

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

JOÃO MARCUS LIMA DE MATOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LETAL E SUBLETAL DE TOXINAS DE *Bacillus*
thuringiensis EM *Spodoptera cosmioides***

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

JOÃO MARCUS LIMA DE MATOS

AVALIAÇÃO DO EFEITO LETAL E SUBLETAL DE TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* EM

Spodoptera cosmioides

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo. Modalidade: trabalho científico.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira

Coorientador: Marcelo Mendes Rabelo

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2017

JOÃO MARCUS LIMA DE MATOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO LETAL E SUBLETAL DE TOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* EM
*Spodoptera cosmioides***

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Viçosa como parte das
exigências para a obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo. Modalidade: trabalho
científico.**

APROVADO: 21 de novembro de 2017

Prof. Eliseu José Guedes Pereira

(orientador)

(UFV)

Dedico essa obra aos meus pais Antônio Aparecido de Matos e Julimar Vale Lima de Matos que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Em especial a minha tia Rosimar Aparecida Lima pelo suporte. Sem o apoio deles nada do que eu construí até aqui seria realizado. Eu agradeço a Deus pela vida deles e pela presença diária durante toda minha vida acadêmica. Eles viveram esse sonho junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e a todas as pessoas que passaram por ela durante a graduação. Saibam que de alguma maneira me engrandeceram como pessoa e como profissional. Quero agradecer ao laboratório Interação Inseto-Planta por todo conhecimento, amizade e companheirismo. Eles foram minha segunda família e compartilharam comigo praticamente todos os dias da minha graduação. Em especial ao professor Eliseu José Guedes Pereira pelos ensinamentos e ao Marcelo Mendes Rabelo por todo apoio e amizade que culminaram na construção desse trabalho. Aos meus amigos que dividiram apartamento, o meu muito obrigado pela amizade, pelas risadas e companheirismo. Aos meus amigos do grupo sem limites e do grupo promessa é dívida, muito obrigado por tornarem meus finais de semana mais leves e cheios de felicidade.

RESUMO

Spodoptera cosmioides é uma espécie de lagarta desfolhadora polífaga com alto potencial destrutivo e com crescente importância nas culturas de soja e algodão. A ascensão dessa praga secundária pode estar relacionada, dentre outros fatores, aos resultados da interação com toxinas inseticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) presentes em cultivares transgênicas de suas plantas hospedeiras. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi determinar a suscetibilidade de *S. cosmioides* às toxinas Cry de *B. thuringiensis* e investigar os efeitos subletais causados por essas toxinas no desenvolvimento larval dessa espécie. Bioensaios com toxina Cry em dieta artificial revelaram que larvas de *S. cosmioides* apresenta alta suscetibilidade à toxina Cry1F e baixa suscetibilidade à toxina Cry2A e Cry1Ac. Posteriormente, foram realizados bioensaios com folhas de algodão Bt que expressam as toxinas Cry1Ac, Cry1Ac+Cry1F e Cry1Ab+Cry2Ae. As toxinas Cry1Ac+Cry1F e Cry1Ab+Cry2Ae exerceram efeito tóxico nos insetos causando redução da biomassa larval, pupal e sobrevivência, além de prolongar o tempo de desenvolvimento dos insetos sobreviventes. Mais uma vez os resultados indicaram baixa suscetibilidade de *S. cosmioides* à toxina Cry1Ac, pois plantas que expressam esta toxina não alteraram nos insetos nenhum parâmetro estudado. Tal constatação nos motivou a testar se a toxina Cry1Ac poderia exercer um efeito subletal e interferir na história de vida e nos parâmetros reprodutivos de *S. cosmioides*. Entretanto, não houve diferença estatística na taxa líquida de reprodução (R_0) no tempo de desenvolvimento (T) e taxa intrínseca de crescimento (r_m). Desta forma, resultados deste trabalho alertam para o risco de aumento da importância de *S. cosmioides* em cultivos de soja e algodão Bt, dado a baixa eficiência de controle de algumas dessas toxinas Bt e ao alto potencial destrutivo que essa praga possui.

