade mais rápida em neonatos. No entanto, o JBTX de comprimento total parece ter efeitos mais duradouros após a interrupção da oferta dos peptídeos, sugerindo que o grampo β adiciona estabilidade biológica ao péptido dentro do inseto. O menor consumo de folhas pelas larvas recém-nascidas alimentadas com JBTX suporta essa idéia. Devido à manutenção da atividade de dissuasão alimentar mais forte, a toxicidade da versão completa do JBTX foi avaliada em larvas mais velhas.

A versão completa do JBTX induziu 69% de mortalidade e uma redução de 70% no consumo quando foi oferecido oralmente a larvas neonatas em discos foliares de

milho. Nas larvas mais velhas, (3° ínstar) o tratamento com JBTX resultou em 100% de mortalidade em experimentos onde o controle induziu apenas 30% de mortalidade. Estas taxas de mortalidade resultaram de larvas neonatas que ingeriram um total de 6,5 µg de JBTX e larvas de terceiro ínstar, ingerindo um total de 40 µg de JBTX por inseto, que foi fornecido continuamente por 5 dias. Semelhante aos nossos resultados, Mulinari et al. (2007) obtiveram 100% de mortalidade após 8 dias de alimentação de larvas de *S. frugiperda* de terceiro ínstar com 50 µg/cm² de JBTX. Portanto, este peptídeo tem atividade contra múltiplos membros da ordem Lepidoptera.

A dinâmica do consumo foliar pelas larvas mais velhas (3° ínstar) foi bastante diferente das recém-nascidas. As larvas neonatas alimentadas com a versão completa JBTX apresentaram redução de 70% no consumo em relação aos controles, porém as larvas velhas alimentadas com o mesmo peptídeo não apresentaram redução no consumo, pois consumiram tanto quanto as controle até que todas morreram no 9° dia. Este peptídeo entomotóxico mata mais rapidamente e reduz significativamente o consumo quando oferecido a larvas mais jovens. O experimento não avançou mais tempo porque discos foliares do milho, como fonte de alimentação, não fornecem nutrição suficiente para as larvas completarem seu ciclo biológico. Em condições naturais no campo, as larvas migram para as espigas para consumir os grãos e completar seu ciclo.

Em nosso experimento com o 3° ínstar, o consumo de JBTX foi seguido pelo aumento de peso das larvas nos primeiros dias do experimento, superior às larvas controle, sugerindo que a alimentação pode ser mantida no sistema digestório, não podendo ser absorvida e utilizada como fonte nutricional e, como resultado, os insetos são estimulados a continuar a se alimentar na tentativa de obter a nutrição necessária. Com base em informações publicadas anteriormente sobre o mecanismo de ação desse peptídeo, é provável que nosso resultado seja devido a efeitos na integridade da membrana do trato digestivo e inibição da diurese.

O mecanismo de ação inseticida de Jaburetox não foi completamente explicado, mas mostra várias atividades biológicas, incluindo alteração da integridade da membrana celular, efeitos fungicidas e bactericidas (BECKER-RITT et al., 2017). Sabe-se que, no vetor da doença de chagas *R. prolixus*, ocorre inibição da diurese e provável desequilíbrio

eletrolítico, com alterações nos níveis de GMP cíclico (Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico) e no potencial transmembrana dos túbulos de Malpighi (STANISÇUASKI et al., 2009).

Estudos com sistemas artificiais também mostraram que o JBTX é capaz de interagir com bicamadas lipídicas, afetando a permeabilidade dos lipossomos (BARROS et al., 2009; MARTINELLI et al., 2014) e formando canais iônicos (PIOVESAN et al., 2014), mas sem causar lise das partículas ou células. A capacidade do Jaburetox de inserir-se na camada lipídica dos lipossomos e, assim, alterar as propriedades físicas da membrana (MICHELLETO et al., 2016) é provavelmente a base físico-química para seus múltiplos efeitos biológicos, incluindo toxicidade para insetos.

Em outro estudo, após injetar JBTX no Hemiptera *T. infestans*, os insetos apresentaram paralisia nas pernas e movimentos desordenados da antena, sugerindo efeitos neurotóxicos, que antecederam a morte. O peptídeo foi localizado no sistema nervoso central dos insetos, no qual foi observada uma redução significativa no conteúdo do neurotransmissor óxido nítrico e na atividade da enzima responsável pela sua formação, óxido nítrico sintase (GALVANI et al., 2015). O JBTX também afeta o sistema imune do *R. prolixus*, causando agregação de hemócitos e alterações morfológicas, sugerindo apoptose dessas células, comprometendo assim a resposta dos insetos aos desafios das bactérias entomopatogênicas (FRUTTERO et al., 2016).

Apesar dos relatos de que o peptídeo é letal para a praga de plantas de insetos *S. frugiperda* (MULINARI et al., 2007), nenhum estudo foi feito para investigar o mecanismo de ação em Lepidoptera. Nossos resultados mostrando aumento da mortalidade demonstram o potencial para os peptídeos terem um efeito semelhante em uma ampla gama de Lepidoptera.

Importante relatar que o peptídeo JBTX é inócuo para espécies de mamíferos. Em análises de biossegurança, JBTX foi administrado a ratos adultos e neonatos através de injeção intraperitoneal e oralmente através de um tubo intragástrico. Nestes experimentos, não houve toxicidade observável (MULINARI et al., 2007), assim, o JBTX oferece potencial seguro para estratégias de culturas transgênicas resistentes a insetos. A

expressão contínua de JBTX em plantas geneticamente modificadas pode representar uma excelente estratégia para o controle de *H. armigera* e contribuir para a redução dos danos causados à agricultura por essa praga.

3.6 Conclusão

As duas formas de JBTX testadas são eficientes no controle de *H. armigera*, demonstrando a possibilidade de usar o peptídeo como uma estratégia para combater essa praga. Além disso, nossa demonstração bem-sucedida do JBTX como um peptídeo ativo contra o *H. armigera* fornece uma estratégia ambientalmente sustentável para reduzir o impacto econômico mundial dessa praga.

4 CAPÍTULO II

Produção de plantas de milho geneticamente modificadas com o gene *jaburetox* visando resistência a *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

4.1 Resumo

Spodoptera frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie polífaga, e uma das pragas mais destrutivas e economicamente importantes do milho (*Zea mays* L.). Dentre as tecnologias mais utilizadas no controle dessa praga encontra-se o uso de plantas transgênicas contendo genes *cry* que codificam uma proteína inseticida. Porém, a sua utilização intensiva, juntamente com a carência de refúgio nas lavouras contribuiu para o desenvolvimento de populações resistentes dessa praga. O peptídeo Jaburetox (JBTX), isolado de uma urease vegetal, tem mostrado potencial no controle de insetos, inclusive *S. frugiperda*, podendo sua sequência codificadora ser utilizada na transformação genética de milho. O objetivo desse trabalho foi verificar se é possível produzir plantas de milho expressando Jaburetos (*Jbtx*) pelo método de *Agrobacterium tumefaciens*; verificar se as plantas contendo *Jbtx* transmitem estavelmente o transgene para suas progênes; e testar se as plantas expressando estavelmente o *Jbtx* apresentam efeito tóxico sobre *S. frugiperda*. Para isso, embriões imaturos de milho foram infectados com *A. tumefaciens* contendo *Jbtx:35S*, e realizado bioensaio alimentando *S. frugiperda* com plantas geneticamente modificadas (GM) expressando o *Jbtx*. Foi possível obter vários eventos de plantas saudáveis e férteis que passaram o gene para as próximas gerações. As plantas de milho expressando *Jbtx* apresentaram efeitos subletais em *S. frugiperda* como: redução do peso de 65%, redução do consumo de 36%, infertilidade das mariposas e mortalidade de 39%. Com base nesses resultados foram escolhidas quatro plantas de três eventos diferentes para serem avaliadas nas próximas gerações. Os resultados obtidos nesse trabalho são importantes para o manejo de insetos no campo, pois, com menor biomassa e consumo alimentar, será menor o potencial dano do inseto à produção. Neste sentido, plantas GM de milho expressando *Jbtx* poderão representar uma importante ferramenta dentro do Manejo Integrado de Pragas (MIP).

Palavras-chave: 1. Transformação genética. 2. Peptídeo entomotóxico. 3. Proteção de plantas. 4. Lagarta-do-cartucho.

4.2 Introdução

Dentre as pragas que atacam o milho (*Zea mays* L.), a lagarta *Spodoptera*

frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) se destaca como a mais importante para a cultura no Brasil (CRUZ, 2009). Em termos de injúrias e danos, na ausência de manejo, a praga chega a destruir completamente o cartucho (GALLO et al., 2002), atacando espigas e colmos, acarretando perdas no rendimento de grãos na ordem de 30% a 60% (LIMA et al., 2010).

A introdução de culturas geneticamente modificadas (GM) que expressam os genes *Cry*, oriundos da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), em sistemas de produção agrícola, possibilitou que programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) fossem mais eficientes, principalmente com a diminuição da dependência do controle químico (SANAHUJA et al., 2011). O uso da tecnologia Bt no milho tem se destacado como uma das principais ferramentas no manejo dessas pragas (EDGERTON et al., 2012; KLÜMPER; QAIM, 2014).

Os milhos GMs, contendo os genes *cry*, são amplamente utilizados na agricultura. Somente em 2016 a taxa de adoção do milho Bt no Brasil foi de 84,6%, ou seja, aproximadamente 15 milhões de hectares. No mundo 45% da área total cultivada foi com plantas geneticamente modificadas, correspondendo a 83 milhões de hectares ocupados pelo milho Bt (JAMES, 2017). No entanto, o uso intensivo da tecnologia Bt sem o emprego das práticas de Manejo de Resistência de Insetos (MRI), como a implementação das áreas de refúgio, pode limitar a durabilidade da eficácia de controle de pragas ao longo do tempo, uma vez que o uso de culturas Bt em ambientes agrícolas resulta em pressão de seleção nas populações de insetos-praga podendo levar à seleção de populações resistentes (BERNARDI et al., 2015).

Vários casos de falha no controle de *S. frugiperda* já foram registrados em diversas regiões brasileiras (RESENDE et al., 2014). Diante disso, o desenvolvimento de outras alternativas de controle da praga é desejável, como o uso do peptídeo entomotóxico Jaburetox (JBTX), derivado de uma urease vegetal. O uso de toxinas alternativas ao Bt pode retardar a evolução da resistência pela praga, por requerer que o inseto tenha que desenvolver outros mecanismos de resistência a elas.

Jaburetox2Ec e JBTX são as duas primeiras versões de um peptídeo

recombinante possuindo 93 aminoácidos, baseado na sequência de uma urease de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Estes peptídeos apresentam um potente efeito contra várias espécies de insetos (MULINARI et al., 2007; CARLINI; LIGABUE-BRAUN, 2016).

JBTX demonstrou ter propriedades entomotóxicas contra insetos vetores de doenças humanas como *Rodnus prolixus*, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) e *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (BECKER-RITT et al., 2017), e pragas agrícolas como *S. frugiperda* (MULINARI et al., 2007), *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002), *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (DIDONÉ et al., dados não publicados), *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Pyralidae) e *Telchin licus licus* (Lepidoptera: Castniidae) (BECKER-RITT et al., 2017).

O modo de ação do JBTX inclui alterações no sistema excretor e nervoso resultando na mortalidade dos insetos (STANISÇUASKI; CARLINI, 2012; PIOVESAN et al., 2014; GALVANI et al., 2015; FRUTTERO et al., 2017). No entanto, não se sabe como será o seu desempenho no controle de insetos-praga quando expressado por plantas de milho, já que depende da quantidade de proteína produzida por essas plantas para que ocorra a mortalidade desses insetos, e nem se é possível produzir plantas de milho expressando esse peptídeo entomotóxico. Porém, a produção de plantas de milho contendo o JBTX representaria uma nova estratégia no controle de insetos-praga como a *S. frugiperda*.

O objetivo desse trabalho foi verificar se é possível produzir plantas de milho GM que expressem *Jaburetox* (*Jbtx*) pelo método de *Agrobacterium tumefaciens*; verificar se as plantas GM contendo *Jbtx* transmitem estavelmente o transgene para suas progênie; e testar se as plantas expressando o *Jbtx* apresentam efeito tóxico sobre *S. frugiperda*.

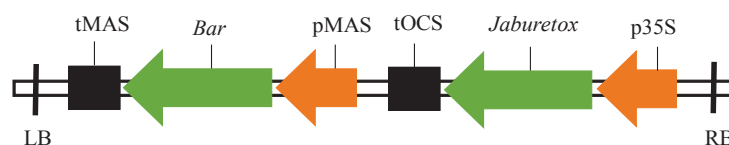
4.3 Material e Métodos

4.3.1 Transformação genética de milho com *A. tumefaciens*

Embriões zigóticos imaturos (EZI) (1,8–2,0 mm) do híbrido de milho Hi-II foram

utilizados como explantes nos experimentos. A transformação do milho mediado pela *A. tumefaciens* foi conduzida seguindo o protocolo descrito por Frame et al, (2011). Os EZI foram infectados (Meio Inf, Tabela 1) por 5 min com *A. tumefaciens* EHA101 portadora do plasmídeo EarleyGate carregando a sequência codificadora do *Jbtx* (279 bp) sob controle do promotor 35S que a partir de agora vamos nos referir no texto como gene *Jbtx*. E o gene *bar* sob controle do promotor MAS (Figura 1). O gene marcador *bar* confere resistência ao herbicida Bialaphos®. Este plasmídeo foi construído pelo Dr. Giancarlo Pasquali do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Embriões infectados foram transferidos para o meio de co-cultivo (Meio CC, Tabela 1) e mantidos no escuro a 20 °C por 5 dias (DIDONÉ et al., 2018) e então subcultivados para o meio de descanso (Meio DS, Tabela 1) e mantido no escuro a 28°C por 7 dias antes o processo de seleção.

Figura 1 - Estrutura do T-DNA do plasmídeo utilizado para a transformação de milho.



Nota: tMAS = terminador manopina sintase da Agrobactéria;
tOCS = Terminator da otopina sintase isolado da Agrobactéria.

4.3.2 Seleção dos eventos transgênicos do milho Hi-II com o gene *jbtx*

Embriões foram cultivados no meio de seleção 1 (Meio S1, Tabela 1) suplementado com 1,5 mg/L do herbicida Bialaphos® no escuro (28 °C) por 2 semanas. Depois de 2 semanas, os calos desenvolvidos nesse meio foram subcultivados para o meio de seleção 2 (Meio S2, Tabela 1) suplementado com 3 mg/L de Bialaphos® por três semanas, sendo subcultivados por cinco vezes em meio S2 fresco a cada três semanas. Os prováveis eventos transgênicos que formaram calos embriogênicos do tipo II foram transferidos para o meio de pré-regeneração por 2 semanas, no escuro. Este meio de pré-regeneração (Meio PrÉR, Tabela 1) apresenta uma concentração redizida de 2,4-D permitindo que os embriões somáticos parem de se dividir e se preparem para germinar. Calos embriogênicos foram então transferidos para o meio de Regeneração 1

(Meio R1, Tabela 1) por 2 semanas, no escuro, para a maturação dos embriões somáticos. Após este período os calos foram subcultivados para o meio de regeneração 2 (Meio R2, Tabela 1) e mantidos na luz (25 °C, 80–100 E/m²/s, fotoperíodo de 16:8) por 7–10 dias para germinação.

Tabela 1 - Meios utilizados para o crescimento da *A. tumefaciens* e nas etapas de transformação genética de embriões imaturos de milho

Meios de cultura	Infecção
Inf	Sais N6; vitaminas Erickson (0,5 mg/L de tiamina HCl, 2 mg/L de glicina, 0,5 mg/L de piridoxina HCL, 0,5 mg/L de ácido nicotínico); 100 mg/L de caseína hidrolisada; 0,7 g/L de L-prolina; 2,0 mg/L de 2,4D; 68,5 g/L de sacarose, 36 g/L de glicose glicose, pH 5,2. Suplementado com 100 µM acetossiringona.
Cocultivo	
CC	Inf sem glicose; sacarose reduzida para 30 g/L e adicionado de 0,5 g/L de MES; 10 µM nitrato de prata; 8,0 g/L de Agar; pH 5,8.
Descanso	
DS	CC sem acetossiringona adicionado de 100 mg/L cefataxima e 100 mg/L de vancomicina, pH 5,8.
Seleção	
S1	CC sem acetossiringona suplementado com 100 mg/L de cefataxima; 100 mg/L vancomicina e 1,5 mg/L de fosfotricina (Bialaphos).
S2	Mesmo do S1, suplementado com 10 mg/L ⁻¹ de fosfotricina (Bialaphos).
Preparação de embriões somáticos para regeneração	
PréR	Sais S1 acrescido das vitaminas MS (0,5 mg/L de tiamina HCl, 2 mg/L de glicina, 0,5 mg/L de piridoxina HCL, 0,5 mg/L de ácido nicotínico), 100 mg/L de mio-inositol, 0,25 mg/L, 2,4-D, 30 g/L, sacarose, 3 g/L Phytigel, 100 mg/L cefatoxima e 6 mg/L de Glufosinato, pH 5,8.
Maturação dos embriões somáticos	
R1	Sais MS, acrescidos de vitaminas MS, 100 mg/L de mio-inositol, 60 g/L sacarose, 3 g/L Phytigel, 100 mg/L cefatoxima e 6 mg/L de Glufosinato, pH 5,8.
Germinação dos embriões somáticos	
R2	Mesmo R1 com reduzida concentração de sacarose 30 g/L; pH 5,8.

