



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**EXPRESSÃO DA TOXINA Cry10Aa EM *Solanum lycopersicum* E
EFEITOS NA BIOLOGIA DA TRAÇA-DO-TOMATEIRO (*Tuta
absoluta*)**

PEDRO BRÍCIO BRITO FERNANDES

BRASÍLIA, DF
2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**EXPRESSÃO DA TOXINA Cry10Aa EM *Solanum lycopersicum* E
EFEITOS NA BIOLOGIA DA TRAÇA-DO-TOMATEIRO (*Tuta
absoluta*)**

PEDRO BRÍCIO BRITO FERNANDES

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

ORIENTADOR: FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO

BRASÍLIA, DF
2022

Figura	Título	Página
1	Biologia comportamental da <i>T. absoluta</i> . (A) Fase adulta, (B) Ovos postados após acasalamento, (C) Fase larval predatória, (D) Efeito de abertura de galerias em frutos e (E) Efeito de formação de minas em parênquima foliar. Imagem modificada de Villas Bôas et al., 2009.	22
2	Mecanismos de ação membranolítica da toxina Bt. A interação específica das toxinas com as membranas hospedeiras ocorre por interação molecular com receptores celulares, seguido de um dos possíveis mecanismos de ação. (a) incorporação dos esporos de <i>B. thuringiensis</i> pelo hospedeiro, (b) dissolução das protoxinas Bt, (c) fragmentação das protoxinas por ação proteolítica, (d) interação com receptores seguida da formação de poros transmembranares.	31
3	Representação esquemática do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa, que contém o cassete de expressão pC2300Cry10Aa portador do fragmento codante da proteína Bt Cry10Aa; promotor 35SCaMV; e terminador ocs3') e o gene marcador de seleção <i>nptII</i> .	36
4	Oligonucleotídeos gene específicos utilizados para checagem da presença dos transgenes <i>cry10Aa</i> e <i>nptII</i> . (a) Primers iniciadores Forward e Reverse específicos do transgene <i>cry10Aa</i> . (b) Primers iniciadores Forward e Reverse específicos do transgene <i>nptII</i> . O tamanho e a temperatura de anelamento dos primers também estão descritos na figura.	39
5	Diagrama dos componentes amostrais para a checagem de segregação do fragmento codante <i>cry10Aa</i> . (a) disposição das plantas pertencentes à linhagem L2- <i>cry10Aa</i> , (b) disposição das plantas pertencentes à linhagem L10- <i>cry10Aa</i> , (b) disposição das plantas pertencentes à linhagem L11- <i>cry10Aa</i> .	40
6	Disposição dos componentes do bioensaio. (A) representação esquemática do ensaio de número 1 (um), (B) representação esquemática do ensaio de número 2 (dois). (I) Período de oviposição de <i>T. absoluta</i> . (II) Monitoramento da emergência de adultos de <i>T. absoluta</i> , por meio da realocação das plantas com linhagens oriundas de mesma gaiola.	42
	Análise molecular por PCR e imunoensaio de fluxo lateral das linhagens transgênicas L2- <i>cry10Aa</i> , L10- <i>cry10Aa</i> e L11- <i>cry10Aa</i> , bem como da linhagem WT. (A) Análise da amplificação do fragmento codante	

7	<p><i>cry10Aa</i> por PCR. M, marcador de peso molecular (1kb Plus, Invitrogen), C- controle negativo, L2, L10 e L11 alíquotas de DNA genômicos referentes às linhagens transgênicas, WT alíquota de DNA genômico referente à linhagem de tomate selvagem e C+ alíquota de suspensão do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa. (B) Análise da amplificação do fragmento codante <i>nptII</i> por PCR. L2, L10 e L11 alíquotas de DNA genômicos referentes às linhagens transgênicas, WT, alíquota de DNA genômico referente à linhagem selvagem, C+ alíquota de suspensão do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa e M, marcador de peso molecular. (C) Análise de imunoenensaio de fluxo lateral específica para a enzima NPTII para as linhagens transgênicas L2-<i>cry10Aa</i>, L10-<i>cry10Aa</i> e L11-<i>cry10Aa</i>, bem como para a linhagem de tomate WT.</p>	43
8	<p>Análise de Southern blot do DNA genômico de 9 (nove) plantas transgênicas de <i>Solanum lycopersicum</i> regeneradas a partir de 3 (três) calos independentes, e uma planta de tomate não transgênica. O número amostral referente as plantas GM analisadas dividem-se em um total de 3 (três) linhagens (L2-<i>cry10Aa</i>, L10-<i>cry10Aa</i> e L11-<i>cry10Aa</i>), tendo sido analisadas um total de 3 plantas para cada uma das linhagens supracitadas.</p>	45
9	<p>Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para Cry10Aa. Linhagens experimentadas: Linhagem controle WT, Linhagem L2-<i>cry10Aa</i> (L2.1, L2.2, L2.3), Linhagem L10-<i>cry10Aa</i> (L10.1, L10.2 e L10.3) e Linhagem L11-<i>cry10Aa</i> (L11.1, L11.2 e L11.3). Uma diluição de 15 ng/μL da proteína Cry10Aa foi utilizada como controle positivo para o ensaio.</p>	47
10	<p>Plantas de tomate desafiadas em ensaio com <i>T. absoluta</i> após 25 dias transcorridos. (A) Plantas pertencentes à linhagem L10-<i>cry10Aa</i>, (B) Plantas pertencentes a linhagem Wild Type.</p>	50
11	<p>Média total de emergência de adultos de <i>T. absolutas</i> em ensaio comparativo. WT: Média de emergência de adultos de <i>T. absoluta</i> em ensaio com plantas da linhagem Micro-Tom selvagem, L2: Média para ensaio com plantas L2-<i>cry10Aa</i>, L10: Média para ensaio com plantas L10-<i>cry10Aa</i>, L11: Média para ensaio com plantas L11-<i>cry10Aa</i>.</p>	51
12	<p>Média total de emergência de adultos de <i>T. absolutas</i> em ensaio comparativo. Controle: Média de emergência de adultos de <i>T. absoluta</i> em ensaio com plantas da linhagem Micro-Tom selvagem, L10: Média para ensaio com plantas L0-<i>cry10Aa</i>.</p>	52

Tabela	Título	Página
1	Análise de segregação gênica por Qui-quadrado (χ^2) referente a geração T1 de 30 (trinta) plantas transgênicas de tomate transformadas com o vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa.	46

RESUMO

Mais de 90 gêneros integram a família *Solanaceae* com destaque para o gênero *Solanum*, considerado um dos grandes ramos desta família com espécies com alto valor nutricional, biotecnológico, bem como medicinal, dentre estas, plantas modelos para a biotecnologia, como: batata (*Solanum tuberosum* L.), berinjela (*Solanum melongena*), e tomate (*Solanum lycopersicum*). O tomate, por sua vez, destaca-se como uma das cinco maiores culturas comerciais no mundo devido ao seu valor industrial e biotecnológico, muito em função da variedade Micro-Tom, considerada uma planta modelo, apresentando um ciclo de vida otimizado, bem como pela sua estatura física reduzida que favorece a sua utilização em investidas de interesse biotecnológico. A suscetibilidade de cultivo do tomate nas mais diversas condições ambientais não anula os danos ocasionados por eventos de instabilidades ambientais, bem como pela ação contínua de predadores. Este processo que pode alcançar a marca de até 50% de perdas de produção total em países subdesenvolvidos, sendo que, dentre os principais agentes predatórios do tomate está a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). A *T. absoluta* é nativa da América do Sul, amplamente descrita como um predador em culturas diversas, porém, com um amplo alvo predatório em tomate e responsável por cerca de 5% das perdas totais de tomate em todo o mundo. Devido aos desafios associados ao controle convencional da *T. absoluta*, as estratégias de manejo utilizadas, por vezes, se resumem no uso reiterado de pesticidas sintéticos, abrindo caminho para riscos ambientais e de saúde pública associados aos mesmos. Em contrapartida, estudos recentes de monitoramento populacional têm apontado para um aumento no surgimento de resistência a pesticida em populações de *T. absoluta* aos princípios ativos comumente utilizados na agricultura, enfatizando a necessidade da busca por moléculas alternativas com segurança e eficácia. Neste sentido, dentre as principais biomoléculas de importância tecnológica descritas nas últimas décadas estão as chamadas toxinas Cry (Bt), parte integrante do metabolismo secundário da bactéria *Bacillus thuringiensis* e detentoras de um vasto conteúdo literário acerca da sua toxicidade relatada contra dípteras, coleópteros, bem como lepidópteros. Neste trabalho, estudamos o efeito da α -endotoxina Cry10Aa sobre *T. absoluta*. Com base nestes dados e na importância econômica e cultural associadas ao manejo da *T. absoluta*, uma das principais pragas predatórias de tomate em expansão mundial, propomos aqui obtenção e validação de toxicidade de um tomate portador do transgene *cry10Aa* para o manejo da *T. absoluta*. Explantes cotiledonares de tomateiro da variedade Micro-Tom foram transformados via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105-GS58283-13pC2300Cry10Aa. Foram geradas 3 linhagens transgênicas, confirmadas por PCR pela detecção do fragmento codante da proteína Cry10Aa de 554 pb, tendo sido a sua inserção no genoma confirmada por Southern blot. A análise da progênie confirmou a presença do inserto na geração T1, segregando em proporção mendeliana 3:1, 15:1 e 63:1. Por sua vez, a análise pelo método de imunoadsorção enzimática (ELISA) revelou um maior acúmulo da proteína Cry10Aa por mg de tecido foliar fresco (~8 ng/mg) para a linhagem L10-*cry10Aa*. O bioensaio realizado com *T. absoluta* não apresentou diferença estatística entre a emergência de adultos para os tratamentos L2-*cry10Aa*, L11-*cry10Aa* em relação a WT. Em contrapartida, os dados reforçam que a emergência de adultos de *T. absoluta* pode ser reduzida em até 50% para a linhagem L10-*cry10Aa*.

Palavras chave: *Solanum lycopersicum*, tomate, Micro-Tom, *Agrobacterium tumefaciens*, traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta*, *Bacillus thuringiensis*, Bt, Cry10Aa.

ABSTRACT

More than 90 genus are part of the *Solanaceae* family, with emphasis on the *Solanum*, considered one of the great branches of this family with species with high nutritional, biotechnological, as well as medicinal value, among these, model plants for biotechnology, such as: the potato (*Solanum tuberosum* L.), eggplant (*Solanum melongena*), as well as tomato (*Solanum lycopersicum*). The tomato, in turn, stands out as one of the five largest commercial crops in the world due to its industrial and biotechnological value, largely due to the Micro-Tom variety, considered a model plant, with an optimized life cycle, as well as due to its reduced physical stature, which favors its use in biotechnological investments. The susceptibility of tomato cultivation in the most diverse environmental conditions does not cancel out the damage caused by events of environmental instabilities, as well as by the continuous action of predators, a process that can reach the mark of up to 50% of total production losses in underdeveloped countries, being that, among the main predatory agents of tomato is the tomato moth (*Tuta absoluta*), native to South America and widely described as a generalized predator in different cultures, however, with a wide predatory target in tomato, being the damages predatory diseases caused by *T. absoluta* responsible for about 5% of total tomato losses worldwide. Due to the challenges associated with the conventional control of *T. absoluta*, the management strategies used, sometimes, are summarized in the repeated use of synthetic pesticides, opening the way for environmental and public health risks associated with them. On the other hand, recent population monitoring studies have pointed to an increase in the emergence of pesticide resistance in populations of *T. absoluta* to active ingredients commonly used in agriculture, emphasizing the need to search for alternative molecules with safety and efficacy. In this sense, among the main biomolecules of technological importance described in the last decades are the so-called Cry (Bt) toxins, an integral part of the secondary metabolism of the bacterium *Bacillus thuringiensis* and holders of a vast literary content about their reported toxicity against diptera, coleopteran, nematodes, as well as lepidopterans, largely due to the cytotoxic capacity of these toxins against moths. In this work we studied the effect of α -endotoxin Cry10Aa on *T. absoluta*. Based on these data and on the economic and cultural importance associated with the management of *T. absoluta*, one of the main predatory tomato pests in expansion worldwide, we propose here to obtain and validate the toxicity of a tomato carrying the *cry10Aa* transgene for the management of *T. absoluta*. Micro-Tom tomato cotyledon explants were transformed via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105-GS58283-13pC2300Cry10Aa. Three transgenic lines were generated, confirmed by PCR by detecting the 554bp Cry10Aa protein coding fragment, and its insertion into the genome was confirmed by Southern blot. Progeny analysis confirmed the presence of the insert in the T1 generation, segregating in Mendelian proportions 3:1 and 15:1. In turn, analysis by the enzyme immunosorbent method (ELISA) revealed a greater accumulation of Cry10Aa protein per mg of fresh leaf tissue (~8 ng/mg) for the L10-*cry10Aa* strain. The bioassay performed with *T. absoluta* showed no statistical difference between emergence of adults for treatments L2-*cry10Aa*, L11-*cry10Aa* in relation to WT. On the other hand, the data reinforce that the emergence of *T. absoluta* adults can be reduced by up to 50% for the L10-*cry10Aa* lineage.

Key words: *Solanum lycopersicum*, tomato, Micro-Tom, *Agrobacterium tumefaciens*, tomato leafminer, *Tuta absoluta*, *Bacillus thuringiensis*, Bt, Cry10Aa.

LISTA DE ABREVIACOES

AIA = cido indolactico;

ATP = Trifosfato de adenosina;

BAP = Benzilaminopurina;

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool;

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Bti: *Bacillus thuringiensis israelensis*

DNA = cido desoxirribonucleico;

EHA105 = Linhagem de *Agrobacterium tumefaciens*;

Embrapa = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuria;

LB = Luria Bertani;

MES = cido morfolino etanosulfnico;

MS = Murashige e Skoog (1962);

NPTII = Neomicina Fosfotransferase tipo II;

PCR = Polymerase Chain Reaction;

pb = Pares de bases;

pH = Potencial hidrogeninico;

PVP = Polivinilpirrolidona;

 = Marca registrada;

RNA = cido ribonucleico;

rpm = Rotaes por minuto;

M = Marca comercial;

WT= Wild Type.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1. REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO	13
2.1 <i>Solanum lycopersicum</i>	13
2.2 Aumento na demanda por alimentos	18
2.3 <i>Tuta absoluta</i>	20
2.4 Manejo da <i>T. absoluta</i> por pesticidas	23
2.5 A genômica a serviço da agricultura	27
2.6 <i>B. thuringiensis</i>	28
2.7 Família de toxinas Cry	29
3. JUSTIFICATIVA	33
4. HIPOTESE	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 Objetivo geral	35
5.2 Objetivos específicos	35
6. MATERIAL E MÉTODOS	35
6.1 Síntese do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa	35
6.2 Transformação de explantes de <i>Solanum lycopersicum</i> por <i>Agrobacterium tumeraciens</i>	37
6.3 Checagem de eventos transgênicos por reação em cadeia da polimerase (PCR)	38
6.4 NPTII ImmunoStrip® Test	39
6.5 Análise das progêneses	39
6.6 Análise de Southern blot	40
6.7 Imunoabsorção enzimática (ELISA)	41
6.8 Ensaio de toxicidade contra <i>T. Absoluta</i>	41
7. RESULTADOS	43
7.1 Checagens de plantas da geração zero (g0) por PCR e NPTII ImmunoStrip® Test	43
7.2 Análise por Southern blot	44
7.3 Análise de progêneses	46
7.4 Imunoabsorção enzimática (ELISA)	47
7.5 Ensaios com <i>Tuta absoluta</i> em plantas de tomateiro	49

8. CONCLUSÃO.....	53
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Mais de 90 gêneros integram a família *Solanaceae*, com destaque para o gênero *Solanum*, considerado um dos grandes ramos desta família taxonômica com cerca de 2.000 espécies descritas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo. A grande diversidade do gênero *Solanum* reflete os diversos padrões morfológicos e metabólicos das plantas que integram o gênero, compreendendo espécies com alto valor nutricional, biotecnológico, bem como medicinal, dentre estas, espécies modelos amplamente utilizadas em estudos de caracterização genômica e/ou metabólica, como a batata (*Solanum tuberosum* L.), a berinjela (*Solanum melongena*), bem como o tomate (*Solanum lycopersicum*). O tomate, por sua vez, caracteriza-se como uma planta herbácea, de caule liso e piloso, apresentando um fruto carnoso e rico em vitaminas e minerais, como: vitamina C, β -caroteno, antioxidantes, além de outros importantes fitoquímicos. Nas últimas décadas, estudos de caracterização físico-química do extrato puro do tomate reforçaram a relação direta entre a ingestão regular do extrato *in natura* ou processado do tomate e a redução significativa na incidência degenerativa de funções cognitivas, doenças cardiovasculares, síndromes metabólicas, bem como distúrbios oncológicos (DORAIS; EHRET; PAPADOPOULOS, 2008; ECHEVERRÍA-LONDOÑO *et al.*, 2020; KAUNDA; ZHANG, 2019).

A ampla difusão geográfica do tomate tem sua origem no oeste da América do Sul, mais precisamente no Peru, e, atualmente, se destaca como uma das cinco maiores culturas comerciais no mundo. Nas últimas décadas, o tomate tornou-se alvo de estudos biotecnológicos, muito devido à ampla diversidade fenotípica e metabólica existente entre as suas linhagens comerciais e selvagens. Por sua vez, dentre os genótipos de tomate considerados modelo para a biotecnologia, destaca-se a cultivar “Micro-Tom”, que apresenta ciclo de vida reduzido, bem como sua estatura física, favorecendo a sua utilização em investidas de interesse biotecnológico por meio da alocação escalonada das plantas em institutos de pesquisa em todo o mundo. Por outro lado, a suscetibilidade de cultivo do tomate nas mais diversas condições ambientais não anula os danos ocasionados por eventos de instabilidades ambientais, bem como pela ação contínua de predadores (FAO, 2017; TRIPATHY; MALLIKARJUNARAO, 2020).

Neste sentido, estima-se que os danos para a agricultura mundial ocasionados pela predação do tomate podem variar entre 40 e 50% da produção total em países subdesenvolvidos, sendo que, dentre os principais agentes predatórios de tomate, está a

traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). *T. absoluta* é nativa da América do Sul e apresenta alvos predatórios em diversas culturas, como a batata (REHMAN *et al.*, 2012) e o feijão (NITIN *et al.*, 2017). No entanto, *T. absoluta* é caracterizada pelo seu hábito predatório em culturas de tomate, tendo sido descrita nas últimas décadas em regiões antes não ocupadas, como na Ásia, África, Europa e na América do Norte. Nas últimas décadas, os danos predatórios ocasionados por *T. absoluta* podem representar até cerca de 5% das perdas totais de tomate em escala mundial (URBANEJA *et al.*, 2012), sendo as limitações associadas ao manejo da *T. absoluta* uma das maiores preocupações para a produção comercial de tomate em todo o mundo. Considerando a importância econômica associada a *T. absoluta*, metodologias que permitam o manejo desta praga têm sido exaustivamente estudadas desde meados do século XX, no entanto, estratégias baseadas no melhoramento clássico de cultivares contra *T. absoluta*, bem como metodologias relacionadas ao uso de biocontroladores têm apresentado, por vezes, um elevado custo de implementação, bem como uma baixa eficiência associada. Este processo tem limitado o controle populacional de *T. absoluta* à estratégias baseadas no uso de agentes agroquímicos (HAN *et al.*, 2019; QUEIROZ *et al.*, 2022).

Neste sentido, o uso reiterado dos pesticidas, estes, caracterizados pela sua toxicidade contra plantas, animais e insetos, apresenta elevados custos associados, bem como riscos ambientais e de saúde pública. Por sua vez, os riscos associados aos pesticidas colocam em xeque a sua utilização escalonada a longo prazo, sendo que, dentre os principais pontos levantados estão: a contaminação do solo, água e do ar em áreas de cultivo, bem como o risco de interações inespecíficas para com a fauna e flora nativas. Outro ponto preocupante relacionado à utilização indiscriminada destes agentes é a recorrência no surgimento de resistência entre as pragas alvo, processo que, segundo especialistas, tem contribuído para o surgimento de organismos super-resistentes nos últimos anos (ESCOBAR-CHÁVEZ; ALVARIÑO; IANNACONE, 2019).