Sumário

1.Introdução	8
2. Objetivo Geral.....	10
2.1 Objetivos específicos	10
3. Material e Métodos	11
3.1 Origem e manutenção dos insetos.....	11
3.2 Cultivo das plantas.....	11
3.3 Suscetibilidade de <i>S. cosmioides</i> às toxinas Cry1F, Cry2A e Cry1Ac de <i>B. thuringiensis</i> em dieta artificial	12
3.4 Desempenho larval de <i>S. cosmioides</i> em folha de algodão Bt.....	12
3.5 Efeitos subletais da toxina Cry1Ac no desempenho imaturo e nos parâmetros reprodutivos de <i>S. cosmioides</i>	13
3.6 Análise dos Dados.....	14
4.Resultados	15
4.1. Suscetibilidade de <i>S. cosmioides</i> a Cry1F, Cry2A e Cry1Ac em dieta artificial ...	15
4.2 Desempenho imaturo de <i>S. cosmioides</i> em folha de algodão Bt.....	15
4.3 Efeitos subletais da toxina Cry1Ac no desempenho imaturo e nos parâmetros reprodutivos de <i>S. cosmioides</i>	16
4.3.1 Desempenho da fase imatura	16
4.3.2 Parâmetros reprodutivos	16
5. Discussão	18
6. Considerações Finais.....	20
7. Referências	21

1. Introdução

Lagartas do complexo *Spodoptera* têm sido relatadas como pragas de crescente importância em regiões produtoras de soja e algodão (Santos *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011; Ceolin-Bortolotto, 2015). Dentre as espécies deste complexo, podemos citar *Spodoptera cosmioides* (Lepidoptera: Noctuidae), que além de polífaga possui alto potencial destrutivo. O consumo de material vegetal nesta espécie é aproximadamente o dobro em relação ao consumo de cada uma das demais espécies de lagartas desfolhadoras que também ocorrem na cultura, como *S. frugiperda*, *S. eridania* e alguns desfolhadores do complexo plusiinae (Bueno *et al.*, 2011).

Esta praga se alimenta de inúmeros hospedeiros, tais como: algodão (maçãs), soja (folhas, vagens), hortaliças, feijão caupi, mudas de eucalipto entre outros (Bertels 1953, Silva *et al.*, 1968, Santos *et al.*, 1980, Gallo *et al.*, 1988). Mesmo com tamanha diversidade de plantas hospedeiras, a sua ocorrência era anteriormente relatada somente em algumas culturas, e geralmente estava associado a desequilíbrios gerados pelo uso excessivo de inseticidas (Habib *et al.*, 1983; Bavaresco *et al.*, 2004). Todavia, o ataque de *S. cosmioides* em cultivos agrícolas, tais como soja e algodão, tem sido observado com maior frequência nos últimos anos e com significativas perdas econômicas, o que sugere uma mudança de status de praga secundária para praga chave. (Quintela *et al.*, 2007; Faria, 2010; Link, 2010; Silvie *et al.*, 2013).

Atualmente, a principal estratégia de controle de lagartas desfolhadoras em soja e algodão tem sido a utilização de plantas transgênicas que expressam proteínas (i.e., toxinas) com ação inseticida, proveniente da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Siebert *et al.*, 2008). A morte da praga acontece devido a ingestão de fragmentos da planta hospedeira contendo a toxina de Bt. A toxina é ativada (QU *et al.*, 2015) no intestino médio da lagarta por ação de proteases, resultando num fragmento tóxico ao inseto suscetível. (Gill *et al.*, 1992; Knowles, 1994; Bravo *et al.*, 2004). No Brasil, as culturas do algodão e soja expressam estas toxinas que são do grupo: Cry1Ac, Cry1F e Cry2Ab (Céleres, 2016).

