

CARACTERIZAÇÃO PROTEOLÍTICA DO CONTEÚDO DO MESÊNTERO E  
SUSCETIBILIDADE DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À  
TOXINA CRY1Ac

por

REBEKA DA COSTA ALVES

(Sob Orientação do Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE)

RESUMO

A broca da cana-de-açúcar ou broca da cabeça amarela *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae), tem predominado nos canaviais nordestinos do Brasil nos últimos anos. Além do uso de parasitoides, é necessário buscar por novos métodos de controle que sejam eficazes e ecologicamente corretos. Atualmente as plantas transgênicas têm obtido grande destaque no cenário agrícola mundial, e é considerada uma alternativa viável e ambientalmente adequada para o controle de insetos, tanto as modificadas por genes de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) que expressam proteínas Cry, quanto as modificadas por genes de plantas que expressam inibidores de proteinases. A caracterização bioquímica de proteases digestivas de *D. flavipennella* é fundamental para avaliar sua suscetibilidade frente a toxinas Cry e inibidores. A toxicidade da proteína Cry1Ac sobre as brocas da cana *D. flavipennella* e *D. saccharalis* (Fabr.) e as atividades das proteinases do intestino de *D. flavipennella* em diferentes pHs, temperaturas e inibidores foram testadas, além da atividade proteolítica das mesmas sobre Cry1Ac *in vitro*. No teste de toxicidade de Cry1Ac, o valor da CL<sub>50</sub> para a população de *D. flavipennella* foi de 2.26 ng/cm<sup>2</sup>, enquanto para a população de *D. saccharalis* foi de 843,14 ng/cm<sup>2</sup>, mostrando-se 373 vezes mais tóxico para *D. flavipennella* do que para *D.*

*saccharalis*. Os resultados de caracterização proteolítica indicaram que as principais enzimas do tubo digestivo de *D. flavipennella* são as serino proteases do tipo tripsina, quimiotripsina e elastase, que atuam num pH ideal entre 9-10 e em temperatura ótima de 50°C. Os resultados da interação das proteases digestivas de *D. flavipennella* com a toxina Cry1Ac sugerem que as enzimas presentes no tubo digestivo podem atuar na ativação da toxina, mas não processam a toxina quando ativada. A toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* apresenta potencial para o desenvolvimento de plantas que expressem este gene para o controle de *D. flavipennella*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Plantas transgênicas, proteases digestivas, broca da cana-de-açúcar, toxina *Bt*, inibidor de proteases.

PROTEOLYTIC CHARACTERIZATION OF THE MIDGUT CONTENT AND  
SUSCEPTIBILITY OF *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) TO  
CRY1Ac TOXIN

by

REBEKA DA COSTA ALVES

(Under the direction of Professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira)

ABSTRACT

The yellow head sugarcane borer *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae) has prevailed in the sugarcane crops from northeastern Brazil in recent years. Besides the use of parasitoids, it is necessary to seek for new control methods that are effective and environmentally friendly. Currently, transgenic plants have achieved great prominence in the world agricultural scenario and are considered a viable and environmentally sound alternative for the control of insects, either modified by *Bacillus thuringiensis* (Berliner) genes expressing Cry proteins, or by plant genes expressing proteinases inhibitors. The biochemical characterization of digestive proteases from *D. flavipennella* is essential to assess their susceptibility to Cry toxins and inhibitors. The toxicity of Cry1Ac protein on the sugarcane borers *D. flavipennella* and *D. saccharalis* (Fabr.) and the activity of gut proteinases *D. flavipennella* in different pH, temperature and inhibitors were assessed in addition to the *in vitro* proteolytic activity towards the Cry1Ac toxin. In Cry1Ac toxicity test, the LC<sub>50</sub> value for the population of *D. flavipennella* was 2.26 ng/cm<sup>2</sup>, while the population of *D. saccharalis* was 843.14 ng/cm<sup>2</sup>, resulting in 373 times more toxic to *D. flavipennella* than to *D. saccharalis*. The results of the characterization indicated that the major proteolytic enzymes of the digestive tract

of *D. flavipennella* are the serine proteases trypsin, chymotrypsin and elastase, which act in an optimum pH of 9-10 and an optimum temperature of 50°C. The results from the interaction of *D. flavipennella* digestive proteases with the Cry1Ac toxin suggest that the enzymes present in its digestive tract may act on the activation the toxin, but did not process the active toxin. The *B. thuringiensis* Cry1Ac toxin shows potential as Cry1Ac-transformed plants expressing this gene to control the *D. flavipennella*.

**KEY WORDS:** Transgenic plants, digestive proteases, sugarcane borer, toxin *Bt*, protease inhibitor.

CARACTERIZAÇÃO PROTEOLÍTICA DO CONTEÚDO DO MESÊNTERO E  
SUSCETIBILIDADE DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À  
TOXINA CRY1Ac

por

REBEKA DA COSTA ALVES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau  
de Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2015

CARACTERIZAÇÃO PROTEOLÍTICA DO CONTEÚDO DO MESÊNTERO E  
SUSCETIBILIDADE DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À  
TOXINA CRY1Ac

por

REBEKA DA COSTA ALVES

Comitê de Orientação:

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

CARACTERIZAÇÃO PROTEOLÍTICA DO CONTEÚDO DO MESÊNTERO E  
SUSCETIBILIDADE DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À  
TOXINA CRY1Ac

por

REBEKA DA COSTA ALVES

Orientador: \_\_\_\_\_  
Herbert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Edmilson Jacinto Marques – UFRPE

\_\_\_\_\_  
Lílian Maria da Solidade Ribeiro – PDJ/CNPq

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo Milagre da Vida.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) que contribuiu para realização deste curso.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Herbert Álvaro Abreu de Siqueira, pela orientação.

Ao professor Edmilson Jacinto Marques pela co-orientação, todo seu apoio e confiança.

Ao professor Jorge Braz Torres, pelo auxílio na compra de material para experimento, e pelos seus ensinamentos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da UFRPE, pela contribuição na minha formação profissional.

À minha família, minha base e socorro para tudo.

Ao meu amigo, companheiro e namorado Anderson Machado, pela força e ajuda imensurável.

A Liliane Marques pela amizade, por todos os seus ensinamentos e colaboração.

A Andresa Batista pela contribuição para realização dos experimentos.

Aos amigos de laboratório Ana Paula Fonseca, Cinthia Matias, Flávia Araújo e Paulo Geovane pelo apoio e momentos de almoço, descontração e confraternizações.

Aos Amigos de turma, Lucas Souza, Rodrigo Silva, Nayara Cristina, Ana Caroline, Carolina Guedes, Vitor Zuim, Leandro Lemos, Paulo Roberto, Glaucilane Santos, Cristina Gómez, Sérgio Alves, Fabiana Cariri, Cristiane Silva e João Paulo.



A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	viii
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO .....	01
LITERATURA CITADA.....	07
2 CARACTERIZAÇÃO PROTEOLÍTICA DO CONTEÚDO DO MESÊNTERO E SUSCETIBILIDADE DE <i>Diatraea flavipennella</i> (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À TOXINA CRY1Ac .....	12
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO .....	15
MATERIAL E MÉTODOS .....	17
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO .....	22
AGRADECIMENTOS.....	26
LITERATURA CITADA.....	26

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Introduzida no Brasil desde 1502, o cultivo da cana-de-açúcar é considerado de grande importância no âmbito socioeconômico, devido a sua matéria prima na produção de alimento e biocombustível (Mendonça 1996). Hoje o Brasil se apresenta como maior produtor de cana-de-açúcar do mundo seguido da Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Colômbia, Filipinas e Indonésia (FAOSTAT 2015).

Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2015), a safra de 2014/2015 está estimada em aproximadamente 642 milhões de toneladas, das quais 281 milhões de toneladas serão destinadas para a fabricação de açúcar e 361 milhões de toneladas para a produção de etanol. Serão produzidos aproximadamente 36,36 milhões de toneladas de açúcar e 28,66 bilhões de litros de etanol.

Um dos fatores que limita a produtividade da cana-de-açúcar é a ocorrência de pragas. Entre elas, as de maior importância nos canaviais do Nordeste estão a broca gigante *Telchin (Castnia) licus licus* (Drury), a cigarrinha da raiz *Mahanarva fimbriolata*, a cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal.), e as brocas *Diatraea* spp. (Mendonça 1996, Marques *et al.* 2008).

A espécie *Diatraea flavipennella* (Box), conhecida como broca da cabeça amarela, é considerada uma das principais pragas da cana-de-açúcar do nordeste brasileiro (Garcia 2013), que provoca injúrias na cana semelhantes aos causados por *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Freitas *et al.* 2007). Enquanto *D. saccharalis* se encontra distribuída em todo Brasil, *D. flavipennella* é restrita aos estados de Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, e no Norte e Nordeste do país (Mendonça *et al.* 1996, Pinto 2006).

As larvas de *D. flavipennella* e *D. saccharalis* provocam injúrias diretas devido ao seu hábito de broquear a cana jovem, provocando falhas na germinação causando a morte da gema apical, sintoma conhecido como “coração morto”. Quando a injúria ocorre na cana adulta provoca brotações laterais, enraizamento aéreo, atrofiamento dos entrenós e tombamento dos colmos brocados, reduzindo assim, a produção agrícola e industrial (Mendonça 1996). Também são consideráveis as injúrias indiretas, pois ao penetrar no colmo, as larvas formam galerias por onde penetram fungos que causam a podridão vermelha – *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon). Estes fungos invertem a sacarose, diminuindo a pureza do caldo e o rendimento em açúcar, contribuindo para queda no rendimento industrial (Botelho & Macedo 2002, Gallo *et al.* 2002).

Levantamentos populacionais das espécies de *Diatraea spp.* realizados no estado de Pernambuco, no período de 1973 até 1986, mostraram um aumento na incidência da espécie *D. flavipennella* sobre *D. saccharalis* (IAA - PLANALSUCAR/CONOR 1973-1986). Em canaviais de Alagoas, Freitas *et al.* (2006), verificaram a predominância de *D. flavipennella* acima de 97%, em relação a *D. saccharalis*, e em canaviais de Pernambuco, Silva (2013) também verificou predominância da *D. flavipennella* de 99,15% sobre *D. saccharalis*. Com esses dados observa-se a grande importância do estudo desta praga, que devido a escassez de informações na literatura, produtores e agricultores podem tratá-la como sendo uma única espécie.

O manejo integrado das *Diatraea spp.* vem sendo realizado, utilizando-se principalmente o controle biológico, sendo o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam), o mais utilizado como método de controle no Brasil e no mundo (Pinto *et al.* 2006) feito através de liberações inoculativas do parasitoide. O sucesso do controle depende do parasitoide encontrar uma planta infestada e, posteriormente, localizar o hospedeiro, que está no interior do colmo da planta (Potting *et al.* 1997). Porém, com a grande expansão da área plantada da cultura, faz-se necessário um grande

número de inimigos naturais a serem produzidos em laboratórios e liberados em campo, além de mão-de-obra especializada para a produção em massa e monitoramento das populações nas grandes áreas afetadas (Gitahy *et al.* 2006).