Estudos recentes de monitoramento populacional têm apontado para um aumento na ocorrência de resistência em populações de *T. absoluta* contra os princípios ativos comumente utilizados na agricultura, enfatizando a necessidade da busca por biomoléculas alternativas. Dentre as principais moléculas de importância biotecnológica descritas nas últimas décadas para este campo de estudo estão as chamadas protoxinas Cry (Bt) que, por sua vez, são parte integrante do metabolismo secundário da bactéria *Bacillus thuringiensis* e, atualmente, apresentam um vasto conteúdo literário acerca da toxicidade das toxinas Bt mediada pela sua dissolução intestinal em formas larvais de insetos. Dentre estas moléculas

e considerando um intervalo de 40 anos, um compilado de estudos científicos atestam a toxicidade das α -endotoxina Bt integrantes da família Cry, contra Nematoides, Dípteras, Coleópteros, bem como Lepidópteros. Estudos realizados nos últimos anos evidenciaram a capacidade citotóxica de algumas destas toxinas frente a *T. absoluta*, sendo que dentre as toxinas Cry elucidadas, está a α -endotoxina Cry10Aa, descrita na literatura com foco em sua toxicidade contra integrantes das famílias Dípteras, e Lepidópteros, em especial, mariposas (BRAVO *et al.*, 2011; HERRERA ROCHA; RODRÍGUEZ CAICEDO; CANTOR, 2018). Por sua vez, os avanços alcançados no campo da genômica agrícola pelo advento da técnica do DNA recombinante, têm possibilitado a obtenção de cultivares comerciais portadoras de perfis híbridos que permitam uma resposta otimizada frente aos principais fatores limitantes à sua produção comercial.

Devido à importância econômica associada ao manejo de *T. absoluta* e considerando a expectativa da comunidade científica sobre as toxinas Bt como alternativas ao manejo das principais pragas agrícolas comumente observadas em todo o mundo, estudos anteriores comprovaram elevados níveis de eficiência de membros da família de toxinas Cry para o manejo de *T. absoluta*. Alguns exemplos são os estudos envolvendo as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab, tendo sido ambas toxinas avaliadas em estudos de melhoramento genético para o controle de pragas em tomate (HANUR *et al.*, 2015; KOUL *et al.*, 2014). Neste sentido, vale ressaltar a ausência de qualquer estudo anterior que tenha avaliado a expressão da toxina Cry10Aa em tomate para o controle de *T. absoluta*. Com base nestes dados e na importância econômica e cultural associadas ao manejo da *T. absoluta*, uma das principais pragas predatórias de tomate em expansão mundial, propomos aqui obtenção e validação de toxicidade de um tomate portador do transgene *cry10Aa* frente a *T. absoluta*.

2. REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1. Solanum lycopersicum

A família taxonômica *Solanaceae* relaciona plantas de alto valor econômico, totalizando cerca de 3.000 espécies descritas, dentre elas, destacam-se a batata (*Solanum tuberosum*), a pimenta (*Capsicum frutescens*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*), bem como o tomate (*Solanum lycopersicum*). O tomate foi primeiramente descrito por Linnaeus, em 1753 (KIMURA; SINHA, 2008; KNAPP; JARVIS, 1990), tendo sido posteriormente

incorporado ao gênero *Solanum* e classificado como *S. lycopersicum*. Estudos moleculares recentes revelaram uma alta diversidade genética para plantas selvagens de *S. lycopersicum* no oeste da América do Sul, mais precisamente no Peru, bem como um baixo índice de divergência genômica (~0,5%) entre as variedades *S. lycopersicum* e *S. pimpinellifolium*, sugerindo a provável origem da espécie neste continente, bem como uma planta mais aparentada para as linhagens comerciais de *S. lycopersicum* (BAI, YULING; LINDHOUT, 2007; GERSZBERG *et al.*, 2015). Por sua vez, devido ao seu extenso processo de domesticação, o tomate tornou-se parte importante da cultura e da economia de países da América Central, Europa, Ásia, bem como da própria América do Sul, tornando-se uma das cinco maiores culturas comerciais do mundo (BISWAS; WU, 2017; KIMURA; SINHA, 2008; ULUISIK *et al.*, 2016; VINCENT *et al.*, 2013).

O tomateiro, se caracteriza por frutos ricos em minerais, vitamina C, β -caroteno e antioxidantes, tendo sido extensivamente estudado na década pela redução significativa para o surgimento doenças cardiovasculares, intestinais e tumorais em indivíduos que utilizam dietas regulares à base do extrato puro do tomate. Por sua vez, dentre os 40 carotenoides essenciais para a composição da dieta humana, cerca de 20 deles são encontrados na composição do tomate, evidenciando a sua utilização como base para a produção de sucos, polpas, bem como ingrediente secundário em outros alimentos industrializados (CARVALHO *et al.*, 2019; GERSZBERG *et al.*, 2015; RAIOLA *et al.*, 2014). De forma complementar, estudos têm demonstrado ainda uma relação direta entre o consumo regular do tomate e o controle gradual de síndromes metabólicas como picos hiperglicêmicos (BANIHANI, 2018; FIGUEIREDO *et al.*, 2020) e hipercolesterolêmicos (KUMAR *et al.*, 2021; PERVEEN *et al.*, 2015).

Dados de produção agrícola mundial de tomate para o ano de 2020 (FAO 2020) apontaram a China (CN), Estados Unidos (USA), Reino Unido (UK) e Índia (IN) como responsáveis por 70% de toda a produção de tomate no mundo (BISWAS; WU, 2017), sendo que, segundo levantamento da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations) que compreendeu o intervalo de 10 anos entre 2004 e 2014, estima-se que a produção mundial de tomate tenha crescido em cerca de 48 milhões de toneladas, alcançando a marca expressiva de 170 milhões de toneladas (FAO 2005; FAO 2017). Já na segunda década do milênio, o levantamento da FAO estimou uma produção líquida de 51 milhões de toneladas pela China (FAO 2020). Neste sentido, o Brasil se destaca como um dos grandes produtores do fruto em todo o mundo, pelo qual, segundo dados do IBGE, no ano de 2020 a produção

nacional do tomate alcançou a marca em área cultivada de 77.965.000 de hectares. Estes dados reforçam a importância do tomate para a manutenção da agricultura, da economia, bem como da indústria e da biotecnologia mundial (IBGE, 2020).

Linhagens comerciais e selvagens de tomate apresentam diferenças que não se limitam tão somente ao perfil fenotípico e metabólico das plantas. Por sua vez, desde a elucidação do genoma do tomate pelo consórcio para o sequenciamento genômico de *Solanum lycopersicum*, projeto que envolveu 14 países e que foi publicado no ano de 2012 na revista Nature (The Tomato Genome Consortium 2012) (SATO *et al.*, 2012), o conhecimento acerca dos perfis fenotípicos e metabólicos de *S. lycopersicum*, bem como os fatores que viabilizam o seu cultivo escalonado *in vitro*, tornaram o tomate uma planta modelo para programas de pesquisas em todo o mundo. Dentre estas características favoráveis, estão: a adaptabilidade de cultivo em diversas condições ambientais, a alta capacidade de produção de sementes, bem como a presença de um genoma relativamente curto e amplamente difundido na literatura (950MB) (KIMURA; SINHA, 2008).

Em meio a diversidade de genótipos que compõe a espécie *S. lycopersicum*, a variedade Micro-Tom é considerada um dos principais organismos modelos para a biotecnologia. Dentre as características que definem uma planta-modelo, espera-se um ciclo de vida curto, um amplo conteúdo genômico acessível na literatura, bem como uma estatura reduzida, permitindo, assim, o cultivo escalonado em centros de pesquisa. Com base nestes preceitos, a variedade Micro-Tom tem sido amplamente pesquisada em estudos de caracterização genômica, química e fisiológica do tomate, sendo esta uma variação em miniatura das linhagens comerciais da planta pelo qual devido à sua estatura reduzida, apresenta suscetibilidade de cultivo em ambientes com densidade populacional aproximada de até 1.357 plantas por metro quadrado (SUN *et al.*, 2006). O ciclo de vida curto é um fator chave que explica a ampla utilização biotecnológica do Micro-Tom, permitindo a colheita de frutos maduros entre 70 e 90 dias após a germinação das sementes. Com base na disponibilidade do conteúdo científico sobre o Micro-Tom, essa linhagem apresenta ainda estratégias de transformação genética consolidadas na literatura, fator que possibilita a utilização do Micro-Tom como uma plataforma para a implementação de estudos com foco na identificação e caracterização de genes com potencial biotecnológico, com rendimento superior a outras plantas modelo, como *Arabidopsis* e o arroz (KOBAYASHI *et al.*, 2014).

O extensivo processo de pesquisa envolvendo linhagens de tomate, como a Micro-Tom, transformaram o tomate em uma cultura de importância econômica mundial e

pioneiro no comércio de transgênicos em todo o mundo como a primeira planta geneticamente modificada a receber autorização para o cultivo comercial pela US Food and Drug Administration em 1992, pelo qual, o tomate Flavr Savr (Calgene) com o silenciamento do gene codificante para a enzima polygalacturonase (PG) (SHEEHY *et al.*, 1987), apresentava retardo no processo de amadurecimento dos frutos, processo que permite um período prolongado de exposição do fruto ao ambiente comercial (KRAMER; REDENBAUGH, 1994).

Atualmente, outras 13 linhagens selvagens de tomate ainda são encontradas em parte da costa oeste da América do Sul, nos Andes, bem como nas Ilhas Galápagos. Por sua vez, iniciativas conservacionistas dedicam esforços na incorporação destas linhagens a bancos de germoplasma, sendo que, cada novo estudo de caracterização elucida genes de importância biotecnológica, possibilitando a sua incorporação híbrida à linhagens comerciais de forma a permitir respostas otimizadas contra eventos limitantes para a produção agrícola do tomate em todo o mundo (SCHAUER; ZAMIR; FERNIE, 2005).

A ampla disseminação geográfica do tomate e a sua adaptação às mais diversas condições climáticas contrastam com as exigências de cultivo desta planta, sendo que, desde meados de 1960, programas de melhoramentos de cultivares em todo o mundo direcionaram o seu foco para a obtenção de linhagens comerciais de tomate com alto valor comercial agregado, priorizando fatores como: alto perfil nutricional, rendimento de produção uniforme, bem como a aceitação de estratégias de cultivo baseadas em agroquímicos (DORAIS; EHRET; PAPADOPOULOS, 2008). Por outro lado, devido aos perfis de tolerância e/ou resistência análogos observados em linhagens selvagens de tomate, a implementação de estudos com foco em hibridização de linhagens se mostra como um caminho oportuno, permitindo assim a obtenção de variedades comerciais aprimorada (KHARKONGAR *et al.*, 2013). Em contrapartida, estratégias de hibridização de linhagens baseadas em cruzamentos induzidos, bem como em enxertamento, apresentam, por vezes, barreiras evolutivas que culminam no baixo custo benefício destas metodologias quando considerada a incorporação de um carácter alvo, bem como a manutenção da qualidade e produtividade agrícola dos frutos (RIGA, 2015).

Ainda sobre as variedades comerciais de tomate comumente cultivadas, fatores bióticos e abióticos podem afetar diretamente o seu rendimento de produção agrícola, dentre estes, destacam-se: as características físico-químicas do solo (aeração, compactação, temperatura e o teor de água acessível do solo), a indisponibilidade de nutrientes, bem como a presença de pragas (NETO *et al.*, 2018). A predação, por sua vez,

é a maior causa de perdas agrícolas no mundo para culturas como a do arroz, batata e café, sendo que, com relação ao tomate, estas perdas podem representar entre 20 e 30% da produção total (MAZZEI *et al.*, 2021; SEID *et al.*, 2015). Um outro ponto diz respeito ao fato de que a ocorrência de eventos predatórios de forma pontual ou persistente, bem como danos resultantes destes, podem culminar em perda significativa da biomassa, estresse oxidativo, alterações metabólicas e estruturais, ou ainda na perda generalizada das plantas em culturas comerciais. Dada a importância comercial e cultural do tomate em âmbito mundial, os obstáculos associados ao manejo das principais suas pragas predatórias contrastam com um aumento crescente na demanda por este fruto em todo o mundo, processo este que está em concordância com um crescimento exponencial da população global e que exige da cadeia de produção alimentar uma maior disponibilidade do tomate, bem como rápido aprimoramento das estratégias agrícolas e genótipos comerciais cultivados (LINDELL *et al.*, 2018).

Até o ano de 1950, a população mundial totalizava cerca de 1 bilhão de pessoas, sendo que, somente nos últimos 70 anos, um acréscimo exponencial de cerca de 152% elevou a marca atual para cerca de 7,7 bilhões de pessoas (LAL, 2007). Dentre outros fatores que explicam o crescimento populacional citado está o aumento gradual na expectativa de vida das pessoas, processo que é reflexo, dentre outros fatores, de uma maior acessibilidade nutricional básica. Estudos apontam para os próximos anos uma taxa de crescimento populacional de 1,2% ao ano em escala mundial, exigindo dos sistemas de geração de alimentos, maiores acumulados de produção, bem como uma maior oferta de alimentos no mercado, o que, segundo especialistas, resultaria em uma redução gradual dos preços e na distribuição igualitária desses bens de consumo de forma (COHEN, 2003). Com base nestes dados e na necessidade da otimização das técnicas de produção agrícolas para as próximas décadas, centros de pesquisa em todo o mundo direcionam seus esforços na busca por abordagens que permitam extrair de terras cultiváveis, elevadas taxas de produção líquida, processo este que se dá pela otimização das técnicas atuais de manejo agrícola, bem como pelo combate a pragas e doenças do campo, possibilitando a equiparação entre oferta e demanda nutricional humana para as próximas décadas (PINILLA *et al.*, 2018; FITTON *et al.*, 2019).

2.2. Aumento na demanda por alimentos

Desde meados do século XX, uma ampla gama de estudos com foco conservacional apontaram riscos ambientais associados à expansão desordenada da produção agrícola em todo o mundo (AHMED *et al.*, 2021; BAI, MENGYAN *et al.*, 2020; BILLEN *et al.*, 2021; HANSEN *et al.*, 2019). Por sua vez, o avanço da agricultura tem sido alvo de questionamentos por meio da expansão gradual das áreas cultiváveis, processo que, por vezes, resulta na redução de áreas preservadas ocupadas por espécies nativas, bem como danos à integridade dos sistemas fluviais e suas nascentes (BERNERS-LEE *et al.*, 2018). Em contrapartida, os pontos levantados contrastam com a expectativa crescente de aumento da população mundial para as próximas décadas, sendo que, segundo estimativas do Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais das Nações Unidas, espera-se um acréscimo de cerca de 2 bilhões de pessoas até o ano de 2050, elevando a população mundial para cerca de 9,7 bilhões de pessoas (Nações Unidas Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, 2015). Estas perspectivas, segundo Ingram (2020), reforçam uma pressão existente sobre a cadeia de produção de insumos a um ponto próximo da insustentabilidade, processo que pode resultar na indisponibilidade de alimentos e no comprometimento da nutrição básica (segurança alimentar) em países desenvolvidos e subdesenvolvidos em um futuro próximo (INGRAM, 2020).

No ano de 1996, a Cúpula Mundial da Alimentação definiu o termo “Segurança Alimentar” como sendo “o acesso econômico a alimentos seguros e nutritivos suficientes para todas as pessoas e em todos os momentos, de forma a atender às suas necessidades e preferências alimentares para uma vida ativa e saudável” (FAO 1996). Segundo Temesgen e Retta (2015), atualmente, o comprometimento da segurança alimentar é um dos principais fatores limitantes à expectativa de vida em regiões da Ásia, África e em países da América Latina, sendo que, metas firmadas por países membros da Organização das Nações Unidas (ONU) reforçam o comprometimento dos países em erradicar a fome e a miséria, metas estas que estão em concordância com o aumento da produção alimentar resultante do crescimento da população mundial (FAO, 2015; TEMESGEN *et al.*, 2015). Por sua vez, apesar do empenho global com foco na produção alimentar escalonada evidenciado nas últimas décadas, ainda em meados de 2010, quase 1 bilhão de pessoas se encontravam em situação de insegurança alimentar em todo o mundo (SRINIVASAN *et al.*, 2010), sendo que, segundo a ONU, cerca de 690 milhões de pessoas encontram-se atualmente em situação de fome, pelo qual, mesmo nos EUA o problema afeta cerca de 13

milhões de lares a cada ano (Wisconsin WIC Programa 2007) (BRIONES ALONSO; COCKX; SWINNEN, 2018; INGRAM, 2011). Estudos mais recentes da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization) revelaram um agravamento na condição nutricional básica em escala mundial, demonstrando que, entre os anos de 2015 e 2018, o mundo atingiu a marca de cerca de 820 milhões de pessoas em situação regular de fome em âmbito mundial, processo que se mostra em discordância com as crescentes taxas de produção e distribuição de alimentos em todo o mundo (BOLIKO, 2019).

Neste sentido, uma combinação de fatores comerciais, como as altas demandas por agrocombustíveis, bem como a erosão gradual dos mercados financeiros mundiais ainda resultante da crise que marcou o final da década anterior, propiciaram um aumento exponencial dos preços da alimentação básica, bem como escassez de alguns dos principais bens de consumo em diversos países, dentre estes: carnes e cereais. Como estratégia para contornar este evento, medidas de controle de exportação de alimentos passaram a ser adotadas por países produtores, culminando na redução do acesso aos bens de consumo e no aumento nos preços no mercado internacional. O resultado deste processo foi o receio generalizado de uma crise alimentar em escala global, alertando o mercado mundial para a necessidade da rápida modernização dos sistemas de produção e distribuição de alimentos em todo o mundo (ROSEN, 2017; TYCZEWSKA *et al.*, 2018).

Ainda neste sentido, Tilman e colaboradores (2011) apresentam em seu estudo de predição da demanda agrícola futura, perspectivas de um aumento entre 100% e 110% para as próximas três décadas (TILMAN *et al.*, 2011). Em contrapartida, a necessidade crescente de uma maior produção agrícola contrasta com a influência que alguns fatores bióticos e abióticos podem representar para a produção no campo, dentre estes, destacam-se a baixa disponibilidade de nutrientes no solo, a escassez hídrica, bem como a ação de pragas. A predação por pragas, em especial a predação de insetos, é um dos principais fatores causadores de perdas em culturas em todo o mundo, dados que podem chegar à metade de toda a produção de algumas das principais culturas mundiais. Dentre as principais culturas que se destacam pelos altos índices de predação agrícola está o tomate, responsável por perdas anuais que podem chegar à casa dos US\$ 4.000 ha. Dentre outros fatores que explicam os altos danos econômicos resultantes da predação do tomate, está a ausência de mecanismos naturais de defesa da planta somada a sua grande importância alimentar e cultural para a economia mundial (DA SILVA *et al.*, 2017). De um ponto de vista geral, o aumento na demanda agrícola para culturas como a do tomate se ancora a necessidade de mudanças graduais das técnicas de produção comumente utilizadas, sendo

que, dentre os agentes predatórios causadores de perdas em culturas de tomate em todo o mundo, a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) destaca-se devido à sua alta capacidade predatória, bem como pela suscetibilidade disseminadora em todo o mundo (BAI, MENGYAN *et al.*, 2020; SYLLA *et al.*, 2019).