Assim como aconteceu com os inseticidas, a utilização de plantas Bt poderia contribuir para o aparecimento de pragas secundárias, visto o intenso controle das

pragas chave (Habib *et al.* 1983). A redução populacional de pragas chave, suscetíveis a toxinas Bt, pode liberar nicho ecológico para infestações de pragas secundárias, a exemplo de *S. cosmioides*, aumentando a chance de sucesso no desenvolvimento desses insetos (Stark, 2003; Van Wyk, 2006; Desneux *et al.*, 2007). O principal problema diante desse cenário é que as lagartas de importância secundária que acometem lavouras de algodão e soja Bt nem sempre são sensíveis às toxinas inseticidas presentes em seus hospedeiros. Além disso, em hospedeiros de *S. cosmioides* como o algodoeiro, já foi relatado que existem oscilações na expressão das toxinas Cry1Ac e Cry2Ab2 em diferentes estruturas e ao longo do desenvolvimento da planta, principalmente na fase reprodutiva e na senescência, tornando esta espécie uma ameaça mesmo em cultivos Bt (Adamczyk *et al.*, 2001; Vohlk *et al.*, 2006). Alterações na expressão da toxina podem ocasionar um decréscimo na atividade inseticida e isso pode permitir que o inseto complete seu ciclo de vida na planta (Kranthi *et al.*, 2005; Olsen *et al.*, 2005).

No Brasil o sistema agrícola é caracterizado pela sucessão e rotação de culturas como a soja e algodão, permitindo que os insetos mudem de uma cultura para outra e fiquem por mais tempo expostos às toxinas Bt expressas nessas plantas. A intensa exposição do inseto às diferentes toxinas Bt em seus hospedeiros, aliado a variação na suscetibilidade entre as espécies praga e variação na expressão dessa toxina na planta pode gerar um efeito no inseto que ainda não está elucidado. As toxinas Bt nas plantas podem causar um efeito estimulatório no inseto menos suscetível, semelhante ao que ocorre em relações específicas entre inseticidas e pragas (Qu *et al.*, 2015). Se essa hipótese for provada, ela pode apoiar explicações sobre o aumento da incidência de *S. cosmioides* em campo. Diante desta abordagem, conhecer a resposta letal e subletal que *S. cosmioides* apresenta quando submetida às plantas de algodão Bt é de extrema valia. Esse estudo representa um grande passo para começar a entender alguns fenômenos que vêm acontecendo em campo com lagartas desfolhadoras, além de auxiliar no desenvolvimento de estratégias de manejo dessas espécies em plantas Bt.

2. Objetivo Geral

Determinar a suscetibilidade de *S. cosmioides* às toxinas Cry1F, Cry1Ac e Cry2A de *B. thuringiensis* e investigar os efeitos letais e subletais causados por essas toxinas no desenvolvimento larval dessa espécie.

2.1 Objetivos específicos

1. Estabelecer a concentração efetiva (CE_{50}) das toxinas Cry1Fa, Cry1Ac e Cry2Aa para inibir 50% do crescimento larval da população de *S. cosmioides*, bem como a concentração letal (CL_{50}) capaz de causar 50% da morte das larvas.
2. Determinar o desempenho da fase imatura (i.e., tempo de desenvolvimento larval, sobrevivência e bioamassa pupal) de *S. cosmioides* submetidas a três cultivares de algodão Bt que expressam as toxinas Cry1Ac, Cry1Ac+Cry1F e Cry1Ab+Cry2Ae.
3. Determinar os possíveis efeitos subletais da toxina Cry1Ac no desempenho da fase imatura (i.e., tempo de desenvolvimento larval, sobrevivência e bioamassa pupal) e nos parâmetros reprodutivos de *S. cosmioides*.

3. Material e Métodos

3.1 Origem e manutenção dos insetos

Adultos de *S. cosmioides* foram coletados no município de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) em armadilha luminosa instalada no campo. Após triagem dos indivíduos, os insetos foram acondicionados em caixa de isopor e encaminhados ao laboratório de Interação Inseto-Planta da Universidade Federal de Viçosa. Os insetos foram criados em dieta artificial usando a metodologia de Greene; Leppla; Dieckerson, 1976.