A utilização de inseticidas sintéticos para o controle da broca da cana-de-açúcar não é recomendada devido a forma de aplicação destes na lavoura, que torna difícil sua penetração no interior dos colmos onde as larvas provocam os maiores prejuízos, além dos danos ambientais provocados por eles (Gitahy *et al.* 2006).

Devido a essas restrições e a necessidade de alternativas seguras, tem ocorrido um aumento no interesse de outros agentes biológicos, como a utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para a produção de plantas geneticamente modificadas, através da introdução dos seus genes, codificadores das toxinas nos genomas dos vegetais, permitindo a expressão contínua das proteínas em todos os tecidos da planta (de Maagd *et al.* 1999, Gitahy *et al.* 2006), atingindo assim as larvas de *Diatraea* as quais se encontram no interior dos colmos durante a maior parte de seu desenvolvimento larval.

*B. thuringiensis* é uma bactéria gram-positiva, aeróbica facultativa, mesófila e quimioheterotrófica (Arantes *et al.* 2002). Encontrada naturalmente no solo, plantas, produtos estocados, insetos mortos e vivos (Villas-Bôas *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 2004). Possui forma de bastonete, e é capaz de se movimentar devido à presença de flagelos peritríquios (Habib & Andrade 1998, Bobrowski *et al.* 2003). Quando em condições ambientais desfavoráveis, a divisão celular de *B. thuringiensis* é interrompida e inicia-se o ciclo de esporulação típico dos bacilos, gerando esporos. Simultaneamente ao processo de esporulação, ocorre a produção de uma inclusão cristalina, formada por polipeptídios denominados de  $\delta$ -endotoxina ou proteínas Cry, que são característicos de cada variedade de *B. thuringiensis*, e apresentam atividade inseticida a larvas de

Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e outros insetos (Feitelson *et al.* 1992, Souza *et al.* 1999, de Maagd *et al.* 2003).

As  $\delta$ -endotoxinas tornam-se tóxicas a insetos, após sua ingestão e solubilização, no intestino médio das larvas (Bravo 1997), onde os cristais são dissolvidos em meio levemente ácido (ex., Coleopteros) ou alcalino (ex., Lepidopteros) e as protoxinas são liberadas. Proteases digestivas presentes no intestino dos insetos têm nesta etapa participação fundamental para ativação destas protoxinas, produzindo uma proteína ativada de menor tamanho (de Maagd *et al.* 2001). Depois de ser ativada pelas proteases, a toxina atravessa a matriz peritrófica e liga-se a receptores específicos presentes nas microvilosidades apicais das células epiteliais do intestino médio (Schnepf *et al.* 1998). Após ligação com o receptor, este permite a toxina se inserir na membrana e formar poros que interferem no transporte de íons pela membrana das células, causando a lise do epitélio do intestino médio, interrompendo a osmoregularidade das células, e neutralizando o pH do lúmen, o que favorece a germinação dos esporos de *Bt*, finalizando com um quadro de septicemia e morte do inseto (Schnepf *et al.* 1998).

Atualmente, mais de 700 genes de proteínas Cry foram sequenciados e classificados em 73 grupos (*cry* 1- *cry* 73) nos últimos anos, a partir de diferentes cepas de *B. thuringiensis* (Crickmore *et al.* 2015). Para o controle de pragas da ordem Lepidoptera, as classes de proteínas Cry1 e Cry2 têm sido usadas tanto em inseticidas biológicos quanto nas plantas transgênicas (Schnepf *et al.* 1998, Ferré *et al.* 2008).

As plantas transgênicas se apresentam como uma alternativa viável e ambientalmente adequada para o controle de insetos. (Castelhana 2014). Várias cultivares de milho-*Bt* são plantadas em todo o mundo e a maioria delas expressam a proteína Cry1Ab para o controle da *D. saccharalis*, Cry1Fa para o controle de *Spodoptera* spp. (Ferré *et al.* 2008), e Cry1Ac para *Helicoverpa virescens* (Fabr.) e *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Christou *et al.* 2006). A primeira

geração de cana-de-açúcar transgênica para o controle de *D. saccharalis* utilizou a toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* como proteína inseticida, e mostrou atividade larvicida significativa (Arencibia *et al.* 1997). Pesquisas desenvolvidas na COPERSUCAR modificaram geneticamente algumas plantas de cana-de-açúcar expressando o gene *cry1Ab* para o controle de *D. saccharalis* (Braga 2001), e nos testes de campo obtiveram sucesso (Braga *et al.* 2003). Atualmente o estudo da cana-de-açúcar geneticamente modificada é regulado através de algumas condições estabelecidas pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, porém algumas etapas ainda precisam ser vencidas até que o produto chegue ao mercado (Nova cana 2015).

Além do uso das  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, alternativa para a obtenção de plantas transgênicas é a utilização de produtos do metabolismo vegetal, uma vez que os vegetais apresentam alguns mecanismos naturais de defesa como a produção de proteínas, que tem como alvo o sistema digestivo de seus predadores. Estas proteínas podem inibir enzimas fundamentais na digestão dos insetos (Lopes 1999). Mickel e Standish (1947) ao observar lagartas de *Tribolium castaneum* (H.) com um desenvolvimento anormal em produtos da soja propôs a possibilidade de atuação de inibidores de peptidases como uma defesa da planta ao ataque daquele inseto. A partir disso foram realizados alguns trabalhos investigando a possibilidade para outros insetos (Green & Ryan 1972; Lipke *et al.* 1954; Steffens *et al.* 1978).

Os inibidores de proteases são proteínas ou pequenos polipeptídeos que podem interferir na digestão dos alimentos no intestino do inseto suficientemente para controlá-los (Gholamzadeh *et al.* 2013). Estes inibidores podem se ligar a proteases digestivas do inseto prejudicando sua digestão e retardando o crescimento e desenvolvimento larval em algumas espécies de insetos, incluindo Lepidoptera (Gatehouse *et al.* 2000).

Proteases digestivas são enzimas muito importantes no canal alimentar dos insetos que exercem papel fundamental no processo de quebra das moléculas dos alimentos, em moléculas

menores. Elas clivam as ligações peptídicas das proteínas para liberar os aminoácidos que serão absorvidos pelas células do epitélio do intestino médio do inseto. (Gholamzadeh *et al.* 2013, Terra & Ferreira 2009). As proteases estão divididas em dois grupos: as endopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas internas e estão subdivididas em serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartato-proteases e malato-proteases; e as exopeptidases quando hidrolisam aminoácidos nas extremidades, que estão subdivididas em aminopeptidases e as carboxipeptidases (Terra & Ferreira 1994).

Dentre as enzimas que se encontram nos lepidópteros, as serino proteases são responsáveis por 95% da atividade digestiva total (Srinivasan *et al.* 2006; Terra & Ferreira 1994). Serino proteases são proteinases que possuem uma serina e uma histidina em seu sítio alvo (Castelhana 2014). Entre elas, as tripsinas, quimiotripsinas e elastases são responsáveis pela digestão inicial de proteínas no intestino de animais superiores (Garcia-Olmedo *et al.* 1987), como também participam no processo digestivo dos insetos, encontrando-se bem distribuídas (Castelhana 2014). Estes três tipos de serino proteases são diferenciadas com base em sua especificidade.

As tripsinas são serino proteases que clivam os polipeptídeos na porção carboxílica dos aminoácidos básicos como lisina e arginina. São proteases comuns à maioria dos insetos e de fundamental importância para a digestão inicial de proteínas. Apresentam massa molecular entre 20kDa e 35kDa e pH ótimo entre 8 e 10 (Terra & Ferreira 1994). Quimiotripsinas são serino proteases que clivam polipeptídeos na extremidade carboxílica de aminoácidos aromático (Castelhana 2014). Em geral, apresentam massa molecular entre 20 kDa e 30kDa, e pH ótimo entre 8 e 10 e são bastante instáveis em pH ácido (Terra & Ferreira 1994). Elastases são serino proteases que clivam em sítios com aminoácidos neutros como alanina e glicina (Ryan 1990).

Além de desempenharem papéis importantes no crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos, observa-se que as proteases digestivas têm participação fundamental no modo de ação



das toxinas de *Bt*, sendo o seu conhecimento de grande relevância, pois qualquer mudança na fisiologia do inseto que afete alguma etapa do seu modo de ação pode evitar a toxicidade de *Bt* e/ou levar ao desenvolvimento de populações resistentes. Diante disto e da importância agrícola de *D. flavipennella*, considerando que esta espécie não apresenta nenhum trabalho ao nível bioquímico, os estudos da caracterização e identificação dos tipos de proteases digestivas de *D. flavipennella* mostram-se fundamental para o desenvolvimento de novos métodos de controle, por exemplo as canas *Bt*, e estudo da sua fisiologia. Portanto, o objetivo deste trabalho foi apresentar propriedades bioquímicas das proteases digestivas de *D. flavipennella*, os efeitos de inibidores sobre a atividade das enzimas, avaliar os efeitos da toxina Cry1Ac, comparando este com o efeito em *D. saccharalis*, e avaliar *in vitro* se há processamento proteolítico da toxina ativa depois da interação com proteínas do tubo digestivo de *D. flavipennella*.

### Literatura Citada

- Arantes, O.M.N., L.A. Villas-Bôas & G.T. Villas-Bôas. 2002.** *Bacillus thuringiensis* estratégias no controle biológico, p. 271-291. In L.A. Serafini, N.M. Barros & J.L. Azevedo (eds.), Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul, EDUCS, 433p.
- Arencibia, A., R.I. Vázquez, D. Prieto, P. Téllez, E.R. Carmona, A. Coego, L. Hernández, G. De lariva & G. Selman-Housein. 1997.** Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. *Mol. Breed.* 3: 247-255.
- Bobrowski, V.L., L.M. Fiuza, G. Pasquali & M.H. Bodanese-Zanettini. 2003.** Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. *Ciência Rural.* 33: 843-850.
- Botelho, P.S.M. & N. Macedo. 2002.** *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*, p. 477-494. In J.R.P Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole, 635p.
- Braga, D.P.V., E.D.B. Arrigoni, M.C. Filho & E.C. Ulian. 2003.** Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. New Seeds Missouri* 5: 209-221.