2.3. *Tuta absoluta*

Dentre os predadores naturais mais frequentes encontrados em culturas comerciais de tomate na América do Sul, está a traça-do-tomateiro, pequenas mariposas pertencentes à família *Gelechiidae*, medindo cerca de 10 mm de envergadura e 6 mm de comprimento e ciclo de vida compreendido entre 26 e 30 dias. Tendo sido primeiramente descrita por Meyrick em 1917, *T. absoluta* é nativa da América do Sul. No entanto, os danos generalizados ocasionados pela sua fase larval são responsáveis por perdas na produção de tomates na Europa, China e também no continente africano. *T. absoluta* apresenta em seu leque de alvos predatórios uma ampla gama de hospedeiros secundários, incluindo a batata (*S. tuberosum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), berinjela (*S. melongena*), beterraba (*Beta vulgaris*), e pimentão (*Capsicum sp.*). Em contrapartida, *T. absoluta* caracteriza-se por danos substanciais em produções comerciais de tomate em todo o mundo, sendo que, desde a sua descrição, estudos de densidade populacional de *T. absoluta* apontam para uma taxa de infestação geral de cerca de 5% da produção do tomate em todo o mundo (CHERIF; VERHEGGEN, 2019).

Por sua vez, o início da primeira década do milênio foi marcado por um alerta associado à invasão de populações de *T. absoluta* no Oriente Médio, África, Ásia e na América do Norte. Devido à suscetibilidade de disseminação geográfica da *T. absoluta*, esta praga foi incorporada à lista de pragas quarentenárias de grau A2 (<https://gd.eppo.int/taxon/GNORAB>) pela Organização de proteção de plantas (European and Mediterranean Plant Protection Organization - EPPO), este banco de dados classifica a *T. absoluta* como uma praga em expansão global, com relevância econômica para a região e o selo A2 reitera que se trata de uma praga localmente presente na região da Europa e do Mediterraneo (RODITAKIS; PAPACHRISTOS; RODITAKIS, 2010). A rápida disseminação geográfica de *T. absoluta* reforça a alta capacidade adaptativa desta praga as mais adversas condições ambientais, apresentando um intervalo de temperatura e desenvolvimento que varia entre 14 °C e 30 °C, atingindo o pico do desenvolvimento populacional em temperaturas próximas a 30 °C (MARTINS *et al.*, 2016). Neste sentido,

T. absoluta apresenta um ciclo de vida variável, adaptando-se ao período fenológico do hospedeiro e atingindo o seu pico proliferativo durante o período de maturidade da planta (CHERIF; VERHEGGEN, 2019). Apesar da disseminação recente de *T. absoluta* pela Eurásia e devido ao seu hábito predatório generalizado em áreas de plantios, esta praga tem se tornado uma fonte de receio generalizado para a produção mundial de tomate. Neste sentido, o comportamento da *T. absoluta* se caracteriza pela interação dos indivíduos em fase adulta, com o acasalamento seguido da postura dos ovos que podem chegar a uma marca de até 55 ovos por fêmea (ERDOĞAN & BABAROĞLU, 2014). Os ovos apresentam coloração amarelada e formato elíptico, sendo que, após a eclosão, originam larvas com cerca de 6 a 9 mm de comprimento. As larvas, por sua vez, garantem a fase predatória que caracteriza a praga em questão, está, por meio da penetração no parênquima foliar, bem como nas flores e ramos pela formação de minas no interior do tecido e nos frutos, pela formação de galerias (**Figura 1**) (MOUSSA *et al.*, 2013). Estudos recentes evidenciaram a presença de perfis genéticos de tomates *wild type* caracterizados por um grau significativo de resistência contra insetos, ácaros e outros predadores, dentre estes, *T. absoluta* (DE AZEVEDO *et al.*, 2003). Esta resistência associa-se a uma maior produção e secreção de compostos aleloquímicos com ação repelente, permitindo o retardo e/ou a interrupção do processo de minação larval (BIONDI *et al.*, 2018). Dados de produção agrícola mundial apontam *T. absoluta* como responsável pela grande maioria dos danos predatórios observados em culturas de tomate em todo o mundo, podendo variar entre 80 e 100% da produção total em regiões subtropicais (BAJRACHARYA; BHAT, 2018).

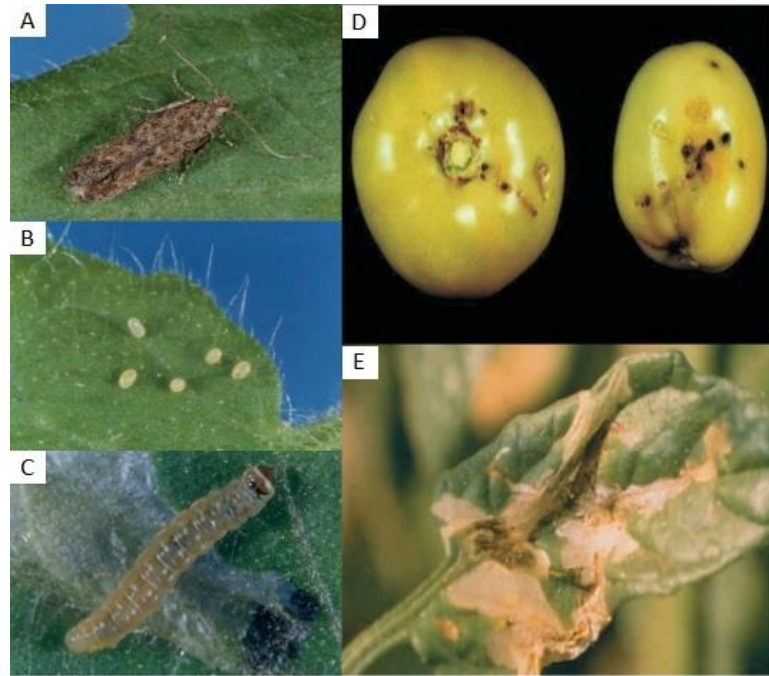


Figura 1. Biologia comportamental de *T. absoluta*. (A) Fase adulta, (B) Ovos postados após acasalamento, (C) Fase larval predatória, (D) Efeito de abertura de galerias em frutos e (E) Efeito de formação de minas em parênquima foliar. Imagem modificada de Villas Bôas et al., 2009.

Com base na alta disseminação geográfica de *T. absoluta*, bem como pela atenção comercial associada a esta espécie, estratégias de manejo desta praga têm sido avaliadas em todo o mundo, sendo que, nas últimas décadas, estratégias baseadas no biocontrole da *T. absoluta* têm sido propostas (DE CAMPOS *et al.*, 2020; URBANEJA *et al.*, 2012; VAN LENTEREN *et al.*, 2021). Estas técnicas, por vezes, se baseiam na implementação de espécies predadoras que possam repelir e/ou preda ovos, larvas e adultos de *T. absoluta* de forma generalizada, alguns exemplos de espécies avaliadas são: parasitóides (PRATISSOLI *et al.*, 2005), plantas biopesticidas (BRUNHEROTTO; VENDRAMIM, 2001), insetos (PICANÇO *et al.*, 2011), bem como bactérias secretoras de citotoxinas (SABBOUR; SOLIMAN, 2014). Atualmente, estudos realizados na América do Sul (FERRACINI *et al.*, 2019; LUNA *et al.*, 2015), Europa (FERRACINI *et al.*, 2019), bem como na Ásia (HAN *et al.*, 2018; SALAS GERVAISSIO *et al.*, 2019) e na África (CHEPCHIRCHIR *et al.*, 2021; MATERU *et al.*, 2016) reforçam a ocorrência de relações tróficas entre espécies predadoras nativas e *T. absoluta*, em contrapartida, dados publicados divergem acerca da viabilidade do biocontrole de *T. absoluta* no campo, isso devido aos altos custos associados, bem como os riscos que envolvem a inserção e a manutenção dos agentes controladores para com a fauna e a flora locais (DESNEUX *et al.*,

2022). Outro ponto importante associado ao biocontrole de *T. absoluta* é o fato de que mesmo linhagens de plantas selvagens biopesticidas apresentam, por vezes, uma baixa produção dos compostos citotóxicos, bem como um espectro de ação limitado contra a praga alvo. Uma alternativa às limitações do biocontrole de *T. absoluta* tem sido o seu manejo químico por pesticidas sintéticos, permitindo a intervenção rápida e simplificada do processo de proliferação da praga, deixando evidente o custo benefício da técnica em relação a outras metodologias aqui já citadas.

2.4. Manejo de *T. absoluta* por pesticidas

Agentes agroquímicos, dentre estes, os pesticidas, têm sido amplamente utilizadas nas últimas décadas, sendo estes, princípios ativos responsáveis por repelir e/ou interromper a proliferação de pragas predatórias, bem como a disseminação de doenças vectoriais e resultando, por vezes, em um acréscimo expressivo nas taxas de produção por área cultivada (BHAT; KHAJURIA; MANSOTRA, 2019). Por sua vez, a denominação aprofundada de “pesticida” refere-se a moléculas isoladas ou combinadas caracterizadas com base em sua capacidade em atuar na prevenção, interrupção, bem como na refutação de um vetor infectivo e/ou predador, agrupando um diversificado número de substâncias, como os herbicidas, nematicidas, inseticidas, moluscicida, avicidas, raticidas, bactericidas, bem como antimicrobianos e fungicidas. Com base nisto, estes podem ainda ser agrupados com base em suas derivações químicas, como sendo sintéticos ou biopesticidas, sendo que, quando sintéticos, estes são subgrupados com base em sua conformação molecular em cinco categorias: organoclorados, organofosforados, carbamatos, neonicotinoides e piretroides (PANG; YANG; HE, 2016).

Desde meados de 1950, a utilização comercial dos primeiros pesticidas sintéticos como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), 2,4-D e BHC tornaram possível a implementação da chamada revolução verde para a agricultura mundial, sendo que, nos anos que se sucederam, estudos analíticos revelaram um aumento gradativo na produção agrícola para os principais países produtores, processo que se associa com a ampla difusão dos pesticidas em escala global. Atualmente, estima-se que sejam utilizados anualmente cerca de 3.5 milhões de toneladas de pesticidas em todo o mundo, sendo que, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, a Índia é o maior produtor destes princípios ativos no mundo, mercado que, em sua maioria, destinando-se aos EUA, Europa e América do Sul (LI *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2019;

ZHANG, 2018). Por sua vez, a produção e/ou comercialização de pesticidas é regimentada por agências sanitárias de cada país, processo que tem como base o Código de Conduta e Utilização de Pesticidas da Organização para a Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization - FAO) (SARKAR et al., 2021), considerado um documento modelo para regulamentar a produção, comercialização e o uso de pesticidas em âmbito global. Atualmente, a China se destaca pelas maiores taxas de aplicação de pesticidas por hectare cultivada, alcançando a marca de até 5 vezes (13kg/ha) a média mundial (FAO, 2020).

Nas últimas décadas, devido ao crescimento econômico de culturas como o tomate em todo o mundo, um número cada vez maior de estudos tem apontado para uma correlação entre a utilização de pesticidas sintéticos e a redução de perdas pela ação de predadores naturais, com destaque para ácaros (RAKHA *et al.*, 2017), moscas (QADIR et al., 2022) e traças (ATAIDE et al., 2017), dados que, segundo Mazzei e colaboradores (2021), podem representar uma redução média de até 30% de perdas totais. De um modo geral, métodos seguros para a utilização destes compostos são previamente definidos com base na legislação vigente em território nacional. Por exemplo, compete aos estados e ao Distrito Federal legislar acerca do uso, produção, consumo e comércio de agrotóxicos em território nacional, sob supervisão da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA, definindo parâmetros que vão desde o limite máximo de resíduos permitidos, o tempo de exposição ao agente químico e o intervalo para a comercialização segura dos alimentos pós-colheita (Lei nº 7802). Em contrapartida, devido ao perfil molecular dos princípios ativos comumente utilizados na agricultura, o manejo químico traz à tona questionamentos associados a riscos ambientais, bem como para a saúde humana e animal decorrentes da utilização indiscriminada destes agentes agroquímicos, sendo que, alguns estudos até mesmo sugerem que a *T. absoluta*, espécie alvo do estudo aqui implementado, apresenta padrões diversos de suscetibilidade ao manejo químico nas diferentes fases do seu ciclo de vida, pelo qual, Salazar e Araya (2021) relatam padrões de tolerância química divergentes entre indivíduos de *T. absoluta* em início da sua fase larval e na fase final (SALAZAR & ARAYA, 2001; MAZZEI *et al.*, 2021). Outro ponto diz respeito ao fato de que desde meados de 1990, um padrão de baixa eficiência tem sido frequentemente relatado em análises de efetividade do manejo sintético de *T. absoluta*, em especial, na América do Sul (GUEDES & SIQUEIRA, 2012; GUEDES et al., 2019), sendo que, segundo especialistas, estes padrões de resistência resultam, dentre outros fatores, da utilização reiterada de pesticidas sintéticos no controle de pragas variadas nas últimas

décadas, até mesmo com múltiplas aplicações por plantio, resultando no surgimento de resistência em populações de *T. absoluta* em todo o mundo (GUEDES *et al.*, 2019; SIQUEIRA; GUEDES; PICANÇO, 2000). No Brasil, *T. absoluta* reitera o seu perfil predatório como uma das principais pragas de tomate, sendo que, segundo Siqueira e colaboradores (2000) em seu estudo de caracterização de resistência pesticida associada à populações de *T. absoluta*, uma alta frequência de perfis resistentes foram observados em indivíduos coletados em diversas regiões do Brasil, com ênfase na resistência contra os agentes *abamectin* e *cartap*, dois dos principais pesticidas utilizados no Brasil nas últimas décadas (SIQUEIRA; GUEDES ; PICANÇO, 2000).

Em contrapartida, o receio generalizado acerca do uso comercial dos pesticidas sintéticos a longo prazo não se limita tão somente ao surgimento de resistência em populações de pragas alvo, nas últimas décadas, instaurou-se um receio generalizado acerca da segurança do manejo agrícola mediado por pesticidas sintéticos associados a acumulação dessas moléculas de forma gradativa ao longo do tempo de produção decorrido (BUAH-KWOFIE; HUMPHRIES; PILLAY, 2018). Neste sentido, estudos de segurança alimentar realizados ao longo dos últimos anos evidenciam a presença, em concentrações elevadas, de frações químicas resultantes da utilização de inseticidas (CHOWDHURY; RAZZAQUE; KHAN, 2011), fungicidas (MELO *et al.*, 2012) e herbicidas (WANG *et al.*, 2020) sintéticos em culturas de tomate em diversos continentes, expondo contrapontos socioambientais que colocam em xeque a utilização comercial segura a longo prazo destes agentes, sendo que, dentre outros pontos levantados, os riscos evidenciados fazem referência à acumulação destes componentes no solo, água, bem como em plantas e animais, processo que pode resultar em desequilíbrio na ciclagem natural de nutrientes e minerais no meio ambiente, como nitrato e fosfato (PAQUETTE *et al.*, 2013). Considerando os riscos associados à saúde humana, a exposição concentrada aos pesticidas pode resultar em danos temporários e/ou persistentes à integridade física dos indivíduos, variando desde sensibilidades suaves, danos dermatológicos, danos ao sistema respiratório e neurotoxicidade. Por sua vez, a exposição prolongada a estes agentes químicos e seus derivados, pode ocasionar comprometimento do sistema metabólico, reprodutivo, bem como no surgimento de câncer.

A composição química dos pesticidas varia amplamente entre as principais famílias agroquímicas comerciais, com destaque para o princípio ativo glifosato, herbicida responsável por 62% das aplicações em território brasileiro para culturas transgênicas como milho (PETERS *et al.*, 1973) e soja (PADGETTE *et al.*, 1995). O glifosato foi

inicialmente descrito pelo químico Henri Martin, tendo sido amplamente utilizado na indústria para a restauração de peças metálicas e como base para o desenvolvimento do agente herbicida em 1970 pela empresa Monsanto. No ano de 2015, a International Agency for Research on Cancer (IARC) divulgou um relatório em que é associada à exposição humana e animal ao glifosato, a ocorrência de genotoxicidade e estresse oxidativo em células animais, processo que é, por vezes, associado ao surgimento de mutagenicidade (FRITSCHI et al., 2015).

No meio ambiente, os riscos associados à utilização indiscriminada dos pesticidas referem-se à composição molecular generalizada de alguns destes agentes, sendo que, a insolubilidade, bem como a reatividade de alguns destes agentes, impede, por vezes, a incorporação natural dos mesmos ao metabolismo de plantas, animais e microrganismos no meio, tornando-os componentes acumulativos denominados xenobióticos. Desde meados do século XX, o avanço da indústria, da medicina e da agricultura alavancou a produção e utilização destes componentes químicos sintéticos e, bem como a acumulação do produto residual destes componentes no meio. Na agricultura, por sua vez, a ocorrência crescente destes contaminantes no campo tornou-se um problema de saúde pública em todo o mundo, sendo que, a inexistência de vias de secreção destes contaminantes em plantas evidenciam os riscos associados a acumulação destes contaminantes em vias de alimentação humana e animal (KOSCHMIEDER et al., 2021). Em animais, por sua vez, o processo evolutivo propiciou o surgimento de vias de secreção de uma ampla gama de contaminantes. No entanto, dentre outras características relativas a estes contaminantes, a sua conformação molecular, por vezes, inviabiliza a solubilização destes agentes em meio intracelular, impedindo a incorporação destas moléculas as vias de desintoxicação celular, resultando, por vezes, em bioacumulação residual. Especialistas associam a expansão industrial, bem como o avanço da agricultura, às principais causas do aumento na ocorrência de eventos de contaminação por compostos xenobióticos no ambiente, processo este que resulta da má destinação destes químicos no meio ambiente.

De um modo geral, a baixa eficiência frequentemente relatada no manejo de algumas das principais pragas comerciais por manejo sintético, seguido do risco associado à utilização destes compostos, reforçam a necessidade da busca por biomoléculas alternativas com efetividade e segurança. Neste sentido, a engenharia genética apresenta-se como uma ferramenta capaz de possibilitar a obtenção de linhagens portadoras de perfis genéticos melhorados que possibilitem uma resposta otimizada frente a eventos de infestação de pragas por meio da expressão gênica de transgenes codificadores de

biomoléculas caracterizadas com base em seu mecanismo de ação contra uma ou mais pragas alvo (LIU *et al.*, 2021; RUIU, 2018).

2.5. A genômica a serviço da agricultura

Desde a elucidação da estrutura do DNA em 1953 por Watson e Crick (WATSON & CRICK, 1993), pesquisadores em todo o mundo tem dedicado seus esforços em abordagens que permitam a expansão do reconhecimento literário acerca do genoma de microrganismos, plantas e animais para a incorporação de genes de interesse biotecnológico ao genoma de uma gama de organismos de relevância econômica, com destaque para as culturas agrícolas comerciais. Considerando a necessidade crescente da obtenção de avanços no combate aos efeitos danosos às adversidades ambientais, bem como a ação de pragas podem representar na produção agrícola, a incorporação da técnica do DNA recombinante a agricultura representou um dos maiores avanços para a produção de alimentos desde a domesticação de algumas das principais culturas comerciais comumente cultivadas ao longo da história da humanidade (FRIEDRICHS *et al.*, 2019; NAIK *et al.*, 2019).

Tendo como base os mecanismos de homologia e reparo do DNA, o advento do DNA recombinante tem possibilitado a obtenção de cultivares portadores de genomas híbridos, processo resultante da combinação heteróloga de fragmentos de DNA de origens distintas, permitindo, por exemplo, a incorporação de um gene marcador de resistência ou tolerância contra um dado fator biótico ou abiótico e otimizando o arremate de linhagens de interesse comercial. Nas últimas décadas, a ampla utilização da recombinação do DNA para a agricultura, se deve, dentre outros fatores, às limitações de eficiência apresentadas por metodologias baseadas no melhoramento clássico de cultivares, sendo que, enquanto às metodologias convencionais baseadas em cruzamentos induzidos, por vezes, apresentam incertezas quanto a incorporação do carácter alvo, além de demandarem um maior tempo decorrido de trabalho e custos elevados de produção, a recombinação genética permite a incorporação de um carácter alvo de forma rápida e como com alta especificidade (JINEK *et al.*, 2012; YANG & GAO, 2018).