3.2 Cultivo das plantas

Os algodões Bt utilizados foram Bolgard I (NUOPAL RR), Widsrtike (FM 975) e TwinLink (EB 0250) com seus respectivos isogênicos (NUOPAL isolinha, FM 933) os dados para a cultivar isogênica do TwinLink foram compostos pela média das outras duas variedades isogênicas (NUOPAL isolinha, FM 933) devido a ausência do isogênico para essa cultivar em laboratório. As sementes foram semeadas em vasos de 10 ou 20 litros, utilizando uma mistura de solo e substrato comercial Plantmax na proporção (2:1). A cada 7 dias, um novo plantio foi realizado para que as folhas utilizadas nos experimentos tivessem sempre a mesma idade. Os cultivos foram conduzidos de acordo com as práticas recomendadas para a região (Ribeiro *et al.*, 1999). As plantas foram irrigadas diariamente e fertilizadas por ocasião do plantio e em cobertura com 100 kg.ha⁻¹ de NPK (4-14-8). O controle de plantas daninhas foi realizado de forma manual e o controle de pragas foi realizado sem o uso de pesticidas.

3.3 Suscetibilidade de *S. cosmioides* às toxinas Cry1F, Cry2A e Cry1Ac de *B. thuringiensis* em dieta artificial

Bioensaio usando neonatas de *S. cosmioides* foram conduzidos utilizando as toxinas Cry1F, Cry2A e Cry1Ac. A toxina de Bt foi aplicada sobre superfície de dieta artificial em bandejas plásticas com 128 células (cada célula de 16 mm de diâm. x 16 mm de altura; CD International, Pitman, NJ). As diluições da toxina foram preparadas em 0,1% Triton-X 100 para obtenção de distribuição uniforme da solução sobre a superfície da dieta. Uma larva neonata (com menos de 24 horas de idade) foi adicionada em cada cavidade da bandeja e avaliou-se o peso do grupo e larvas do mesmo tratamento após 7 e 14 dias de exposição. O tratamento controle constituiu de cavidades com a dieta artificial tratadas com água contendo 0,1% Triton-X 100. A mortalidade observada foi transformada para mortalidade corrigida no tratamento controle. Esses dados foram submetidos à análise de próbite (Finney 1971 ; Robertson *et al.*, 2007). para determinar concentrações letais e seus intervalos de confiança. O peso das larvas foi transformado em % de inibição de crescimento relativo ao controle e os dados foram analisados por regressão não linear (SAS Institute Inc. 2002).

3.4 Desempenho larval de *S. cosmioides* em folha de algodão Bt

O desempenho da linhagem de *S. cosmioides* ao algodão Bt, foi determinado usando folhas de algodoeiros Bt e não-Bt desenvolvidas até o estágio V5 As folhas de acordo com o tratamento foram dispostas em bandejas de PVC com 16 cavidades (Advento do Brasil, Diadema, SP). Em cada cavidade foi transferida uma neonata eclodida após 24 horas. As folhas foram trocadas diariamente até a pupação das larvas. As bandejas foram mantidas em sala de criação climatizada (Temperatura $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo 14:10 h, L:E). Foram comparadas a biomassa larval aos 7 e 14 dias, biomassa pupal, tempo de desenvolvimento e sobrevivência.

3.5 Efeitos subletais da toxina Cry1Ac no desempenho imaturo e nos parâmetros reprodutivos de *S. cosmioides*

O efeito subletal de *S. cosmioides* submetida à toxina Cry1Ac foi avaliado através do desempenho larval aos 7 dias, da tabela de vida e de fertilidade de insetos. As subdoses crescentes utilizadas foram (0, 1.1, 3.3, 9.9, 29.6, 88.9, 266.7 ng.cm⁻²) da toxina Cry1Ac na superfície da dieta artificial. Passados 14 dias de exposição aos tratamentos, os insetos foram retirados da unidade experimental e transferidos para bandejas de PVC com 16 células contendo dieta artificial e criados até a pupação. No momento da constatação das pupas nas bandejas, as mesmas foram pesadas e determinou-se o sexo. As pupas foram individualizadas em potes de polietileno (5 cm de altura x 7,5 Φ) e utilizou-se papel úmido para que não ocorresse o ressecamento das mesmas. Foram montadas gaiolas contendo 3 casais de *S. cosmioides*. Os casais foram dispostos em gaiolas de PVC (30 cm de altura x 20 cm Φ) e alimentados com uma solução aquosa utilizando: 10 % de açúcar, 5% ácido ascórbico nas proporções 10% e 5% respectivamente. Para obter as posturas utilizou-se folhas de papel sulfite como substrato e diariamente foram coletadas as massas de ovos. Posteriormente, as posturas foram transferidas para sacos plásticos até que as larvas eclodissem dos ovos. Para determinar a fertilidade, contou-se diariamente o número de neonatas eclodidas das massas de ovos. Além disso, foi determinado a razão sexual, sobrevivência, idade das fêmeas e estimado os parâmetros reprodutivos (R_0) que corresponde a capacidade do inseto de aumentar o número de indivíduos de uma geração para outra, taxa intrínseca de crescimento (r_m) que é a capacidade de uma fêmea gerar uma outra fêmea por unidade de tempo e o intervalo de geração (T) que é o tempo total de vida dos pais até os seus descendentes.