- Braga, D.V.P. 2001.** Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína CryIa (B) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Dissertação de Mestrado, ESALQ, Piracicaba, SP. 71p
- Bravo, A. 1997.** Phylogenetic Relationships of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793–2801
- Castelhana, E.C. 2014.** Efeito dos inibidores de peptidase de soja no padrão de expressão e atividade enzimática intestinal de lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 91p
- Christou, P., T. Capell, A. Kohli, J.A. Gatehouse & A.M.R. Gatehouse. 2006.** Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Pl. Sci.* 11: 302-308.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). 2015.** Levantamento de safra da cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>. Acesso em 30/01/2015.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, A. Bravo & D.H. Dean. 2015.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Disponível em: [http://www.lifesci.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/](http://www.lifesci.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/). Acesso em 12/01/2015.
- De Maagd, R.A., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore & H.E. Schnepf. 2003.** Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-433.
- De Maagd, R.A., A. Bravo & N. Crickmore. 2001.** How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17:193-199.
- De Maagd, R.A., D. Bosch & W. Stiekema. 1999.** *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. *Trends Pl. Sci.* 4: 9-13.
- FAOSTAT. 2015.** Sugar cane production. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 12/01/2015.
- Feitelson, J.S., J. Payne & L. Kim. 1992.** *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Nat. Biotechnol.* 10: 271-275.
- Ferré, J., J. Van Rie & S.C. Macintosh. 2008.** Insecticidal genetically modified crops and insect resistance management (IRM), p. 41–85. In J. Romeis, A. M. Shelton, and G. G. Kennedy (ed.), *Integration of insect resistant genetically modified crops within IPM programs*. Springer Science and Business Media, Dordrecht, The Netherlands.

- Freitas, M.R.T., E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.P.P. Fonseca, A.L. Mendonça, J.S. Santos, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'ana. 2007.** The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Fl. Entomol. 90: 309-313.
- Freitas, M.R.T., A.P.P. Fonseca, E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.L. Mendonça, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'Ana. 2006.** The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the State of Alagoas, Brazil. Fl. Entomol. 89: 539-540.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E. BertiFilho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Garcia, J.F. 2013.** Manual de identificação de pragas da cana. Campinas SP. 220p.
- García-Olmedo, F., G. Salcedo, R. Sánchez-Monge, J. Royo & P. Carbonero. 1987.** Plant proteinaceous, inhibitors of proteinases and  $\alpha$ -amylases. In: Miflin, B. (ed.) Oxford surveys of plant molecular and cell biology. Oxford University Press. 4: 275-334.
- Gatehouse J.A., A.M.R. Gatehouse & D.P. Brown. 2000.** Control of phytophagous insect pests using serine proteinase inhibitors. In: Michaud D. (ed.): Recombinant protease inhibitors in plants. Landes Bioscience, Texas: 9–26.
- Gholamzadeh Chitgar M., M. Ghadamyari & M. Sharifi. 2013.** Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). Pl. Protect. Sci. 49: 19–26.
- Gitahy, P.M., P.G. Galvao, J.L.S. Araujo & J.I. Baldani. 2006.** Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de açúcar *Diatraea saccharalis*. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 44p.
- Green, T.R. & Ryan, C.A. 1972.** Wound induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. Science, Washington D.C. 175: 776-777.
- Habib, M.E.M. & C.E.S. Andrade. 1998.** Bactérias entomopatogênicas, p. 383-446. In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, 1163p.
- IAA - PLANALSUCAR/CONOR (Programa Nacional de Melhoramento de Cana-de-açúcar/ Coordenadoria Regional Norte). 1973-1986.** Entomologia. In Relatórios anais. Carpina, PE.
- Lipke, H., Fraenkel, G.S., Liener & I.E. Growth 1954.** Inhibitors: effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium Confusum*. Agric. Food Chem. 2: 410-414.
- Lopes, A.R. 1999.** Caracterização das tripsinas de insetos. 98p. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo - UNIFESP, Instituto de Química, São Paulo.

- Marques, E.J., R.O.R. Lima, R.M. Andrade & J.M. Araújo Jr. 2008.** Controle biológico das brocas. *Diatraea* spp, *Telchin licus licus* e cigarrinhas *Mahanarva* spp em cana-de-açúcar, p. 95-111. In: M. Vezon, T.J. Paula Jr. & A. Pallini (orgs.), Avanços no controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa, EPAMIG, 283p.
- Mendonça, A.F. 1996.** Guia das principais pragas da cana-de-açúcar, p. 3-48. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.
- Mendonça, A.F., A.S. Seregatte, F.A. Moraes & W.H. Oliveira. 1996.** Manejo integrado da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lep.: Pyralidae) na Agroserra, Maranhão, Brasil, p. 219-225. In A. F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 200p.
- Mickel, C.E. & J. Standish 1947.** Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin. 178: 1-20. In P.K. Lawrence & K.R. Koundal. 2002 Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Eletronic J. biotechnol., Valparaíso, 5. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/fbpe/img/ejb/v5n1/03/3.pdf>>.
- Nova Cana 2015** Disponível em: <http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/ctnbio-cana-geneticamente-modificada-240914/> e <http://www.novacana.com/n/cana/variedades/brasileiros-criam-primeira-cana-transgenica-resistente-broca-280114/> Acesso em 02/03/2015.
- Pinto, A.S. 2006.** Controle de pragas da cana-de-açúcar. Sertãozinho, Biocontrol, 64p.
- Pinto, A.S., J.F. Garcia & P.S.M. Botelho. 2006.** Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (Org.). Controle biológico de pragas: na prática. Piracicaba, FEALQ, 287p.
- Potting, R.P.J., H. Otten & L.E.M. Vet. 1997.** Absence of odour learning in the stembores parasitoid *Cotesia flavipes*. Anim. Behav. 53: 1211-1223.
- Ryan, C.A. 1990.** Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 425-449.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rien, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler & D.H. Dean. 1998.** *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.
- Silva, C.C.M. 2013.** Associação de *Cotesia flavipes* (cam.) com *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. e *Beauveria bassiana* (bals.) vuill no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella* (box) (Lepidoptera: Crambidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 51p.

- Souza, M.T., M.I. Lima, J.O. Silva-Werneck, J.C.S. Dias & B.M. Ribeiro. 1999.** Ultrastructural and molecular characterization of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* S93 active against *Spodoptera frugiperda*. *Biocell* 23: 43-49.
- Srinivasan, A., A.P. Giri & V.S. Gupta. 2006.** Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cell. Mol. Biol. Lett. Wroclaw.* 11:132-154.
- Steffens, R., F.R. Fox & B. Kassel. 1978.** Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *J. Agric. Food Chem. Washington.* 26: 170-174.
- Suzuki, M.T., D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 2004.** Fate of *Bacillus thuringiensis* strains in different insect larvae. *Can. J. Microbiol.* 50: 973-975.
- Vilas-Bôas, G.F.L.T, L.A. Vilas-Bôas, D. Lereclus & O.M.N. Arantes. 1998.** *Bacillus thuringiensis* conjugation under environmental conditions. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 369-374.
- Terra, W.R. & C. Ferreira. 2009.** Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos. In: Panizzi, A.R.; Parra, J.R.P. *Bioecologia e nutrição de insetos.* Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 4: 175-209.
- Terra, W.R. & C. Ferreira. 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol. New York.* 109B: 1-62.

## CAPÍTULO 2

# CARACTERIZAÇÃO PROTEOLÍTICA DO CONTEÚDO DO MESÊNTERO E SUSCETIBILIDADE DE *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) À TOXINA CRY1Ac<sup>1</sup>

REBEKA DA C. ALVES<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Departamento de Agronomia - Entomologia, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos,  
52171-900 Recife, PE, Brasil.

---

<sup>1</sup>Alves, R. C. Atividade da toxina Cry1Ac a *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) e caracterização do lúmen intestinal. A ser submetido.

RESUMO – O uso de plantas transgênicas vem sendo utilizado com sucesso no controle de vários insetos praga, sendo uma estratégia inovadora para o controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella* (Box). Para isto, o estudo sobre sua suscetibilidade a toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), e sobre suas atividades intestinais faz-se necessário. A toxina Cry1Ac de *Bt* foi avaliada quanto a sua atividade inseticida contra *D. flavipennella* e *D. saccharalis* (Fabr.). Além disto, a atividade de proteinases do tubo digestivo de *D. flavipennella* e atividade proteolítica das mesmas sobre Cry1Ac foi testada *in vitro* em diferentes intervalos de tempo. No teste de toxicidade de Cry1Ac, o valor da CL<sub>50</sub> para a população de *D. flavipennella* foi de 2.26 ng/cm<sup>2</sup> de dieta, enquanto para a população de *D. saccharalis* foi de 843,14 ng/cm<sup>2</sup>, mostrando-se 373 vezes mais tóxico para *D. flavipennella* do que para *D. saccharalis*. Os resultados da atividade das proteinases indicaram que as principais enzimas do tubo digestivo de *D. flavipennella* são as serino proteases do tipo tripsina, quimiotripsina e elastase, que atuam num pH ideal entre 9-10, e numa temperatura ótima de 50°C. Dos resultados da interação das proteases digestivas de *D. flavipennella* com a toxina Cry1Ac, as proteases presentes no tubo digestivo atuaram na sua extra ativação, e não degradaram a toxina. Os resultados deste trabalho demonstram que a toxina *Bt* apresenta grande potencial para o desenvolvimento de plantas transgênicas expressando o gene *cry1Ac* para o controle de *D. flavipennella*.

PALAVRAS-CHAVE: Proteases digestivas, broca da cana-de-açúcar, proteína Cry, lepidoptera

PROTEOLYTIC CHARACTERIZATION OF THE MIDGUT CONTENT AND  
SUSCEPTIBILITY OF *Diatraea flavipennella* (BOX) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) THE  
TOXIN CRY1Ac

ABSTRACT – The use of transgenic plants has been used successfully in the control of various insect pests, and may also be an innovative strategy for the control of sugarcane borer *Diatraea flavipennella* (Box). For this, the study of their susceptibility to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis* (Berliner), and its proteolytic enzyme activities is necessary. The *Bt* Cry1Ac toxin was evaluated for its insecticidal activity against *D. flavipennella* and *D. saccharalis* (Fabr.). Moreover, the proteinase activity of the digestive content and *D. flavipennella* proteolytic activity towards Cry1Ac was tested *in vitro* in different time intervals. The LC<sub>50</sub> value of Cry1Ac for the population of *D. flavipennella* was 2.26 ng / cm<sup>2</sup> of diet surface, while the population of *D. saccharalis* was 843.14 ng / cm<sup>2</sup>, resulting in 373 times more toxic to *D. flavipennella* than to *D. saccharalis*. The results showed that proteinase activity key enzymes in the digestive tract *D. flavipennella* are the serine proteases trypsin, chymotrypsin and elastase that act on a pH optimum of 9-10 and a temperature optimum of 50 ° C. The results of the interaction of *D. flavipennella* digestive proteases with Cry1Ac toxin showed that proteases extra processed proteins present on the toxin preparation, preserving only a 62-65 kDa peptide (proteolytic resistant core), which did not degrade. The *B. thuringiensis* Cry1Ac toxin shows great potential as Cry1Ac-transformed plants expressing this gene to control the *D. flavipennella*.