Dentre os transgenes de interesse agrícola exaustivamente pesquisados nos últimos anos, destacam-se genes associados a tolerância hídrica (DARMANTI *et al.*, 2016; GOEL *et al.*, 2011), genes de interferência contra induções virulentas (CHUNG & JANDER, 2022), bem como toxinas biopesticidas contra pragas (ALMEIDA *et al.*, 2021), em

especial, genes associados a defesa contra predadores naturais. Desde meados de do século XX, a caracterização molecular e genômica de uma ampla gama de toxinas microbianas tem se tornado alvo de estudos biotecnológicos, isto se dá pela atividade citotóxica característica de algumas destas toxinas contra grupos de pragas agrícolas de relevância econômica, com destaque para fragmentos codantes das chamadas toxinas Bt que são parte integrante do genoma da espécie *B. thuringiensis* e portadoras de um vasto acervo literário, tendo sido extensivamente isoladas para o controle de pragas de relevância comercial desde meados do século XIX (KAHN *et al.*, 2021; MARQUES *et al.*, 2018).

2.6. *B. thuringiensis*

B. thuringiensis é uma espécie de bactéria gram-positivas pertencentes à família *Bacillaceae*, que foi primeiramente isolada por Ishiwata, em 1901, em larvas do bicho da seda (ISHIWATA, 1901). Dentre a ampla diversidade de ambientes ocupados por *B. thuringiensis*, culturas desta bactéria podem ser comumente isoladas em amostras de solo, água, bem como em material biológico em decomposição. Ao final do século XX, *B. thuringiensis* tornou-se alvo de investidas de interesse biotecnológico devido ao fato de que, quando expostas a eventos como escassez de alimentos e/ou alta densidade populacional, o acúmulo de proteínas sinalizadoras desencadeia eventos de esporulação, sendo estas estruturas vegetativas compostos, em grande parte, por corpos de inclusão localizados em posição parasporal em formas diversas como: irregulares, esféricas, ovais e/ou bipiramidais. Dentre a diversidade da composição proteica e estrutural do esporo de *B. thuringiensis*, destaca-se as inclusões cristalinas denominadas δ -endotoxinas, um amplo grupo de toxinas que entre outras características, apresentam propriedades imunorreguladoras (BORIN *et al.*, 2021; RUBIO; BRAVO; OLMOS, 2017), bem como alta letalidade em interações com fases larvais de insetos de diferentes ordens, dentre estes: Lepidópteros, Dípteras e Coleópteros, além de outros organismos como: bem como lagartas, ácaros e protozoários. A eficiência de *B. thuringiensis* em expressar um ou mais genes codificantes de endotoxinas de esporos durante a sua fase estacionária permite um alto espectro de atuação patogênica oportunista contra larvas de insetos e outros organismos enfraquecidos (HECKEL, 2020; SCHNEPF *et al.*, 1998).

As δ -endotoxinas são objetos de estudo biotecnológico desde meados de 1870, podendo ser definidas como lipopolissacarídeos formados, em parte, pelo seu conteúdo interno proteico. Nas últimas décadas, investidas científicas foram idealizadas para as δ -

endotoxinas de *B. thuringiensis* como biopesticidas para o uso na agricultura comercial e no controle de pragas em geral, esse processo se dá pelo fato de que, dentre a ampla diversidade de toxinas que compõem este grupo, como: parasporinas, S-layer, Vip, proteínas Sip, bem como as toxinas do tipo Cristal (Cry) e Citolítica (Cyt), as toxinas Cry e Cyt tem sido extensivamente descritas pelo seu amplo espectro de toxicidade conhecida contra grupos taxonômicos de insetos, pela sua baixa toxicidade contra células de mamíferos, outros animais e plantas, bem como pela suscetibilidade destas biomoléculas em ser biodegradadas em um curto espaço de tempo (DUARTE NETO *et al.*, 2020; MAJUMDER *et al.*, 2018).

2.7. Família de toxinas Cry

O perfil citotóxico atribuídos às endotoxinas Bt do tipo Cry e Cyt está associado à pronta solubilização das mesmas em pH 8,0 característico do aparato intestinal de hospedeiros naturais da *B. thuringiensis*, como: insetos, sendo posteriormente ativadas pela remoção proteolítica de um peptídeo N-terminal com cerca de 30 aminoácidos, evento que possibilita a sua interação com receptores celulares do epitélio do intestino médio do organismo alvo (HECKEL, 2020). Por sua vez, as proteínas Cry e Cyt pertencem a um grupo proteico denominado proteínas formadoras de poros (pore-forming toxins PFT), sendo elas subdivididas com base em suas estruturas secundárias, bem como na interação frente as membranas hospedeiras (**Figura 2**), processo este que ocorre por meio da formação de canais iônicos transmembranares resultantes da disposição estrutural de feixes em α -hélice, que para as toxinas Cry, corresponde ao seu domínio I. Em contrapartida, a formação de um barril de monômeros de folhas- β se dá para toxinas pertencentes a família β -barril. Neste sentido, a família alfa-helicoidais é composta por toxinas como: exotoxina A, colicina, toxinas 3d-Cry, sendo que a família β -barril inclui, dentre outras, as toxinas: perfringolisina O, aerolisina, hemolisina, bem como as toxinas Cyt. Em ambos os casos, a formação dos poros supracitados é sucedida do extravasamento do conteúdo intracelular hospedeiro, processo este que proporciona aos esporos, um meio de germinação e que por vezes resulta em um quadro de septicemia e na resultante morte do indivíduo (BRAVO; GILL; SOBERÓN, 2007).

De um modo geral, as toxinas Cry são classificadas com base em sua estrutura primária, sendo divididas em 54 grupos principais (Cry1-54), bem como em uma ampla diversidade de toxinas variantes caracteristicamente nomeadas pela presença de letras. Em

sua maioria, as toxinas Cry apresentam 3 domínios moleculares, sendo comumente classificadas por toxinas 3d-Cry. Os domínios II e III são caracteristicamente conservados e apresentam certo grau de similaridade com outras toxinas Bt, já o domínio II é formado por um conjunto de 3 folhas- β antiparalelas que configuram um núcleo hidrofóbico e garantem a exposição das chamadas regiões de loop, envolvidas com a interação para com o receptor da célula hospedeira (BRAVO; SOBERÓN, 2008).

O domínio I (N-terminal), é composto por um conjunto de 7 α -hélices dispostas em feixes, sendo esta conformação caracteristicamente ressaltada pela presença de uma hélice hidrofóbica disposta no centro (α -5). Por sua vez, a presença da hélice α -5 permite a interação desta com receptores específicos, sendo muito recorrente a interação específica com os receptores do caderina, abundantes nas microvilosidades das células epiteliais do intestino médio de uma ampla gama de organismos em sua fase larval. Estudos de inibição de receptores de caderina em culturas celulares têm demonstrado a redução da toxicidade da Cry em larvas de insetos (GÓMEZ *et al.*, 2001), demonstrando a importância da esta interação inicial, processo fundamental para a oligomerização da toxina por fragmentação proteolítica, permitindo a interação da toxina recém oligomerização para com receptores secundários ancorados a bicamada lipídica, processo precursor dos eventos de toxicidade sistêmica (BRAVO; SOBERÓN, 2008; GÓMEZ *et al.*, 2002) (**Figura 2**).

Tendo como base o ciclo de vida da *T. absoluta* e mais precisamente, a sua fase larval, período que compreende a sua fase predatória em culturas de tomate, a fase larval de *T. absoluta* pode ser dividida em 4 (quatro) instares, etapas de cruciais do desenvolvimento corporal e metabólico da larva (GIUSTOLIN; VENDRAMIM; POSTALI PARRA, 2002). Neste sentido, estudos de validação da toxicidade de toxinas Bt contra diferentes estágios larvais de *T. absoluta*, têm demonstrado uma maior ação citotóxica contra larvas durante o segundo e terceiro instar, toxicidade que aumenta gradativamente com o maior período de exposição larval à toxina (4° e 5° dia). (HASHEMITASSUJI *et al.*, 2015; KANDIL; ABDEL-KERIM; MOUSTAFA, 2020; SANDEEP KUMAR *et al.*, 2020). É previamente esperado que uma maior ação citotóxica das toxinas Bt contra hospedeiros passe por dois pontos principais, sendo estes a fragmentação proteolítica das toxinas recém solubilizadas, bem como uma rápida interação molecular com os receptores presentes no corpo celular do intestino médio do hospedeiro (**Figura 2**). Sendo assim, a flutuação da toxicidade Bt em diferentes instares de *T. absoluta*, relaciona-se com dois possíveis processos, sendo estes uma maior disponibilidade proteolítica durante o 2° e 3° instar, bem como uma maior disponibilidade e/ou

variabilidade de receptores alvo, processo que reflete em uma maior ação citotóxica durante estas etapa do desenvolvimento larval (DAMMAK *et al.*, 2016).

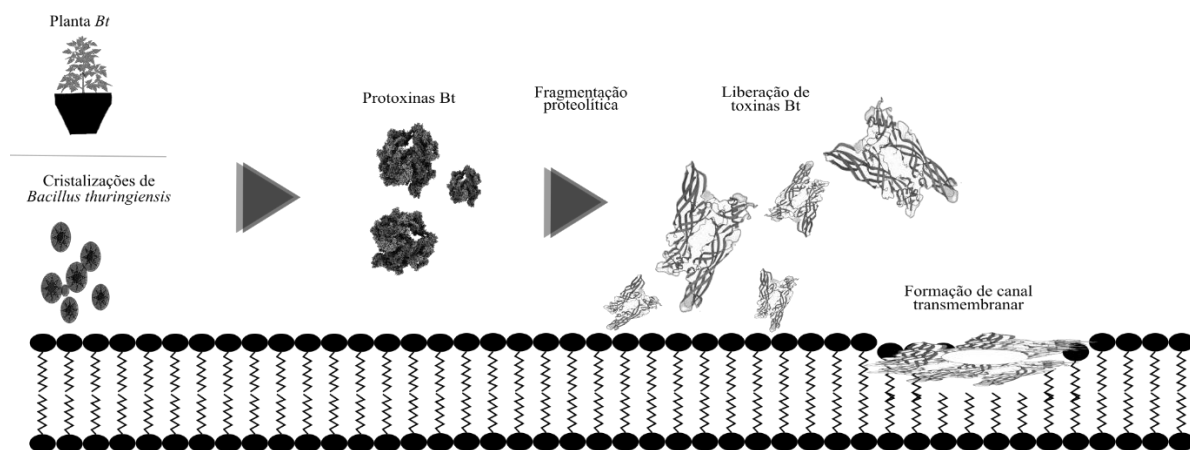


Figura 2. Mecanismos de ação membranólítica da toxina Bt. A interação específica das toxinas com as membranas hospedeiras ocorre por interação molecular com receptores celulares, seguido de um dos possíveis mecanismos de ação. (a) incorporação dos esporos de *B. thuringiensis* pelo hospedeiro, (b) dissolução das protoxinas Bt, (c) fragmentação das protoxinas por ação proteolítica, (d) interação com receptores seguida da formação de poros transmembranares.

Dentre o amplo espectro citotóxico das endotoxinas Bt contra insetos, as proteínas Cyt apresentam predominantemente toxicidade contra membros da ordem Díptera, enquanto que as proteínas Cry, apresentam um amplo espectro de ação citotóxica contra Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, bem como nematoides (HECKEL, 2020). Os genes que codificam toxinas Cry em *B. thuringiensis* estão associados, em sua maioria, a grandes plasmídeos, sendo que, estudos de diversidade genética têm demonstrado uma alta frequência na troca de genes Cry entre diferentes cepas de *B. thuringiensis* por conjugação bacteriana, processo que contribui para a diversidade genética entre cepas de *B. thuringiensis* e proporcionam um maior espectro de ação de uma determinada cepa contra uma maior diversidade de alvos biológicos (HEATH *et al.*, 2004; MENDOZA-ALMANZA *et al.*, 2020).

O amplo espectro citotóxico apresentado por proteínas Cry contra formas larvais de insetos e outras pragas resultou em um interesse crescente pela utilização comercial destas proteínas para o controle de pragas em diversos países. A formulação de pesticidas à base de toxinas Cry em sua forma isolada é um processo árduo e desfavorável do ponto de vista financeiro, acarretando em perda do material isolado e na redução do poder de ação da toxina a médio e longo prazo. Por sua vez, o enriquecimento gradual dos bancos genômicos de *B. thuringiensis*, nos quais, até o ano de 2020, cerca de 800 genes Cry haviam

sido caracterizados com base em suas similaridades e sequência de aminoácidos, proporcionaram a cada nova proteína isolada, um amplo leque de possibilidades com base na ação tóxica contra pragas antes inalcançáveis (MENDOZA-ALMANZA *et al.*, 2020).

Do ponto de vista biológico, a ampla diversidade da família de toxinas Cry reflete diretamente no potencial destas toxinas contra insetos e outros grupos predatórios. Outro ponto importante diz respeito ao potencial sinérgico destas toxinas, pelo qual, estudos demonstram uma atividade conjunta de grupos de toxinas Cry e/ou Cyt contra um ou mais hospedeiros (SALEHI JOUZANI *et al.*, 2008). Com o advento da engenharia genética, já no ano de 1990, o primeiro algodão Bt foi autorizado para plantio em escala comercial nos Estados Unidos e na Austrália, sendo que, dados apresentados em anos posteriores demonstraram uma redução do uso de agentes agroquímicos para esta cultura que ultrapassou a faixa dos 50%. Já em 2010, a primeira soja Bt capaz de expressar uma proteína Cry (*CryIAc*) foi incorporada ao mercado brasileiro pela Monsanto (Id: MON 89788 × MON 87701) (BENGYELLA *et al.*, 2018). Com base nos riscos associados bioacumulação residual pela utilização dos pesticidas sintéticos para o ambiente, desde a elucidação das primeiras toxinas Cry, um receio generalizado se formou acerca da utilização segura das culturas comerciais de plantas Bt com ênfase na possibilidade de acumulação destes compostos no solo a curto, médio e até longo prazo, processo resultante da degradação da matéria orgânica de culturas anteriores (MARCHETTI *et al.*, 2007). Estudos recentes apontam a inexistência de evidências significativas que sustentem estes riscos, sendo que, em culturas controladas e enriquecidas pela inoculação de altas concentrações de toxinas Bt em solo e em sistemas de hidroponia, segundo Saxena & Stotzky (2000), demonstram a ausência da detecção das toxinas em tecido foliar e radicular, bem como o correto desenvolvimento da fauna e microfauna para estes ambientes mesmo após sucessivas culturas Bt (SAXENA; STOTZKY, 2000).

Em meio a diversidade da família genética Cry, o processo evolutivo propiciou uma maior frequência para alguns genes, sendo que, dados de diversidade genética demonstram uma maior frequência gênica de alguns genes específicos de Cry em diferentes cepas de *B. thuringiensis*, dentre estes, destaca-se os genes pertencentes a subfamília *cry10* (EL-KERSH *et al.*, 2014). Neste sentido, Salehi Jouzani e colaboradores (2008) em seu mapeamento de toxinas Cry em isolados de *B. thuringiensis* de solo iraniano, relatam a presença de 38 diferentes perfis de genes Cry, sendo o *cry10Aa* o segundo gene observado com uma maior frequência, tendo sido descrito em cerca de 40% das cepas isoladas (SALEHI JOUZANI *et al.*, 2008). O gene codificador da prototoxina Cry10Aa foi

primeiramente identificada como parte integrante do genoma da *B. thuringiensis* subsp *israelensis* (Bti), sendo que, estudos iniciais apontaram uma alta letalidade da toxina para insetos das ordens Díptera (DE SOUZA AGUIAR et al., 2012) e Coleóptera (DE SOUZA et al., 2012)

Em outro estudo, Viana e colaboradores relataram uma frequência de detecção do gene *cry10Aa* em cerca de 50% de amostras de solo das regiões brasileiras da Amazônia, Cerrado e Caatinga (VIANAA et al., 2020). Por sua vez, Aguiar e colaboradores (2012) avaliaram a ação da proteína recombinante Cry10Aa em ensaios frente a culturas do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), sendo que os dados publicados reforçaram a alta afinidade das prototoxinas Cry10Aa contra células de *A. grandis*, bem como uma alta letalidade em bioensaio (DE SOUZA AGUIAR et al., 2012). Atualmente, outros estudos caracterizam as toxinas Cry10Aa na literatura com base em seu mecanismo de ação contra diversos grupos predatórios, dentre estes os membros das ordens Coleóptera (SALLET, 2013), Díptera (ARMENGOL et al., 2007), bem como Lepidóptera, em especial, existem relatos de citotoxicidade de Cry10Aa em mariposas (DIJAI ANTONINO DE SOUZA JÚNIOR, 2007).

Neste sentido, quando se considera a importância econômica e cultural do tomate em âmbito mundial, bem como a necessidades de alternativas associadas ao manejo da mariposa *T. absoluta*, uma das principais pragas predatórias em culturas de tomate e reconhecida como uma praga em expansão mundial, é de suma importância o estudo e a caracterização de biomoléculas alternativas que possam ser incorporadas ao leque de ferramentas para o manejo da praga supracitada. Portanto, propomos aqui obtenção e validação por bioensaio de um tomate portador do transgene codante da toxina Cry10Aa frente a ação predatória controlada de *T. absoluta*.

3. JUSTIFICATIVA

O tomate é uma das cinco maiores culturas comerciais do mundo e o patamar econômico ocupado por esta planta em cenário mundial é colocado à prova frente às vulnerabilidades da sua produção comercial, processo que está por vezes associado a eventos sazonais e/ou regulares de alterações ambientais, na disponibilidade de nutrientes, em eventos de estresse hídrico ou pela ação de predadores naturais. Considerando os danos ocasionados pela predação em culturas comerciais de tomate, um amplo grupo de espécies são a tempos conhecidas pelo seu hábito predatório em culturas comerciais de tomate,

dentre estas, está a traça-do-tomateiro (*T. absoluta*), considerada como uma praga em expansão global e responsável por perdas de produção que chegam a cerca de 5% da produção anual de tomate em todo o mundo.

Na busca por metodologias que permitam o controle da *T. absoluta* é evidenciada uma ampla gama de estudos científicos que concordam entre si com base nas limitações do manejo biológico de *T. absoluta*. Por outro lado, há riscos associados ao uso indiscriminado de pesticidas, e estudos sugerem o surgimento de resistência à agroquímicos em populações de *T. absoluta* em diferentes países, dentre estes, o Brasil. Estes dados reforçam a necessidade da busca por biomoléculas com pouca ou nenhuma toxicidade para a fauna e flora nativas, além de um amplo espectro de ação tóxica para *T. absoluta* durante uma ou mais fases do seu ciclo de vida.

Neste sentido, destacam-se as toxinas Bt, caracterizadas na literatura por meio da sua atividade citotóxica contra uma ampla diversidade de organismos com hábito predatório em culturas agrícolas. Em meio a diversidade molecular da superfamília de toxinas Bt está o subgrupo das toxinas Cry, descritas na literatura com base em sua ação citotóxica contra membros das ordens díptera, coleóptera e lepidóptera, em especial, mariposas, tendo sido implementada nas últimas décadas em sua forma isolada, como agente de controle biológico, no manejo de grupos diversos de pragas. Apesar da viabilidade do controle biológico, alguns desafios como baixo rendimento no processo de obtenção de moléculas isoladas e dificuldade de manutenção da integridade molecular das mesmas têm impossibilitado a sua utilização escalonada no meio agrícola. Neste sentido, o desenvolvimento de plantas de tomate geneticamente modificados expressando biotoxinas Cry contra os principais grupos de pragas comerciais abre caminho para a obtenção de um tomate com potencial ação citotóxica contra *T. absoluta*.

4. HIPÓTESE

O gene codificador da protoxina Cry10Aa incorporado ao genoma do tomate confere resistência a *T. absoluta*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

Expressão do transgene *cry10Aa* em tomate Micro-Tom para obtenção de resistência a *Tuta absoluta*.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1 Transformação de plantas de tomateiro via *Agrobacterium* utilizando o vetor pC2300Cry10Aa.
- 5.2.2 Caracterização genômica dos eventos obtidos por PCR e RT-PCR e Southern blot
- 5.2.3 Imunodeteção da toxina Cry10Aa por ELISA realizada com anticorpo específico para a toxina alvo.
- 5.2.4 Realização de bioensaio com eventos transgênicos e *Tuta absoluta* para analisar o efeito da alimentação em larvas de para quantificação da emergência de adultos de *T. absoluta*.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Síntese do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa

A construção do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa (12442 pb) contendo o cassete para expressão de *cry10Aa* foi realizada pela empresa Epoch Life Science (www.epochlifescience.com). O cassete de expressão pC2300Cry10Aa possui ainda a região codificadora da enzima neomicina fosfotransferase tipo II (NPTII), marcador de resistência ao antibiótico canamicina em tecido vegetal (**Figura 3**).