3.6 Análise dos Dados

Nos biensaos de suscetibilidade, o peso larval foi transformado em porcentagem de inibição de crescimento em relação ao controle. Os dados de mortalidade e inibição de crescimento foram analisados por análise próbite (Finney, 1971) usando o programa POLO-PLUS (Robertson *et al.*, 2007). Os valores de biomassa larval e pupal, tempo de desenvolvimento larval e sobrevivência em folhas de algodão Bt e não-Bt e em dieta artificial atenderam as pressuposições da análise de variância (ANOVA) e foram comparados pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Os parâmetros de crescimento populacional foram determinados usando a programação SAS desenvolvida por Maia *et al.* (2000) e as variâncias associadas às estimativas foram obtidas pelo método de Jackknife (Efron 1982, Meyer *et al.*, 1986). Esse procedimento permite a construção de intervalos de confiança para os parâmetros estimados, além de comparações pelo teste *t* usando os respectivos *P* valores.

4. Resultados

4.1. Suscetibilidade de *S. cosmioides* à Cry1F, Cry2A e Cry1Ac em dieta artificial

Os resultados dos bioensaios com toxinas Cry em dieta artificial (Tabela 1) mostraram que *S. cosmioides* possui alta suscetibilidade a Cry1F a baixa suscetibilidade às toxinas Cry2A e Cry1Ac. Esses resultados são amparados pelos valores de inibição de crescimento e mortalidade (CE_{50} e CL_{50}) e ajuste satisfatório ao modelo de próbite ($P > 0,05$). *S. cosmioides* apresentou maior inibição no crescimento quando exposta a Cry1F (concentração efetiva para reduzir 50% do crescimento larval, $CE_{50} = 9,4 \text{ ng/cm}^2$). A CE_{50} para as toxinas Cry2A e Cry1Ac foram 689,5 e 273,1 ng/cm^2 , respectivamente. As concentrações de Cry1F e Cry2Aa para causar 50% de mortalidade larval (CL_{50}) foram 455 e 1497 ng/cm^2 , respectivamente, enquanto a CL_{50} em insetos expostos a toxina Cry1Ac foi superior a 10000 ng/cm^2 .

4.2 Desempenho imaturo de *S. cosmioides* em folha de algodão Bt

No bioensaio em folhas de algodão foram investigados a biomassa larval e pupal, tempo de desenvolvimento e sobrevivência de *S. cosmioides*. Os dados representados na Figura 1a, b, c e d, indicam que não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados para os insetos expostos as folhas de algodão que expressa a toxina Cry1Ac. Resultado oposto foi obtido nas demais variedades de algodão Bt. Insetos expostos ao algodão Cry1Ac+Cry1F não foram capazes de completar o desenvolvimento larval e morreram antes de atingirem a fase de pupa. Quando os insetos foram expostos as plantas de algodão Cry1Ab+Cry2Ae, houve interferência das toxinas no desenvolvimento larval, confirmado pela redução na biomassa larval, biomassa de pupa e prolongamento do tempo de desenvolvimento.