KEY WORDS: Digestive proteases, sugarcane borer, Cry protein, Lepidoptera



## Introdução

A cultura da cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* (L.) é de grande importância econômica no Brasil por produzir alimentos e álcool combustível para a indústria automobilística e co-geração de energia (Silva 2013). Esta cultura abriga numerosas espécies de insetos, sendo que algumas delas, dependendo da época do ano e da região, podem ocasionar sérios prejuízos econômicos (Macedo & Botelho 1988, Marques *et al.* 2008). Dentre as pragas que infestam a cultura da cana-de-açúcar, as larvas do gênero *Diatraea* spp. estão entre as principais nas Américas. A *Diatraea flavipennella* (Box), conhecida como broca da cabeça amarela, provoca injúrias na cana-de-açúcar semelhantes aos causados por *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Freitas *et al.* 2007), revertendo em danos que influenciam principalmente na produtividade e qualidade da cana-de-açúcar (Sandoval & Senô 2010).

O Controle das *Diatraea* spp. vem sendo realizado, utilizando-se principalmente o controle biológico, sendo o parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam), o mais utilizado como método de controle no Brasil e no mundo (Pinto *et al.* 2006). Porém, com a expansão da área plantada da cultura, faz-se necessário um grande número de inimigos naturais a serem produzidos, além de mão-de-obra especializada (Gitahy *et al.* 2006). Devido a essas restrições e a necessidade de alternativas seguras, tem ocorrido um aumento no interesse de outros agentes biológicos, como a utilização de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) para a produção de plantas geneticamente modificadas (de Maagd *et al.* 1999, Gitahy *et al.* 2006).

A expressão de genes de toxinas inseticidas Cry de *B. thuringiensis* (*Bt*) em plantas transgênicas é atualmente uma estratégia significativa e muito utilizada contra os insetos praga (Lomate & Hivrale 2013). O desenvolvimento de canas de açúcar transgênicas que expressem genes de toxinas pode ser uma alternativa para o controle de *D. flavipennella*, uma vez que passa a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, dificultando o controle com inseticidas (Braga *et al.*

2003). Várias culturas-Bt encontram-se em plantios em todo mundo, como o milho-Bt que expressa o gene Cry1Ab para o controle da *D. saccharalis*, Cry1Ac para o controle de *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) e *Helicoverpa virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), e mais recentemente expressando Cry1Fa para o controle de *Spodoptera* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) (Ferré *et al.* 2008, Christou *et al.* 2006).

Além da expressão de genes de toxinas de *Bt*, genes de plantas que codificam inibidores enzimáticos também têm sido estudados com o objetivo de uso biotecnológico, incluindo o controle de insetos através da inibição de proteases digestivas. Trabalhos realizados com inibidores de peptidases de soja demonstraram distúrbios na fisiologia e retardo no desenvolvimento de *D. saccharalis* em função da ingestão desses inibidores expressos em plantas transgênicas de cana de açúcar (Falco & Silva-Filho 2003, Pompermayer *et al.* 2001).

Para o controle de *D. flavipennella* através de plantas transgênicas, quer por genes de *Bt* ou por inibidores de proteases, faz-se necessário uma maior compreensão das funções intestinais e dos processos regulatórios da digestão deste inseto. As enzimas digestivas, tais como as enzimas proteolíticas desempenham papéis importantes no crescimento dos insetos, desenvolvimento e reprodução. Além disto, as proteases digestivas têm participação na solubilização, ativação e desativação da protoxina de *B. thuringiensis* (Lomate & Hivrale 2013, Li *et al.* 2004), o que faz seu estudo ser de grande importância, pois qualquer mudança na fisiologia do intestino do inseto que afete uma ou mais etapas do seu processo de modo de ação pode evitar a toxicidade e/ou levar ao desenvolvimento de populações resistentes (Li *et al.* 2004).

Desta forma este trabalho teve como objetivo avaliar a suscetibilidade das espécies *D. saccharalis* e *D. flavipennella* à toxina Cry1Ac; caracterizar a atividade proteolítica do conteúdo intestinal de *D. flavipennella*, avaliando as propriedades bioquímicas das proteases digestivas presentes; avaliar os efeitos de inibidores sobre a atividade destas proteases; e avaliar *in vitro* se há

processamento proteolítico da toxina ativa depois da interação com as proteases do seu conteúdo intestinal.

### **Material e Métodos**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Patologia de Insetos e no Laboratório de Interação Insetos-Tóxicos do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

**Criação e Manutenção dos Insetos.** A criação de *D. flavipennella* foi mantida no Laboratório de Patologia de Insetos/UFRPE, onde as larvas foram alimentadas em dieta artificial de Hensley & Hammond (1968) modificada por Araújo (1985). As larvas a partir do 3º instar foram transferidas para caixas plásticas (30 x 18 x 04 cm) contendo blocos da dieta e ao atingirem o estágio de crisálida, as mesmas foram transferidas para recipientes plásticos (26 x 17 x 08 cm), contendo no fundo papel filtro mais algodão umedecido, até a emergência dos adultos. Os adultos foram confinados em gaiolas de PVC (21 x 15 cm), com o interior revestido com papel sulfite, como substrato para a postura, e adicionada solução glicosada a 10% para alimentação. Os ovos foram coletados diariamente, esterilizados com formol (3%) e sulfato de cobre (1%), e posteriormente armazenados em placas de Petri (15 x 02 cm) com pedaço de algodão umedecido, por aproximadamente sete dias. Após eclosão, as neonatas foram distribuídas em tubos de fundo chato contendo 20 mL de dieta. Os adultos foram mantidos a  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  de UR, enquanto as lagartas, crisálidas e ovos a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $70 \pm 10\%$  de UR, com fotoperíodo de 12h L: 12h E para ambos.

Larvas de *D. saccharalis* foram utilizadas apenas para o efeito de toxicidade, como um comparativo de suscetibilidade entre as duas espécies. As larvas utilizadas nos ensaios foram

fornecidas pelo Laboratório de Produção de *Cotesia flavipes* da Associação dos Plantadores de Cana (ASPLAN– PB).

**Preparação da Toxina de Bt.** A toxina Cry1Ac foi gentilmente doada pelo Dr. Blair Siegfried (Universidade de Nebraska – Lincoln). Esta proteína foi incubada com a enzima tripsina bovina para ativação da mesma. Posteriormente, a toxina foi quantificada por Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). O procedimento consistiu em usar o kit comercial de quantificação em placa PathoScreen® Kit (Agdia ®Inc., Elkhart, IN), que utiliza anticorpos contra Bt-Cry1Ac/Cry1Ab e peroxidase conjugada.

**Toxicidade em *Diatraea flavipennella* e *Diatraea saccharalis*.** Para os bioensaios com *D. flavipennella* e *D. saccharalis*, uma alíquota de 30 µL da toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* diluída em tampão PBST, foi aplicada uniformemente sobre a superfície da dieta artificial (1 mL de dieta/poço) previamente distribuídas em bandejas de bioensaios de 128 células (Bio-Serv Frenchtown, NJ). Após a evaporação do excesso de umidade, larvas neonatas de *D. flavipennella* e *D. saccharalis* foram acondicionadas individualmente e as bandejas fechadas com tampas transparentes e ventiladas (Bio-Serv Frenchtown, NJ). Sete concentrações foram usadas para os bioensaios, as mesmas determinadas a partir dos ensaios preliminares (utilizando concentrações de fator 2). Para acondicionamento do material, foi utilizada câmara incubadora (BOD), regulada para  $25 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  de UR e fotoperíodo de 12h L: 12h E. A testemunha consistiu do tampão PBST, que foi aplicado em volume equivalente aos lotes tratados. Três repetições foram realizadas e os tratamentos avaliados ao 7º e 15º dia após a aplicação da toxina. O critério de mortalidade foi baseado na ausência de locomoção das larvas após o toque com pincel de cerdas macias.

**Análises Estatísticas.** Os dados de concentração-mortalidade foram submetidos à análise de Probit a 5% (i.é,  $P > 0,05$ ) (Finney 1971), após a correção pela mortalidade do controle (Abbott

1925), usando POLO – PLUS 2.0 (LeOra-Software 2005). As respostas da toxina de *B. thuringiensis* testada nos bioensaios de concentração-mortalidade foram utilizadas para obtenção das inclinações das curvas e estimativas das CL<sub>50</sub>s e CL<sub>90</sub>s para *D. flavipennella* e *D. saccharalis*. A razão de tolerância a Cry1Ac foi calculada entre *D. flavipennella* e *D. saccharalis* pelo “teste da razão letal”, sendo considerados significativos quando o intervalo de confiança a 95% (IC) não incluiu o valor 1,0 (Robertson *et al.* 2007).

**Extração do Conteúdo Digestivo.** Larvas de 5<sup>o</sup> estágio de *D. flavipennella* foram resfriadas a 0°C por cerca de 5 minutos e dissecadas. Para cada amostra, foram utilizados 15 intestinos médio. Após a dissecação, os tubos digestivos foram imediatamente transferidos para tubos de microcentrífuga resfriados com capacidade para 1,5 mL contendo solução 0,15M de NaCl (1 tubo/300µl) e centrifugados a 15.000g/4°C por cinco minutos. Em seguida o sobrenadante contendo as proteinases foi cuidadosamente coletado e armazenado a -20°C até o uso. A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (Smith *et al.* 1985) usando um kit de análise de proteínas (Pierce Co.). A curva padrão foi estabelecida usando albumina de soro bovino (BSA). A concentração protéica de cada amostra foi padronizada para 0,25 mg/mL de proteína total, e diluída posteriormente se necessário.

**Determinação de pH Ótimo para Atividade Enzimática.** Para avaliar a atividade de serino proteases, substratos sintéticos específicos foram utilizados: N- $\alpha$ -benzoil-L-arginina  $\rho$ -nitroanilida (BapNA) para tripsina e proteases cisteínicas, N-succinil-ala-ala-pro-phe- $\rho$ -nitroanilida (SAAPF $\rho$ NA) para quimiotripsina e N-succinil-ala-ala-pro-leu  $\rho$ -nitroanilida (SAAPL $\rho$ NA) para elastase. Todos os substratos foram obtidos da Sigma (Sigma Co.) e utilizados a uma concentração final de 0,5 mM. As amostras foram diluídas 1:10 em diferentes tampões: 0,1 M ácido cítrico – citrato de sódio (pH 3-6); 0,1 M tris-HCl (pH 7-9); 0,1 M Glicina-NaOH (pH 10), todos contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. 50 µl das amostras diluídas nos diferentes tampões foram

adicionadas em poços de placa de microtitulação e em seguida foi adicionado 50 µL do substrato diluído no mesmo tampão para iniciar a reação. Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os brancos apropriados foram corrigidos em todos os casos. Depois de 5 minutos de incubação à temperatura de 30°C, a absorbância foi aferida a 405 nm (comprimento de onda) utilizando um leitor de microplacas (Biotek®) e o software Gen 5®.