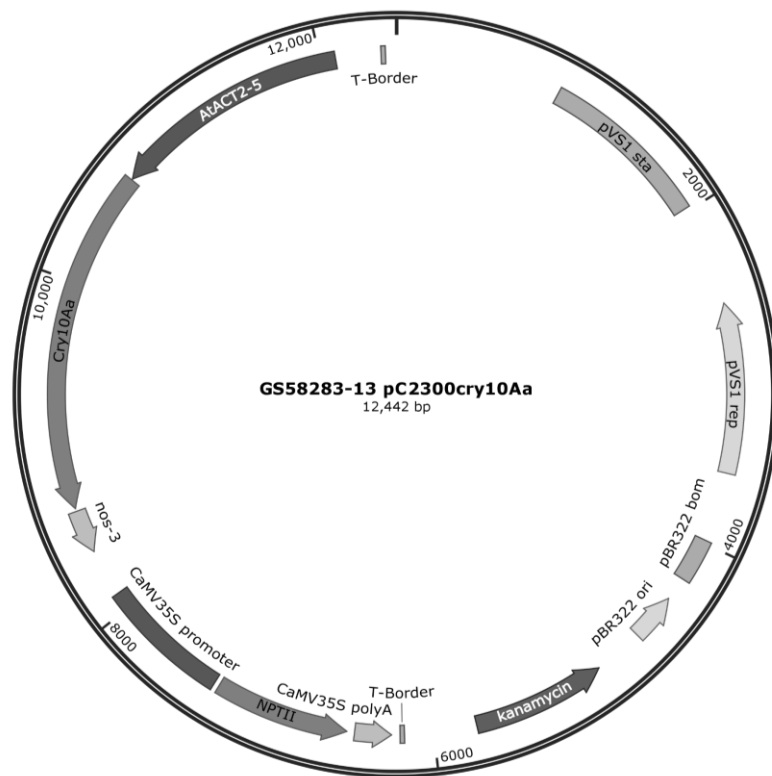


Figura 3. Representação esquemática do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa, que contém o cassete de expressão pC2300Cry10Aa portador do fragmento codante da proteína Bt Cry10Aa; promotor 35SCaMV; e terminador ocs3', além do gene marcador de seleção *npIII*.

A transformação de *Agrobacterium* com o vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa teve como base o protocolo de Brasileiro e Guimarães (2015), pelo qual uma alíquota de 1,0 µL (~5 ng de DNA) referente ao vetor recombinante GS58283-13pC2300Cry10Aa (**Figura 3**) foi adicionada a 40 µL de suspensão de células de *A. tumefaciens* linhagem EH105. O volume total da suspensão foi transferido para uma cubeta (0,1 cm de distância entre as 23 extremidades com polos eletrodos) e depositada em um eletroporador (MicroPulser, BioRad, Estados Unidos) com resistência de 200 Ω e capacitância de 25 µF, sendo aplicado um diferencial de potencial elétrico de 1,8 kV sobre a cubeta. Após o processo de eletroporação, as células foram alíquotadas em um total de 400 µL de meio LB líquido e mantidas por 120 minutos a 28°C. O volume resultante foi transferido para uma placa preenchida por meio LB sólido enriquecido com agentes seletores canamicina (100 mg/mL) e rifampicina (100 mg/mL). A placa foi posteriormente mantida a 28°C por 72 horas. Um total de 2 (dois) clones foram observados e isolados por inoculação em de meio LB líquido acrescidos de canamicina 100 mg/mL e rifampicina 100 mg/mL, tendo sido

novamente incubados por 72 horas a 160 rpm e 28°C. A presença do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa para os clones 1 (um) e 2 (dois) foi então confirmada por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e analisada por eletroforese em gel de agarose (AGE) 1% (m/v). Posteriormente, um total de 5mL do inóculo recombinante 1 foi embebido em 5 mL de glicerol 50% e alíquotas de 200µL foram preparadas e armazenadas a -80°C.

6.2. Transformação de explantes de *S. lycopersicum* por *A. tumeraciens*

A transformação dos explantes cotiledonares de *S. lycopersicum* transcorreu com base no protocolo de Sun *et al.* (2006), parcialmente modificado. Inicialmente, sementes de tomate linhagem Micro-Tom foram previamente tratadas para desinfestação, tendo sido inicialmente suspensas em solução de etanol 70% por 1 minuto, seguido da transferência das sementes para solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos. As sementes foram lavadas com água destilada previamente autoclavada por 5 (cinco) vezes. As sementes Micro-Tom, previamente desinfestadas, foram germinadas na ausência de luz por 8 (oito) dias em frascos de cultivo preenchidos por 35 ml de meio MS (Murashige and Skoog 1962) com (MS vitaminas 0,5X, sacarose 1,5%, ágar 0,6% e pH 5,7). Posteriormente, as plântulas germinadas foram mantidas a 25°C em fotoperíodo de 16 (dezesesseis) horas de luz por 8 (oito) horas de escuridão durante 72 (setenta e duas) horas com lâmpadas de led (irradiância de 60 µmol m⁻² s⁻¹). Para a transformação das plântulas, uma alíquota de suspensão de células EH-105-GS58283-13pC2300Cry10Aa foi cultivada em meio AB sólido (CHILTON *et al.*, 1974) enriquecido com os antibióticos canamicina (100 mg/L) e rifampicina (100 mg/L). Posteriormente, uma raspagem da cultura bacteriana foi realizada, seguida da sua suspensão de 30mL em meio líquido de cocultura (MS sem vitaminas 4,3 g/L, sacarose 30 g/L, PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, BAP 1,1 mg/L, aia 0,1 µM, acetoseringona 200 µM, cisteína 400 mg/L, vitamina B5 5mL/L, pH 5,2). A densidade óptica da suspensão foi ajustada para 0,500 em equipamento espectrofotômetro A600 (Eppendorf biophotometer plus, DE). Neste momento, secções cotiledonares dos primórdios foliares de Micro-Tom foram embebidas na suspensão celular citada, por meio da separação do eixo embrionário, bem como das partes proximais e distais, de forma a originar múltiplos fragmentos foliares aqui denominados explantes.

Devido ao fato de o vetor recombinante GS58283-13pC2300Cry10Aa (**Figura 3**) ser portador do gene *nptII*, que marca a resistência para o antibiótico canamicina em tecidos vegetais, os explantes foram então subcultivados em meio indutor (MS sem vitaminas 4,3

g/L, sacarose 20 g/L, PVP 200 mg/L, MES 200 mg/L, AgNO₃ 2 mg/L, timetin 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L, zeatina 1,75 mg/L, AIA 0,17 mg/L, vitamina B5 1X, ágar 0,6% e pH 5,7) enriquecido com o agente seletivo canamicina 100 mg/L e mantidos por 15 (quinze) dias em fotoperíodo de 16 horas de luz, por 8 horas sem luz por 15 dias e então transferidos para um novo meio. Por meio da observação dos calos regenerativos com botões adventícios, brotos regenerativos foram circuncidados no comprimento máximo do caule e transferidos para frascos de cultivo contendo meio de alongamento e enraizamento (Ms sem vitaminas 4,4 g/L, sacarose 30 g/L, timetin 100 mg/L, cefotaxima 200 mg/L, vitamina B5 1X, ágar 6 g/L e pH 5,7), sendo que, para auxiliar no processo de enraizamento, o enriquecimento com o agente seletivo foi dispensado. As plântulas isoladas foram devidamente aclimatadas a 25°C em fotoperíodo de 16 horas de luz, por 8 horas sem luz.

6.3. Checagem de eventos transgênicos por reação em cadeia da polimerase (PCR)

De forma posterior, as plântulas enraizadas tiveram a presença do cassete de expressão pC2300Cry10Aa avaliada por meio da amplificação dos transgenes *cry10Aa* e *nptII* por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Para isto, o DNA genômico foi obtido por método de extração CTAB de Rogers e Bendich (1985) a partir de ~0,5 g de material foliar, tendo sido as alíquotas de 1,5 µL de DNA genômico referente a cada um dos eventos de regeneração inoculadas em reação de PCR como DNA *template*. As reações foram então depositadas em um termociclador (Applied Biosystems) e posteriormente fracionadas em gel de agarose 1% (AGE 2%). Para a reação, foi utilizada a enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante, sendo que, para a detecção do fragmento *cry10Aa* (554pb) utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores (primers) Cry10Aa-Forward e Cry10Aa-Reverse (**Figura 4a**) e para a detecção do fragmento *nptII* (479pb), foram utilizados os primers NPTII1F e NPTII1R (**Figura 4b**), homólogos às extremidades 5' e 3' dos respectivos fragmentos codificantes das proteínas Cry10Aa e NPTII. Os primers foram sintetizados pela empresa Exxtend SP (<https://www.exxtend.com.br/>) contendo a sequência de DNA, tamanho e temperaturas de *melting* informados abaixo (**Figura 4**).

(a) Sequência Oligonucleotídeos Iniciadores <i>cry10Aa</i>	Tamanho	Tm °C
Primer Foward 5' GCCCAGCGTTGTATGTTTGG 3'	20 pb	60.5 °C
Primer Reverse 5' AGTGGGTACTATGCTTGCGG 3'	20 pb	60.5 °C
(b) Sequência Oligonucleotídeos Iniciadores <i>nptII</i>	Tamanho	Tm °C
Primer Foward 5' GAGGCTATTCGGCTATGACTG 3'	21 pb	66.0 °C
Primer Reverse 5' CGCCTTGAGCCTGGCGAACA 3'	20 pb	62.0 °C

Figura 4. Oligonucleotídeos gene específicos utilizados para checagem da presença dos transgenes *cry10Aa* e *nptII*. (a) Primers iniciadores Forward e Reverse específicos do transgene *cry10Aa*. (b) Primers iniciadores Forward e Reverse específicos do transgene *nptII*. O tamanho e a temperatura de anelamento dos primers também estão descritos na figura.

Para o fracionamento em AGE 1%, era previamente esperado a observação de bandas fragmentares de ~554 pb e ~479 pb respectivamente referentes aos fragmentos recombinantes *cry10Aa* e *nptII*. Neste sentido, as plântulas PCR positivas foram transferidas para caixas de cultivo e as plântulas PCR negativas foram prontamente descartadas.

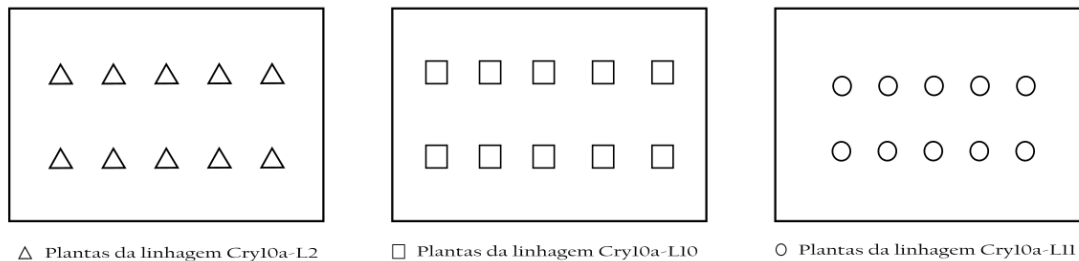
6.4. *NPTII* ImmunoStrip® Test

De forma posterior a checagem por PCR, plantas positivadas foram testadas pelo método de imunoenensaio de fluxo lateral (ImmunoStrip - Agdia, EUA) para detecção da proteína NPTII, onde amostras de ~10 mg de material foliar foram maceradas na presença do tampão comercial fosfato-salino (PBS) 1X, conforme as instruções do fabricante e após obtenção do extrato foliar, fitas de imunodeteção foram inseridas e mantidas para análise visual. A partir da identificação dos eventos T₀, sementes foram coletadas e armazenadas a 4°C.

6.5. Análise das progênies

As linhagens positivas (geração T₀) tiveram suas sementes devidamente germinadas em 1-solo vermelho: 1-substrato adubado: 1-vermiculita e um total de 10 plantas foram selecionadas de forma aleatória para análise de segregação gênica por PCR (**Figura 5**). Tendo como base uma razão Mendeliana (3:1 ou 15:1), para determinar se a taxa de segregação observada foi consistente com o nível de confiança de 95%, utilizamos

o teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson, por meio de um fator de correção de Yates para os casos em que uma das frequências fosse menor que 5, ou quando o valor total de plantas avaliadas fosse menor que 20.



X² Análise estatística por
Teste Qui-quadrado de Pearson.

Figura 5. Diagrama dos componentes amostrais para a checagem de segregação do fragmento codante *cry10Aa*. (a) disposição das plantas pertencentes à linhagem L2-*cry10Aa*, (b) disposição das plantas pertencentes à linhagem L10-*cry10Aa*, (c) disposição das plantas pertencentes à linhagem L11-*cry10Aa*.

6.6. Análise de Southern blot

Para a análise de Southern blot, utilizou-se o protocolo de Romano e Vianna (2015), onde o DNA genômico das linhagens GM em homozigose foi analisado, tendo sido o DNA de plantas Micro-Tom Wild Type (WT) usado como controle negativo. Neste sentido, 5 μ g de DNA de cada planta foram digeridos com endonucleases de restrição SpeI (New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, EUA), fracionado em AGE 1,0%, transferidos para membranas de nylon e hibridizados com sondas marcadas radioativamente com P³² para detectar o Cry10a. As sondas foram marcadas com o kit de rotulagem DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermoscientific, PAIS). As membranas foram pré-hibridizadas em 10 ml de tampão de hibridização PerfectHyb Plus Hybridization Buffer (Sigma, PAIS), por 2 h a 65°C, e hibridizado por 12–16 h a 65°C com sondas radioativas P³². As membranas foram lavadas por duas vezes durante 20 minutos com solução de lavagem I (SSC 2X e SDS 0,1%) e posteriormente com solução de lavagem II (SSC 1X e SDS 0,1%) ambas as lavagens a 62°C e expostas ao Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, EUA) por 16 horas a temperatura ambiente.

6.7. Imunoabsorção enzimática (ELISA)

A extração, detecção e quantificação do acúmulo da proteína Cry10Aa em material foliar fresco para as linhagens L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*, bem como do extrato foliar referente a linhagem WT ficou a cargo da empresa Nanjing Zoonbio Biotechnology Co LDT (Jiangsu, China) e foi realizada com base em protocolo padrão de Imunoabsorção enzimática (ELISA) pelo método direto da empresa (<http://www.zoonbio.com/en/antibody-service-index-Testing-ELISA.html>), até a corrente data de 23 de agosto de 2022. Tendo sido realizada em 3 (três) repetições biológicas e três repetições técnicas (nº 9).

6.8. Ensaio de toxicidade contra *T. Absoluta*.

As culturas de *T. absoluta* foram cedidas pela Embrapa Hortaliças (CNPq), Brasília, Distrito Federal. O ensaio foi formulado em três linhagens Micro-Tom-*cry10Aa* (L2, L10 e L11) e a linhagem Micro-Tom WT em um total de três gaiolas para cultura de insetos 45 cm x 45 cm x 55 cm (Rescholar Equipment, Haryana, Índia). Para as linhagens L2-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*, um total de 10 (dez) plantas PCR positivas (homozigotas) foram dispostas em três gaiolas (3:3:4), sendo que, para a linhagem L10-*cry10Aa*, devido a uma menor disponibilidade amostral de plantas, um total de 6 (seis) plantas PCR positivas (homozigotas) foram dispostas nas gaiolas seguindo a padronização da alocação anterior (2:2:2). O padrão amostral reduzido referente a linhagem L10-*cry10Aa* foi contraposto ao final do ensaio por um processo de compensação estatística por meio da equivalência dos dados amostrais totais. Neste sentido, um montante de 144 (cento e quarenta e quatro) indivíduos de *T. absolutas* em sua fase adulta foram dispostos para as 3 gaiolas (4 insetos/planta), tendo sido realizada a manutenção de mel de abelha 10% embebido em algodão durante todo o período de copulação e oviposição. Os espécimes de *T. absolutas* foram mantidos na presença das plantas até que os adultos não foram mais observados na parte superior das gaiolas (término do período de oviposição), tendo sido então as plantas pertencentes à mesma gaiola sublocadas em gaiolas aeradas para a manutenção da emergência de adultos. Durante os 15 dias seguintes, a predação larval foi observada e a emergência de novos adultos contabilizada para os representantes das linhagens de cada uma das gaiolas de isolamento (**Figura 6A e B**).

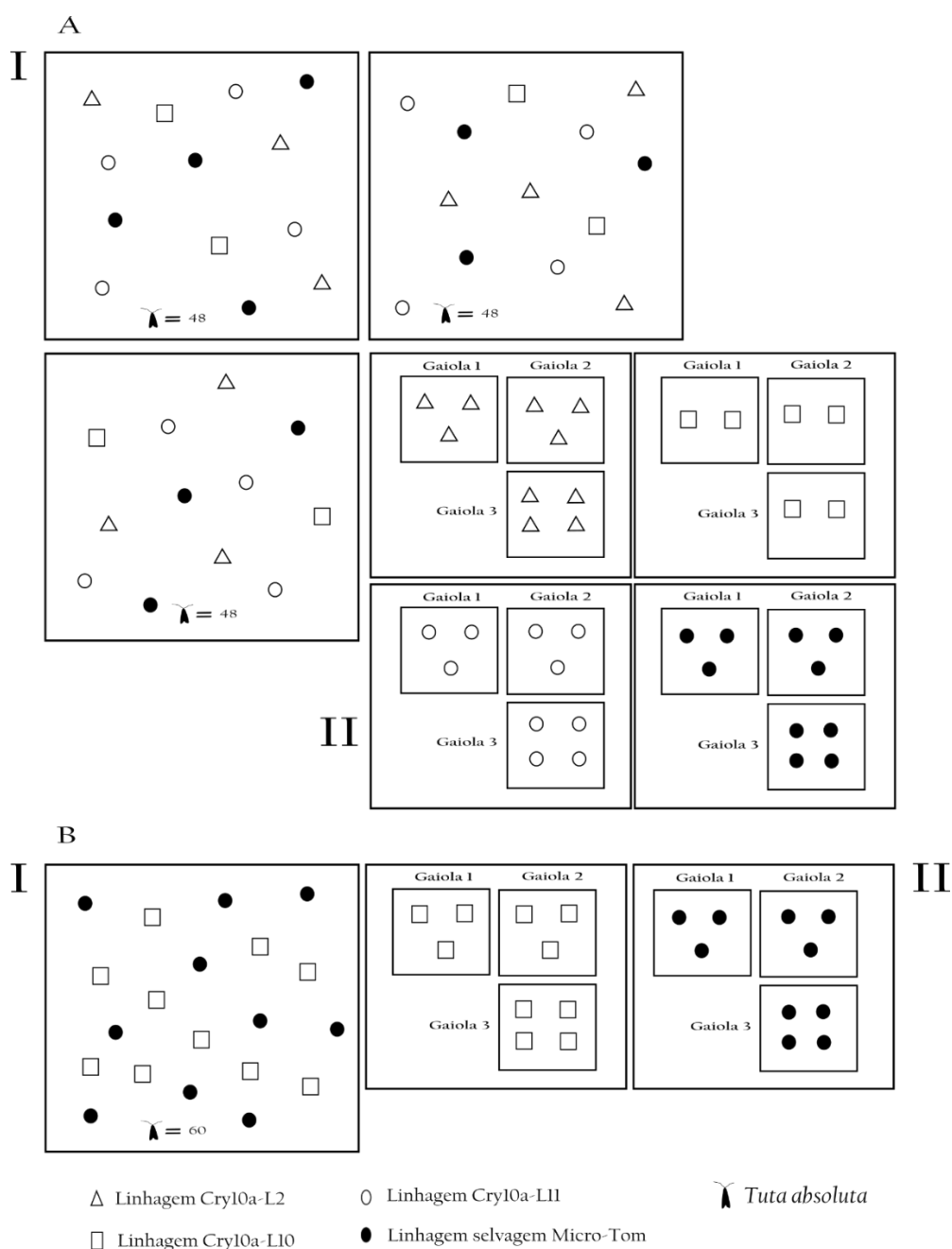


Figura 6. Disposição dos componentes do bioensaio. (A) representação esquemática do ensaio de número 1 (um), (B) representação esquemática do ensaio de número 2 (dois). (I) Período de oviposição de *T. absoluta*. (II) Monitoramento da emergência de adultos de *T. absoluta*, por meio da realocação das plantas com linhagens oriundas de mesma gaiola.