Fonte: Adaptado de Frame et al. (2011).

As plantas germinadas foram aclimatadas em câmara com alta umidade, em potes plásticos de 500 ml contendo 50% substrato esterilizado Eucatex tipo floreira e 50% vermiculita. Nessa câmara foram mantidas por sete a dez na qual foi gradualmente reduzida a umidade. Depois as plantas foram transferidas para casa de vegetação climatizada, em vasos com capacidade de 10 L, contendo o mesmo substrato acima, para seu desenvolvimento e produção de sementes T0.

Foi avaliada a percentagem de calos embriogênicos produzidas no meio de seleção, número de plantas regeneradas e aclimatadas.

4.3.3 Análise de presença do gene por PCR

As prováveis plantas transgênicas foram submetidas a análise de Reação em cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação da presença do *Jbtx*. O DNA das plantas foi extraído com o *Kit* de extração de DNA (*DNeasy Plant Mini Kit - Qiagen*) e utilizado como molde para a amplificação do gene usando utilizando o par de iniciador *Forward* 5'-CACCATGGGTCCAGTTAATG-3' e *Reverse* 5'-ATAACTTTTCCACCTCC-3' (MULINARI et al., 2007).

A reação de amplificação foi realizada em solução de 22 µL, contendo 150 ng de DNA; 2,5 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato, 25mM de MgCl₂; 2 µL de tampão (5X); 0.1 µL de Taq polimerase (5U por µL) e 10 µM de cada iniciador. As condições de amplificação empregadas foram um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C (2 min) seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C (30 seg), anelamento a 54 °C (45 seg) e alongamento a 72 °C (1 min). A extensão final foi realizada a 72 °C (5 min). O produto da amplificação (270 pb) foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com *Gel Red (Biotium)* e visualizado sob luz ultravioleta (254 nm) com a analisador de imagem *Amersham Imager 600*.

4.3.4 Segregação dos eventos transgênicos nas gerações T1 e T2

Os regenerantes primários (T0) se referem às plantas transgênicas oriundas dos explantes originalmente submetidos à transformação genética com *A. tumefaciens*. A geração T1 é composta por plantas derivadas de sementes obtidas da autopolinização das plantas T0 ou da polinização cruzada da planta T0 com planta controle Hi-II (não transformada) que se desenvolveram em casa de vegetação, com luminosidade e temperatura controlada. A geração T2 corresponde as plantas derivadas de sementes da geração T1, produzidas na sua maioria pela autofecundação das plantas T1 ou pelo cruzamento destas com plantas controles quando o pólen não era disponível.

Para a análise de segregação dos eventos GMs gerados, amostras de folhas das plantas de cada geração foram coletadas para extração de DNA genômico, seguido por

análise de PCR convencional para confirmação da presença do inserto do gene de interesse. Os iniciadores e condições de amplificação da PCR foram os mesmos descritos acima. O cálculo da segregação foi realizado pelo teste do qui-quadrado (X^2). As plantas negativas foram descartadas e as positivas mantidas para realização das próximas análises e para serem autopolinizadas e gerarem as progênes.

4.3.5 Análise da expressão relativa do *Jbtx* via RT-qPCR

Para expressão relativa do *Jbtx* nas gerações T1 e T2, foram coletadas amostras de folhas das plantas positivas para o gene, as quais foram maceradas em nitrogênio líquido e o RNA total extraído utilizando *Kit RNeasy* (QIAGEN) conforme as instruções do fabricante. Cerca de 1 µg do RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA utilizando *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems). A quantificação relativa do nível de expressão gênica, para cada gene e tratamento analisado, foi realizada utilizando as amostras em duplicatas biológicas. As reações foram conduzidas em termociclador *Step One Plus* (Thermo Fischer Scientific) utilizando o kit *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), conforme as instruções do fabricante. Como normalizador foi utilizado o gene *fator de alongação 1-α* (*Efl-α*) que apresenta expressão constitutiva em todos os tecidos do milho.

A reação de quantificação relativa foi realizada em um volume final de 20 µL, adicionando 10 µL de *Fast SYBR[®] Green Master Mix*; 0,5 µL de cada iniciador *Forward* e *Reverse* na concentração de 2,5 µM (Tabela 2); 2 µL de cDNA na concentração de 5 ng/µL e 7 µL de água milliQ[®] para completar o volume final. Os parâmetros de ciclagem para as reações de amplificação foram: de 95 °C por 20 s, 40 ciclos de 95 °C por 3 s e 63 °C por 30 s. Para análise da pureza dos produtos do RT-PCR foi realizada a análise da curva de dissociação (curva de *Melting*) de 65 °C à 95 °C. Sendo coletados os dados nesta última etapa.

Tabela 2 - Pares de iniciadores do gene de referência e *Jbtx* utilizados para RT-qPCR

Gene	Sequência do iniciador (5'-3')	Amplicom (pb)	Eficiência ¹
<i>Efl-a</i>	F: TGGGCCTACTGGTCTTACTACTGA R: ACATACCCACGCTTCAGATCCT	155	1,89
<i>Jbtx</i>	F:GCAGAAGGGAATTTGGACATAA R:TGGTGAAAGGACAATCAGGG	81	1,89

⁽¹⁾: eficiência de amplificação dos iniciadores calculada pelo programa LinReg dados relativos a 5ng de molde e 2,5 mM *primers* na reação.

A determinação dos níveis de expressão do gene alvo foi realizada pela quantificação relativa utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para cada evento foi detectado o valor de Ct para ambos os *Jbtx* e normalizador (*efl-a*). O valor do Ct do gene alvo foi subtraído do valor do Ct do controle endógeno, para normalizar a reação, obtendo-se o valor de ΔCt . Em seguida, o valor ΔCt dos eventos foi subtraído do valor do ΔCt da amostra calibradora (amostra controle com menor expressão do gene *Jbtx*), resultando no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi ainda utilizado na fórmula do nível de expressão, $x^{(-\Delta\Delta Ct)}$ onde x representa a somatória da eficiência do gene alvo e do controle endógeno.

4.3.6 Bioensao para avaliação do efeito das plantas transgênicas ao inseto-praga *S. frugiperda*

Foram utilizadas lagartas neonatas de *S. frugiperda* provenientes da criação do Laboratório de Entomologia da Universidade de Passo Fundo (UPF). Os eventos avaliados foram os que apresentaram maior expressão gênica do *Jbtx* na geração T2. As plantas controle utilizadas foram do híbrido Hi-II, não transformadas. Foram avaliadas dezesseis plantas pertencentes a 3 eventos independentes de milho transgênico e duas plantas controles.

O delineamento experimental foi completamente casualizado com dezoito tratamentos e quatro repetições. A unidade experimental foi constituída por 10 placas de Petri (5,0 cm x 0,8 cm) contendo uma lagarta cada, perfazendo um total de 720 lagartas. Após oito dias de experimento foi reduzida a quantidade amostral para cinco placas de

Petri (5,0 cm x 0,8 cm) por repetição, as lagartas reservadas foram armazenadas em -80 °C para futuras análises fisiológicas.

Discos foliares das plantas foram oferecidos em placas de Petri contendo no fundo papel filtro umedecido com 200 µL de água destilada até as lagartas formarem pupas. As placas foram mantidas em câmara climatizada regulada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ com fotoperíodo de 12 horas.

A quantidade de discos foliares disponibilizados para as lagartas foi aumentando à medida que as lagartas foram trocando de ínstar, iniciando com $0,5 \text{ cm}^2$ e terminando com $8,0 \text{ cm}^2$ (Tratadas) e 30 cm^2 (Controles).

As pupas obtidas foram sexadas, e a medida que adultos iam emergindo formaram-se casais. Os casais foram mantidos nas mesmas condições descritas anteriormente, em gaiolas cilíndricas de tubos de PVC (12 cm de diâmetro x 20 cm de altura), fechadas numa extremidade com placa de Petri e na outra com tecido tipo voal e revestidas internamente com papel filtro, utilizado como substrato para as posturas. Os casais foram alimentados com uma solução aquosa de mel a 10%, trocada a cada dois dias.

As gaiolas eram revisadas diariamente, quando também era anotado o número de posturas efetuadas e de ovos por postura. Seis posturas por gaiola foram individualizadas em placa de Petri (6 cm x 1 cm), e observada durante cinco dias para se determinar a viabilidade dos ovos.

4.2.6.1 Avaliações do bioensaio

Diariamente, foi avaliada o número de lagartas mortas e observada a troca de ínstar, através do resgate da cápsula cefálica. O consumo de área foliar foi avaliado a cada 48 h (renovação do disco foliar), comparando-se o valor inicial com a área restante, medida em papel milimetrado.

Também foi avaliada a deformação de pupas, peso de pupas 24 h após sua formação, número de mariposas normais e deformadas, número de postura e de ovos por mariposa e viabilidade de ovos a partir de seis posturas por gaiola.

Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

4.4 Resultados

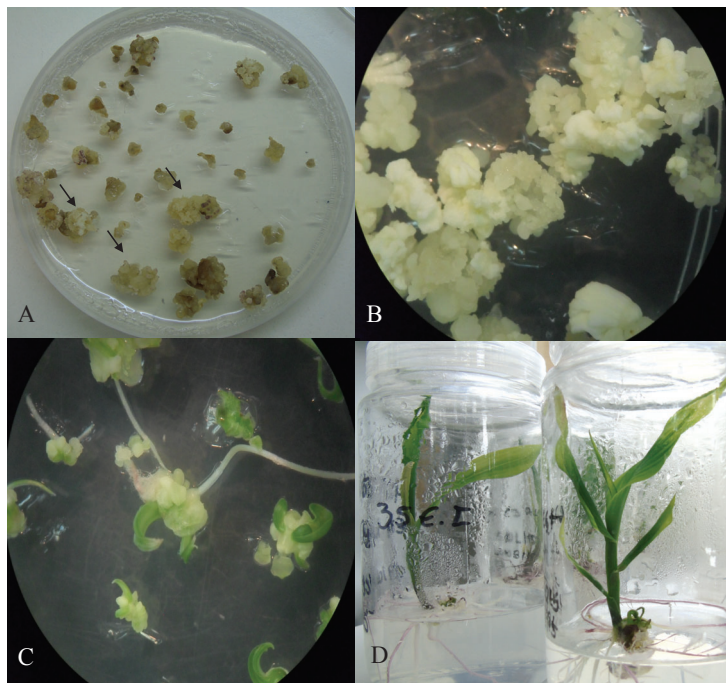
4.4.1 Transformação genética de milho com *A. tumefaciens*

Foram realizados sete experimentos independentes de transformação genética, onde 5.460 EZIs do híbrido Hi-II de milho foram infectados com *A. tumefaciens* contendo os genes *Jbtx* (controle de insetos) e *bar* (gene marcador; resistência a herbicida). Em média, foram obtidos 4,8% de calos resistentes a herbicidas, destes, foram produzidas 68 plantas saudáveis e férteis (Tabela 3). Aspectos dos calos resistentes a herbicidas e plantas de milho em regeneração T0 *in vitro* são mostrados na Figura 2.

Tabela 3 - Frequência de calos resistentes ao Bialaphos® obtidos de embriões imaturos de milho Hi-II cultivados com *A. tumefaciens* EHA105 portadora do vetor binário pEarleyGate 100-J-V5, número de plantas regeneradas *in vitro* a partir dos eventos de transformação, número de plantas PCR positivas e número de eventos obtidos em casa experimento. Passo Fundo, 2015

Experimentos	Embriões imaturos infectados (N)	Calos resistentes ao herbicida (%)	Plantas Aclimatadas (N)	Plantas PCR positivas (N)	Eventos
I	1.200	8.3	2	2	2
II	1.400	6.0	33	29	12
III	310	1.6	-	-	-
IV	1.110	2.5	15	12	2
V	270	6.3	9	6	4
VI	630	3.4	9	8	4
VII	540	0.7	-	-	-
TOTAL	5.460	4.8	68	57	24

Figura 2 - Produção de milho transgênico: A) calo embriogênico (setas) em meio de seleção com 3,0 mg/L de Bialaphos®; B) maturação e C) germinação de embriões somáticos; D) regeneração de plantas *in vitro*. Passo Fundo, 2015



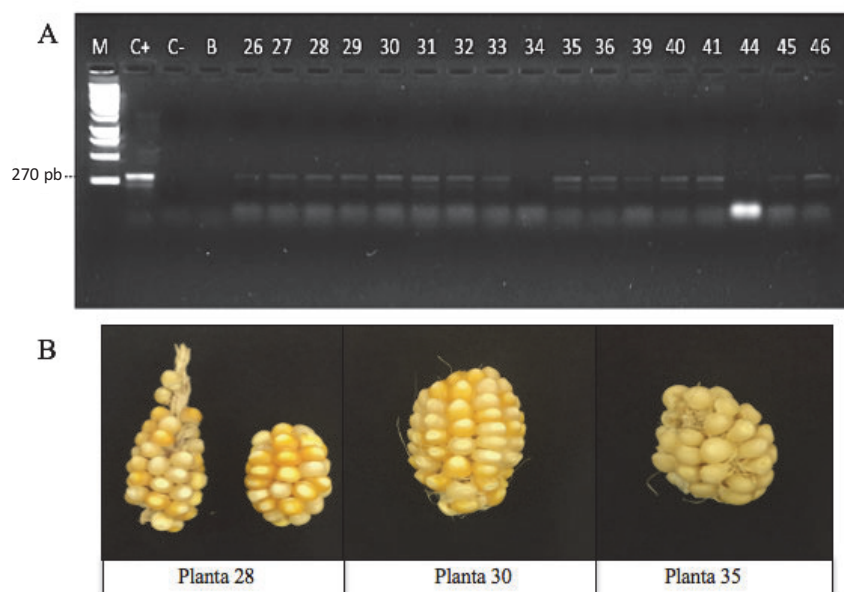
Nota: Setas indicam calos embriogênicos em meio de seleção.

4.4.2 Análise da presença do gene por PCR

A análise de PCR indicou a presença do gene *Jbtx* em 84% das plantas regeneradas (Tabela 2, Figura 3A). A eficiência de transformação calculada foi de 1,04% (57 plantas transgênicas de 5.460 EIZs infectados) no sistema utilizado. Grupos de referência de transformação genética de milho com *A. tumefaciens* reportam uma média de eficiência de 3 a 5% (FRAME et al., 2002; NAHAMPUN et al., 2016).

As plantas transgênicas produzidas foram regeneradas a partir de 24 eventos de transformação. O que significa que estas plantas foram transformadas independentemente e podem portar o gene heterólogo em diferentes localizações no genoma do milho. A posição do inserto no cromossomo pode afetar sua expressão e estabilidade.

Figura 3 - A) Análise da PCR das plantas regeneradas dos experimentos de transformação com a *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 carregando *Jbtx:35S* - M: DNA marcador de 1 kb; C+: DNA plasmidial da *A. tumefaciens* EHA105:pEarleyGate100-JV-5 como controle positivo; C-: planta de milho não transgênica, como controle negativo; B: Branco (água); Canaletas numeradas são amostras de plantas mostrando amplificação do gene *jaburetox* (270 pb). B) Sementes T1 produzidas pelas plantas transgênicas T0 de milho. Passo Fundo, 2015



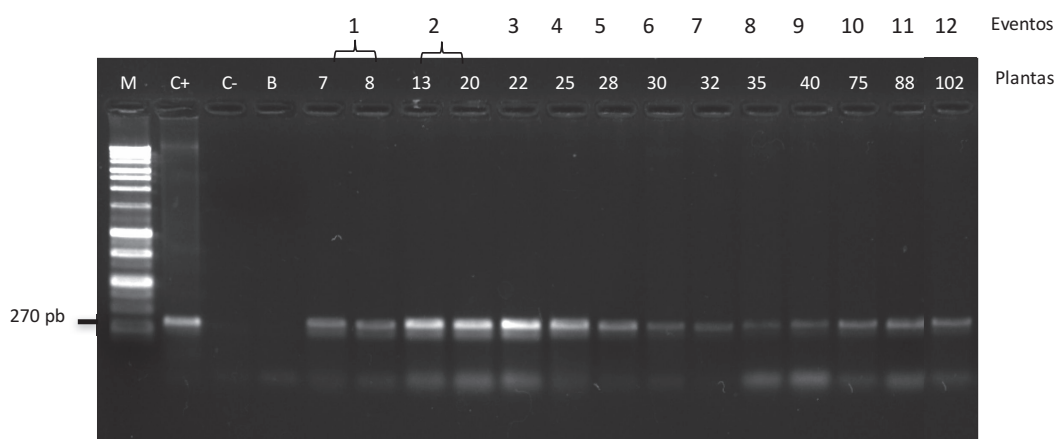
As plantas transgênicas (geração T0) foram mantidas em casa de vegetação com condição ambiental controlada. Elas foram autopolinizadas (quando o pólen estava presente) ou cruzados com plantas de milho Hi-II não transgênicas (controles) para a produção de sementes. As 57 plantas T0 produziram 24 espigas e 644 sementes. As plantas T0 produzem poucas sementes (Figura 3B), uma vez que são originárias de tecidos que passaram por um longo período de cultivo *in vitro* sob processo rígido de seleção. A relação dos eventos estudados em cada geração se encontra no apêndice 1.