**Atividade proteolítica de *Diatraea flavipennella* em diferentes temperaturas.** Para avaliar a atividade de serino proteases em diferentes temperaturas, foram utilizados os mesmos substratos utilizados no ensaio anterior. 50 µL da amostra diluída apenas no tampão Tris-HCl pH=9 foi adicionada em poços de placa de microtitulação e em seguida foram adicionado 50 µL do substrato diluído no mesmo tampão para iniciar a reação. Foram avaliadas as temperaturas 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C para cada reação, e incubadas por 5 minutos cada. A absorbância foi monitorada a 405 nm utilizando um leitor de microplacas (Biotek®) e o software Gen 5®.

**Inibição Enzimática.** O efeito de inibidores de proteinases sobre a atividade proteolítica do tubo digestivo foi avaliado. Os inibidores utilizados foram: Phenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) para serino proteases; Ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) para metalo-proteases; Tosil lisil clorometil cetona (TLCK) para tripsina e Tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) para quimiotripsina. Os mesmos foram preparados em soluções aquosas (TLCK e EDTA), em etanol (TPCK) ou metanol (PMSF) nas concentrações de  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^0$  e armazenados a -20°C. As incubações foram conduzidas no pH 9, com o inibidor pré-incubado com a enzima a 30°C por 30 minutos antes da adição do substrato, e após a adição do substrato o ensaio foi incubado por 5 minutos. A absorbância foi monitorada a 405 nm e a atividade inibitória foi mostrada como porcentagem residual quando comparada com o controle do teste.

**Interação das Enzimas Digestivas de *Diatraea flavipennella* com a Toxina Cry1Ac *in vitro*.** O processamento proteolítico da toxina Cry1Ac foi avaliado pela incubação de 1µg da toxina ativa

com proteínas digestivas de *D. flavipennella* (5µg de proteína total) em um volume final de 10µL em tampão Tris-Hcl (pH 9). As amostras foram incubadas a 30°C por diferentes intervalos de tempo: 5, 10, 15, 30 e 60 minutos. As reações foram diluídas 2:1 com tampão Laemmli (Laemmli 1970) e aquecidas à 95°C por 5 minutos para parar a reação e desnaturar as proteínas. Uma alíquota de 30 µL de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Os experimentos foram conduzidos em aparato de eletroforese mini-vertical usando gel separador de 8% de acrilamida. A corrida foi executada usando-se um sistema de tampão descontínuo Tris-glicina, a uma corrente constante de 30 mA por aproximadamente 40 minutos. Os géis foram corados em solução de Coomassie Brilliant Blue R-250, álcool metílico e ácido acético. O peso molecular das proteínas foi determinado a partir da migração eletroforética do padrão.

## Resultados

**Toxicidade** Os dados de concentração-mortalidade da proteína Cry1Ac se ajustou ao modelo de Probit ( $\chi^2$  não significativo,  $P > 0,05$ ). O valor da  $CL_{50}$  para a população de *D. flavipennella* foi de 2.26 ng/cm<sup>2</sup>, e para a população de *D. saccharalis* foi de 843,14 ng/cm<sup>2</sup> (Tabela 1). Cry1Ac mostrou-se 373 vezes mais tóxico a *D. flavipennella* do que para *D. saccharalis*.

**Determinação de pH Ótimo para Atividade Enzimática.** Na determinação do pH ótimo para as atividades de tripsina, quimiotripsina e elastase utilizando os substratos BApNA, SAAPFpNA, e SAAPLpNA houve atividade a partir do pH 6 sendo a hidrólise máxima obtida no pH 10 (maior pH avaliado) (Fig. 1).

**Atividade Proteolítica em Diferentes Temperaturas.** A atividade das serino proteases aumentou continuamente com o aumento da temperatura (0 a 80°C) atingindo um pico máximo

em torno de 50°C para quimiotripsina e elastase, e 60°C para tripsina, decrescendo logo em seguida (Fig. 2).

**Inibição Enzimática** A atividade de enzimas diante do substrato BA $\rho$ NA foi totalmente inibida por TLCK na concentração de 10 mM (Fig. 3). Já a atividade contra o substrato SAAPF $\rho$ NA foi totalmente inibida por PMSF na concentração de 10 mM (Fig. 4). A atividade contra o substrato SAAPL $\rho$ NA foi inibida por TPCK, inibindo cerca de 60% da atividade e quase totalmente inibida por PMSF alcançando 90% de inibição na concentração de 10 mM (Fig. 5).

#### **Interação das Enzimas Digestivas de *Diatraea flavipennella* com a Toxina Cry1Ac *in vitro*.**

Em relação ao processamento da toxina Cry1Ac quando incubada com enzimas digestivas por diferentes intervalos de tempo, observou-se que a toxina aparentemente não sofreu alteração nos menores intervalos de tempo (5 – 15 minutos), começando a sofrer um pequeno processamento a partir do intervalo de 30 minutos, que aumentou no intervalo de 1h (Fig. 6). Todos os tempos de incubação e concentrações de enzimas usados apresentaram um padrão de bandas duplo no intervalo de 60-70 kDa, onde apenas uma delas corresponde a posição da toxina ativada de aproximadamente 65 kDa, semelhante ao encontrado na toxina ativada. A incubação de 1h completou a ativação proteolítica da pró-toxina a uma única banda correspondente à da toxina ativada com tripsina bovina.

### **Discussão**

O controle das brocas *Diatraea spp*, ao longo dos anos tem sido conduzido através de controle biológico com parasitoides *C. flavipes* que conseguem localizá-las dentro do colmo. O sucesso desta tática está associado à liberação massal frequente de parasitoides, aumentando os custos. O uso de toxinas, particularmente de *Bt*, é uma ferramenta promissora, que uma vez expressa constitutivamente na cana de açúcar poderá controlar ao longo do cultivo a *D.*



*flavipennella*. No entanto, informações sobre a suscetibilidade desta espécie a toxinas de Bt é escasso ou inexistente. Aqui, esta espécie demonstrou uma alta suscetibilidade à toxina Cry1Ac comparada à sua espécie irmã, *D. saccharalis*. A suscetibilidade de *D. flavipennella* foi de 373 vezes maior do que *D. saccharalis*. Isto sugere que esta toxina pode ser uma ferramenta importante para o manejo da espécie *D. flavipennella*, mas não tão eficaz no controle de *D. saccharalis*, que necessitaria de concentrações muito elevadas para obter sucesso no controle.

Bioensaio semelhante a este foi realizado por De Macedo *et al.* (2012), com proteínas Cry individuais e larvas de *D. saccharalis*, onde observou-se que a CL<sub>50</sub> das proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac foram 222, 327 e 610 ng/cm<sup>2</sup> respectivamente. Pinheiro (2013) realizou bioensaios com as proteínas Cry1Aa, Cry1Ab e Cry1Ac que mesmo utilizando altas doses (5000 ng/cm<sup>2</sup>), as proteínas não causaram mortalidade significativa em larvas de *D. saccharalis*. Bohorova *et al.* (1997) avaliaram a suscetibilidade das principais pragas do milho à diferentes proteínas Cry1, e verificaram que as proteínas Cry1Ab e Cry1Ac causaram baixa taxa de mortalidade sobre larvas de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*. Menor suscetibilidade também foi observado em larvas de *D. saccharalis* à proteína inseticida Cry1Ab expressa no milho *Bt* MON810 comparadas às outras brocas do colmo *O. nubilalis* e *Diatraea grandiosella* (Huang *et al.* 2006, Wu *et al.* 2009).

Ao contrário destes resultados, *D. flavipennella* foi susceptível a Cry1Ac. Trabalhos como este utilizando a espécie *D. flavipennella* são inexistentes, sendo este um trabalho inédito e de grande importância, uma vez que trata-se de duas espécies do mesmo gênero em que uma mostrou suscetibilidade e a outra tolerância a mesma toxina Cry1Ac. Este resultado sugere que uma mesma toxina pode apresentar atividade diferenciada em diferentes espécies, ou *D. flavipennella* e *D. saccharalis* apresentam suscetibilidade diferenciada, pois mesmo tratando-se de espécies do mesmo gênero, estas podem apresentar proteases ou receptores diferentes que podem ou não interagir com a toxina Cry1Ac.

Em relação aos resultados referentes a determinação de pH ótimo para atividade das enzimas do lúmen de *D. flavipennella*, foi observado possivelmente a presença de proteases cisteínicas, e de serino proteases do tipo tripsina, quimiotripsina e elastase. Os dados mostraram que o pH ideal para a atividade destas proteases está entre 9-10. No entanto, não foi avaliado pH acima de 10, e uma tendência de queda ou aumento não pode ser estabelecida. De acordo com Terra & Ferreira (1994), serino proteases digestivas de insetos geralmente apresentam atividade em ambientes com valores de pH entre 8 e 12. Resultados semelhantes foram relatados em outras larvas de lepidópteros como *Parnassius Apollo* Linnaeus (Lepidoptera: Papilionidae) com pH 9-10 (Nakonieczny *et al.* 2007), *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae) com pH 11 para atividade proteolítica de tripsina (Gholamzadeh *et al.* 2013), *O. nubilalis* com pH 11,1 (Li *et al.* 2004). Em geral, as serino proteases são mais ativas em pH alcalino (9 a 11), condição encontrada no sistema digestivo de insetos da ordem Lepidoptera (Jamal *et al.* 2013).

A temperatura é um outro fator que influencia a atividade proteolítica dos insetos. Proteases digestivas de *D. flavipennella* tem atividade dentro de uma ampla gama de temperaturas (0-80°C), apresentando atividade ótima para tripsina na temperatura de 60°C, e para quimiotripsina e elastase a 50°C. Resultado semelhante a este foi encontrado por Gholamzadeh *et al.* (2013), para a caracterização de proteases intestinais de *Choreutis nemorana*, que obtiveram atividade ótima a 45°C, Bernardi *et al.* (1996) que observaram uma atividade enzimática ótima na temperatura em torno de 53°C para *O. nubilalis*, e também Pereira *et al.* (2005) com atividade máxima de enzimas similar a tripsina do intestino de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) a 50°C. Todos estes resultados contradizem com outros demonstrados para a determinação de temperatura ótima para atividade proteolítica em lepidópteros, por exemplo em *Spodoptera littoralis* que mostrou atividade ótima para tripsina na temperatura de 30°C (Marchetti *et al.* 1998), e em *Achaea janata* (Lepidoptera: Noctuidae) também com atividade ótima a 30°C (Budatha *et al.* 2008). De acordo

com Rodrigues (2004), a temperatura ótima para o desenvolvimento do inseto é próxima a 25°C, 38°C é o seu limiar máximo, e acima de 52°C o inseto é levado a morte. Esta variação do ótimo de temperatura pode ser causada por condições fisiológicas e biológicas de cada inseto (Abraham *et al.* 1992).