Para ambos os ensaios executados, a contabilização da emergência de adultos nas subgaiolas foi realizada durante um período de 21 dias, tendo sido os dados de emergência estatisticamente examinados com base em uma análise de variância (ANOVA) em software Prism GraphPad Software[®] (<https://www.graphpad.com/scientific->

software/prism/), tendo como padrão de referência os dados de adultos emergentes para as plantas da variedade Micro-Tom WT.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Análise de plantas geneticamente modificadas (T_0) por PCR e NPTII ImmunoStrip® Test

O fracionamento das reações de PCR para a análise da presença dos fragmentos recombinantes *cry10Aa* e *nptII* em AGE 1% apresentou um padrão de bandas que revelou a presença de bandas com cerca de 554 pb para as reações marcadas pela presença dos primers CRY10aF e Cry10aR, e bandas com cerca de 439 pb para as reações marcadas pela presença dos primers NPTII1F e NPTII1R. Com relação ao imunoenensaio de fluxo lateral, o padrão observado condiz com os resultados observados para o AGE 1%, sendo que a presença de uma marca reativa teste, que segundo o fabricante (ImmunoStrip - Agdia, EUA) indica a presença da enzima neomicina fosfotransferase tipo II (NPTII) foi observada para o extrato foliar referente as plantas das linhagens L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa* (**Figura 7C**). Neste sentido e com base na fase de leitura do cassete de expressão pC2300Cry10Aa, do qual o gene codificador da enzima NPTII é parte integrante, a detecção da proteína por ensaio imunológico supõe a correta expressão do cassete transgênico para as linhagens transgênicas. A marca de reação não foi observada para o extrato foliar referente a linhagem WT, dado este que reforça os resultados apresentados pelas análises por PCR (**Figura 7A e Figura 7B**).

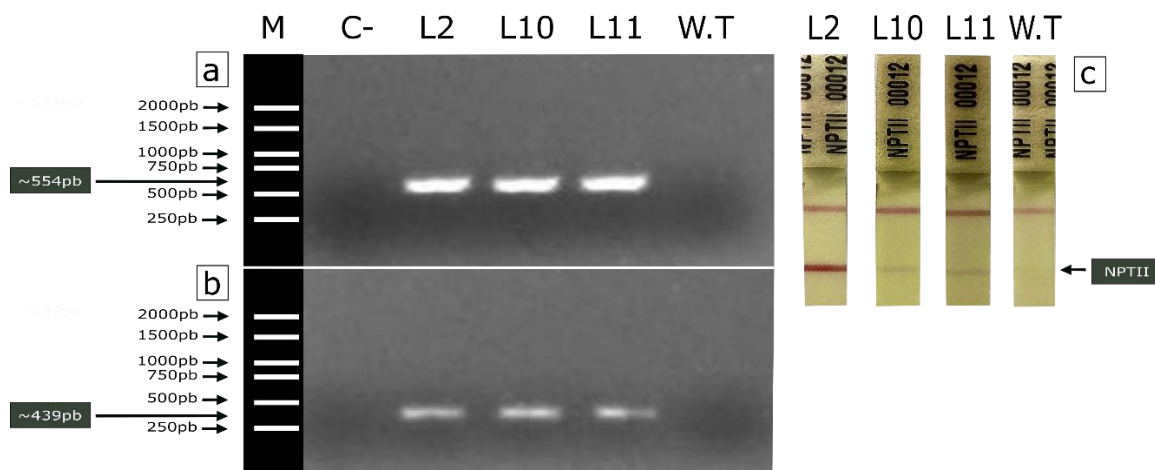


Figura 7. Análise molecular por PCR e imunoenensaio de fluxo lateral das linhagens transgênicas L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*, bem como da linhagem WT. (A) Análise da amplificação do

fragmento codante *cry10Aa* por PCR. M, marcador de peso molecular (1kb Plus, Invitrogen), C- controle negativo, L2, L10 e L11 alíquotas de DNA genômicos referentes às linhagens transgênicas, WT alíquota de DNA genômico referente à linhagem de tomate selvagem e C+ alíquota de suspensão do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa. (B) Análise da amplificação do fragmento codante *nptII* por PCR. L2, L10 e L11 alíquotas de DNA genômicos referentes às linhagens transgênicas, WT, alíquota de DNA genômico referente à linhagem selvagem, C+ alíquota de suspensão do vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa e M, marcador de peso molecular. (C) Análise de imunoenensaio de fluxo lateral específica para a enzima NPTII para as linhagens transgênicas L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*, bem como para a linhagem de tomate WT.

Considerando a região prevista para o anelamento para os primers Cry10F e Cry10R, bem como a posição esperada para o amplicon *cry10Aa* (554 pb) em AGE 1%, tendo como referência o marcador DNA Ladder 1kb (Invitrogen), o padrão de bandas observados indica a presença do transgene *cry10Aa* para as para as reações referentes às linhagens transgênicas L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa* (**Figura 7A**). O padrão de bandas referentes às reações para detecção de *nptII*, corroboram com o esperado, baseando-se ainda na região de anelamento dos primers NPTIII1F e NPTIII1R, os quais permitem a obtenção de um amplicon com cerca de 439 pb. Neste sentido, as observações resultantes do fracionamento das reações *cry10Aa* e *nptII* reforçam a presença dos transgenes supracitados que são partes integrantes do cassete de expressão pC2300Cry10Aa para as amostras de DNA genômico das linhagens de tomate transgênico L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*.

A inexistência de bandas de amplificação para as reações onde DNA template foi substituído por água Milli-Q, aqui denominados como controles negativos (C-), bem como para as reações marcadas pela presença do DNA *template* obtido de uma planta de tomate WT, reforçam a segurança dos resultados obtidos para as análises referentes às linhagens transgênicas L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*.

7.2. Análise por Southern blot

A análise de Southern blot foi realizada com 3 plantas GM aclimatadas, sendo elas pertencentes a cada uma das linhagens obtidas (L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*) provenientes de 3 (três) eventos distintos. Por sua vez, uma outra planta de tomate Micro-Tom WT foi utilizada como planta controle.

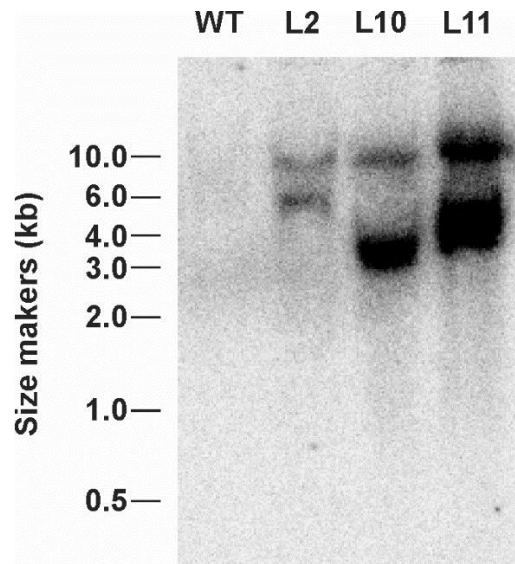


Figura 8. Análise de Southern blot do DNA genômico de 9 (nove) plantas transgênicas de *Solanum lycopersicum* regeneradas a partir de 3 (três) calos independentes, e uma planta de tomate variedade Micro-Tom WT. O número amostral referente às plantas GM analisadas dividem-se em um total de 3 (três) linhagens (L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*), tendo sido analisadas um total de 3 plantas para cada uma das linhagens supracitadas.

A inserção do transgene *cry10Aa* no genoma das plantas GM foi confirmada com base no padrão de bandas observadas (**Figura 8**). Estima-se com base no padrão de bandas observados, a presença do transgene em ao menos duas cópias para cada fração GM analisada. Tendo como base a fase de leitura aberta do cassete pC2300Cry10Aa (ítem 6.1), a ausência de sítios de restrição específicos para a endonuclease *SpeI* (Thermo scientific), resulta na fragmentação de cópias do transgene flanqueados por sequencias oligonucleotídicas de origem genômica, processo que justifica a observação de padrões de bandas divergentes entre as linhagens GM aqui analisadas. Considerando o padrão de bandas observados para as frações L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*, uma maior densidade fragmentar visualmente observada permite estimar eventos de sobreposição de bandas. Este processo, por sua vez, associa-se à um maior número de cópias do transgene recombinante para os genomas anteriormente citados (CASU; SELIVANOVA; PERROUX, 2012). Em contrapartida, limitações analíticas associadas a técnica de Southern blot impossibilitam conclusões mais aprofundadas, exigindo, por vezes, análises complementares que apresentem maior grau de sensibilidade. Com base no padrão observado para a reação referente a planta WT, não se observou a presença de bandas,

reforçando a fidelidade do padrão dos resultados anteriormente observados para as frações L2, L10 e L11.

7.3. Análise de progênies

A análise de progênie referentes às linhagens L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa* foi realizada com base em um teste de Qui-quadrado (χ^2), tendo sido os dados dispostos na tabela disponibilizada abaixo (**Tabela 1**).

Tabela 1. Análise de segregação gênica por Qui-quadrado (χ^2) referente a geração T1 de 30 (trinta) plantas transgênicas de tomate transformadas com o vetor GS58283-13pC2300Cry10Aa.

Linhagem	Geração T1		3:1		15:1		63:1	
	Positivas	Negativas	χ^2	Pb	χ^2	Pb	χ^2	Pb
L2	10	0	4,3	0,06	2,02	0,41	2,7	0,69
L10	9	1	1,7	0,27	0,10	0,62	0,98	0,03
L11	7	3	0,13	0,71	6,51	0,001	36,38	0

(a) Dados baseados em análise de PCR para detecção do transgene *cry10Aa*.

(b) Foram testados os padrões de segregação 3:1 e 15:1, sendo considerada a proporção mais provável e com menor valor de qui- quadrado.

(c) A correção de Yates foi utilizada quando uma das frequências era menor que 5.

(d) Probabilidade que os valores observados reflitam a segregação esperada de 3:1 ou 15:1. $\alpha = 0,05$.

(e) A demarcação por símbolo “*” determina a hipótese aceita *: 3/1 (1 locus), **: 15/1 (2 locus) e ***: 63/1 (3 locus).

A análise de progênie se baseou em um número amostral de 10 plantas homozigotas referentes a cada uma das linhagens GM analisadas, seguido de um teste de Qui-quadrado (χ^2), que por sua vez, sugeriu que, considerando o alto valor de significância estatística para a hipótese de 3 (três) locus para a linhagem L2-*cry10Aa*, seguido de um valor meramente expressivo para a hipótese referente de 2 (dois) locus para a mesma linhagem, aceitamos a hipótese referente a três locus. Por sua vez, com base no dado de *Pvalor* referente a 0,62 obtido para a linhagem L10-*cry10Aa*, aceitamos a hipótese que aponta a presença do transgene em 2 (dois) locus para a linhagem L10-*cry10Aa*. Por fim, o resultado de *Pvalor* observado para a linhagem L11-*cry10Aa*, sugere a aceitação da hipótese referente à presença do cassete recombinante em 3 (três) locus para a referida linhagem.

7.4. Imunoabsorção enzimática (ELISA)

A detecção e quantificação do acúmulo da proteína Cry10Aa para o extrato proteico obtido a partir da extração em material foliar fresco das linhagens L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*, bem como da variedade WT foi realizada por meio do método de ELISA, tendo como base o protocolo padrão da empresa Zoonbio (item 6.7). A análise foi realizada em três repetições técnicas e três repetições biológicas (n = 9). A exposição dos dados à uma análise ANOVA, permitiram identificar uma diferença estatística significativa entre os dados comparativos das linhagens GM observadas ($P < 0,05$) em relação aos dados da variedade WT. Os dados de detecção do acúmulo da proteína Cry10Aa para as frações analisadas em escala semi-log estão expostos na figura abaixo (**Figura 9**).

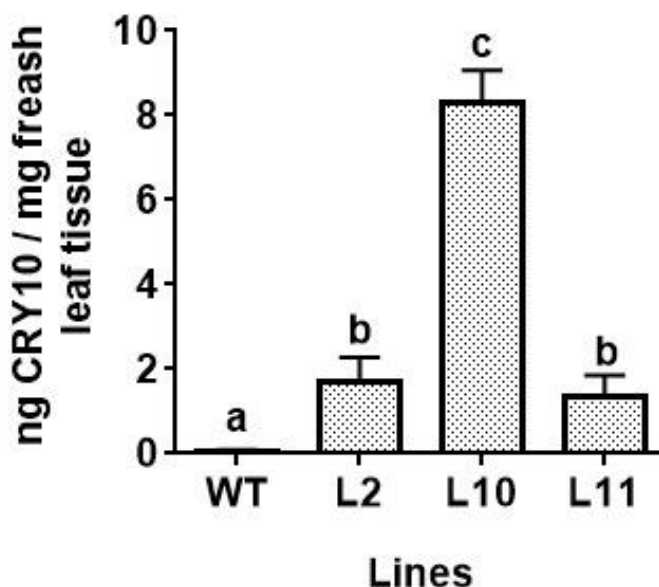


Figura 9. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para Cry10Aa. Linhagens experimentadas: Micro-Tom WT (WT.1, WT.2, WT.3), Linhagem L2-*cry10Aa* (L2.1, L2.2, L2.3), Linhagem L10-*cry10Aa* (L10.1, L10.2 e L10.3) e Linhagem L11-*cry10Aa* (L11.1, L11.2 e L11.3).

Tendo como base a análise pelo método de ELISA e ainda o alto grau de especificidade da interação anticorpo anti-Cry10Aa com a proteína alvo para uma absorbância de 450 nm, os dados de imunoabsorção indicam a não detecção da proteína

expressa Cry10Aa para a fração do extrato protéico referente a linhagem WT, sendo possível inferir, com base no dado observado, a ausência da proteína Cry10Aa para a fração analisada. Por sua vez e baseando-se no padrão observado para a fração negativa do experimento, os dados referentes a linhagem L2-*cry10Aa* apresentam uma taxa de acúmulo da proteína Cry10Aa referente a 1,72 ng/mg de tecido foliar fresco, sendo que, mesmo em baixa concentração, a fração referente a linhagem L2-*cry10Aa* reforça a especificidade da interação anti-Cry10Aa com a proteína alvo. Em contrapartida, um maior acúmulo da proteína Cry10Aa foi observado para a fração referente a linhagem L10-*cry10Aa*, apresentando um acúmulo 8,3 ng/mg de tecido foliar fresco. Este padrão, por sua vez, não só reforça a possibilidade da expressão do transgene *cry10Aa* incorporado ao genoma do tomate, mas também sugere uma alta taxa de expressão para a referida linhagem. Por sua vez, os dados referentes a linhagem L11-*cry10Aa* indicam um acúmulo da proteína Cry10Aa a uma concentração de 1,3 ng/mg de tecido foliar fresco.

Considerando o padrão observado para o ImmunoStrip test (item 7.1) por meio da detecção da enzima NPTII, no qual o seu fragmento codante é parte integrante do cassete pC2300Cry10Aa, esperava-se uma maior expressão do cassete supracitado para a linhagem L2-*cry10Aa* em relação às demais linhagens GM. A detecção do acúmulo da proteína Cry10Aa pelo método de ELISA (item 7.4), no entanto, revelou um baixo acúmulo da proteína citada para a linhagem L2, seguido de um maior acúmulo desta para a linhagem L10-*cry10Aa*. Buscando caminhos que expliquem os padrões observados, Ulian e colaboradores (1996) observaram que a ocorrência de eventos de metilação na região promotora de fragmentos *nptii* recombinantes, por vezes, resultam em padrões divergentes de acúmulo desta enzima em células vegetais. Neste estudo, os pesquisadores relatam a ocorrência de eventos de metilação em uma alta frequência para as cópias recombinantes do cassete (ULIAN et al., 1996).

Outro possível caminho diz respeito à possibilidade de eventos de silenciamento gênico em transformações mediadas por *A. tumefaciens*, processo que pode resultar na baixa expressão de cópias de um transgene, ou de fragmentos específicos que integram este cassete incorporado à um dado genoma (JAKOWITSCH et al., 1999). Um dado que reforça este processo são os estudos que relatam uma maior regularidade na expressão gênica para estratégias de transformação baseadas nas chamadas “construções simples de expressão” do inglês “*Minimal constructions (MC)*”, técnicas que dispensam a utilização de vetores bacterianos para transformações mediadas por biobalística. Neste sentido, Sandhu e Altpeter (2008), bem como Kim e colaboradores (2012), reforçam os padrões

supracitados para as construções simples em seus estudos de integração gênica, reforçando a ocorrência de padrões divergentes de expressão e acúmulo da enzima NPTII em células vegetais transformadas por construções de origem bacteriana, comumente chamados vetores de expressão (SANDHU & ALTPETER, 2008; KIM et al., 2012).

Outro caminho especulativo para o resultado observado diz respeito à possibilidade da ocorrência de eventos pontuais de mutações ou deleções em regiões recombinantes, bem como a incorporação parcial de um ou mais fragmentos específicos do cassete. Este processo explicaria padrões de divergência na expressão de genes específicos pertencentes a um mesmo cassete recombinante (MURFETT et al., 2001; KAPUSI et al., 2017).

7.5. Ensaio com *T. absoluta* em plantas de tomateiro

Os dados quantitativos de emergência de adultos referentes ao ensaio com *T. absoluta* com plantas L2-*cry10Aa*, L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa* homozigotas e Micro-Tom WT, demonstraram que não houve influência significativa comparada no número de médio de adultos de *T. absoluta* que emergiram entre as larvas alimentadas com material foliar proveniente da linhagem WT e das linhagens L2-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*. Considerando ainda as análises de imunoabsorção enzimática descritas anteriormente, os dados de emergência de adultos de *T. absoluta* supracitados para as linhagens L2-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa* estão em concordância com o padrão de baixo acúmulo da proteína Cry10Aa para as frações de imunoabsorção referentes às linhagens citadas. Estes dados reforçam que a baixa concentração da proteína expressa Cry10Aa, inviabiliza uma possível resposta citotóxica das linhagens citadas frente ao processo predatório das larvas de *T. absoluta*.

No entanto, considerando os dados comparativos referentes ao número de médio de adultos de *T. absoluta* emergidos para os tratamentos das larvas alimentadas com material foliar proveniente da linhagem L10-*cry10Aa*, em relação às demais linhagens testadas, a análise de variância (ANOVA), por meio dos parâmetros de Brown Forsythe Test, sugerem uma alta diferença significativa existente. Este resultado se baseia no resultado de *P*valor: 0,0002 frente a um valor comparativo de *P*valor: 0,005 (**Figura 11**). Considerando ainda o tratamento L10-*cry10Aa*, uma análise visual prévia revelou um

menor dano predatório em plantas provenientes da linhagem supracitada em relação às plantas do tratamento WT (**Figura 10**).