4.4.3 Segregação dos eventos nas gerações T1 e T2 e expressão relativa do transgene

As 644 sementes coletadas das plantas transgênicas de milho, portadoras do gene *Jbtx*, foram semeadas em casa de vegetação para a obtenção da geração T1. Destas, 573

sementes germinaram e produziram plantas adultas. Para determinação da presença do gene *Jbtx* nas 573 plantas T1 foi realizado PCR convencional. Para tal, o DNA de todas as plantas foi isolado e avaliado conforme descrito anteriormente. O gene *Jbtx* foi confirmado em 172 plantas de milho, provenientes de 12 eventos diferentes (Figura 4). Esse fato é positivo, pois aumenta a chance de identificarmos plantas com resistência a insetos, visto que cada evento tem uma localização do gene diferenciada no genoma do milho, aumentando a possibilidade de identificação de plantas com maiores expressões do *Jbtx*.

Figura 4 - Análise da PCR de plantas T1 produzidas da transformação com *Agrobacterium tumefaciens* carregando *Jbtx:35S* - M: DNA marcador de 1 kb; C+: DNA plasmidial da *A. tumefaciens* EHA105:pEarleyGate 100-JV-5 como controle positivo; C- : planta de milho não transgênica, como controle negativo; B: Branco (água); Canaletas numeradas são amostras de plantas mostrando a amplificação do gene *jaburetox*, Passo Fundo, 2016



Dos 24 eventos positivos obtidos em T0, somente 15 eventos produziram sementes. Destes 15 eventos analisados na geração T1 apenas 12 passaram o gene *Jbtx* para a geração seguinte, sendo as plantas presente nesses eventos: P7 e P8, P13 e P20, P22, P25, P28, P30, P32, P35, P40, P75, P88 e P102. Alguns mecanismos genéticos podem explicar a não transmissão do transgene para a descendência T1, nos três eventos GMs restantes, e serão melhor discutidos no decorrer deste trabalho.

Dois eventos são contemplados por duas plantas; o evento 1 com a P7 e P8 e o

evento 2 com a P13 e P20 (Figura 4). Isso ocorre devido as plantas serem provenientes do mesmo calo transformado, ou seja, o mesmo EZI que passou pelo processo de transformação formou calo embriogênico com embriões somáticos em sua superfície que geraram duas plantas. As plantas regeneradas do mesmo calo embriogênico, provavelmente contem o gene inserido no mesmo local do genoma, o qual chamamos de evento. Como não foram realizados testes para identificação do local de inserção do gene no genoma das plantas, iremos considerar que essas plantas como pertencentes ao ao mesmo evento.

É esperado que nem todas as plantas T1 sejam portadoras do transgene *Jbtx* devido à segregação genética, por isso, somente 172 das 573 plantas analisadas foram positivas. O esperado é que 75% (3:1) das plantas T1 sejam transgênicas quando a planta T0 é autofecundada; e essa frequência baixa para 50% (1:1) quando a planta T0 é polinizada com uma planta controle não transgênica. Na geração T1 a maioria das plantas não apresentaram padrão de herança Mendeliana esperada (Dados não mostrados). Apenas quatro plantas de 24, apresentaram a proporção 1:1 ou 3:1 esperada, sendo elas a P13, P28, P35 e a P40.

4.4.4 Análise da expressão relativa do *Jbtx* via RT-qPCR

Das 172 plantas T1 positivas para o gene *Jbtx*, foi realizada a extração de RNA e a produção do cDNA (DNA completar ao RNA mensageiro). A partir do cDNA foi realizado o RT-qPCR para verificação da expressão do gene *Jbtx* em relação a planta calibradora (planta transgênica com a menor expressão do gene). Das 172 plantas analisadas, 153 (~89%) apresentaram expressão do gene *Jbtx*.

O maior nível de expressão relativa do gene alvo foi detectado na planta T1 P30-1, de 11.763,63 vezes a mais que a expressão do gene na planta calibradora (Figura 5), essa planta é descendente da T0 P30. É possível que esse evento apresente várias cópias do transgene em seu genoma, o que explicaria a sua superexpressão, ou ainda esteja posicionado numa região genômica que lhe permite alta expressão.

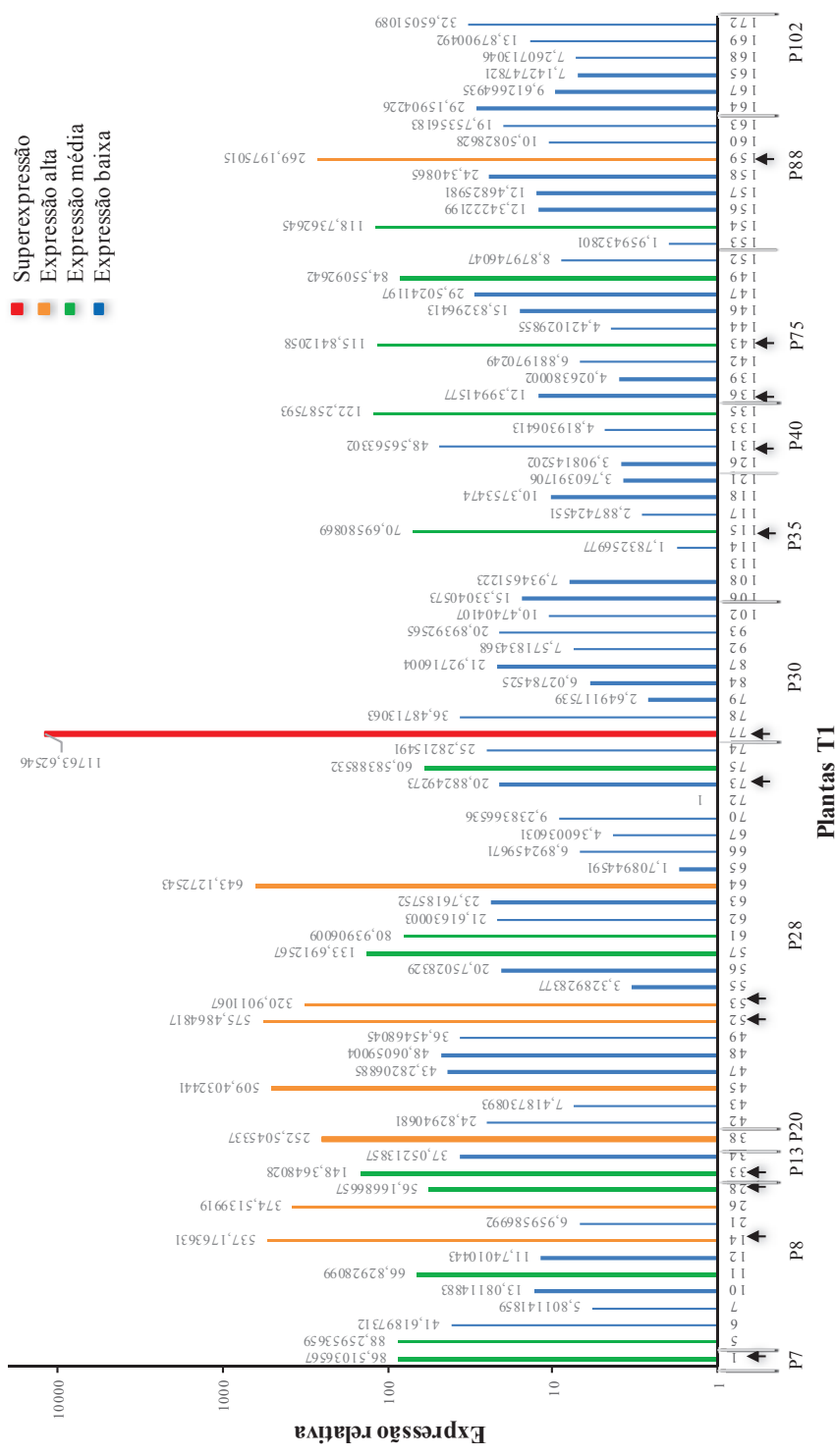
A variação da expressão gênica entre plantas pertencentes ao mesmo evento pode

ser devido a variação do estado de homozigose/hemizigose das mesmas. Uma alta expressão (acima de 250 vezes) também foi observada nos descendentes das plantas T0 P8, P28 e P88. Interessantemente, uma menor expressão (1 e 1,7 vezes) do gene alvo foi detectada no evento P28, essa variação de expressão do gene foi observada em vários eventos e pode ser explicada pelas plantas estarem em heterosigose e/ou apresentarem diferente número de cópias inseridas. O evento P102 teve a menor média de expressão das plantas avaliadas (16,17 vezes), essas plantas podem apresentar menor número de cópias comparada com os outros eventos T1 avaliados ou ainda pode refletir o efeito negativo da posição do gene no genoma hospedeiro.

As plantas que seguiram para a próxima geração (T2) foram selecionadas mediante a análise da curva de dissociação e a média de Ct obtida no RT-qPCR. A curva de dissociação apresentando apenas um pico é importante para garantir que não há contaminações na reação ou ampliações inespecíficas. Também foi levado em consideração para a escolha, plantas que representassem diferentes eventos, para aumentar a chance de identificar plantas resistentes a insetos. Foi realizada uma escala de expressão das plantas, sendo acima de 1.000 vezes da expressão do controle consideradas plantas superexpressando o gene; acima de 220x consideradas com expressão alta; acima de 50x expressão média e; abaixo de 50x expressão baixa. Desta forma, foram então selecionadas: uma planta apresentando superexpressão do gene *Jbtx*, quatro plantas com alta expressão do gene, cinco com expressão média e três plantas com expressão baixa, conforme indicado pelas setas na figura 5. No total 13 plantas T1 foram selecionadas para a próxima geração.

Na geração T2 foram analisadas 241 plantas provenientes da geração T1 selecionadas pela PCR. Essas 241 plantas pertencem a oito eventos distintos (P7 e P8, P13, P28, P30, P35, P40, P75 e P88) das quais 119 apresentaram a presença do gene *Jbtx* no seu genoma, o que representa 49% das plantas positivas para o gene (Tabela 4).

Figura 5 - Expressão gênica relativa do transgene *Jbtx* na geração T1 de nove eventos em relação ao calibrador (Planta com menor média de Ct). A expressão do transgene foi normalizada com o gene de referência *Efl-a*. Passo Fundo, 2016



Nota: Setas indicam plantas selecionadas para geração T2.

As progênies das plantas P7-6, P8-41, P8-72, P28-3, P28-5, P28-35, P30-1 e P75-15 da geração T1, apresentaram padrão de herança Mendeliana esperado para um *locus* dominante quando foram cruzadas com planta controle (1:1) ou autofecundadas (3:1) (Tabela 4). Isso mostra que a segregação da geração T2 foi mais estável que a observada na geração T1. No entanto, nas progênies das plantas P35-23 e P75-4 foi verificada uma proporção inesperada, sendo que a proporção das duas classes de plantas desvia do esperado de 1:1 e 3:1, aproximando-se da proporção 1:6 e 1:2,4. A análise da progênie das demais plantas não foi possível ser realizada devido as premissas do Teste X^2 , na qual é muito sensível ao tamanho da amostra, onde necessita de no mínimo 10 indivíduos quando a proporção esperada é 1:1 e 15 indivíduos para 3:1 (RAMALHO et al., 2012). Posteriores análises de Southern blot confirmariam número de cópias do transgene nesses eventos que não obtiveram segregação esperada, sendo possível monitorar a segregação de cópias dos transgenes e associar padrões de segregação específicos com maiores e menores níveis de expressão gênica.

Tabela 4 - Segregação do gene *Jbtx* em plantas da geração T2 obtidas através de autofecundação e fecundação cruzadas com controle das plantas T1. Passo Fundo, 2017

Eventos	Plantas T2	Plantas germinadas (N)	<i>Jbtx</i> ⁺ (N)	<i>Jbtx</i> ⁻ (N)	Fecundação	Segregação esperada	X^2
1	P7-6	30	18	12	Cruzada	1:1	0,6
1	P8-41	29	17	12	Cruzada	1:1	0,8
1	P8-72	30	17	13	Cruzada	1:1	0,5
2	P13-3	7	3	4	Cruzada	1:1	-
3	P28-3	28	17	11	Auto	3:1	3,0
3	P28-5	12	5	7	Cruzada	1:1	0,3
3	P28-35	22	9	13	Cruzada	1:1	0,7
4	P30-1	17	9	8	Cruzada	1:1	0,0
5	P35-23	21	3	18	Cruzada	1:1	10,7*
6	P40-12	2	2	0	Auto	3:1	-
7	P75-4	17	5	12	Auto	3:1	13,8*
7	P75-15	19	8	11	Cruzada	1:1	0,4
8	P88-51	7	5	2	Cruzada	1:1	-
8	13	241	119	123			

Nota: Presença (*Jbtx*⁺) e ausência (*Jbtx*⁻) do gene foi determinada por PCR.

* $P < 0,05$ (rejeitam a hipótese de segregação esperada).

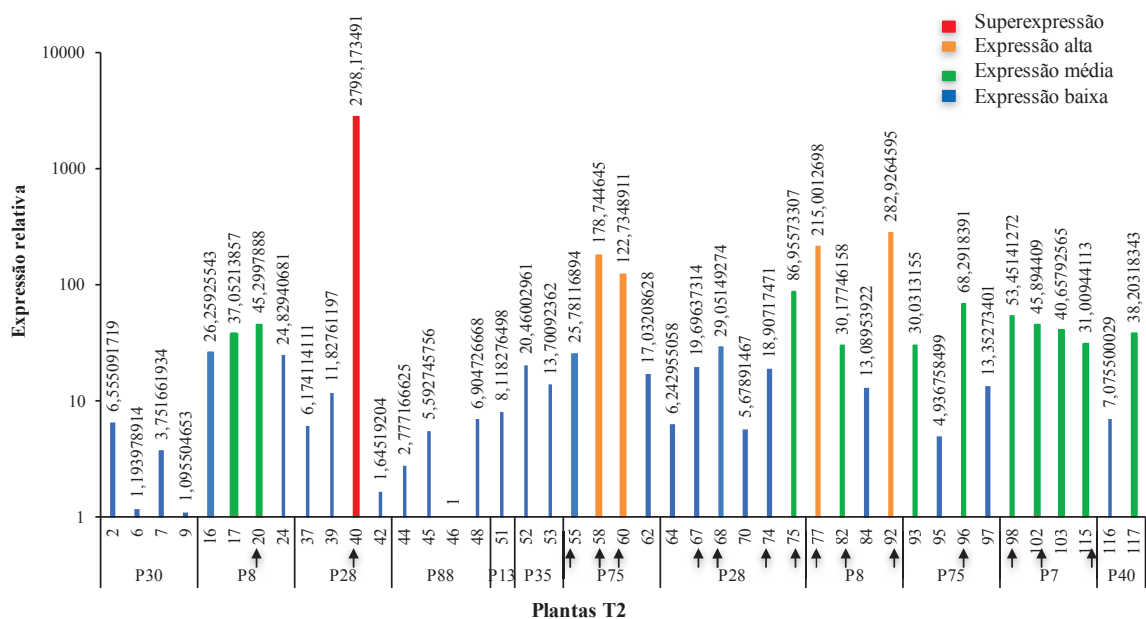
- Número de indivíduos muito baixo para o teste X^2 ser acurado.

As 119 plantas positivas para o gene *Jbtx* tiveram seu RNA extraído e foram avaliadas quanto a expressão do gene. Apenas três plantas não apresentaram expressão do gene nessa geração, mostrando que o gene está mais estável comparado a geração anterior (T1) (Figura 6). Novamente as plantas apresentaram grande diferença na expressão do *Jbtx*, e dessa vez foram escolhidas somente as plantas com maiores expressões gênicas para realização do bioensaio com o inseto-praga de milho *S. frugiperda*.

É interessante observar que as plantas descendentes do evento P30, que na geração T1 apresentou expressão de mais de 11.000 vezes do gene em relação ao controle (Figura 5), na geração T2 apresentaram de 1 a 6 vezes de expressão relativa (Figura 6). A baixa expressão gênica identificada nessas plantas está possivelmente associada a um grande número de cópias que pode ter sido introduzido durante o processo de infecção nesse evento. Devido ao alto número de cópias e possíveis rearranjos no genoma, essas plantas, provavelmente, tiveram sua expressão silenciada ou drasticamente reduzida nessa geração.