Em relação ao estudo de inibição de proteases, os resultados demonstraram que o conteúdo digestivo de *D. flavipennella* possui serino proteases do tipo tripsina, quimiotripsina e elastase. O substrato BApNA teve inibição significativa por TLCK, que é um inibidor de tripsina, inibindo 90% da atividade a 1mM, e 100% da atividade quando a 10mM. Resultado semelhante foi encontrado por George *et al.* (2008) no trabalho de caracterização de proteases digestivas do intestino de *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae), onde o substrato BApNA foi fortemente inibido por TLCK sugerindo a atividade de tripsina. A atividade de SAAPFpNA foi inibida por PMSF, que é um inibidor de serino proteases e que inibiu aproximadamente 85% da atividade a 10mM. A baixa inibição por TPCK (cerca de 35%) pode demonstrar insensibilidade ou resistência da protease quimiotripsina a este inibidor. Dados semelhantes a este foram relatados por Özgür *et al.* (2009) em *Helicoverpa armigera*, que observaram inibição satisfatória com PMSF, e baixa inibição de TPCK utilizando o substrato SAAPFpNA. A hidrólise de SAAPLpNA por PMSF que inibiu 90% da atividade quando a 10mM, sugere a atividade de elastase no intestino de *D. flavipennella*. Este estudo demonstrou que os inibidores PMSF e TLCK causaram diminuição significativa na atividade das proteases, comparados aos outros inibidores, concluindo que as serino proteases tripsina, quimiotripsina e elastase, são as principais enzimas hidrolizantes no intestino de *D. flavipennella*.

Dos resultados da interação das proteases digestivas de *D. flavipennella* com a toxina Cry1Ac ativada, foi observado que ocorreu um extra processamento da toxina gerando mais toxina ativada, e não ocorreu degradação o que mostra uma resistência da Cry1Ac ativada à proteólise por

proteases do intestino de *D. flavipennella*. O processamento da protoxina em toxina de subsp *Bt. kurstaki* estirpes HD-1 e HD-73(Cry1Ac) por proteases intestinais também tem sido relatado em outras espécies de lepidópteros como *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) (Ogiwara *et al.* 1992). Outros trabalhos confirmam que proteinases de insetos como tripsina ou quimiotripsina podem hidrolisar protoxinas *Bt*, levando a sua ativação e não degradação (Tojo *et al.* 1986, Milne & Kaplan 1993, Oppert *et al.* 1996, Martínez Ramírez & Real 1996, Carroll *et al.* 1997).

A caracterização da atividade proteolítica em *D. flavipennella* foi um estudo prévio que servirá como base para outros, uma vez que não havia trabalhos neste nível com *D. flavipennella*, sendo este pioneiro. Este trabalho apresenta resultados positivos que podem ser utilizados na busca por novos tipos de controle biológico, como a utilização de cana transgênica expressando Cry1Ac para o controle de *D. flavipennella*.

### Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, possibilitando a realização deste trabalho.

### Literatura Citada

- Abbott, W.S.A. 1925.** Method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- Abraham, E. G., J. Nagaraju, & R. K. Datta, 1992.** Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombyx mori* L.: Comparative analysis in diapausing and nondiapausing strains. Insect Biochem. Mol. Biol. 22: 867-873.
- Araújo, J.R., P.S.M. Botelho, S.M.S.S. Araújo, L.C. Almeida & N. Degaspari. 1985.** Nova dieta artificial para criação da *Diatraea saccharalis* (Fabr.). Saccharum APC 36: 45-48.
- Bernardi, R., G. Tedeschi, S. Ronchi & S. Palieri. 1996.** Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 26: 883-889.

- Braga, D.P.V., E.D.B Arrigoni, M.C. Silva-Filho & E.C. Ulian. 2003.** Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. New Seeds Missouri* 5: 209-221.
- Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A.M. Maciel, R.M. Brito, D. Hoisington & A. Bravo. 1997.** Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412-415.
- Budatha M., Meur G. & Dutta-Gupta A. 2008** Identification and characterization of midgut proteases in *Achaea janata* and their implications. *Biotechnol. Letters* 30: 305–310.
- Carroll J., D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie & D.J. Ellar. 1997.** Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A  $\delta$ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* 70:4149.
- Christou P., T. Capell, A. Kohli, J.A. Gatehouse & A.M.R. Gatehouse. 2006.** Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Pl. Sci.* 11: 302-308.
- De Macedo, C.L., E.S. Martins, L.L.P. De Macedo, A.C. Santos, L.B. Praça, L.A. B. Góis & R.G. Monnerat. 2012.** Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* efficient strains against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Pesq. Agropec. Bras.* 47: 1759-1765.
- De Maagd, R.A., D. Bosch & W. Stiekema. 1999.** *Bacillus thuringiensis* toxin mediated insect resistance in plants. *Trends Pl. Sci.* 4: 9-13.
- Falco, M.C. & Silva-Filho, M.C. 2003** Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. *Pl. Physiol. Biochem.* 41: 761-766.
- Ferré, J., J. González-Cabrera, Y. bel & B. escriche. 2008.** Exploring the potential of corn borers to develop resistance to Bt-corn in Europe. *IOBC wprs Bull.* 33: 1–6.
- Finney, D.J. 1971.** Probit analysis. London: Cambridge University Press, 333p.
- Freitas, M.R.T., E.L. Silva, A.L. Mendonça, C.E. Silva, A.P.P. Fonseca, A.L. Mendonça, J.S. Santos, R.R. Nascimento & A.E.G. Sant'ana. 2007.** The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. *Fl. Entomol.* 90: 309-313.
- George D., N. Ferry, E.J. Back, A.M.R. Gatehouse. 2008.** Characterisation of midgut digestive proteases from the maize stem borer, *Busseola fusca*. *Pest Manag. Sci.* 64: 1151–1158.
- Gholamzadeh Chitgar M., Ghadamyari M. & Sharifi M. 2013** Identification and characterisation of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). *Pl. Protect. Sci.* 49: 19–26.

- Gitahy, P.M., P.G. Galvao, J.L.S. Araujo & J.I. Baldani. 2006.** Perspectivas biotecnológicas de *Bacillus thuringiensis* no controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 44p.
- Hensley, S.D. & A.M. Hammond Jr. 1968.** Laboratory technique for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61: 1742-1743.
- Huang, F., B.R. Leonard & R.H. Gable. 2006.** Comparative susceptibility of European corn borer, southwestern corn borer, and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab protein in a commercial Bt-corn hybrid. J. Econ. Entomol. 99: 194-202.
- Jamal, F., P.K. Pandey, D. Singh & M.Y. Khan. 2013.** Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. Phytochem. Review 12: 1-34.
- Laemmli, K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LeOra-Software 2005.** POLO-Plus, POLO for Windows computer program, version 2.0. LeOraSoftware, Petaluma, CA.
- Li, H.; B. Oppert, R.A. Higgins, F. Huang, K.Y. Zhu & L.L. Buschman. 2004.** Insect Biochem. Mol. Biol. 34: 753-762.
- Lomate, P.R. & V.K. Hivrale. 2013.** Pest. Biochem. Physiol. 105: 77-83.
- Macedo, N., Botelho, P.S.M. 1988.** Controle integrado da broca cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Pyralidae). Brasil Açucareiro, 106: 2-12.
- Marchetti, S., C. Chiabá, F. Chiesa, A. Bandiera & A. Piotti. 1998.** Isolation and partial characterization of two trypsins from the larval midgut of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 449-458.
- Martinez-Ramirez AC & M.D. Real. 1996.** Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* CryIIIa toxin and specific binding to brush-border membrane vesicles of *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). Pest Biochem. Physiol. 54: 115-122.
- Marques, E.J., R.O.R. Lima, R.M. Andrade & J.M. Araújo Jr. 2008.** Controle biológico das brocas. *Diatraea* spp, *Telchin licus licus* e cigarrinhas *Mahanarva* spp em cana-de-açúcar, p. 95-111. In: M. Vezon, T.J. Paula Jr. & A. Pallini (orgs.), Avanços no controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa, EPAMIG, 283p.
- Milne R & H. Kaplan. 1993.** Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 23: 663-673.

- Nakonieczny M., K. Michalczyk & A. Kedziorski. 2007.** Midgut protease activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo* ssp. *frankenbergeri*. *Comp. Rend. Biol.* 330: 126–134.
- Ogiwara K, L.S. Indrasith, S. Asano & H. Hori. 1992.** Processing of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 121-126.
- Oppert B, K.J. Kramer, D. Johnson, S.J. Upton & W.H. McGaughey. 1996.** Luminal proteinases from *Plodia interpunctella* and the hydrolysis of *Bacillus thuringiensis* CryIAC protoxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 571-583.
- Özgür E., M. Yücel & H.A. Öktem. 2009.** Identification and characterization of hydrolytic enzymes from the midgut of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), *Turk. J. Agric.*, 33: 285-294.
- Pereira, M.E., F.A. Dörr, N.C. Peixoto, J.F. Lima-Garcia, F. Dörr & G.G. Brito. 2005.** Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38: 1633-1641.
- Pinheiro, D.H. 2013** Interação de proteínas Cry1A com as vesículas da borda escovada da membrana apical (BBMVs) do intestino médio de *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea saccharalis* e avaliação do tempo de cultivo sobre a produção de  $\beta$  exotoxina em isolados de *Bacillus thuringiensis*. Dissertação de Mestrado, UFLA, Minas Gerais, 125p.
- Pinto, A.S., J.F. Garcia & P.S.M. Botelho. 2006.** Controle biológico de pragas da cana-de-açúcar, p. 65-74. In A.S. Pinto, D.E. Nava, M.M. Rossi & D.T. Malerbo-Souza (Org.). *Controle biológico de pragas: na prática*. Piracicaba, FEALQ, 287p.
- Pompermayer, P., A.R. Lopes, W.R. Terra, J.R.P. Parra, M.C. Falco & M.C. Silva-Filho. 2001.** Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. *Entomol. Exp. Appl.*, Amsterdam, 99: 79-85.
- Robertson, J.L., R.M. Russell, H.K. Preisler & N.E. Savin. 2007.** *Bioassays with arthropods*. boca raton, CRC Press, 224p.
- Rodrigues, W.C. 2004.** Fatores que influenciam no desenvolvimento dos insetos. *Info Insetos*, 1:1-4. Disponível em: [www.entomologistasbrasil.cjb.net](http://www.entomologistasbrasil.cjb.net).
- Sandoval, S.S & K.C.A. Senô. 2010.** Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. *Nucleus*. 7: 243-258.