Os dados da Figura 2 mostram que *S. cosmioides* quando submetida ao algodão Cry1Ac, apresentou sobrevivência semelhante ao controle Iso Cry1Ac, que não expressa toxina Bt. Os insetos submetidos as variedade de algodão Cry1Ac+Cry1F e Cry1Ab+Cry2Ae, tiveram sobrevivência menor no decorrer dos dias de avaliação se

comparados aos seus respectivos cultivares isogênicos (Iso Cry1Ac+Cry1F e Iso Cry1Ab+Cry2Ae).

4.3 Efeitos subletais da toxina Cry1Ac no desempenho imaturo e nos parâmetros reprodutivos de *S. cosmioides*

4.3.1 Desempenho da fase imatura

As concentrações da toxina Cry1Ac testadas foram 0; 1,1; 3,3; 9,9; 29,6; 88,9; 266,7 ng.cm⁻², as quais não causam efeito letal em *S. cosmioides* como indicado nos experimentos de suscetibilidade em que a concentração para CL₅₀ (Concentração letal para matar 50% dos indivíduos) é superior (Tabela 1). As concentrações 1,1; 3,3 e 9,9 ng.cm⁻² da toxina Cry1Ac não causaram efeito na biomassa larval. Essa resposta é evidenciada pela sobreposição das barras de erro entre essas concentrações e a testemunha, sem presença de toxinas (Figura 3). A partir da concentração de 29,6 ng.cm⁻² pode se observar inibição no crescimento até atingir o máximo na concentração de 266,7 ng.cm⁻². O tempo de desenvolvimento (Larva-Pupa), biomassa pupal e a duração do período pupal (Pupa-Adulto) de *S. cosmioides* submetida às concentrações subletais da toxina Cry1Ac não variou significativamente entre as concentrações. O tempo de desenvolvimento larval oscilou entre 27 e 30 dias ($F_{8,333} = 1,54$; $P > 0,05$). A biomassa pupal também foi semelhante entre os tratamentos variando de 451 a 474 mg ($F_{8,317} = 1.267$; $P > 0,05$) enquanto a variação no período pupal está entre 13 - 14 dias ($F_{8,268} = 1,198$; $P > 0,05$).

4.3.2 Parâmetros reprodutivos

A Figura 4 mostra os resultados referentes aos parâmetros de fertilidade dos insetos que foram expostos as doses subletais da toxina Cry1Ac. A taxa líquida de reprodução (R_0) é a capacidade da fêmea aumentar o número de fêmeas de uma geração para outra. A taxa intrínseca de crescimento (r_m) é a capacidade de uma fêmea gerar uma outra fêmea por unidade de tempo. O tempo de geração (T) é o

tempo de vida dos pais até o surgimento dos seus descendentes, ou seja, o intervalo entre gerações. Os resultados indicaram não haver diferenças estatísticas na taxa líquida de reprodução (R_0) e no tempo de geração (T) dos insetos. Na taxa intrínseca de crescimento (r_m) apenas os insetos expostos a concentração de 88,9 ng/cm² tiveram pior desempenho comparado aos demais.

5. Discussão

A baixa suscetibilidade de *S. cosmioides* às toxinas Cry2A e Cry1Ac pode ser explicada em razão da quantidade e tipo de receptores no epitélio do intestino médio desta espécie ou pela inativação das toxinas por proteases desses insetos (Hoffmann *et al.*, 1988). A interação da toxina Bt com seus receptores é muito específica e a toxicidade depende da ligação da toxina aos seus receptores, sendo que uma maior afinidade dessa ligação pode explicar a maior suscetibilidade das larvas à Cry1F. Além disso, a diferença na suscetibilidade de espécies de lagartas a toxinas Bt pode estar ligada a outros aspectos envolvidos em sua rota intoxicativa, incluindo o tamanho da toxina (peso molecular) e sua conformação tridimensional, sua clivagem proteolítica e a solubilização no pH intestinal dos insetos. Juntos, esses processos determinam a interação da toxina com proteínas receptoras específicas nas membranas do epitélio intestinal do inseto, permitindo que haja maior ou menor toxicidade dependendo das condições físico-químicas do tubo digestivo larval (Karim; Dean, 2000; Pardo- López; Soberón; Bravo, 2013). Nos ensaios em folhas de algodão Bt, que expressam as toxinas Cry1Ac, Cry1Ac+Cry1F e Cry1Ab+Cry2Ae, também foram encontradas variações nos parâmetros estudados. Esses resultados comprovam o maior efeito tóxico de Cry1F e Cry2A e menor de Cry1Ac, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios de suscetibilidade utilizando toxina purificada em dieta artificial.