Outro fato importante é que as plantas descendentes do evento P7 apresentaram na geração T2, a menor variação da expressão do gene (31 a 53 vezes) (Figura 6), apresentando, inclusive, pouca variação em relação a planta mãe da geração T1 (P7-6) (Figura 5). Possivelmente, esse evento possui poucas cópias do gene inseridas no seu genoma. Sendo este evento um forte candidato para seguir nas próximas geração devido sua expressão mais estável do transgene.

Figura 6 - Expressão gênica relativa do transgene *Jbtx* na geração T2 de oito eventos obtidos em relação ao calibrador (planta com menor média de Ct). A expressão do transgene foi normalizada com o gene de referencia *Efl-a*. Passo Fundo, 2017



Nota: Setas indicam plantas selecionadas para bioensaio com *S. frugiperda*.

4.4.5 Bioensaio para avaliação do efeito das plantas transgênicas ao inseto-praga *S. frugiperda*

As plantas escolhidas para o bioensaio com *S. frugiperda*, foram as que apresentaram maior expressão gênica do *Jbtx* via RT-qPCR, para tal foram avaliados quatro eventos (descendentes de 4 eventos, porém a partir de agora iremos considerar como eventos independentes) e em média quatro plantas de cada evento, mais dois controles que não passaram pelo processo de transformação genética (Tabela 5).

Para estudar o efeito das plantas expressando *Jbtx* no inseto-praga, larvas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* foram alimentadas com discos foliares de plantas transgênicas e controles por 22 dias. A mortalidade das larvas foi geralmente crescente até o 12º dia do experimento (Figura 7). Após este período a mortalidade estabilizou, provavelmente porque as plantas de milho doadoras dos discos foliares entraram na fase reprodutiva. Nesta fase é sabido que a planta mobiliza energia e concentra seu metabolismo para a produção de gametas e sementes. Essa alteração do metabolismo da

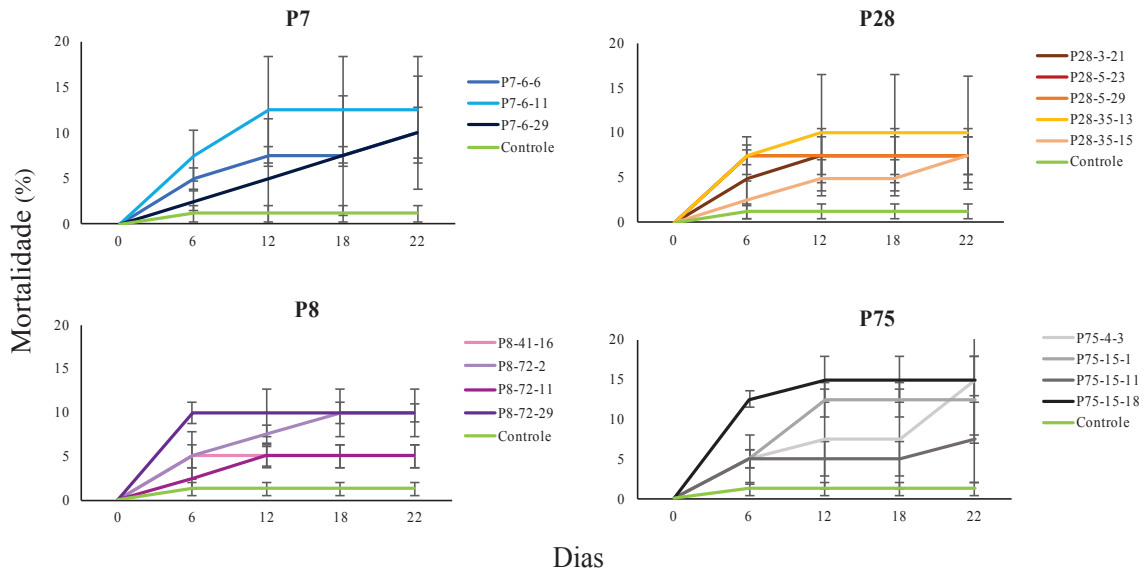
planta pode, provavelmente, explicar a baixa mortalidade verificada nas larvas nesse experimento.

Tabela 5 - Eventos e plantas transgênicas da geração T2 avaliados quanto ao efeito do *Jaburetox* à *Spodoptera frugiperda*. Passo Fundo, 2017

Eventos	Nº identificação	Plantas	Expressão Relativa (X)
P8	20	P8-41-16	45
	77	P8-72-2	215
	92	P8-72-29	282
	82	P8-72-11	30
P28	40	P28-3-21	2798
	68	P28-35-15	29
	75	P28-5-29	86
	67	P28-35-13	19
	74	P28-5-23	18
P75	58	P75-15-11	178
	60	P75-15-18	122
	96	P75-4-3	68
	55	P75-15-1	25
P7	98	P7-6-6	53
	102	P7-6-11	45
	115	P7-6-29	31
Controle 1		Hi-II	0
Controle 2		Hi-II	0
4 Eventos		18 Plantas	

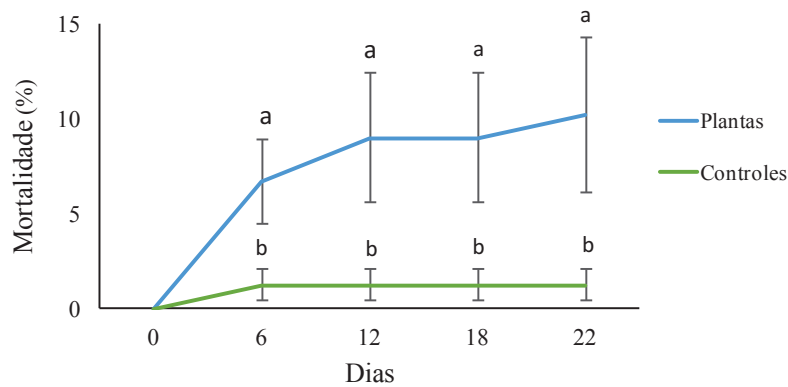
Não houve diferença significativa na mortalidade das larvas em comparação com o controle, nem diferença entre as plantas de cada evento (Figura 7). Por outro lado, quando se analisa a média de mortalidade acumulada das larvas alimentadas com as plantas de todos os eventos, comparada com a média dos controles após 22 dias de experimento, houve diferença significativa. As larvas alimentadas com as plantas GM apresentaram 10% de mortalidade comparada com 1,25% de mortalidade das larvas controles (Figura 8).

Figura 7 - Mortalidade acumulada de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018



Nota: Médias dentro do mesmo dia não diferiram entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 8 - Mortalidade média acumulada de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018



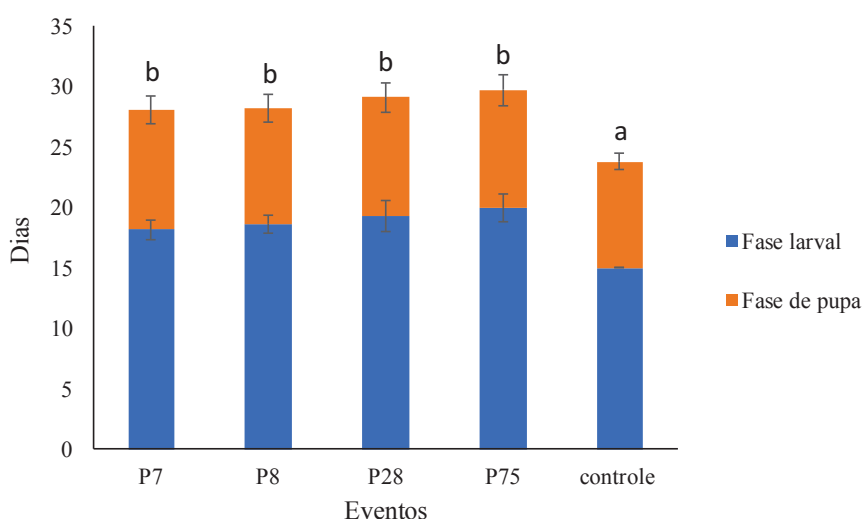
Nota: Médias com a mesma letra dentro do mesmo dia não diferem entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Observou-se um prolongamento da fase larval para as lagartas submetidas ao tratamento com plantas GM expressando *Jbtx* (19 dias), em comparação às plantas controles (15 dias) (Figura 9). Tal fato pode ser decorrente de um possível efeito deterrente expresso pelo *Jbtx* ou de inanição do inseto, que teria impedido a manutenção

da alimentação das lagartas e, por conseguinte, o acúmulo de nutrientes necessários à mudança de fase, no período normal de tempo. Este fenômeno resultaria em um menor número de gerações do inseto num ano e em uma menor população do inseto.

O prolongamento da fase larval juntamente com a fase de pupa retardou o início da emergência de adultos nas *S. frugiperda* que se alimentaram com as plantas GM. Este prolongamento, além de deixar por mais tempo os insetos expostos à ação dos inimigos naturais, pode funcionar também no quesito sazonalidade da praga, quebrando a sincronização entre o período de ocorrência desta em relação ao ciclo fenológico das culturas hospedeiras, assim, por escape, o plantio não sofreria danos.

Figura 9 - Duração das fases de larva e de pupa de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando o gene *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018



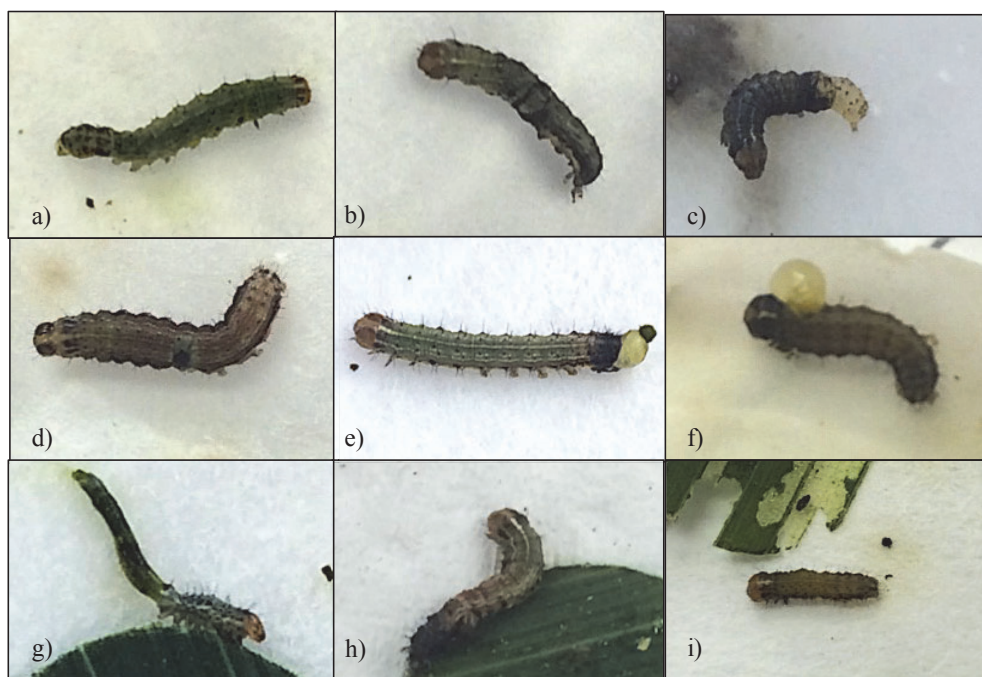
Nota: Médias com a mesma letra nas colunas não diferem entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Outro motivo de prolongamento das fases da *S. frugiperda* pode ser devido o JBTX atuar na sinalização da UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase (UAP), implicando nas vias de glicosilação e na síntese de quitina. Nos insetos, a quitina funciona como material de suporte para as cutículas da epiderme e das traqueias, bem como as matrizes peritróficas que revestem o epitélio intestinal (FRUTTERO et al., 2017). O crescimento dos insetos e a morfogênese são estritamente dependentes da capacidade de remodelar estruturas contendo quitina. Para isso, insetos sintetizam repetidamente a

quitina e produzem enzimas quitinolíticas em diferentes tecidos. A coordenação da síntese de quitina e sua degradação requer controle rigoroso das enzimas participantes durante o desenvolvimento.

Para permitir o crescimento e desenvolvimento os insetos são forçados a substituir periodicamente sua cutícula antiga por uma nova e mais solta durante a muda (ecdise). Se não apresentarem a enzima responsável pela produção da quitina pode ocorrer malformação durante a ecdise e não liberação da antiga cutícula, como foi verificado em alguns insetos (Figura 10a, b e c). Também foi verificado um sulco no tegumento de algumas larvas, o que pode estar relacionado com a produção de quitina no local (Figura 10d). Outras alterações morfológicas nas larvas relacionadas a toxicidade do JBTX também foram verificadas (Figura 10).

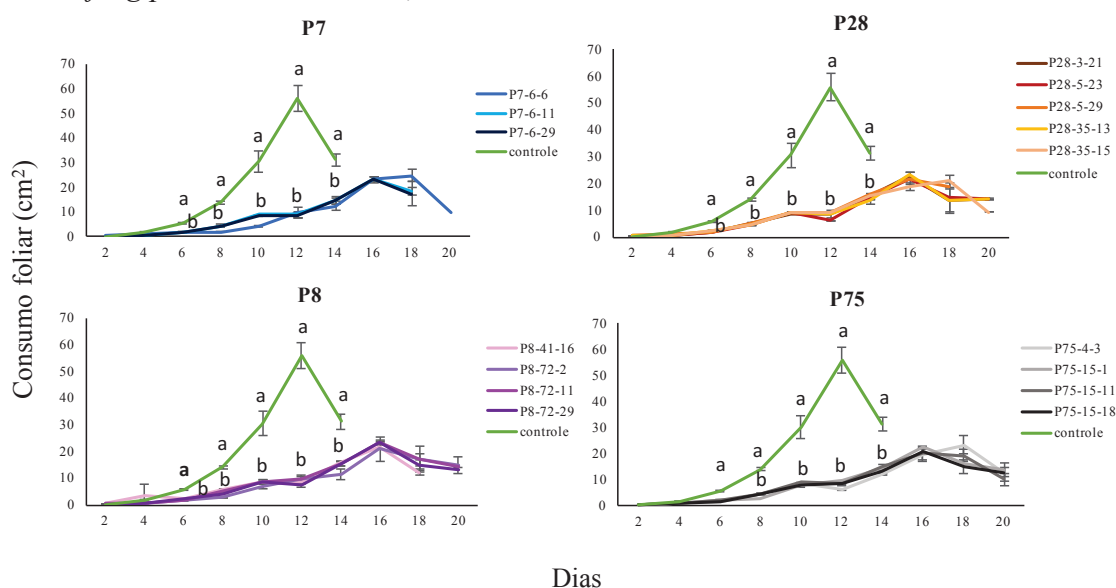
Figura 10 - Alterações morfológicas em larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de plantas de diferentes eventos de milho geneticamente modificados expressando *Jaburetox*: a, b e c) larva com processo de muda incompleta e com presença da antiga cutícula; d) presença de sulco no tegumento; e) liberação de parte do intestino; f) liberação de corpo gorduroso no tegumento; g) liberação total do intestino; h) necrose na porção terminal da larva; i) encurtamento da larva. Passo Fundo, 2018



Fonte: Fotos do autor.

Um dos efeitos notáveis do JBTX sobre os insetos é a sua ação na inibição da alimentação. Sendo que no 12º dia de experimento as larvas que se alimentaram com as plantas controles (não transgênicas) comeram 6 vezes mais que as tratadas com plantas expressando *Jbtx*, na média para todos os tratamentos. Mesmo no 14º dia, quando as larvas controles estavam passado para a fase de pré-pupa, que a alimentação diminuiu assim como o metabolismo para a formação de pupa, a diferença na alimentação foi de 2 vezes a mais, comparada com as tratadas (Figura 11). É importante ressaltar que após o 12º dia as plantas cultivadas em casa de vegetação, passaram para o estágio reprodutivo e as larvas tratadas com milho geneticamente modificado aumentaram 2 vezes o consumo, apresentando consumo médio de 8 cm² no 12º dia e 17 cm² no 14º dia.