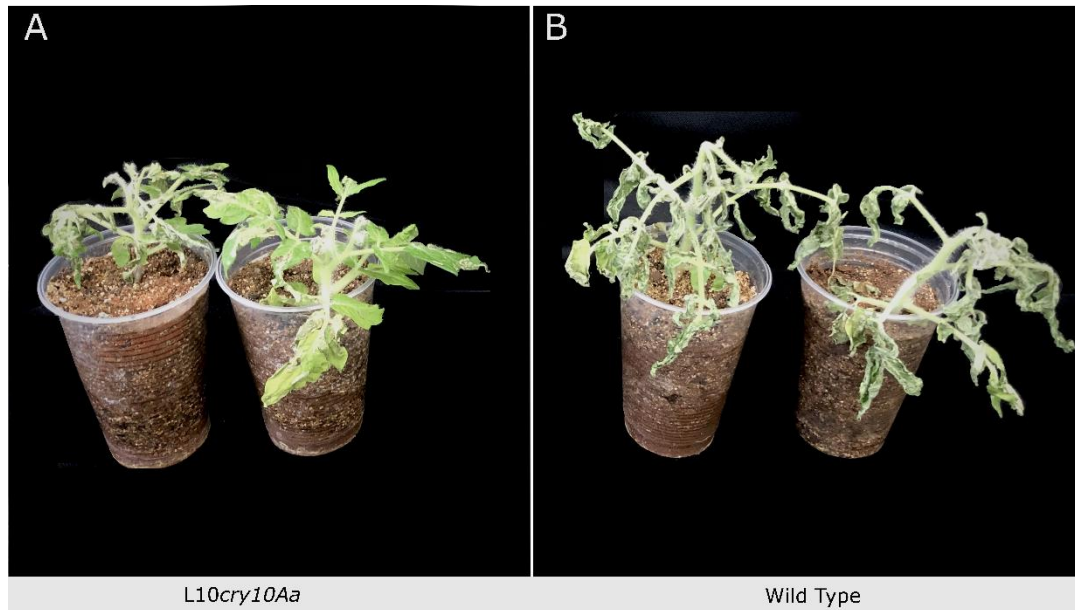


Figura 10. Plantas de tomate desafiadas em ensaio com *T. absoluta* após 25 dias transcorridos para o bioensaio de nº 1. (A) Plantas pertencentes à linhagem L10-*cry10Aa*, (B) Plantas pertencentes à variedade Micro-Tom WT.

A redução na emergência de adultos de *T. absoluta* foi de cerca de 50% para a linhagem L10-*cry10Aa*, quando considerado os dados referentes às linhagens WT, L2-*cry10Aa*, bem como L11-*cry10Aa* (**Figura 11**). Considerando ainda os dados de imunoabsorção enzimática observados para a análise da fração referente a linhagem L10-*cry10Aa*, a alta redução da emergência de adultos de *T. absoluta* apresenta um padrão inversamente proporcional a alta taxa de acúmulo da proteína Cry10Aa para esta linhagem, processo que está em concordância com a hipótese que sugere um alto grau de toxicidade da proteína expressa Cry10Aa para a praga alvo.

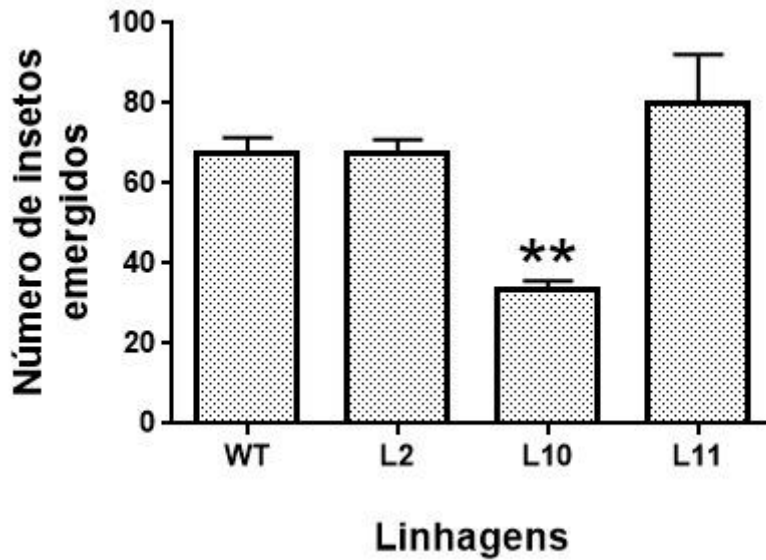


Figura 11. Média total de emergência de adultos de *T. absolutas* em ensaio comparativo. WT: Média de emergência de adultos de *T. absoluta* em ensaio com plantas da variedade Micro-Tom Wild Type, L2: Média para ensaio com plantas L2-*cry10Aa*, L10: Média para ensaio com plantas L10-*cry10Aa*, L11: Média para ensaio com plantas L11-*cry10Aa*.

Com base nos resultados obtidos para o primeiro ensaio, um segundo ensaio foi executado tendo como premissa a análise comparativa de forma isolada de um total de 20 plantas, sendo estes referentes a 10 (dez) plantas da linhagem L10-*cry10Aa* e 10 plantas da linhagem Micro-Tom WT (**Figura 12**).

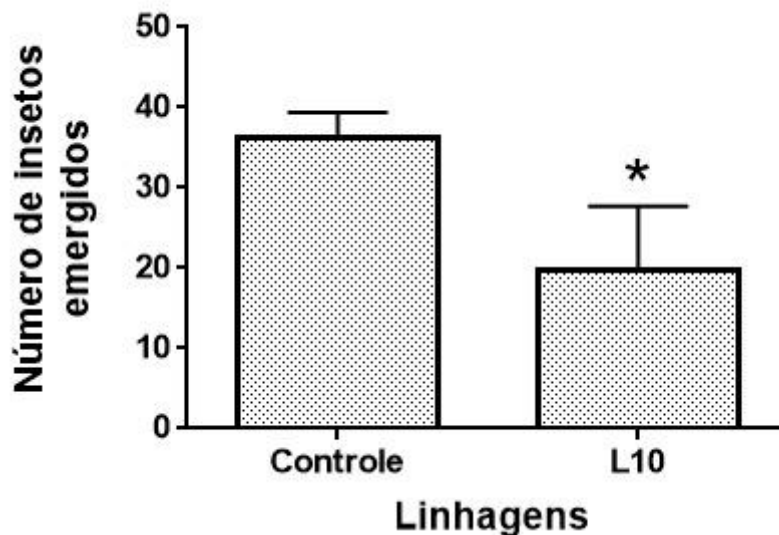


Figura 12. Média total de emergência de adultos de *T. absoluta* em ensaio comparativo. Controle: Média de emergência de adultos de *T. absoluta* em tratamento com plantas da variedade Micro-Tom Wild Type, L10: Média para ensaio com plantas L0-*cry10Aa*.

A análise estatística dos dados finais, tendo como base a realização de um teste T-student, sugerem uma diferença estatística significativa no número médio de adultos de *T. absoluta* emergidos para larvas que tenham se alimentado com material foliar proveniente das plantas da linhagem L10-*cry10Aa* em relação a linhagem Micro-Tom WT. A análise estatística revelou um resultado em *Pvalor*: 0,0282 frente a um valor comparativo de *Pvalor*: 0,05 (**Figura 12**). Ainda seguindo o padrão anteriormente observado, a redução na emergência de adultos de *T. absoluta* foi de cerca de 50% para a contagem média referente a subgaiola na qual as plantas da linhagem L10-*cry10Aa* foram alocadas para a manutenção da emergência de adultos de *T. absoluta*, quando considerado os dados referentes a linhagem WT. Neste sentido, considerando o fator chave da referida análise que é a presença da proteína Cry10Aa, estes dados, por sua vez, reforçam a discussão apresentada para os dados referentes ao ensaio inicial, indicando a existência de uma relação direta entre a presença da proteína expressa a uma concentração de aproximadamente 8 ng/mg e a redução de cerca de 50% da emergência de adultos de *T. absoluta* por ciclo reprodutivo em ambiente controlado.

8. CONCLUSÃO

Com base nas análises descritas no presente trabalho, a amplificação do fragmento codante da proteína Cry10Aa se deu com eficiência pela técnica de PCR para as frações genômicas referentes às linhagens L2-*cry10Aa*., L10-*cry10Aa* e L11-*cry10Aa*. A correta detecção do transgene *cry10Aa* com a ausência de amplificações referentes a fração WT, seguido da detecção da proteína NPTII por meio do NPTII ImmunoStrip Test atestam não só a presença do transgene no genoma das linhagens GM supracitadas, bem como a correta expressão do cassete incorporado pelas linhagens GM. Por sua vez, o alto grau de expressão do transgene *cry10Aa* proposto para a fração referente a linhagem L10-*cry10Aa* por meio dos dados observados para a análise por meio do método de ELISA, reforçam a capacidade do tomateiro acumular a proteína Cry10Aa em concentrações superiores a 5 ng/mg de tecido foliar.

O acúmulo da proteína Cry10Aa em alta concentração observado para as frações referentes a linhagem L10-*cry10Aa* se mostra em concordância direta com os dados de emergência de adultos de *T. absoluta* para o tratamento L10. Neste sentido, o acúmulo da Cry10Aa para a linhagem mencionada, quando comparados a baixa expressão observada para as demais linhagens e ainda quando comparados aos dados de emergência de adultos de *T. absoluta* para as demais linhagens, reforçam a presença da proteína Cry10Aa como fator chave para a redução na emergência de adultos de *T. absoluta* observada em tratamento L10-*cry10Aa*.

Vale ressaltar que, com base nos dados comparativos observados, o alto grau de toxicidade da proteína Cry10Aa para a *T. absoluta*, demonstrado com base no presente estudo e que apresenta um padrão de toxicidade que acompanha a concentração da proteína Cry10Aa, se mostrando ainda mais tóxica com base no aumento do acúmulo da proteína, sendo que, os dados observados permitem ainda inferir que em campo, a linhagem supracitada permitiria uma redução populacional de cerca de 50% emergência de adultos de *T. absoluta* por ciclo, processo que permitiria uma redução gradativa e generalizada no tamanho populacional da praga alvo em campo.

Por fim e diante destes dados, concluímos pela eficácia da Cry10Aa em gerar uma tolerância à *T. absoluta*, uma das principais pragas de tomate em cenário mundial, apresentando aqui uma estratégia viável e que dispensa a utilização de pesticidas para o manejo de *T. absoluta* por meio da expressão da proteína em tecido foliar do tomateiro por meio da linhagem L10-*cry10Aa*.

9. REFERENCIAL BIBLIOGRAFICO

AHMED, Alengebawy. *et al.* Plants : Ecological Risks and Human Health Implications. **Toxics**, v. 9, p. 42, 2021.

ALMEIDA, Mauricélia F. *et al.* Plant Resistance in Some Modern Soybean Varieties May Favor Population Growth and Modify the Stylet Penetration of Bemisia tabaci (Hemiptera: Aleyrodidae). **Journal of economic entomology**, v. 114, n. 2, p. 970–978, 2021.

ARMENGOL, G. *et al.* Diversity of Colombian strains of Bacillus thuringiensis with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insects. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 77–88, 2007.

ATAIDE, L. M. S., ARCE, C. C. M., CURTINHAS, J. N., DA SILVA, D. J. H., DESOUSA, O., & LIMA, E. Flight behavior and oviposition of Tuta absoluta on susceptible and resistant genotypes of Solanum lycopersicum. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 11, n. 4, p. 567–575, 2017.

BAI, Mengyan *et al.* Generation of a multiplex mutagenesis population via pooled CRISPR-Cas9 in soya bean. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 3, p. 721–731, 2020.

BAI, Yuling; LINDHOUT, Pim. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1085–1094, 2007.

BAJRACHARYA, Ajaya S.R.; BHAT, Binu. Life cycle of South American tomato leaf miner, Tuta absoluta (Meyrick, 1917) in Nepal. **Journal of entomology and zoology studies**, v. 6, n. 1, p. 287–290, 2018. Disponível em: <www.entomoljournal.com>.

BANIHANI, Saleem A. Tomato (Solanum lycopersicum l.) and type 2 diabetes. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 114–120, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1439959>>.

BENGYELLA, Louis *et al.* Global challenges faced by engineered Bacillus thuringiensis Cry genes in soybean (Glycine max L.) in the twenty-first century. **3 Biotech**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1484-8>>.

BERNERS-LEE, M. *et al.* Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. **Elementa**, v. 6, 2018.

- BHAT, R.; KHAJURIA, M.; MANSOTRA, D.K. A systematic review on global environmental risks associated with pesticide application in agriculture. **Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation**, v. 249404, n. Iiim, p. 96–110, 2019.
- BILLEN, Gilles *et al.* Reshaping the European agro-food system and closing its nitrogen cycle: The potential of combining dietary change, agroecology, and circularity. **One Earth**, v. 4, n. 6, p. 839–850, 2021.
- BIONDI, Antonio *et al.* Biondi 2018 revisão america do sul - tuta. n. September 2017, p. 239–258, 2018.
- BISWAS, Trina; WU, Feng. The US Tomato Industry: An Overview of Production. p. 1–4, 2017.
- BOLIKO, Mbuli Charles. FAO and the situation of food security and nutrition in the world. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 65, p. S4–S8, 2019.
- BORIN, Diego Becker *et al.* Parasporin a13-2 of bacillus thuringiensis isolates from the papaloapan region (Mexico) induce a cytotoxic effect by late apoptosis against breast cancer cells. **Toxins**, v. 13, n. 7, 2021.
- BRASILEIRO, Ana Cristina Miranda; GUIMARÃES, Patrícia Messenberg. Cultivo e conservação de *Escherichia coli* e *Agrobacterium ssp.* In: Ana Cristina Miranda Brasileiro; Patrícia Messenberg Guimarães. (Org). **Cultivo e conservação de Escherichia coli e Agrobacterium ssp.** 2ed. Brasília: Embrapa, 2015, v. 1, p. 21-38.
- BRAVO, Alejandra *et al.* Bacillus thuringiensis: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 7, p. 423–431, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>>.
- BRAVO, Alejandra; GILL, Sarjeet S.; SOBERÓN, Mario. Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.
- BRAVO, Alejandra; SOBERÓN, Mario. How to cope with insect resistance to Bt toxins? **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 573–579, 2008.
- BRIONES ALONSO, Elena; COCKX, Lara; SWINNEN, Johan. Culture and food security. **Global Food Security**, v. 17, n. February, p. 113–127, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.02.002>>.
- BRUNHEROTTO, Rogério; VENDRAMIM, José Djair. Bioatividade de Extratos Aquosos de *Melia azedarach L.* Sobre o Desenvolvimento de Tuta absoluta (Meyrick)

(Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro Bioactivity of Aqueous Extracts of *Melia azedarach* L. on Tomato Pinworm *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: **Crop Protection**, v. 30, n. 3, p. 455–459, 2001.

BUAH-KWOFIE, Archibold; HUMPHRIES, Marc S.; PILLAY, Letitia. Bioaccumulation and risk assessment of organochlorine pesticides in fish from a global biodiversity hotspot: iSimangaliso Wetland Park, South Africa. **Science of the Total Environment**, v. 621, p. 273–281, 2018.

CARVALHO, I. P.S. *et al.* IN VITRO Anticancer Activity and Physicochemical Properties of SOLANUM LYCOCARPUM Alkaloidic Extract Loaded in Natural Lipid-Based Nanoparticles. **Colloids and Interface Science Communications**, v. 28, n. May 2018, p. 5–14, 2019.

CASU, Rosanne E.; SELIVANOVA, Alexandra; PERROUX, Jai M. High-throughput assessment of transgene copy number in sugarcane using real-time quantitative PCR. **Plant cell reports**, v. 31, n. 1, p. 167-177, 2012.

CHEPCHIRCHIR, Fridah *et al.* Knowledge, attitude, and practices on tomato leaf miner, *tuta absoluta* on tomato and potential demand for integrated pest management among smallholder farmers in kenya and uganda. **Agriculture (Switzerland)**, v. 11, n. 12, 2021.

CHERIF, Asma; VERHEGGEN, François. A review of *tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) host plants and their impact on management strategies. **Biotechnology, Agronomy and Society and Environment**, v. 23, n. 4, p. 270–278, 2019.

CHOWDHURY, M T I; RAZZAQUE, M A; KHAN, M S I. Chlorinated Pesticide Residue Status in Tomato, Potato and Carrot. **Journal of Experimental Sciences**, v. 2, n. January 2011, p. 1–05, 2011. Disponível em: <www.jexpsciences.com>.

CHUNG, Seung Ho; JANDER, Georg. Inhibition of *Rhopalosiphum maidis* (Corn Leaf Aphid) Growth on Maize by Virus-Induced Gene Silencing with Sugarcane Mosaic Virus. In: **RNAi Strategies for Pest Management**. Humana, New York, NY, 2022. p. 139-153.

COHEN, Joel E. Human Population: The Next Half Century. **Science**, v. 302, n. 5648, p. 1172–1175, 2003.

COMMONS, Creative; NONDERIVATIVEWORK, Attribution- Noncommercial-. Documentos de Trabajo ISSN 2174-4912 Agricliometrics and agricultural change in the nineteenth and Twentieth centuries Vicente Pinilla □ DT-AEHE N°1803 Documentos de Trabajo ISSN 2174-4912 Agricliometría y cambio agrícola en los siglos XIX Y XX. n. April, 2018.

DA SILVA, Ricardo Siqueira *et al.* Potential risk levels of invasive *Neoleucinodes*

elegantalis (small tomato borer) in areas optimal for open-field *Solanum lycopersicum* (tomato) cultivation in the present and under predicted climate change. **Pest Management Science**, v. 73, n. 3, p. 616–627, 2017.

DAMMAK, Mariam *et al.* Involvement of the processing step in the susceptibility/tolerance of two lepidopteran larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 127, p. 46–50, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.09.005>>.

DARMANTI, Sri *et al.* Antioxidative defenses of soybean [*Glycine max* (L.) merr. cv. Grobogan] against purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) interference during drought stress. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 26, n. 1, p. 225–232, 2016.

DE AZEVEDO, Sebastião Márcio *et al.* Zingiberene-mediated resistance to the South American tomato pinworm derived from *Lycopersicon hirsutum* var. *hirsutum*. **Euphytica**, v. 134, n. 3, p. 347–351, 2003.

DE CAMPOS, Mateus Ribeiro *et al.* Impact of a shared sugar food source on biological control of *Tuta absoluta* by the parasitoid *Necremnus tuta*e. **Journal of Pest Science**, v. 93, n. 1, p. 207–218, 2020.

DE SOUZA AGUIAR, R. W., MARTINS, E. S., RIBEIRO, B. M., & MONNERAT, R. G. Cry10Aa Protein is Highly Toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an Important Insect Pest in Brazilian Cotton Crop Fields. **Bt Research**, 2012.

DESNEUX, N., HAN, P., MANSOUR, R., ARNÓ, J., BRÉVAULT, T., CAMPOS, M. R., ... & BIONDI, A. Integrated pest management of *Tuta absoluta*: practical implementations across different world regions. **Journal of Pest Science**, v. 95, n. 1, p. 17–39, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10340-021-01442-8>>.

DIJAI ANTONINO DE SOUZA JÚNIOR, J. Caracterização e avaliação de cepas de autóctones de *Bacillus thuringiensis* Para controle de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). 2007.

DORAIS, Martine; EHRET, David L.; PAPADOPOULOS, Athanasios P. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. **Phytochemistry Reviews**, v. 7, n. 2, p. 231–250, 2008.

DUARTE NETO, José Manoel W. *et al.* *Bacillus thuringiensis* endotoxin production: a systematic review of the past 10 years. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 1–21, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-020-02904-4>>.