- Silva, C. C. M. 2013.** Associação de *Cotesia flavipes* (cam.) com *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. e *Beauveria bassiana* (bals.) vuill no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella* (box) (Lepidoptera: Crambidae). Tese de Doutorado, UFRPE, Recife, 51p.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-86.
- Terra, W.R. & C. Ferreira. 1994.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* New York, 109B: 1-62.
- Tojo A., W. Samasanti, N. Yoshida & K. Aizawa. 1986.** Effects of the three proteases from gut juice of the silkworm, *Bombyx mori*, on the two morphologically different inclusions of  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 strain. *Agric. Biol. Chem.* 50: 575-580.
- Wu, X., R.B. Leonard, Y.C. Zhu, A.A. Craig, G.P Head & F. Huang 2009.** Susceptibility of Cry1Ab-resistant and susceptible sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Invertebr. Pathol.* 100: 29-34.



Tabela 1. Suscetibilidade de *Diatraea flavipennella* e *Diatraea saccharalis* a toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*.

Temperatura:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; U.R.:  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 h.

Espécie	N <sup>1</sup>	Inclinação $\pm$ EP <sup>2</sup>	CL <sub>50</sub> (IC 95%) <sup>3</sup>	CL <sub>90</sub> (IC 95%) <sup>3</sup>	$\chi^2$ (GL) <sup>4</sup>	RT <sub>50</sub> (IC 95%) <sup>5</sup>
<i>D. flavipennella</i>	336	$0,95 \pm 0,23$	2,26 (0,12 - 6,89)	50,83 (26,78 - 94,01)	1,13 (5)	1 (0,2-5,1)
<i>D. saccharalis</i>	336	$2,27 \pm 0,35$	843,14 (565,18 - 1098,46)	3098,68 (2383,87 - 4594,12)	4,99 (5)	373,4 (272,2 - 512,2)*

<sup>1</sup> Número total de insetos testados.

<sup>2</sup> Inclinação  $\pm$  Erro padrão.

<sup>3</sup> ng Cry1Ac/cm<sup>2</sup> de área de dieta artificial.

<sup>4</sup> Qui-quadrado e Grau de liberdade.

<sup>5</sup> Razão de tolerância: Razão das estimativas da CL<sub>50</sub> de Cry1Ac entre *D. flavipennella* e *D. saccharalis*, calculada através do método de Robertson *et al.* (2007).

\*Razão de tolerância significativa para a toxina Cry1Ac, uma vez que o intervalo de confiança não compreende o valor 1,0

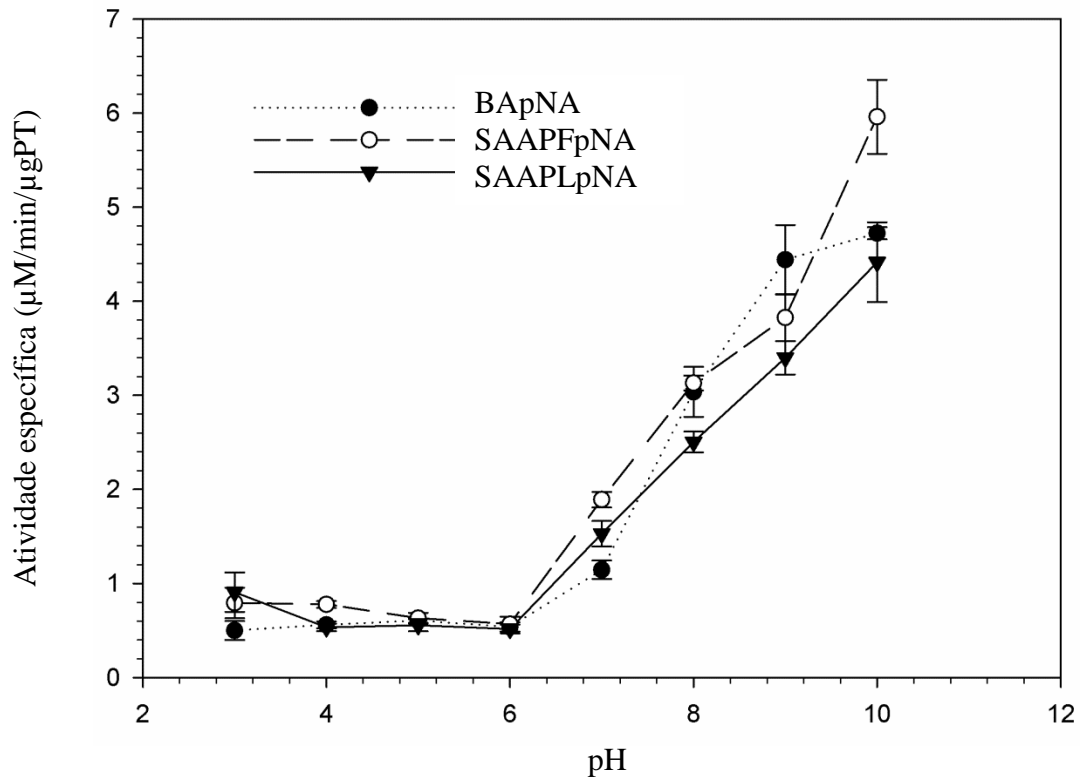


Figura 1. Atividade de proteases do intestino de larvas de *Diatraea flavipennella* usando BApNA, SAAPFpNA e SAAPLpNA, em tampões de pH crescente de 3 a 10, e temperatura de 30°C

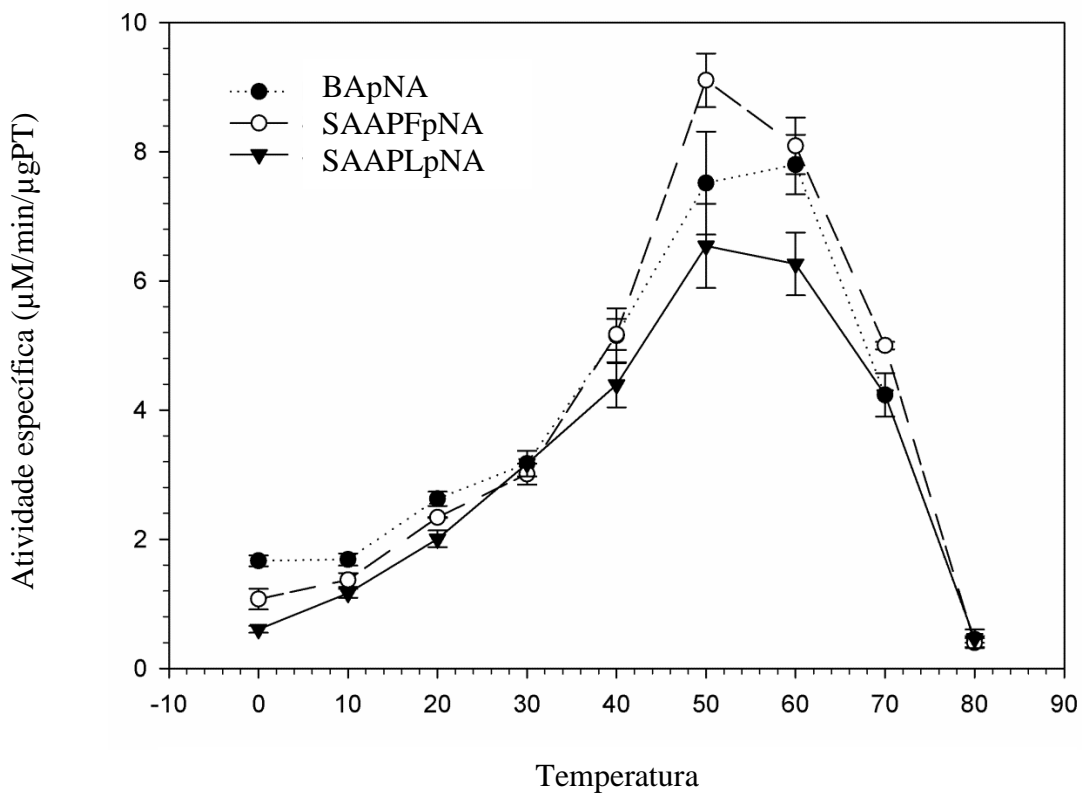


Figura 2. Atividade de proteases do intestino de larvas de *Diatraea flavipennella* usando BApNA, SAAPFpNA e SAAPLpNA, em tampão de pH 9 nas temperaturas de 0 a 80°C.

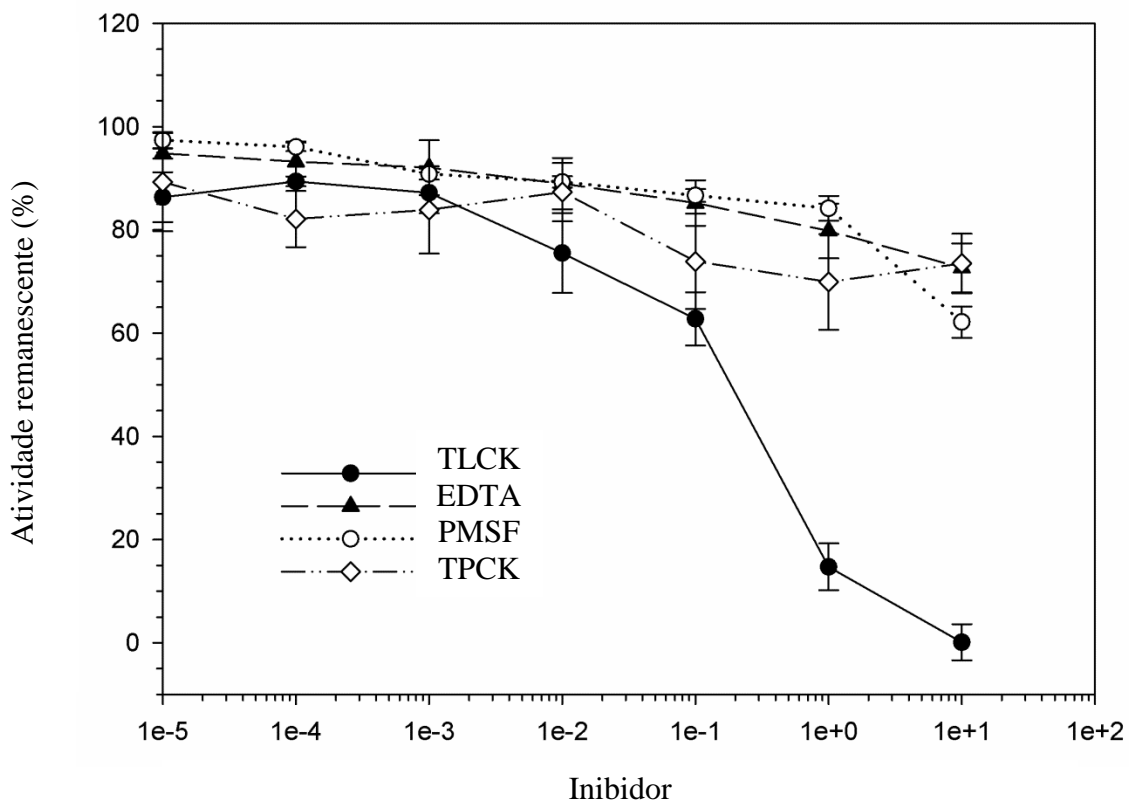


Figura 3. Efeito de inibidores de proteases sobre a hidrólise de BApNA pelas enzimas do tubo digestivo de *Diatraea flavipennella*. pH 9 e temperatura de 30°C.