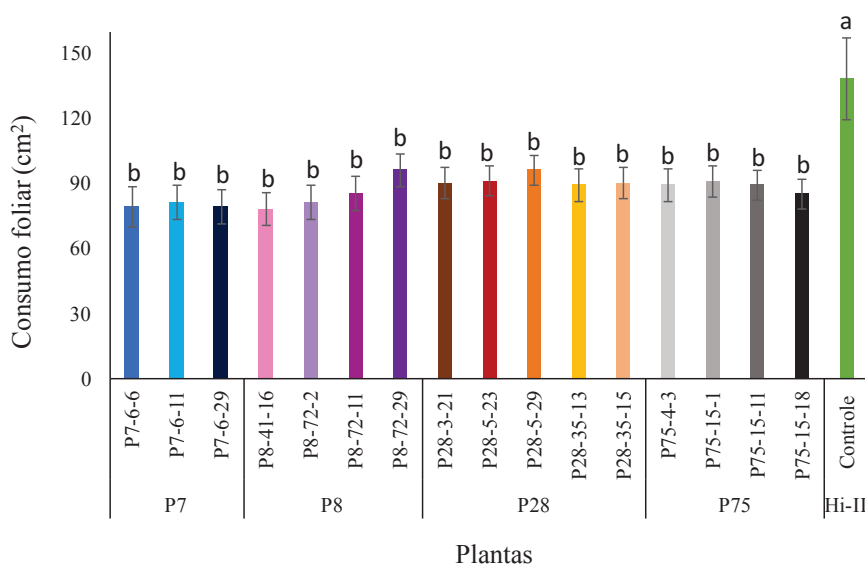
Figura 11 - Consumo de folhas de plantas de diferentes eventos de milho geneticamente modificados expressando o gene *Jaburetox* pelas larvas de *Spodoptera frugiperda*. Passo Fundo, 2018



Nota: Médias com a mesma letra dentro do mesmo dia não diferem entre si (teste de Tukey, P<0,05)

O consumo médio de folhas acumulado no experimento foi de 139 cm² para as larvas controles e 89 cm² para as tratadas, o que representaria 36% a menos de injúria causada pelas lagartas de *S. frugiperda* em plantas de milho expressando *Jbtx* (Figura 12).

Figura 12 - Consumo acumulado pela larva de *Spodoptera frugiperda* alimentada com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018



Nota: Médias com a mesma letra nas colunas não diferem entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Além de apresentarem diferença no consumo e no peso, as larvas apresentaram diferença no tamanho. No 8º dia de experimento as larvas controles mediam, em média, 3 cm de comprimento e as tratadas com plantas de milho expressando *Jbtx* com 2 cm em média (Figura 13).

Figura 13 - Tamanho das larvas de *Spodoptera frugiperda* no dia 8: a) alimentadas com plantas controles e; b) alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018

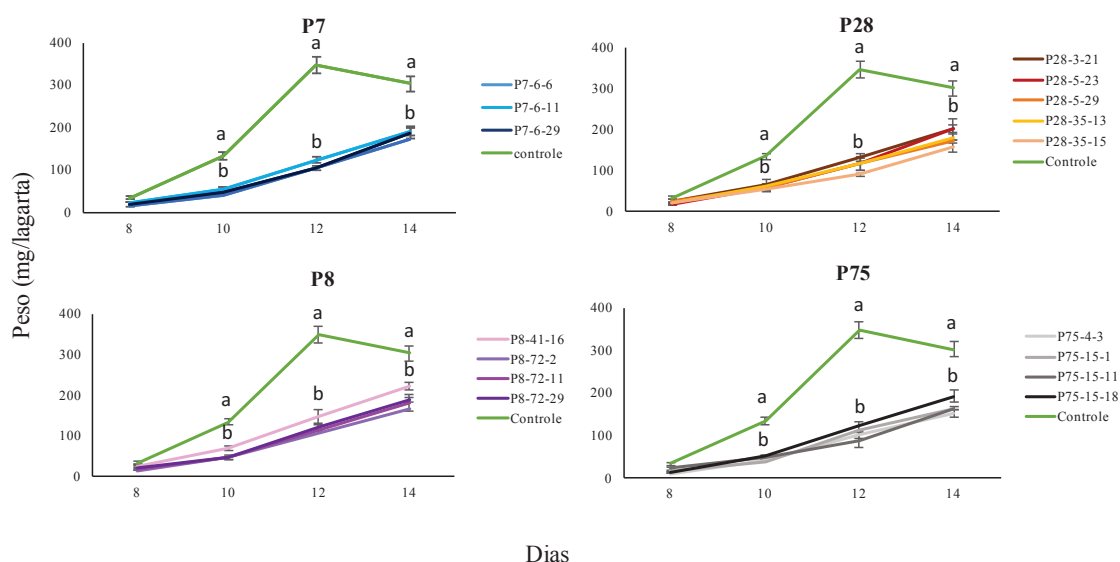


Nota: Barra de 1 cm.

O peso das larvas foi avaliado somente do 8º até o 14º dia, porque antes disso as larvas estão muito pequenas e o peso era insignificante e difíceis de quantificar. A partir do 14º dia, as larvas controles começaram a entrar na fase de pré-pupa, onde diminuem o metabolismo e, conseqüentemente, o peso. Houve diferença significativa de peso entre as larvas controles e as tratadas com plantas de milho GM. As larvas tratadas pesaram 65% a menos que as controles no 12º dia (Figura 14). A menor média de peso foi verificada nas larvas que se alimentaram de plantas do evento P75 apresentando 106 mg no 12º dia. A maior média entre as plantas com *Jbtx* foi do evento P8, com 122 mg, enquanto que a média de peso do controle aos 12 dias foi de 347 mg.

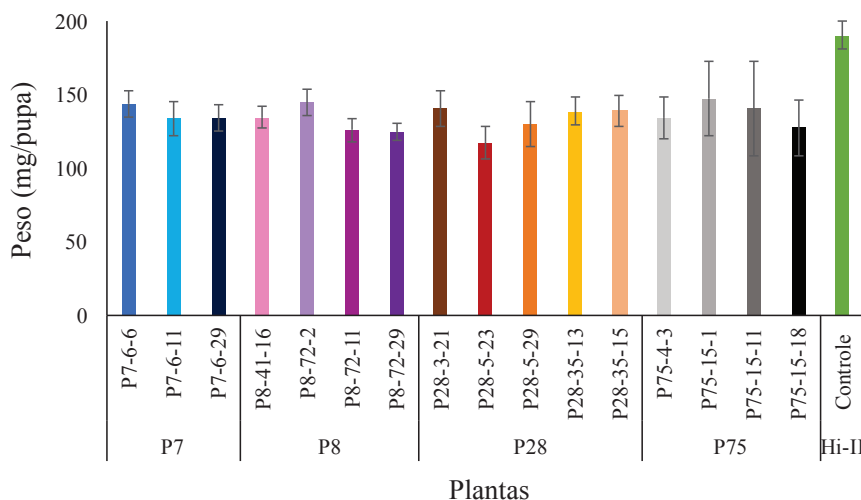
Também foi verificada diferença entre o peso das pupas proveniente de larvas que se alimentaram nas plantas GM expressando *Jbtx* e os controles (Figura 15). As pupas tratadas apresentaram 60 mg a menos que as controles. Esse resultado indica que o JBTX pode ter exercido efeito fagoinibidor ou, ainda, menor eficiência de conversão do alimento ingerido pelas larvas devido à presença da substância tóxica nas plantas.

Figura 14 - Peso das larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018



Nota: Médias com a mesma letra dentro do mesmo dia não diferem entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$)

Figura 15 - Peso de pupas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando *Jaburetox*. Passo Fundo, 2018

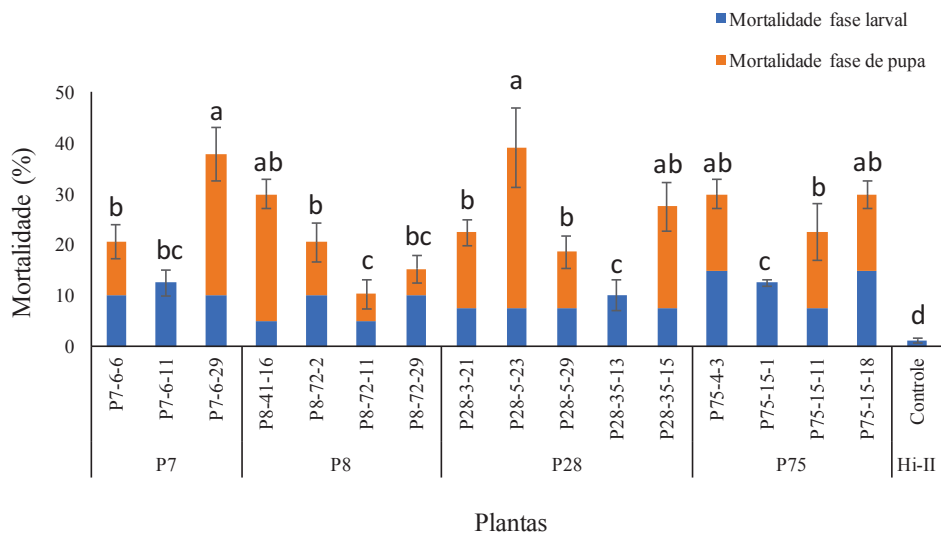


Nota: Médias com a mesma letra nas colunas não diferem entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$).

A maioria das plantas GM com *Jbtx* provocou mortalidade de pupas. As pupas resultantes das larvas que se alimentaram das plantas P8-41-16, P28-5-23 e da P7-6-29 apresentaram de 25 a 31% de mortalidade (Figura 16). Algumas larvas que se alimentaram com as plantas GM também não conseguiram realizar a última ecdise ou se tornaram pupas malformadas, mantendo algumas características de lagartas como, por exemplo, pernas e cápsula cefálica (Figura 17d), vindo a morrer posteriormente. Foram observados outros tipos de malformações, que acabaram por originar adultos defeituosos (Figura 17). As pupas da planta P28-5-23 apresentaram 25% de malformação.

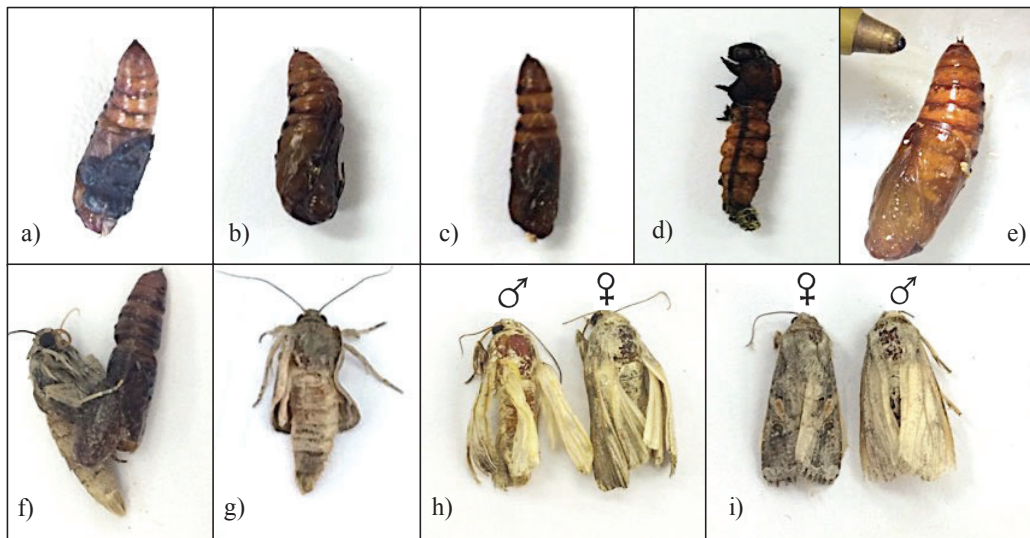
Analisando a mortalidade acumulada nas fases de larva e de pupa, todas as plantas com *Jbtx* diferiram do controle. As plantas P7-6-29 e P8-5-23 se destacaram por apresentar 38 e 39% de mortalidade do inseto-praga, seguidas das plantas P8-41-13, P28-35-15, P75-4-3 e P75-15-18 que provocaram ~30% de mortalidade. As demais plantas proporcionaram mortalidade de 10 a 22% da praga. Os insetos que se alimentaram das plantas controles apresentaram mortalidade baixa (1,25%, média dos dois controles) e somente na fase de larva

Figura 16 - Mortalidade acumulada de larvas e pupas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando Jaburetox. Passo Fundo, 2018



Nota: Médias com a mesma letra nas colunas não diferem entre si (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Figura 17 - Alterações morfológicas em pupas e adultos de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de plantas de diferentes eventos de milho geneticamente modificados expressando *Jaburetox*: a) pupa com falha no processo de retirada do tegumento; b e c) pupas malformadas; d) pupa com características morfológicas de larva e) pupa normal (controle); f) adulto com asas não distendidas e pupa unida nas asas; g) adulto com asas pequenas; h) casal de adultos malformados, com asas dobradas e i) casal de adultos sem deformação (controle). Passo Fundo, 2018



Com relação às consequências para a fase adulta, constatou-se uma redução na fecundidade das fêmeas expostas à algumas das plantas com *Jbtx* (Tabela 5). A maioria dos tratamentos diferiu entre si, com um total de 570 ovos no controle e uma variação de 173 a 815 ovos para as plantas com *Jbtx* (Tabela 5). O que ocorreu na planta P75-15-18, que as mariposas colocaram 245 ovos a mais que no controle pode ser explicado pelo aumento da reprodução em populações estressadas, onde a compensação da população pelo processo reprodutivo aumenta para a sobrevivência dos indivíduos. Mesmo contendo redução significativa na oviposição, o número de ovos das mariposas controles foi inferior da média de ovos (1.300) colocados por *S. frugiperda* em ambiente natural (CRUZ, 1995).

Tabela 5 - Número de casais de adultos formados, número de ovos por fêmea, viabilidade dos ovos e deformidade de adultos de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com diferentes eventos e plantas de milho geneticamente modificadas expressando Jaburetox. Passo Fundo, 2018

Eventos	Plantas	Nº de casais	Nº ovos/ fêmea	Viabilidade dos ovos (%)*	Deformação adultos (%)
P7	P7-6-6	6	412,7 abc	81,8 ab	26,3 abc
	P7-6-11	5	425,4 abc	81,3 ab	36,8 abc
	P7-6-29	4	257,0 bc	29,5 ab	22,2 abcd
P8	P8-41-16	4	210,5 c	29,7 ab	10,0 bcd
	P8-72-2	7	369,1 abc	38,6 ab	21,0 abcd
	P8-72-11	8	279,5 bc	38,7 ab	42,1 ab
	P8-72-29	6	524,7 bc	88,5 ab	42,1 ab
P28	P28-3-21	7	173,3 c	0,0 b	31,5 abc
	P28-5-23	6	269,2 c	14,6 ab	20,0 abcd
	P28-5-29	7	227,0 bc	41,0 ab	22,2 abcd
	P28-35-13	8	255,4 bc	31,9 ab	25,0 abc
	P28-35-15	9	563,3 abc	66,6 ab	5,0 cd
P75	P75-4-3	8	226,3 c	0,0 b	10,0 cd
	P75-15-1	7	403,7 abc	43,7 ab	52,9 a
	P75-15-11	7	358,4 abc	32,2 ab	20,0 abcd
	P75-15-18	5	815,4 a	61,3 ab	45,0 a
Hi-II	Controle	19	570,7 ab	94,7 a	2,6 d
	CV (%)	123	42,4	57,6	20,4

Nota: *Avaliação de seis posturas por gaiola.

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% (P<0,05).

Para o parâmetro biológico fertilidade, o número de ovos viáveis foi maior no controle, que diferiu dos tratamentos P28-3-21 e P75-4-3. Assim, enquanto o controle apresentou 95% de ovos férteis, nessas plantas a viabilidade dos ovos foi nula (Tabela 5).

Não se sabe se os ovos foram inférteis por não ocorrer acasalamento ou se teve algum mecanismo que impediu que as larvas se desenvolvessem ou eclodissem. Outro ponto importante é que essas plantas obtiveram uma expressão diferente do gene, sendo que a P28-3-21 teve uma superexpressão gênica, apresentado 2798 vezes mais que a planta calibradora e a P75-4-3 apresentou expressão média sendo de 68 vezes. Já a mortalidade acumulada de larvas e de pupas causada por essas plantas foi de 25 e 30%, respectivamente. A deformação de adultos foi encontrada em todos os tratamentos, sendo observado 3% no controle e 45% na planta P75-15-18.

Com base nesses resultados as plantas candidatas a serem avaliadas na próxima geração (T3) são a P75-4-3 e a P28-3-21, que não apresentaram ovos viáveis, e as plantas P28-5-23 (14% de ovos viáveis) e P7-6-29 (29% de ovos viáveis), por apresentarem maior mortalidade em todo o experimento e pequena fertilidade dos ovos. A planta P7-6-29 também seria escolhida por pertencer ao evento P7, que nas análises de expressão gênica se mostrou mais estável, podendo ter apenas uma cópia do gene *Jbtx* no genoma, além de possivelmente estar em homozigose.

4.5 Discussão

O gene *Jbtx* foi introduzido com sucesso no genoma do milho sendo as plantas transgênicas produzidas férteis e saudáveis. Para a obtenção de plantas GM a caracterização molecular de um evento transgênico é tão importante quanto a sua obtenção. Cada evento T0 de transformação é único, seja pelo local de inserção do transgene no genoma da planta ou pelo número de cópias inseridas ou ainda pelo tipo (em série, na mesma direção, invertido, aleatórios no genoma, etc.) de inserção dessas cópias (KOHLI et al., 2010). Essas características únicas de cada evento T0 são transferidas para as futuras gerações T1 e T2 e podem explicar as diferenças de expressão gênica observada em cada geração.