- ECHEVERRÍA-LONDOÑO, Susy *et al.* Dynamism and context-dependency in diversification of the megadiverse plant genus *Solanum* (Solanaceae). **Journal of Systematics and Evolution**, v. 58, n. 6, p. 767–782, 2020.
- EL-KERSH, T. A. *et al.* Isolation and distribution of mosquito-larvicidal cry genes in *Bacillus thuringiensis* strains native to Saudi Arabia. **Tropical biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 616–632, 2014.
- ERDOĞAN, P., & BABAROĞLU, N. E. Life Table of the Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University**, v. 31, n. 2014–2, p. 75–75, 2014.
- ESCOBAR-CHÁVEZ, Cristiam; ALVARIÑO, Lorena; IANNACONE, José. Evaluación del Riesgo Ambiental Acuático de la mezcla de los plaguicidas imidacloprid (insecticida) y propineb (fungicida) en *Daphnia magna stratus*, **1820**. v. 9, 2019.
- FAO. (1996). Rome declaration and world food summit plan of action. Rome: FAO.
- FAO (2005), Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2022.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO-UN). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo. Cumplimiento de los objetivos internacionales para 2015 em relación el hambre: balance de los desiguales progresos. Roma: FAO-ONU; 2015.
- FAO (2017), Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>>. Acesso em: 12 de maio de 2022.
- FAO (2020), Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QV>>. Acesso em: 27 de agosto de 2022.
- FERRACINI, Chiara *et al.* Natural enemies of *Tuta absoluta* in the Mediterranean basin, Europe and South America. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 6, p. 578–609, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1572711>>.
- FIGUEIREDO, Ingrid Delbone *et al.* Lycopene improves the metformin effects on glycemic control and decreases biomarkers of glycoxidative stress in diabetic rats. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 3117–3135, 2020.
- FITTON, N. *et al.* The vulnerabilities of agricultural land and food production to future water scarcity. **Global Environmental Change**, v. 58, n. July 2018, p. 101944, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2019.101944>>.

FRIEDRICHS, Steffi *et al.* An overview of regulatory approaches to genome editing in agriculture. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 208–220, 2019.

FRITSCHI, L., MCLAUGHLIN, J., SERGI, C. M., CALAF, G. M., LE CURIEUX, F., FORASTIERE, F., ... & JAMESON, C. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 5, p. 490–491, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)>.

GERSZBERG, Aneta *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 3, p. 881–902, 2015.

GIUSTOLIN, Teresinha Augusta; VENDRAMIM, José Djair; POSTALI PARRA, José Roberto. Número de ínstaes larvais de *Tuta absoluta* (meyrick) em genótipos de tomateiro. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 2, p. 393–396, 2002.

GOEL, Deepa *et al.* Transformation of tomato with a bacterial *codA* gene enhances tolerance to salt and water stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 11, p. 1286–1294, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2011.01.010>>.

GÓMEZ, Isabel *et al.* Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. **FEBS Letters**, v. 513, n. 2–3, p. 242–246, 2002.

GÓMEZ, Isabel *et al.* Mapping the Epitope in Cadherin-like Receptors Involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A Toxin Interaction Using Phage Display. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 31, p. 28906–28912, 2001.

GUEDES, R. N. C.; SIQUEIRA, H. A. A. The tomato borer *Tuta absoluta*: insecticide resistance and control failure. **CABI Reviews**, n. 2012, p. 1-7, 2012

GUEDES, R. N.C. *et al.* Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: patterns, spread, mechanisms, management and outlook. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1329–1342, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10340-019-01086-9>>.

HAN, Peng *et al.* Are we ready for the invasion of *Tuta absoluta*? Unanswered key questions for elaborating an Integrated Pest Management package in Xinjiang, China. **Entomologia Generalis**, v. 38, n. 2, p. 113–125, 2018.

HAN, Peng *et al.* *Tuta absoluta* continues to disperse in Asia: damage, ongoing management and future challenges. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1317–1327, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10340-018-1062-1>>.

HANSEN, James *et al.* Climate risk management and rural poverty reduction.

Agricultural Systems, v. 172, n. December 2017, p. 28–46, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agsy.2018.01.019>>.

HANUR, V. S. *et al.* Genetic transformation of tomato using Bt Cry2A gene and characterization in Indian cultivar arka vikas. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 1805–1814, 2015.

HASHEMITASSUJI, Azra *et al.* Effects of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki and Spinosad on three larval stages 1st, 2nd and 3rd of tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in laboratory conditions. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 5, p. 377–384, 2015.

HEATH, Allen C.G. *et al.* Efficacy of native and recombinant Cry1B protein against experimentally induced and naturally acquired ovine myiasis (fly strike) in sheep. **Journal of Economic Entomology**, v. 97, n. 6, p. 1797–1804, 2004.

HECKEL, David G. How do toxins from *Bacillus thuringiensis* kill insects? An evolutionary perspective. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. 1–12, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/arch.21673>>.

HERRERA ROCHA, María; RODRÍGUEZ CAICEDO, Daniel; CANTOR, Fernando. Revista Facultad de Ciencias Básicas Antecedentes y Perspectivas para el Manejo Integrado de *Tuta absoluta* Meyrick 1917 (Lepidoptera: Gelechiidae). **Historia del artículo Resumen**, v. 14, n. 1, p. 73–81, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.xxxx>>.

ROMANO, Eduardo; VIANNA, Giovanni R. Análise da integração de transgenes pela técnica de Southern blot. In: Eduardo Romano; Giovanni R. Vianna. (Org.). **Análise da integração de transgenes pela técnica de Southern blot**. 2ed. Brasília: Embrapa, 2015, v. 1, p. 215-232.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA: produção agrícola municipal: tabelas. 2020. **Dados em nível de microrregião**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola-municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados>>. Acesso em: 27 de agosto de 2022.

INGRAM, John. A food systems approach to researching food security and its interactions with global environmental change. **Food Security**, v. 3, n. 4, p. 417–431, 2011.

INGRAM, John. Nutrition security is more than food security. **Nature Food**, v. 1, n. 1, p. 2, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s43016-019-0002-4>>.

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

JAKOWITSCH, Johannes et al. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. **The Plant Journal**, v. 17, n. 2, p. 131-140, 1999.

JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J. A., & CHARPENTIER, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 10, p. 1052–1055, 2012.

KAHN, Theodore W. *et al.* A *Bacillus thuringiensis* Cry protein controls soybean cyst nematode in transgenic soybean plants. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23743-3>>.

KANDIL, Mohamed A.; ABDEL-KERIM, Rania N.; MOUSTAFA, Moataz A.M. Lethal and sub-lethal effects of bio-and chemical insecticides on the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1–7, 2020.

KAPUSI, Eszter et al. Deleções de fragmentos genômicos hereditários e pequenos indels no gene ENGase putativo induzido por CRISPR/Cas9 em cevada. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 540, 2017.

KAUNDA, Joseph Sakah; ZHANG, Ying Jun. The Genus *Solanum*: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review. [S.l.]: **Springer Singapore**, 2019. v. 9. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13659-019-0201-6>>.

KHARKONGAR, H. P., KHANNA, V. K., TYAGI, W., RAI, M., & MEETEI, N. T. Wide Hybridization and Embryo-Rescue for Crop Improvement in *Solanum*. **Agrotechnology**, v. 01, n. S11, 2013.

KIM, Jae Yoon; GALLO, Maria; ALTPETER, Fredy. Analysis of transgene integration and expression following biolistic transfer of different quantities of minimal expression cassette into sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 108, n. 2, p. 297-302, 2012.

KIMURA, Seisuke; SINHA, Neelima. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-

bearing crop. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 3, n. 11, 2008.

KNAPP, SANDRA; JARVIS, CHARLES E. The typification of the names of New World Solanum species described by Linnaeus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 104, n. 4, p. 325–367, 1990.

KOBAYASHI, Masaaki *et al.* Genome-wide analysis of intraspecific dna polymorphism in “micro-tom”, a model cultivar of tomato (*solanum lycopersicum*). **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 2, p. 445–454, 2014.

KOSCHMIEDER, J., WÜST, F., SCHAUB, P., ÁLVAREZ, D., TRAUTMANN, D., KRISCHKE, M., ... & WELSCH, R. Plant apocarotenoid metabolism utilizes defense mechanisms against reactive carbonyl species and xenobiotics. **Plant physiology**, v. 185, n. 2, p. 331–351, 2021.

KOUL, Bhupendra *et al.* Transgenic tomato line expressing modified *Bacillus thuringiensis cry1Ab* gene showing complete resistance to two lepidopteran pests. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–13, 2014.

KRAMER, Matthew G; REDENBAUGH, Keith.

Commercialization_of_a_tomato_with_an_an.pdf. *Euphytica*. [S.l: s.n.]. , 1994

KUMAR, Manoj *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 142, 2021.

LAL, Rattan. Anthropogenic Influences on World Soils and Implications to Global Food Security. **Advances in Agronomy**, v. 93, n. SUPPL., p. 69–93, 2007.

LI, Changjian *et al.* The present situation of pesticide residues in China and their removal and transformation during food processing. **Food Chemistry**, v. 354, n. March, p. 129552, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129552>>.

LINDELL, Catherine *et al.* Enhancing agricultural landscapes to increase crop pest reduction by vertebrates. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 257, n. February, p. 1–11, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.028>>.

LIU, Xiaoman *et al.* Overview of mechanisms and uses of biopesticides. **International Journal of Pest Management**, v. 67, n. 1, p. 65–72, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>>.

LUNA, María G. *et al.* Potential of Biological Control Agents Against *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): Current Knowledge in Argentina. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 2, p. 489–494, 2015.

MAJUMDER, Shuvobrata *et al.* Bt jute expressing fused δ -endotoxin cry1Ab/Ac for

- resistance to lepidopteran pests. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 1–14, 2018.
- MARCHETTI, Elisa *et al.* Persistence of Cry toxins and cry genes from genetically modified plants in two agricultural soils. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 27, n. 3, p. 231–236, 2007.
- MARQUES, Luiz H. *et al.* Impact of transgenic soybean expressing Cry1Ac and Cry1F proteins on the non-target arthropod community associated with soybean in Brazil. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–23, 2018.
- MARTINS, J. C., PICANÇO, M. C., BACCI, L., GUEDES, R. N. C., SANTANA, P. A., FERREIRA, D. O., & CHEDIAK, M. Life table determination of thermal requirements of the tomato borer *Tuta absoluta*. **Journal of Pest Science**, v. 89, n. 4, p. 897–908, 2016.
- MATERU, Christopher L *et al.* Farmer's Perception Knowledge and Practices on Management of *Tuta Absoluta* Meyerick (*Lepidoptera Gelechiidae*) in Tomato Growing Areas in Tanzania. **International Journal of Research in Agriculture and Forestry**, v. 3, n. 2, p. 1–5, 2016.
- MAZZEI, João Roberto Fortes *et al.* Estudo Comparativo Das Concentrações De Agrotóxicos No Solo Provenientes Dos Métodos De Plantio Do Tomate Convencional, Orgânico E Sustentável / Comparative Study of Pesticide Concentrations in Soil From Conventional, Organic and Sustainable Tomato Growin. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22981–23000, 2021.
- MELO, Armindo *et al.* Monitoring pesticide residues in greenhouse tomato by combining acetonitrile-based extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas-chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1071–1077, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.112>>.
- MENDOZA-ALMANZA, Gretel *et al.* The cytotoxic spectrum of *Bacillus thuringiensis* toxins: From insects to human cancer cells. **Toxins**, v. 12, n. 5, p. 1–22, 2020.
- MOUSSA, Saad *et al.* The Status of Tomato Leafminer; *Tuta absoluta* (Meyrick) (*Lepidoptera: Gelechiidae*) in Egypt and Potential Effective Pesticides. **Academic Journal of Entomology**, v. 6, n. 3, p. 110–115, 2013. Disponível em: <<http://www.apc.gov.eg>>.
- MURFETT, Jane *et al.* Identificação de mutantes de histona deacetilase HDA6 de *Arabidopsis* que afetam a expressão do transgene. **The Plant Cell**, v. 13, n. 5, p. 1047–1061, 2001.

NAIK, Kalyani *et al.* Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, n. August, p. 101326, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>>.

NETO, Andrezza da Silva Machado *et al.* Costs, viability and risks of organic tomato production in a protected environment. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 4, p. 584–591, 2018.

PADGETTE, S. R., KOLACZ, K. H., DELANNAY, X., RE, D. B., LAVALLEE, B. J., TINIUS, C. N., ... & KISHORE, G. M. **Padgett-Development-RR-Soy-1995**. [S.l.: s.n.], 1995.

PANG, Shintaro; YANG, Tianxi; HE, Lili. Review of surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of synthetic chemical pesticides. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 73–82, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.017>>.

PAQUETTE, Sébastien Rioux *et al.* Seasonal patterns in Tree Swallow prey (Diptera) abundance are affected by agricultural intensification. **Ecological Applications**, v. 23, n. 1, p. 122–133, 2013.

PERVEEN, Rashida *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum*) Carotenoids and Lycopenes Chemistry; Metabolism, Absorption, Nutrition, and Allied Health Claims—A Comprehensive Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 7, p. 919–929, 2015.

PETERS, R. A. *et al.* Glyphosate for perennial sod kill in no-tillage corn. **Proceedings of the Northeastern Weed Science Society, New York.**, n. Volume 27, p. 1-6, 1973.

PICANÇO, Marcelo Coutinho *et al.* Social wasp predators of *Tuta absoluta*. **Sociobiology**, v. 58, n. 3, p. 621–633, 2011.

PRATISSOLI, Dirceu *et al.* Estimativa de *Trichogramma pretiosum* para controle de *Tuta absoluta* em tomateiro estaqueado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 715–718, 2005.

QADIR, S. U., RAJA, V., SIDDIQUI, W. A., SHAH, T., ALANSI, S., & EL-SHEIKH, M. A. Ascorbate glutathione antioxidant system alleviates fly ash stress by modulating growth physiology and biochemical responses in *Solanum lycopersicum*: Ascorbate Glutathione Alleviates Fly Ash Stress in *Solanum lycopersicum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1322–1336, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.013>>.

QUEIROZ, Renan B. *et al.* Influence of tomato plants nutritional status on the fitness and damage of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, v. 24, n. 2, p. 260–266, 2022.

RAIOLA, Assunta *et al.* Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

RAKHA, Mohamed *et al.* Evaluation of wild tomato accessions (*Solanum* spp.) for resistance to two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) based on trichome type and acylsugar content. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 64, n. 5, p. 1011–1022, 2017.

REHMAN, A. *et al.* Potato: a new host plant of *Tuta absoluta* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae) in Turkey. **Pakistan J. Zool**, v. 44, n. 4, p. 1183-1184, 2012.

RIGA, Patrick. Effect of rootstock on growth, fruit production and quality of tomato plants grown under low temperature and light conditions. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 56, n. 5, p. 626–638, 2015.

RODITAKIS, E.; PAPACHRISTOS, D.; RODITAKIS, N. E. Current status of the tomato leafminer *Tuta absoluta* in Greece. **EPPO Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 163–166, 2010.
ROSEN, Stacey. GlobalEconomic.pdf. [S.d.].

RUBIO, Viviana P.; BRAVO, Alejandra; OLMOS, Jorge. Identification of a *Bacillus thuringiensis* surface layer protein with cytotoxic activity against MDA-MB-231 breast cancer cells. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 36–42, 2017.

RUIU, Luca. Microbial biopesticides in agroecosystems. **Agronomy**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2018.

SABBOUR, M. M.; SOLIMAN, N. Evaluations of Three *Bacillus thuringiensis* Against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Egypt. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 8, p. 2067–2073, 2014.

SALAS GERVAASSIO, Nadia G. *et al.* A re-examination of *Tuta absoluta* parasitoids in South America for optimized biological control. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1343–1357, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10340-018-01078-1>>.

SALAZAR, E. R., & ARAYA, J. E. SALAZAR, Erika R.; ARAYA, Jaime E. Respuesta de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick), a insecticidas en Arica. **Agricultura Técnica**, v. 61, n. 4, p. 429-435, 2001..pdf. . [S.l: s.n.] , [S.d.]

SALEHI JOUZANI, Gholamreza *et al.* Distribution and diversity of Dipteran-specific

cry and cyt genes in native *Bacillus thuringiensis* strains obtained from different ecosystems of Iran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 83–94, 2008.

SALLET, L.A.P. Seleção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Repositório UnB** p. 1–109, 2013.

SANDEEP KUMAR, J. *et al.* Potential of standard strains of *Bacillus thuringiensis* against the tomato pinworm, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, 2020.

SANDHU, Sukhpreet; ALTPETER, Fredy. Co-integration, co-expression and inheritance of unlinked minimal transgene expression cassettes in an apomictic turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flugge). **Plant cell reports**, v. 27, n. 11, p. 1755-1765, 2008.

SARKAR, S., GIL, J. D. B., KEELEY, J., & JANSEN, K. The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food. Think Tank. **European Parliament**. [S.l: s.n.], 2021. Disponível em: <[https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EXPO_STU\(2021\)653622](https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EXPO_STU(2021)653622)>.

SATO, Shusei *et al.* The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. 635–641, 2012.

SAXENA, D.; STOTZKY, G. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, n. 1, p. 35–39, 2000.

SCHAUER, Nicolas; ZAMIR, Dani; FERNIE, Alisdair R. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: A survey of the *Solanum lycopersicum* complex. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 297–307, 2005.

SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ... & DEAN, D. *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1039–1046, 1998.

SEID, Awol *et al.* Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)-a century-old battle. **Nematology**, v. 17, n. 9, p. 995–1009, 2015.

SHARMA, Anket *et al.* Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42452-019-1485-1>>.

SHEEHY, Raymond E. *et al.* Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 208, n. 1–2, p. 30–36,

1987.

SIQUEIRA, H. A.A.; GUEDES, R. N.C.; PICANCO, M. C. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lep., Gelechiidae). **Journal of Applied Entomology**, v. 124, n. 5–6, p. 233–238, 2000.

SRINIVASAN, U. T., CHEUNG, W. W., WATSON, R., & SUMAILA, U. R. Food security implications of global marine catch losses due to overfishing. **Journal of Bioeconomics**, v. 12, n. 3, p. 183–200, 2010.

SUN, Hyeon Jin *et al.* A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. **Plant and Cell Physiology**, v. 47, n. 3, p. 426–431, 2006.

SYLLA, Serigne *et al.* Geographic variation of host preference by the invasive tomato leaf miner *Tuta absoluta*: implications for host range expansion. **Journal of Pest Science**, v. 92, n. 4, p. 1387–1396, 2019.

TEMESGEN, MELESE; RETTA, Negussie. Nutritional Potential , Health and Food Security Benefits of Taro Colocasia Esculenta (L .): A Review. **Food Science and Quality Management**, v. 36, p. 23–31, 2015.

TILMAN, David *et al.* Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20260–20264, 2011.

TRIPATHY, Barsha; MALLIKARJUNARAO, K. Variability in tomato (*Solanum lycopersicum* L .): A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 4, p. 383–388, 2020.

TYCZEWSKA, Agata *et al.* Towards Food Security: Current State and Future Prospects of Agrobiotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 12, p. 1219–1229, 2018.

ULIAN, E. C. et al. DNA methylation and expression of NPT II in transgenic petunias and progeny. **Theoretical and applied genetics**, v. 92, n. 8, p. 976-981, 1996.

ULUISIK, Selman *et al.* Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 9, p. 950–952, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3602>>.

URBANEJA, Alberto *et al.* Prospects for the biological control of *Tuta absoluta* in tomatoes of the Mediterranean basin. **Pest Management Science**, v. 68, n. 9, p. 1215–1222, 2012.

VAN LENTEREN, Joop C. *et al.* The pest kill rate of thirteen natural enemies as aggregate evaluation criterion of their biological control potential of *Tuta absoluta*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-90034-8>>.

VIANAA, J. L. *et al.* Isolates of bacillus thuringiensis from maranhão biomes with potential insecticidal action against aedes aegypti larvae (diptera, culicidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 1, p. 114–124, 2020.

VILLAS BÔAS, Geni Livtin; CASTELO BRANCO, Marina; MEDEIROS, Maria Alice. Manejo integrado da traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) em sistema de produção integrada de tomate indústria (PITI), **Embrapa Sede**, 2009. Disponível em: <<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR20091783046>>.

VINCENT, Holly *et al.* A prioritized crop wild relative inventory to help underpin global food security. **Biological Conservation**, v. 167, p. 265–275, 2013.

WANG, Qianqian *et al.* Sensitive determination of phenylurea herbicides in soybean milk and tomato samples by a novel hypercrosslinked polymer based solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 317, n. June 2019, p. 126410, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126410>>.

WATSON, J. D., & CRICK, F. H. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Jama*, v. 269, n. 15, p. 1966, 1993.

YANG, W., & GAO, Y. Translesion and repair DNA polymerases: diverse structure and mechanism. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.

ZHANG, Wenjun. Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 8, n. 1, p. 1–27, 2018. Disponível em: <www.iaees.org>.