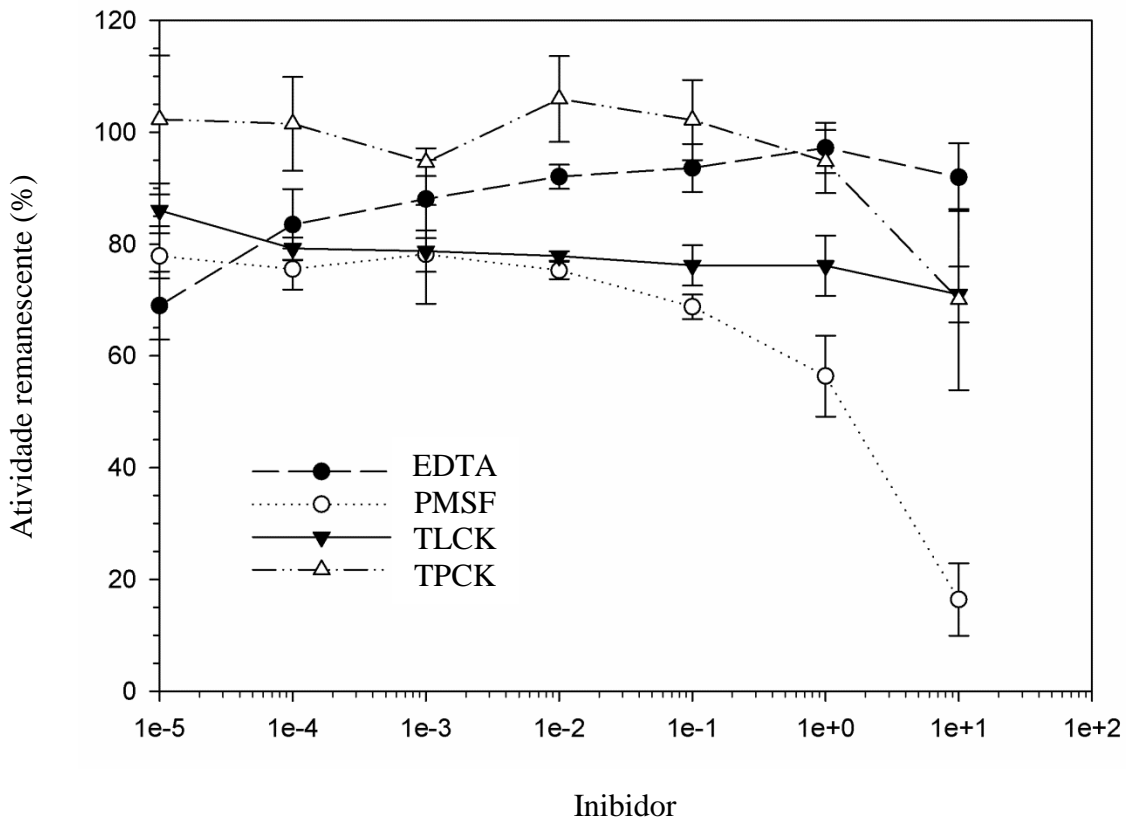


Figura 4. Efeito de inibidores de proteases sobre a hidrólise de SAAPFpNA pelas enzimas do tubo digestivo de *Diatraea flavipennella*. pH 9 e temperatura de 30°C.

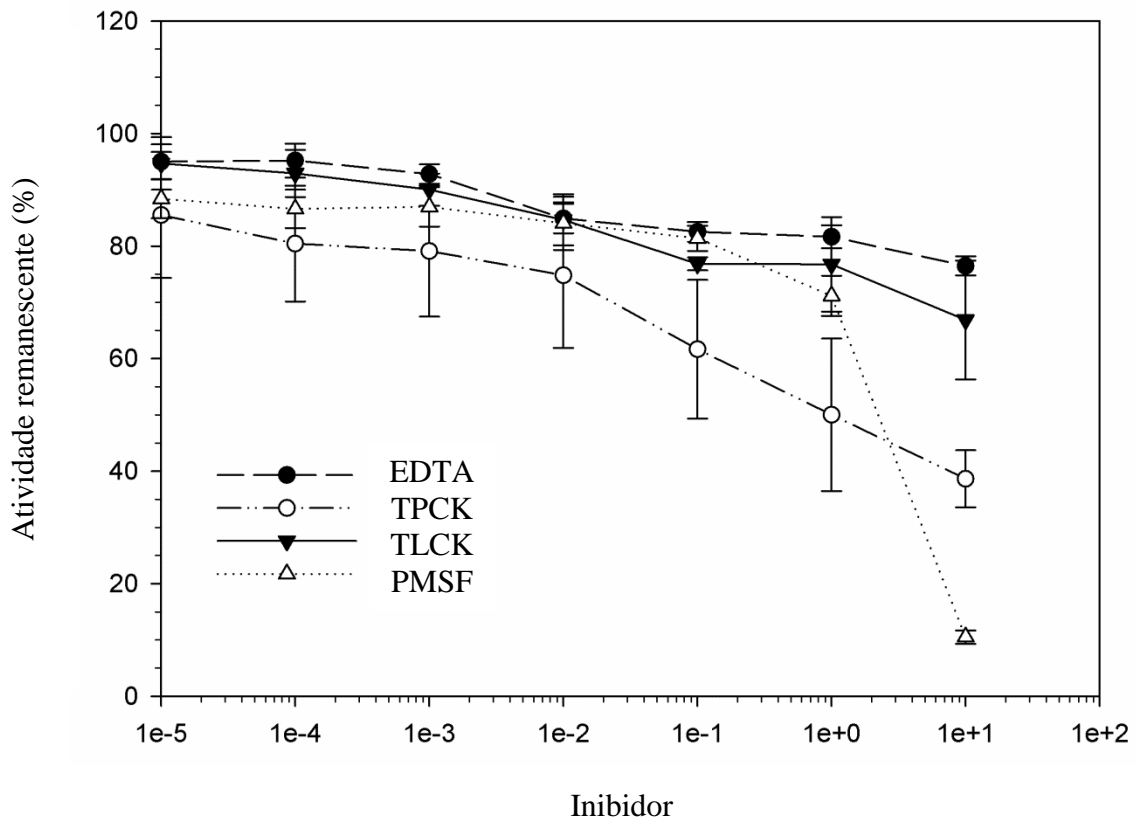


Figura 5. Efeito de inibidores de proteases sobre a hidrólise de SAAPLpNA pelas enzimas do tubo digestivo de *Diatraea flavipennella*. pH 9 e temperatura de 30°C.

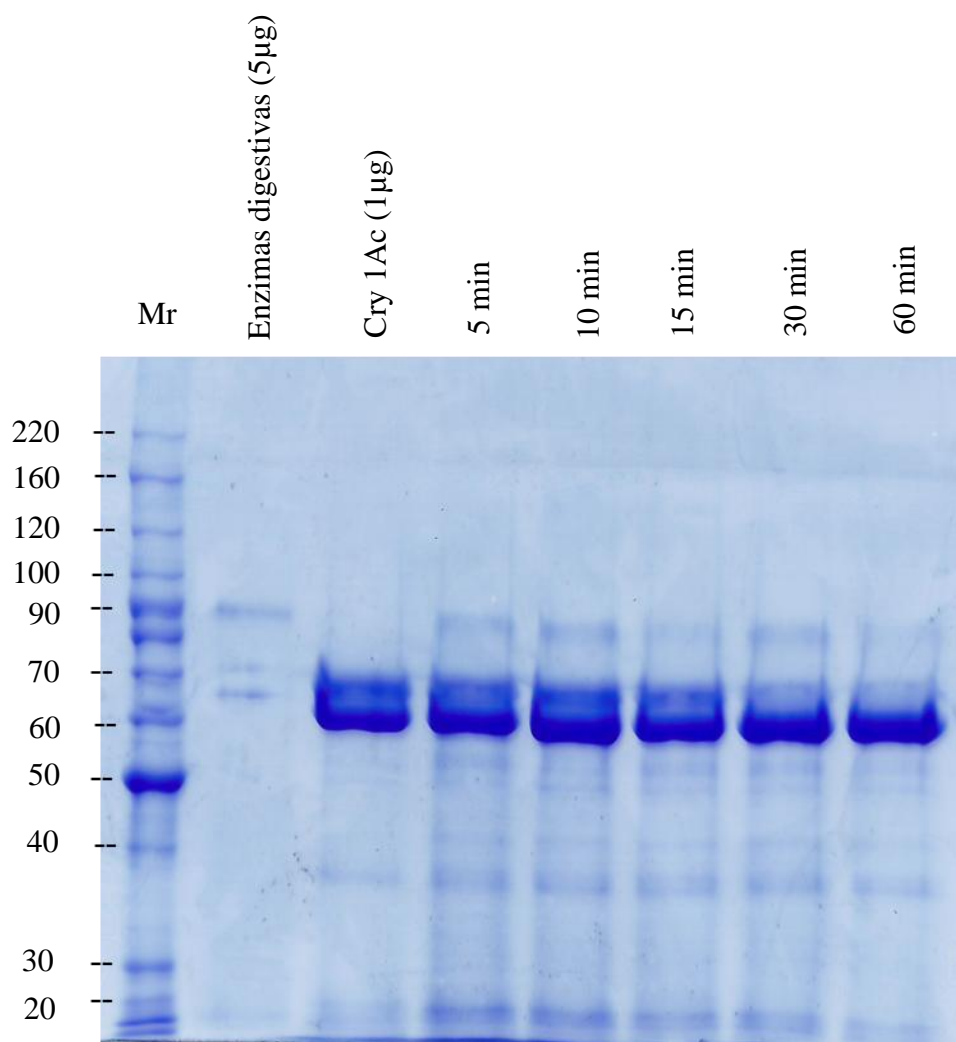


Figura 6. Perfil eletroforético da ação das enzimas digestivas de *Diatraea flavipennella* sobre a toxina de *Bt* Cry1Ac após diferentes tempos de incubação. pH 9 e temperatura de 30°C.