Neste estudo, um total de 57 plantas saudáveis pertencente a 24 eventos foram obtidas com a construção *35S:Jbtx*. Entretanto, nove eventos não formaram sementes e três eventos não transmitiram o transgene para a próxima geração. Romano et al. (2005)

caracterizaram molecularmente alguns eventos GMs por mais de dois anos, e concluíram que os possíveis mecanismos envolvidos na eliminação de transgenes de uma geração para outra envolvem recombinações intracromossômicas, instabilidades genéticas provenientes das manipulações da cultura de tecido e co-eliminação dos transgenes ativada por algum processo de defesa do genoma vegetal, ou até mesmo pela polinização com pólen negativo para o gene, já que o milho produz milhões de grãos de pólen e as plantas T0 são hemizigotas para o gene, ou seja, apresentam o gene somente em um cromossomo.

A não expressão do gene em algumas plantas pode ser explicada por ter ocorrido silenciamento do mesmo, o qual pode ser devido a: muitas cópias inseridas no genoma, expressão muito elevada do gene, rearranjos do gene e até mesmo por transposons. Normalmente, no processo de transformação via *A. tumefaciens* um baixo número de cópias do transgene são inseridas (OLTMANN et al., 2010), comparado a métodos de transferência direta de DNA, tais como eletroporação ou bombardeamento de partículas (GELVIN 2003). No entanto, segundo Song et al. (2003) o processo de integração do transgene sofre influência direta da estirpe de *Agrobacterium* e do gene exógeno utilizado.

Diferentes condições experimentais podem levar a uma complexa integração desses transgenes no genoma, como observado por Wu et al. (2014) na avaliação de embriões de sorgo transformados com diferentes estirpes de *A. tumefaciens* utilizando cinco diferentes construções gênicas. No trabalho 35% dos eventos obtidos apresentaram a inserção de múltiplas cópias no genoma e interessante a segregação mendeliana ocorreu em 66,7% das plantas. Segundo Ahuja e Fladung, (2014) apesar de muitas vezes múltiplas cópias do transgene serem integradas no genoma, estas geralmente co-segregam como um locus transgênico. Ou seja, eles geralmente se integram em *loci* muito próximos ou no mesmo *locus*.

Por outro lado, a expressão variável do transgene entre os eventos estudados, pode não estar diretamente relacionada com o número de cópias, mas talvez relacionada com local de integração do transgene no genoma vegetal (JOYCE et al., 2014; TAMURA et al., 2016). A integração do T-DNA de *Agrobacterium* ocorre preferencialmente em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (BOURRAS; ROUXEL;

MEYER, 2015), em diferentes regiões do genoma e também de forma aleatória (GELVIN; KIM, 2007). A distribuição da integração do T-DNA foi observada em regiões codificantes, regiões não codificantes, regiões intergênicas, sequência repetitivas, incluindo regiões de centrômero e telômero (GELVIN; KIM, 2007). Ou seja, o número de cópias e o local onde inseridas no DNA da planta interferem no nível de expressão do transgene, e geralmente múltiplas cópias do transgene resulta no seu silenciamento (HENSEL et al., 2012), o que foi observado em alguns eventos, como o P30, de uma geração para outra.

O padrão de segregação excepcional observado nesse estudo pode estar relacionado com múltiplas cópias do gene inserido no genoma das plantas, pois, se uma única cópia do transgene for inserida em um *locus* único no genoma hospedeiro, o padrão de segregação mendeliana ocorre de forma esperada. Já, se o padrão de segregação excepcional e a intransferibilidade do transgene para as próximas gerações ocorrerem, está relacionado ao resultado da inserção de mais de uma cópia do gene de interesse em *locus* (HENSEL et al., 2012; SINGH et al., 2015).

Para controlar estes problemas de regulação gênica, inserção de múltiplas cópias, inserção do transgene em locais não ativos do genoma e silenciamento gênico, surgiram na última década, diferentes nucleases capazes de gerar edições gênicas direcionadas, podendo ser ferramentas importantes para melhorar a edição de genes e a integração do gene em locais específicos do genoma em diferentes espécies, incluindo plantas (LIU et al., 2017; ISLAM, 2018). O recém descoberto sistema de RNA guia Cas9 (gRNA) revolucionou este conceito (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014). O sistema consiste de uma endonuclease Cas9 derivada de *Streptococcus pyogenes* e um RNA guia quimérico único que direciona Cas9 para uma sequência de DNA alvo no genoma. A edição do genoma CRISPR/Cas9 é realizada introduzindo uma quebra de fita dupla de DNA no locus alvo, via Cas9, podendo induzir pequenas inserções de DNA exógeno ou deleções, ou ainda realizar alteração de sequência precisas, permitindo a edição genômica. O sistema foi testado com sucesso em culturas agronomicamente importantes, como milho, trigo, arroz e soja (DU et al., 2016; JIANG et al., 2013; LIANG et al., 2014; SUN et al., 2016; SVITASHEV et al., 2015; ZHU et al., 2016).

A inserção de um gene em um sítio-específico usando CRISPR/cas9 já foi relatado em milho, mostrando que é possível utilizar essa metodologia para a espécie. A segregação mendeliana da geração T1 dessas plantas foi conforme o esperado para a inserção de uma cópia do gene (SVITASHEV et al., 2015).

CRISPR/Cas9 permite uma melhoria precisa das espécies de plantas comercialmente relevantes por meio de metodologias transgênicas. Essas melhorias incluem o aumento da tolerância à seca, melhoria da composição do óleo de semente, tolerância ao herbicida e pode incluir resistência a insetos, pela inserção do gene *Jbtx* por esse método. Essas mudanças podem ser introduzidas nos genótipos com melhor velocidade e qualidade, em comparação com os métodos tradicionais de reprodução, visto que, os mutantes homozigotos podem ser gerados em uma única geração usando essa tecnologia de edição do genoma (ZHANG et al., 2014; ISLAM, 2018). A precisão, o alcance e a flexibilidade proporcionados pela CRISPR/Cas9 prometem um papel importante para a edição do genoma em futuros esforços de melhoria de culturas (ISLAM, 2018).

Em relação ao bioensaio realizado, onde discos foliares de plantas de milho GM expressando *Jbtx* foram ofertadas às larvas de *S. frugiperda*, é importante ressaltar, que nesse estudo, foram observados baixos índices de mortalidade no estágio larval (10%), que podem estar relacionados com a quantidade da proteína heteróloga produzidas nas células do milho. Uma maior taxa de mortalidade era esperada nessa fase, pois quando ofertado 16 µg do peptídeo JBTX purificado sobre discos foliares de milho para larvas neonatas de *H. armígera* e *S. frugiperda* foi observada mortalidade de 70% e 100%, respectivamente em oito dias (Dados Capítulo I; MULINARI et al., 2007).

Outro ponto a ser destacado é que, de maneira geral, houve um crescimento da mortalidade larval até o 12º dia do experimento, e que após esse período a mortalidade paralisou. Esse período coincide com a transição do estágio fenológico da planta para o reprodutivo. Desta forma, a oferta de discos foliares de plantas que se encontravam no estágio reprodutivo não demonstrou efeito na mortalidade das larvas. Portanto, a passagem para o estágio reprodutivo pode ter reduzido a concentração de proteínas JBTX produzidas pelas plantas, já que essas passam a produzir proteínas de reserva para a

reprodução (CARRIÈRE et al., 2016). Segundo Waquil (2007), já foi verificado em plantas Bt que a dose de proteínas produzido por plantas geneticamente modificadas tem grande influência na mortalidade de *S. frugiperda*. Para verificar se o nível de proteína foi reduzida de uma fase para outra da planta, e para verificar a dose de proteína produzida por cada planta, análises de quantificação do peptídeo JBTX estão sendo realizadas pelo método imunológico de Elisa. Para tal, foram coletadas folhas das plantas GM no estágio vegetativo e reprodutivo.

A primeira tentativa de expressar o gene *Jbtx* em plantas transgênicas foi conduzida por Mulinari (2008) que utilizou a agrobactéria contendo o vetor binário pCAMBIA2300-AMV-35Sd-jaburetox2-Tnos para transformar plantas de tabaco. Plantas transgênicas oferecidas a *S. frugiperda* induziram de 50 a 100% de mortalidade, em 15 a 30 dias, sendo que a mortalidade foi relativa ao nível de expressão de *Jbtx* em diferentes linhagens transgênicas. Em uma segunda tentativa de expressar *Jbtx* em plantas, como uma estratégia de controle de insetos, Becker-Ritt et al. (2017) produziram plantas de cana-de-açúcar a partir de calos bombardeados, mostrando resistência aos lepidópteros *Diatraea saccharalis* e *Telchin licus licus*, causando até 100% de mortalidade das larvas. Plantas de soja expressando *Jbtx*, transformadas via agrobactéria, causaram mortalidade de até 53% em larvas de *H. armigera* em 8 dias, e de 100% em 30 dias. O alto índice de mortalidade não foi observado nesse estudo, visto que a expressão de *Jbtx* em plantas de milho proporcionou mortalidade máxima de 39%, em 30 dias, em larvas de *S. frugiperda*.

A utilização do promotor constitutivo 35S na construção gênica, que foi isolado do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV35S), para controlar a expressão do gene *Jbtx* em milho pode ser o motivo da baixa produção de JBTX pelas plantas, e, portanto, do baixo índice de mortalidade observado em *S. frugiperda* nesse estudo. O promotor 35S direciona alto nível de expressão constitutiva em dicotiledôneas, por ser fortemente reconhecido pelo complexo basal de transcrição dessas plantas, e não direcionar o mesmo nível de expressão em monocotiledôneas, que é o caso do milho (BENFEY; CHUA, 1990).

Por esta razão, uma nova construção gênica com *Jbtx* sob controle do promotor

Ubi-1, isolado do gene da ubiquitina de milho (CHRISTENSEN; SHARROCK; QUAIL, 1992), foi desenvolvida, e novos experimentos de transformação genética de milho com essa construção já foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da UPF com o intuito de produzir plantas que apresentem maiores expressões do *Jbtx* e que sejam mais eficientes no controle de insetos.

Apesar do principal foco da maioria dos estudos toxicológicos ser a sobrevivência e mortalidade dos insetos, há uma consciência crescente sobre a importância de efeitos tóxicos não letais. Os efeitos subletais, de uma forma geral, podem se manifestar como redução no tempo de vida, das taxas de desenvolvimento, da fertilidade, da fecundidade, mudanças na razão sexual, e as mudanças de comportamento, como na alimentação. Para Bt, os efeitos subletais mais comumente observados, dependendo da dose ingerida, são inibição da alimentação, redução do peso pupal e prolongamento do ciclo dos lepidópteros (STARK; BANKS, 2003; MORAES et al., 2016).

Os efeitos observados nas larvas que sobreviveram neste estudo mostraram que o *Jbtx*, quando expresso em plantas de milho, apresenta efeitos subletais desejáveis para o controle das larvas de *S. frugiperda*.

Dutton et al. (2005) relataram que as toxinas Bt são deterrentes para as larvas de lepidópteros e que essa característica em milho Bt acarreta baixo ganho de peso das larvas alimentadas com esse tipo de milho. Para Mendes et al. (2009) os insetos que sobrevivem após serem alimentados com milho transgênico apresentam menor acúmulo de biomassa, reduzindo sua competitividade no ambiente, comprometendo o desempenho dessa população de insetos. Por outro lado, longas exposições do inseto a toxinas resultam numa redução na alimentação do inseto decorrente da toxicidade pós-ingestão. Essa toxicidade pode afetar a fisiologia do inseto e não o seu comportamento alimentar (ISMÁN, 2002).

No presente estudo pode ter sido observado uma possível característica de deterrência do JBTX, ou, também, de uma toxicidade após a ingestão pelas larvas. Devido os sintomas encontrados no desenvolvimento de *S. frugiperda* serem os mesmos relatados pelos autores em plantas expressando Bt. Também, foi verificada pela primeira vez redução de peso em lepidópteros, já que, os ensaios realizados anteriormente com *H.*

armigera, alimentada com a proteína em folhas de milho e com plantas transgênicas de soja, não foi observado esse efeito na biologia do inseto (Dados não publicado e dados do Capítulo I).

Já foi relatada redução de biomassa em larvas alimentadas com milho transgênico Bt de 68,4% e 100% (STORER et al., 2010; MORAIS et al., 2016). No presente estudo foi demonstrado uma redução de peso de 65%, ficando no mesmo patamar do que já visto para Bt. Essa redução de peso das larvas de *S. frugiperda*, pode estar relacionado com a não mobilização de reservas de energia e uma menor eficiência na exploração de nutrientes digeridos. Juntamente com o aumento da excreção de fluidos e a indução de uma resposta de inanição, isso tudo pode ter levado à perda de peso observada em *S. frugiperda* (BOIÇA JÚNIOR et al., 2013; MORAES et al., 2016).

Segundo Chapman e De Boer (1995), o ganho de peso em insetos é controlado por uma rede neural influenciada diretamente pela atividade locomotora, disponibilidade de alimento e atividade hormonal (ex.: saciedade). Além do sistema nervoso central (SNC), o sistema nervoso estomatogástrico (que controla as contrações do intestino do inseto) também pode influenciar na alimentação do mesmo. De acordo com Robertson et al. (2012), ao seccionar os nervos que conectam o gânglio frontal ao intestino há uma inibição na alimentação, sugerindo o envolvimento desses gânglios no comportamento de alimentação do inseto. Portanto, um possível efeito do JBTX sobre esses gânglios ou nervos poderia induzir a redução no ganho de peso *S. frugiperda* e ao prolongamento na duração da fase larval.

A mudança em cada fase de desenvolvimento dos insetos é acompanhada de importantes alterações na fisiologia dos mesmos (POLANCZYK et al., 2012). Portanto, os resultados obtidos permitem inferir que o JBTX interfere na mudança de fase, sobretudo para a fase de pupa, e desta para adulto, onde o organismo se transformará através de um processo complexo, proporcionando um percentual elevado de mortalidade e/ou inviabilidade no desenvolvimento de *S. frugiperda*. As larvas sobreviventes que ingeriram alguma quantidade dessa substância, sofreram alterações em seu desenvolvimento, e os adultos apresentam fecundidade ou fertilidade reduzida, fatores que

interferem no crescimento populacional da praga, podendo mantê-la abaixo do nível de dano econômico nos sistemas de produção.

Polanczyk, Alves e Padulla (2005) constataram efeitos subletais em *S. frugiperda* que, em alguns casos, se manifestaram na fase adulta afetando a oviposição e viabilidade dos adultos. Estudos feitos por Paula et al. (2014) e Moraes et al. (2016) corroboram estes dados, pois demonstraram que em condições de laboratório a toxina Cry1Ac de Bt afetou a viabilidade dos ovos e a fecundidade foi afetada negativamente em mariposas fêmeas obtidas a partir de recém-nascidos tratados com Bt, com a taxa de eclosão de ovos quase zero. O mesmo resultado foi observado nesse estudo, onde as mariposas obtidas de larvas que se alimentaram com plantas de milho contendo o *Jbtx* apresentaram baixa viabilidade de ovos e algumas tiveram todos seus ovos inviáveis.

O mecanismo de ação do JBTX não está totalmente elucidado e ainda não foi estudado como atua em lepidópteros. Porém, sabe-se que este peptídeo atua como desestabilizador de membranas biológicas (BARROS et al., 2009; PIOVESAN et al., 2014), além de afetar vias metabólicas envolvendo cálcio, serotonina e cGMP (monofosfato de guanidina cíclico), causando, através dessas vias, uma desregulação no balanço hídrico em túbulos de Malpighi, quando testado *in vitro* (STANISÇUASKI et al., 2009; DEFFERRARI et al., 2014).

Em trabalhos recentes foi demonstrado que o JBTX está envolvido na atividade enzimática do óxido nítrico sintase (NOS) responsável pela produção do neurotransmissor óxido nítrico e na sinalização da UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase (UAP), implicando nas vias de glicosilação e na síntese de quitina (GALVANI et al., 2015; FRUTTERO et al., 2017). A quitina em insetos tem um importante papel visto que é componente da cutícula, glândulas salivares, traquéia, matriz peritrófica (MERZENDORFER, 2011). Galvani et al. (2015) estabeleceram que a UAP interagia fisicamente com o JBTX no SNC elevando a atividade enzimática da UAP. Entretanto, Fruttero et al. (2017) observaram que o JBTX desencadeia uma diminuição na expressão de RNAm de UAP e quitina sintetase.

Ainda não se sabe se a distribuição de JBTX é homogênea em insetos, mas se sabe

que esse peptídeo é capaz de atravessar o epitélio intestinal e alcançar a hemolinfa, o que possibilita que atue em outros órgãos, onde pode ocorrer um possível direcionamento deste peptídeo entomotóxico para glândulas salivares, corpos gordurosos e epiderme. Quando o JBTX atravessa a membrana intestinal para a hemolinfa, o peptídeo pode entrar em contato com a epiderme, possibilitando que interaja com a UAP presente nesse órgão, aumentando sua atividade. Por fim, atinge o corpo gorduroso que é um órgão equivalente ao fígado e ao tecido adiposo dos mamíferos. Esse órgão é o principal responsável por produzir proteínas e metabólitos circulantes na hemolinfa, o que inclui diversas proteínas glicosiladas de secreção constante (ARRESE; SOULAGES, 2010). A importância fisiológica do corpo gorduroso e da epiderme os torna um bom alvo para respostas envolvendo mecanismos de toxicidade, o que explicaria as alterações apresentadas pelas larvas que se alimentaram com as plantas de milho expressando *Jbtx*.

Foram produzidos vários eventos independentes de milho transgênico contendo o gene *Jbtx* usando o sistema de transformação de *A. tumefaciens*. Esses eventos mostraram grande potencial no controle de *S. frugiperda* sendo quatro plantas de três eventos diferentes (P75-4-3, P28-3-21, P28-5-23 e P7-6-29) promissoras para serem utilizadas como um método de resistência à lepidópteros-praga no milho. Os resultados obtidos nesse trabalho são importantes para o manejo de insetos no campo, pois, com menor biomassa e consumo alimentar, será menor o potencial dano do inseto à produção. Neste sentido, plantas transgênicas de milho expressando *Jbtx* poderão representar uma importante ferramenta dentro do MIP.

4.6 Conclusões

É possível inserir de forma estável o gene *Jbtx* em milho pela técnica de *A. tumefaciens*, e obter diferentes gerações de plantas de milho expressando esse gene.

Plantas de milho contendo *Jbtx* tem efeito sobre *S. frugiperda*, reduzindo o seu consumo, o seu peso, inviabilizando seus ovos e ocasionando na sua mortalidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As próximas etapas desse trabalho serão focadas na finalização da caracterização molecular das plantas transformadas, o que envolverá a análise do número de cópias inseridas por *Southern blot* e análise da expressão proteica por espectrometria de massa. Além de investigar se essas plantas controlam outros insetos-praga como por exemplo *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae).

Em paralelo, está sendo realizada a obtenção de novas plantas transgênicas com *Jbtx* sob o controle do promotor *Ubi-1* com o intuito de obter plantas com maiores expressões da toxina.

A obtenção de milho expressando *Jbtx* de forma estável, que controla lepidópteros-praga como *S. frugiperda* e *H. armigera*, é uma importante estratégia biotecnológica de plantas, trazendo grande valor para a agricultura, pois a utilização desse milho resistente a insetos pode substituir métodos de controle ou complementar os mesmos, trazendo inúmeros benefícios ao MIP. Além disso, irá contribuir com a produção da cultura do milho, redução da utilização de inseticidas e conservação da biodiversidade.

6 CONCLUSÃO GERAL

Plantas de milho GM, que expressam o gene *Jbtx*, representam nova alternativa para o controle de insetos, além de serem consistentes com a filosofia do MIP, cujo objetivo é o manejo de pragas que associa o ambiente e a dinâmica populacional da espécie utilizando todas as técnicas apropriadas e métodos de forma tão compatível quanto possível para manter a população de praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico.

Desde que as primeiras plantas transgênicas começaram a ser comercializadas há quase duas décadas, esta tecnologia tem contribuído para desenvolver novas formas de proteção de plantas visando aumentar a produção mundial de alimentos. Esse trabalho mostra ser possível produzir plantas de milho expresasando o gene *Jbtx* e controlar lepidópteros-praga como *S. frugiperda* e *H. armigera*. O que irá diminuir o dano causado por esses insetos nas lavouras, podendo trazer soluções para o problema do equilíbrio entre a produção de alimentos e a população mundial em expansão neste novo milênio.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, M. R.; FLADUNG, M. Integration and inheritance of transgenes in crop plants and trees. **Tree Genetics & Genomes**, v. 10, n. 4, p. 779–790, 2014.
- ALI, A.; CHOUDHURY, R. A.; AHMAD, Z.; RAHMAN, F.; KHAN, F. R.; AHMAD, S. K. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.
- ALVES, S. B.; ZUCCHI, R. A.; VENDRAMIM, J. D. **Pragas do milho, arroz, trigo e sorgo**. In: Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura. Piracicaba: FEALQ, 1992. p. 273-310.
- ANDREWS, K. L. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 71, n. 4, p. 630-653, 1988.
- ARMSTRONG, C. L.; PARKER, G. B.; PERSHING, J. C.; BROWN, S. M.; SANDERS, P. R.; DUNCAN, D. R.; STONE, T.; DEAN, D. A.; De BOER, D. L.; HART, J.; HOWE, A. R.; MORRISH, F. M.; PAJEAU, M. E.; PETERSEN, W. L.; REICH, B. J.; RODRIGUEZ, R.; SANTINO, C. G.; SATO, S. J.; SCHULER, W.; SIMS, S. R.; STEHLING, S.; TAROCHIONE, L. J.; FROMM, M. E. Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Crop Science**, v. 35, p. 550-557, 1995.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation insect fat body: an overview. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 207–228, 2010.
- ASOKAN, G. S.; CHANDRA, M.; MANAMOHAN, N. K. K.; KUMAR, T. Response of various target genes to diet-delivered dsRNA mediated RNA interference in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Pest Science**, v. 87, p. 163–172, 2014.
- ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12 p.
- BALASUBRAMANIAN, A.; PONNURAJ, K. crystal structure of the first plant urease from *Jack bean*: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 400, n. 3, p. 274–283, 2010.
- BALASUBRAMANIAN, A.; DURAIRAJPANDIAN, V.; ELUMALAI, S.; MATHIVANAN, N.; MUNIRAJAN, A. K. & PONNURAJ, K. Structural and functional studies on urease from pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 301–309, 2013.

BARROS, P. R.; STASSEN, H.; FREITAS, M. S.; CARLINI, C. R.; NASCIMENTO, M. A. C.; FOLLMER, C. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox- 2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, n. 12, p. 1848–54, 2009.

BECHER-RITT, A. B.; PORTUGAL, C. S.; CARLINI, C. R. Jaburetox: update on a urease-derived peptide. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, p. 1-8, 2017.

BECKER-RITT, A. B.; CARLINI, C. R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides. **Biopolymers**, v. 98, n. 4, p. 367–84, 2012.

BENFEY, P. N.; CHUA, N. The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. **Science**, v. 250, n. 4983, p. 959-966. 1990.

BERNARDI, O.; SORGATTO, R. J.; BARBOSA, A. D.; DOMINGUES, F. A.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C., Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically-modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection**, v. 58, n. p. 33-40. 2014.

BERNARDI, D.; SALMERON, E.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, O.; DOURADO, P. M.; CARVALHO, R. A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P.; OMOTO, C. Cross-resistance between Cry1 proteins in fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) may affect the durability of current pyramided Bt maize hybrids in Brazil. **PloS One**, v. 10, n. 10, e0140130, 2015.

BORTOLI, S.A.; VACARI, A.M.; MAGALHÃES, G.O. de; DIBELLI, W.; BORTOLI, C. P. de; ALVES, M.P. Subdosagens de *Bacillus thuringiensis* em *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Revista Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 50-57, 2012.

BOIÇA JÚNIOR, A. L.; SOUZA, B. H. S.; LOPES, G. S.; COSTA, E. N.; MORAES, R. F. O.; EDUARDO, W. I. Atualidades em resistência de plantas a insetos. In: BUSOLI, A. C.; BUENO, L. C. de S.; MENDES, A. N.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e conceitos**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2013.

BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology**, v. 105, n. 10, p. 1288-1301, 2015.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515–1539, 2002.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 667–675, 1981.

CARLINI, C. R.; POLACCO, J. C. Toxic properties of urease. **Crop Science**, v. 48, p. 1665–1672, 2008.

CARLINI, C. R.; LIGABUE-BRAUN, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, v. 110, p. 90-109, 2016.

CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E. A.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, p. 340–348, 1997.

CARRIÈRE, Y.; FABRICK, J. A.; TABASHNIK, B. E. Can pyramids and seed mixture delay resistance to Bt crops?. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 291-302, 2016.

CARVALHO, C. H. S.; BOHOROVA, N.; BORDALLO, P. N.; ABREU, L. L.; VALICENTE, F. H.; BRESSAN, W.; PAIVA, E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 73-76, 2004.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PloS one**, v. 8, e62268, 2013.

CÉLERES. **Informativo biotecnologia o acompanhamento de adoção da biotecnologia agrícola no Brasil**, safra 2015/16. Disponível em: <<http://celeres.com.br/post.php?p=184&lang=pt>>. Acesso em 10/abril. 2018.

CHAPMAN, R. F.; DE BOER, G. **Regulatory Mechanisms in Insect Feeding**. Springer Book. 1995

CHOMCZYNSKI, P.; MACKEY, K. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. **Biotechniques**, v. 19, p. 942-500. 1995.

CHRISTENSEN, A. H.; SHARROCK, R. A.; QUAIL, P. H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. **Plant Molecular Biology**, v. 18, n. 4, p. 675-689, 1992.

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

CRUZ, I. Estratégias de manejo do milho Bt em condições de safrinha. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 10., 2009, Rio Verde. **Anais...** Rio Verde: Universidade de Rio Verde, 2009. p. 154-170.

CRUZ, I. Manejo de pragas da cultura do milho. In: CRUZ, J. C.; KARAM, D.; MONTEIRO, M. A. R.; MAGALHAES, P. C. (Ed.). **A Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. cap. 12, p.303-362.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): A new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 3, p. 201–207, 2014.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; OLIVEIRA, H. O.; CARVALHAIS, T. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DEFFERRARI, M. S.; SILVA, R.; ORCHARD, I.; CARLINI, C. R. “Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid- modulated hemocyte aggregation in the chagas’ disease vector *Rhodnius prolixus*.” **Toxicon**, v. 82, p. 18–25. 2014.

DEFFERRARI, M. S.; DEMARTINI, D. R.; MARCELINO, T. B.; PINTO, P. M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 6, p. 388–399, 2011.

DIDONÉ, D. A.; SILVA, M. R.; CECCON, C. C.; TEIXEIRA, T.; SUZIN, M.; GRANDO, M. F.; Increased transient genetic transformation in immature embryos of Brazilian BR 451 maize co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens*. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 40, p. 1-6. 2018.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L. & ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346: n. 12 p. 580-596, 2014.

DU, H.; ZENG, X.; ZHAO, M.; CUI, X.; WANG, Q.; YANG, H.; CHENG, H. Efficient targeted mutagenesis in soybean by TALENs and CRISPR/Cas9. **Journal Biotechnology**, v. 217, p. 90–97, 2016.

DUTTON, A.; ROMEIS, J.; BIGLER, F. Effects of Bt maize expressing Cry1Ab and Bt spray on *Spodoptera littoralis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 114, p. 161-169, 2005.

EDGERTON, M. D.; FRIDGEN, J.; ANDERSON JÚNIOR, J. R.; AHLGRIM, J.; CRISWELL, M.; DHUNGANA, P.; GOCKEN, T.; LI, Z.; MARIAPPAN, S.; PILCHER, C. D.; ROSIELLE, A.; STARK, S. B. Transgenic insect resistance traits increase corn yield and yield stability. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 493-496, 2012.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION (EPPO). Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera*. Paris: EPPO, 1981 (Bulletin 11).

FARIAS, J.R.; COSTA, E.C.; GUEDES, J.V.C.; ARBAGE, A.P.; B. NETO, A.; BIGOLIN, M.; PINTO, F.F. Managing the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, and corn earworm, *Helicoverpa zea*, using Bt corn and insecticide treatments. **Journal of Insect Science**, Oxford, v.13, p.1-10, 2013.

FARIAS, J.R.; ANDOW, D.A.; HORIKOSHI, R.J.; SORGATTO, R.J.; FRESIA, P.; DOS SANTOS, A.C.; OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150- 158, 2014.

FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITS, M. E.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M. & CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 162–171, 2000.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual review of entomology**, v. 34, n. 1, p. 17-53, 1989.

FOLLMER, C., PEREIRA, F. V., DA SILVEIRA, N.P. & CARLINI, C.R. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. **Biophysical Chemistry**, v. 111, p. 79–87, 2008.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C. & CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **The Biochemical Journal**, v. 360, p. 217–224, 2001.

FOLLMER, C.; REAL-GUERRA, R.; WASSERMANN, G. E.; OLIVERA-SEVERO, D. & CARLINI, C. R. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, p. 1357–1363, 2004.

FOLLMER, C. CARLINI, C.R., YONEAMA, M.L., DIAS, J.F. Pixe analysis of urease isoenzymes isolated from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 189, p. 462-486. 2002

FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K.W. TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Reports, Genetic Transformation e Hybridization**, v. 25, p.1024-1034, 2006.

FRAME, B. R.; SHOU, H.; CHIKWAMBA, R. K.; ZHANG, Z.; XIANG, C.; FONGER, T. M.; PEGG, S. E. K.; LI, B.; NETTLETON, D. S.; PEI, D.; WANG, K. *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System Breakthrough Technologies. **Plant Physiology**, v. 129, p. 13-22, 2002.

FRAME, B.; MAIN, M.; SCHICK, R.; WANG, K. Genetic Transformation Using Maize Immature Zygotic Embryos. In: THORPE, A.; YEUNG, E. C. Plant Embryo Culture: Methods and Protocols, **Methods in Molecular Biology**. v. 710, p. 327-341, 2011.

FRUTTERO, L. L, MOYETTA, N. R, UBERTI, A. F, GRAHL, M. V, LOPES, F. C, BROLL, V., FEDER, D., CARLINI, C. R. Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 412. 2016.

FRUTTERO, L. L., MOYETTA, N. R., KRUG, M. S., BROLL, V., GRAHL, M. V. C., REAL-GUERRA, R., STANISÇUASKI, F., CARLINI, C. R. (2017). Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. **Acta Tropical**, v. 168, p. 54-63. 2017.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALGO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GALVANI GL, FRUTTERO LL, CORONEL MF, NOWICKI S, DEMARTINI DR, DEFFERRARI MS, POSTAL M, CANAVOSO LE, CARLINI CR, SETTEMBRINI BP. Effect the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of

Triatoma infestans (Insecta: Heteroptera). **Biochim Biophys Acta**, v. 1850, p. 255-262. 2015.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene- jockeying” tool. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 67, p. 16-37, 2003.

GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1769, p. 410–421, 2007.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 615- 636, 1992.

GIOLLO, F.P.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; BUSATO, G.R. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 8, p. 221-224, 2002.

GŁOWACKA, K., KROMDIJK, J., LEONELLI, L., NIYOGI, K. K., CLEMENTE, T. E., & LONG, S. P. An evaluation of new and established methods to determine T-DNA copy number and homozygosity in transgenic plants. **Plant, cell & environment**. v .39, n. 4, p. 908-1017. 2016.

GORDON-KAMM, W.; SPINCER, T. M.; MANGANO, M. L.; ANDANS, T. R. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. **The Plant Cell**, v. 2, p. 603-618, 1990.

GUOQING, L.; ZHAOJUN, H.; LILI, M.; XIAORAN, Q.; CHANGKUN, C.; YINCHANG, W. Natural oviposition-deterrent chemicals in female cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). **Journal of Insect Pathology**, v. 47, n. 9, p. 951-956, 2001.

HALLMAN, G., Importancia de algunas relaciones naturales plantas--artropodos en la agricultura de la zona calida del Tolima Central. **Revista colombiana de entomologia**. 1979.

HEMATI, S.A.; NASERI, B.; RAZMOJOU, J. Reproductive performance and growth indices of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. **Journal of Crop Protection**, v. 2, n. 2, p. 193-208, 2014.

HENSEL, G.; OLESZCZUK, S.; DAGHMA, D. E. S.; ZIMNY, J.; MELZER, M.; KUMLEHN, J. Analysis of t-dna integration and generative segregation in transgenic winter triticale (x triticosecale wittmack). **Bmc plant biology**, v. 12, n. 1 p. 1. 2012.

HIEI, Y.; ISHIDA, Y.; KOMARI, T. Progress of Cereal Transformation Technology Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 628, 2014.

HUANG, J. ROZELLE, S.; PRAY, C.; WANG, Q. Plant biotechnology in China. **Science**, New York, v. 295, p. 674-677, 2002.

ISHIDA, Y.; HIEI, Y.; KOMARI, T. *Agrobacterium* mediated transformation of maize. **Nature Protocols**, v. 2, n. 7, p. 1614-1621, 2007.

ISLAM, W. CRISPR-Cas9; an efficient tool for precise plant genome editing. **Molecular and Cellular Probes**, v. 39, p. 47-52. 2018.

ISMAN, M. B. Insect antifeedants. **Pesticide Outlook**, v. 13, p. 152-157. 20

JAKKA, S.R.K.; KNIGHT, V.R.; JURAT-FUENTES, J.L. Fitness costs associated with field- evolved resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 1, p. 342-351, 2014.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010**. ISAAA Brief, n. 44, *ISAAA*: Ithaca, New York, 2010.

_____. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2013**. ISAAA Brief, n. 44, *ISAAA*: Ithaca, 2013.

_____. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015**. ISAAA Brief, n. 44, *ISAAA*: Ithaca, 2016.

_____. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016**. ISAAA Brief, n. 44, *ISAAA*: Ithaca, 2017.

JIANG, W.; ZHOU, H.; BI, H.; FROMM, M.; YANG, B.; WEEKS, D.P. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. **Nucleic Acids**. v. 41, p. e188, 2013.

JOYCE, P.; HERMANN, S.; O'CONNELL, A.; DINH, Q.; SHUMBE, L.; LAKSHMANAN, P. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 411–424, 2014.

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

KLÜMPER, W.; QAIM, M. A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-7, 2014.

KOHLI, A.; MIRO, B.; TWYMAN, R. M. **Transgene integration, expression and stability in plants: strategies for improvements**. In KOLE C., MICHLER C.H., ABBOTT A.G., HALL T.C. (eds) *Transgenic Crop Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. *Transgenic crop plants*. p. 201-237, 2010.

LAMMERS, J.W.; MACLEOD, A. **Report of a pest risk analysis: *Helicoverpa armigera*** (Hübner, 1808). 2007. Disponível em: <<http://www.fera.defra.gov.uk/plants/plantHealth/pestsDiseases/documents/helicoverpa.pdf>>. Acesso em: 15 de março de 2018.

LEITE, L.A.R.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. External morphology of the adult of *Dynamine postverta* (Cramer) (Lepidoptera, Nymphalidae, Biblidinae) and patterns of morphological similarity among species from eight tribes of Nymphalidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 57, n. 2, p. 133-148, 2014.

LIANG, Z.; ZHANG, K.; CHEN, K. AND GAO, C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. **Journal Genetic and Genome**, v. 41, p. 63-68, 2014.

LIM, Z. X.; ROBINSON, K. E.; JAIN, R. J.; CHANDRA, S.; ASOKA, R.; ASGARI, S.; MITTER, N. Diet-delivered RNAi in *Helicoverpa armigera* – Progresses and challenges. **Journal Insect Physiology**, v. 85, p. 86-93. 2016

LIMA, M. S.; SILVA, P. S. L.; OLIVEIRA, O. F.; SILVA, K. M. B.; FREITAS, F. C. L. Corn yield response to weed and fall armyworm controls. **Planta Daninha**, v. 28, p. 103-111, 2010.

LIU, X.; WU, S.; XU, J.; SUI, C.; WEI, J. Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 7, n. 3, p. 292-302, 2017.

MAELZER, D. A.; ZALUCKI M. P. Analysis and interpretation of longterm light-trap data for *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia: the effect of climate and crop host plants. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 5, 455-464, 1999.

MAMTA, R. K. R. K.; RAJAM, M. V. Targeting chitinase gene of *Helicoverpa armigera* by host-induced RNA interference confers insect resistance in tobacco and tomato. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 281-292, 2016

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; DEMARTINI, D.R.; DAL BELO, C. A.; ALMEIDA, C.G.M; FOLLMER, C.; VERLI, H.; CARLINI, C.R; PASQUALI, G. Structure-function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935–944, 2014.

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

MENDES, S. M.; MARUCCI, R. C.; MOREIRA, S. G.; WAQUIL, J. M. **Milho Bt: avaliação preliminar da resistência de híbridos comerciais à lagarta-do- cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2009. 8 p. (Comunicado Técnico, 157).

MERZENDORFER, H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 9, p. 759– 769. 2011.

MICHELETTO, Y. M. S; MORO, C. F.; LOPES, F. C.; LIGABUE-BRAUN, R.; MARTINELLI, A. H. S.; MARQUES, C. M.; SCHRODER, A. P.; CARLINI, C. R.; SILVEIRA, N. P. Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and a derived peptide with lipid vesicles. **Colloids and Surfaces**, v. 145, p. 576-585, 2016.

MIRONIDIS, G. K.; STAMOPOULOS, D. C.; SAVOPOULOU- SOULTANI, M. Overwintering survival and spring emergence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Northern Greece. **Environmental Entomology**, v. 39, n. 4, p. 1068-1084, 2010.

MORAES, A. R. A. de; LOURENÇÃO, A. L.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; VENDRAMIM, J. D. Antibiose à lagarta-do-cartucho em híbridos de milho *bt*. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.15, n.1, p. 1-10, 2016.

MORAL-GARCIA, F.J. Analysis of the spatiotemporal distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in a tomato field using a stochastic approach. **Biosystems Engineering**, v. 93, n. 3, p. 253-259, 2006.

MULINARI, F.; BECKER-RITT, A. B.; DEMARTINI, D. R.; LIGABUE-BRAUN, R.; STANISÇUASKI, F.; VERLI, H.; FRAGOSO, R. R.; SCHROEDER, E. K.; CARLINI, C. R. & GROSSI-DE-SÁ, M. F. Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 12, p. 1758–1768, 2011.

MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L. R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; RIGDEN, D. J. & CARLINI, C. R. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042–50, 2007.

MURÚA, M. G.; SCALORA, F. S.; NAVARRO, F. R.; CAZADO, L. E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M. E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist Society**, v. 97, n. 2, p. 854-856, 2014.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2011.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative life history and fecundity of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) on different soybean varieties. **Entomological Science**, v. 12, n. 2, p. 147-154, 2009.

NAHAMPUN, H. N.; LÓPEZ-ARREDONDO, D.; XU, X.; HERRERA-ESTRELLA, L.; WANG, K. Assessment of ptxD gene as an alternative selectable marker for Agrobacterium-mediated maize transformation. **Plant Cell Reports**, v. 35, n. 5, p. 1121-1132, 2016.

NASCIMENTO, A. R. B.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p.985-996, 2015.

NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. ***Helicoverpa armigera* (Old World Bollworm) - Detection in Florida**. Disponível em: <<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=629&keyword=Helicoverpa%20armigera>>. Acesso em: 10 março 2018.

OLTMANN, H.; FRAME, B.; LEE, LY.; JOHNSON, S.; LI, B.; WANG, K.; GELVIN, S. B. Generation of backbone-free, low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. **Plant physiology**, v. 152, n. 3, p. 1158–66, 2010.

OMBORI, O.; MUOMA, J.; MACHUKA, J. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 113, p. 11–23. 2013.

- OMOTO, C.; BERBARDI, O.; SALMERON, E.; SORGATTO, R. J.; DOURADO, P. M.; CRIVELLARI, A.; CARVALHO, R. A.; WILLSE, A.; MARTINELLI, S.; HEAD, G. P. Field- evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n. 9, p. 1727-1736. 2016.
- PAULA, D.P.; ANDOW D.A.; TIMBÓ R.V.; SUJII E.R.; PIRES C.S.S.; FONTES E.M.G. Uptake and transfer of a *Bt* toxin by a Lepidoptera to its eggs and effects on its offspring. **PLoS ONE**, Cambridge, v. 9, n. 2, e95422, 2014.
- PEDGLEY, D.E. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, v. 36, n. 1, p. 15-20, 1985.
- PEREZ, C.; FERNANDEZ, L. E. SUN, J.; FOLCH, J.L.; GILL, S. S.; SOBERON, M.; BRAVO, A. *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane bound receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 18303–18308, 2005.
- PIOVESAN, A. R.; MARTINELLI, A. H. S.; LIGABUE-BRAUN, R.; SCHWARTZ, J. & CARLINI, C. R. Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 547, p. 6–17, 2014.
- PIRES-ALVES, M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; BARCELLOS, G. B. S.; CARLINI, C. R. & MORAES, M. G. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 2, p. 139–145, 2003.
- POGUE, G.M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, n. 1, p. 1-202, 2002.
- POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, v. 1, n.1/2, p. 114-124, 2005.
- POLANCZYK, R. A.; DE BORTOLI, S. A.; DE BORTOLI, C. P. *Bacillus thuringiensis* - based biopesticides against agricultural pests in Latin America. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**. Rijeka: Intech, 2012, p. 445-462.
- POSTAL, M.; MARTINELLI, A. H. S.; BECKER-RITT, A. B.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEMARTINI, D. R.; RIBEIRO, S. F. F. CARLINI, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22–32, 2012.

- PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. S.; GOMES, A. C. M. M.; FLACÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p.11-16, 2004.
- PRATISSOLI, D.; LIMA, V. L. S.; PIROVANI, V. D.; LIMA, W. L. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on tomato in the Espírito Santo state. **Horticultura Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 101-105, 2015.
- QUE, Q.; ELUMALAI, S.; LI, X.; ZHONG, H.; NALAPALLI, S.; SCHWEINER, M.; FEI, X.; NUCCIO, M.; KELLIHER, X.; GU, W.; CHEN, Z.; CHILTON, M-D. M. Maize transformation technology development for commercial event generation. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 379. 2014.
- RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B.; SOUZA, E. A.; GONÇALVES, F. M.; SOUZA, J. C. **Genética na agropecuária**. 5. Ed. Lavras: Ed. UFLA, 2012. 566p.
- REIGADA, C.; GUIMARÃES, K. F.; PARRA, J. R. P. Relative Fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on Seven Host Plants: A Perspective for IPM in Brazil. **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2015.
- RESENDE, D. C.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; DUARTE, J. D. O.; SANTOS, F. A. Adoção da área de refúgio e manejo de resistência de insetos em milho Bt. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n. 1, p. 119-128. 2014.
- ROBERTSON, L.; RODRIGUEZ, E. P.; LANGE, A. B. The Neural and Peptidergic Control of Gut Contraction in *Locusta migratoria*: The Effect of an FGLa/AST. **Journal of Experimental Biology**, v. 215, n. 19, p. 3394–3402. 2012.
- ROSA, A. P. A. D. A.; TRECHA, C. O.; ALVES, A. C.; GARCIA, L.; GONÇALVES, V. P. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) em linhagens de milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 39-45, 2012.
- SALVADORI, J. R.; PEREIRA, P. R. V. da; SPECHT, A. *Helicoverpa armigera* no Sul. **Revista Cultivar**, v.15, n. 176, p. 22-23, 2013.
- SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 283-300, 2011.
- SELVAPANDIYAN, A.; ARORA, N.; RAJAGOPAL, R.; JALALI, S. K.; VENKATESAN, T.; SINGH, S. P.; BHATNAGAR, R. K. Toxicity analysis of N- and C-terminus deleted vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5855–5858, 2001.

SENAVE. Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas. **Asunción: Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola**, 2013. Disponível em: <<http://www.abc.com.py/edicionimpresa/economia/senave-en-alerta-trasingreso-de-peligrosa/plagaagricola-629240.html>>. Acesso em: 15 março de 2018.

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

SINGH, D.; HAICOUR, R.; SIHACHAKR, D.; RAJAM, M. V. Expression of rice chitinase gene in transgenic eggplant confers resistance to fungal wilts. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 233-240. 2015.

SONG, J.; BRADEEN, J. M.; NAESS, S. K.; HELGESON, J. P.; JIANG, J. BIBAC and TAC clones containing potato genomic DNA fragments larger than 100kb are not stable in *Agrobacterium*. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 107, n. 5, p. 958–964. 2003.

STANISÇUASKI, F.; CARLINI, C. R. Plant ureases and related peptides: Understanding their entomotoxic properties. **Toxins**, v. 4, p. 55–67, 2012.

STANISÇUASKI, F.; BRUGGE, V.; CARLINI, C. R.; ORCHARD, I. In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. **Journal Insect Physiology**, v. 55, p. 255–263, 2009.

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C. T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C. R. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, p. 753–760, 2005.

STANISÇUASKI, F.; TE BRUGGE, V.; CARLINI, C. R.; ORCHARD, I. Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 1078–1086, 2010.

STARK, J. D.; BANKS, J. E. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 505-519, 2003.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031- 1038, 2010.

SULLIVAN, M.; MOLET, T. CPHST. Pest Datasheet for *Helicoverpa armigera*. USDA-APHIS-PPQ-CPHST. **Revised April**, p. 1-17, 2014.

SUMNER, J. B. The isolation and crystalization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, p. 435-441, 1926.

SUN, Y.; ZHANG, X.; WU, C.; HE, Y.; MA, Y.; HOU, H.; GUO, X. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase. **Molecular Plant**, v. 9, p. 628–631, 2016.

SUZANA, C. S.; DAMIANI, R.; FORTUNA, L. S.; SALVADORI, J. R. Desempenho de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes fontes alimentares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 4, p. 480-485, 2015.

SVITASHEV, S.; YOUNG, J. K.; SCHWARTZ, C.; GAO, H.; FALCO, S. C.; AND CIGAN, A. M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using cas9 and guide RNA. **Plant Physiology**, v. 169, p. 931–945, 2015.

TAMURA, K.; KAWABAYASHI, T.; SHIKANAI, T.; HARA-NISHIMURA, I. Decreased Expression of a Gene Caused by a T-DNA Insertion in an Adjacent Gene in Arabidopsis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, e0147911. 2016.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 11, 2013.

TEODORO, A.V.; SILVA, S. S.; PASSOS, E. M. dos; SANTOS, J. M. NEGRISOLI-JUNIOR, A. S.; GUZZO, E. C. **Biologia e reconhecimento das principais lagartas-praga do milho de ocorrência no agreste e zona da mata de Alagoas, Bahia e Sergipe**. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico 173, 8 p., 2015.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; SETTEMBRINI, B. P.; CARLINI, C. R.; AYUB, M. A. Z. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 821-827, 2007.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/ Embrapa-CNPQ, 1999.

WAQUIL, J. M. **Manejo fitossanitário e ambiental: milho transgênico Bt e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho**. VIII Seminário Nacional de Milho Safrinha, Sete Lagoas, 2007.

WENG, H.; PAN, A.; YANG, L.; ZHANG, C.; LIU, Z.; DABING ZHANG, D. Estimating number of transgene copies in transgenic rapeseed by real-time pcr assay with *HMG I/Y* as an endogenous reference gene. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 22, p. 289–300, 2004.

WU, E.; LENDERTS, B.; GLASSMAN, K.; BEREZOWSKA-KANIEWSKA, M.; CHRISTENSEN, H. Optimized Agrobacterium-mediated sorghum transformation protocol and molecular data of transgenic sorghum plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v. 50, n. 1, p. 9–18, 2014.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; WEI, P.; ZHANG, B.; GOU, F.; FENG, Z.; MAO, Y. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. **Plant Biotechnology Journal**, v. 12, p. 797–807, 2014.

ZHU, J. J.; SONG, N.; SUN, S. L.; YANG, W. L.; ZHAO, H. M.; SONG, W. B. Efficiency and inheritance of targeted mutagenesis in maize using CRISPR-Cas9. **Journal of Genetic and Genomics**, v. 43, p. 25-36, 2016.

APÊNDICES

Apêndice I - Relação das avaliações realizadas nas plantas dos diferentes eventos em cada geração

Gerações	Avaliações	Nº	Nº Eventos	Eventos
T0	Plantas regeneradas (Aclimatizadas)	68	24	P4; P7, 8 e 9; P10 e 11; P12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; P21, 22, 23 e 130; P24, 25, 26, 27, 43, 44, 47, 48, 49, 50, 92, 93 e 95; P28 e 29; P30; P31; P32, 33, 34 e 77; P35, 36 e 53; P37, 38 e 39; P40 e 41; P50 e 52; P75 e 76; P85, 87 e 88; P102 e 104; P106; P107; P115 e 123; P118 e 119; P128; P129; P131, 132 e 133.
	Plantas PCR positivas	57	24	P4; P7 e 8; P10; P12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20; P21, 22 e 130; P24, 25, 26, 27, 47, 48, 49, 50, 92, 93 e 95; P28 e 29; P30; P31; P32, 33 e 77; P35, 36 e 53; P39; P40 e 41; P52; P75; P85, 87 e 88; P102; P106; P107; P115 e 123; P118 e 119; P128; P129; P131, 132 e 133.
	N sementes	644	15	P7 e 8; P10; P12, 13 e 20; P22; P25; P28 e 29; P30; P32; P35; P40; P52; P75; P85 e 88; P102; P115
T1	Plantas PCR positivas	172	12	P7 e 8; P13 e 20; P22; P25; P28; P30; P32; P35; P40; P75; P88; P102
	RT-qPCR	153	9	P7 e 8; P13 e 20; P28; P30; P35; P40; P75; P88; P102.
	Nº sementes	241	9	
T2	Plantas PCR positivas	119	8	P7 e 8; P13; P28; P30; P35; P40; P75; P88.
	RT-qPCR	116	8	
	Plantas bioensaio <i>Spodoptera frugiperda</i>	16	3	P7 e 8; P28; P75.
	Nº sementes	1145	3	

Nota: eventos estão separados por ponto e vírgula (;)