O baixo efeito tóxico de Cry1Ac foi o que motivou as investigações dos possíveis efeitos subletais dessa toxina em *S. cosmioides*, já que por não causar uma letalidade evidente na fase imatura dos insetos, os demais efeitos, incluindo estimulatórios, decorrentes da interação inseto e toxina Bt ainda não foram investigados. Para explorar as consequências da alimentação de *S. cosmioides* em Cry1Ac foram conduzidos bioensaios com exposição de larvas a subdoses da toxina Cry1Ac em dieta artificial e os parâmetros de história de vida e fertilidade foram avaliados. As concentrações subletais de Cry1Ac causaram uma resposta bifásica em larvas de *S. cosmioides*, visto que em baixas concentrações não modificaram a biomassa (i.e., ganho de peso) enquanto concentrações mais elevadas causaram efeito inibitório no crescimento. Embora a variação na biomassa larval de *S. cosmioides* não tenha se refletido na biomassa pupal, a hipótese de que essa variação, sobretudo em

concentrações elevadas, possa exercer influência sobre outras fases de vida do inseto não pode ser descartada. Existem evidências em outras espécies em que a exposição à toxinas inseticidas pode afetar o desempenho reprodutivo dos insetos (Qu *et al.*, 2015).

Avaliou-se os parâmetros de fertilidade e os resultados encontrados indicam que os insetos submetidos às subdoses da toxina Cry1Ac não apresentam variação na taxa líquida de crescimento (R_0) e no tempo de geração (T) e taxa intrínseca de crescimento (r_m). O fato da exposição a doses subletais não ter exercido influência nos parâmetros reprodutivos e a notável capacidade que muitos insetos possuem de se recuperar da inibição de crescimento larval sugerem um efeito compensatório e indicam que *S. cosmioides* continua a constituir uma ameaça para as lavouras de algodão Cry1Ac. Todos os processos biológicos no inseto, do ovo até o adulto, são atividades que requerem energia, se o indivíduo passa por um processo de estresse (inibição de crescimento) é esperado que haja desbalanços energéticos. Assim sendo, a energia utilizada para reparar o estresse pode comprometer outros processos fisiológicos por diminuir a energia disponível (Calow & Sibly, 1990). No entanto, a energia pode ser obtida do alimento e se este recurso não é limitante, o inseto pode usufruir dessa oportunidade para alocar energia suficiente e suprir ou reparar o desgaste energético frente a um agente tóxico.

Os resultados deste trabalho sugerem que a inibição de crescimento larval, causada por exposição a toxina Cry1Ac durante os sete primeiros dias de vida do inseto, não é suficiente para alterar o desempenho reprodutivo dos mesmos quando adultos. Além disso, nas concentrações testadas, nenhum efeito benéfico foi observado decorrente da interação *S. cosmioides* + Cry1Ac, não sendo esta uma hipótese válida para justificar o aumento da importância de *S. cosmioides* em cultivos Bt, como soja e algodão. A baixa suscetibilidade de *S. cosmioides* à toxina Cry1Ac presente em cultivares Bt de algodão e soja alerta para o um possível aumento da importância nos cultivos de soja e algodão Bt, o que é preocupante em razão ao seu alto potencial destrutivo.

6. Considerações Finais

Nos experimentos, testou-se os efeitos das toxinas Bt presentes em variedades de algodão e as possíveis consequências que a exposição larval a essas toxinas podem causar aos insetos. Os resultados indicam haver risco de aumento da importância de *S. cosmioides* nos cultivos de algodão Bt, em especial na variedade Bt que expressa a toxina Cry1Ac, em razão da baixa eficiência de controle das lagartas por essa toxina e do potencial destrutivo que essa praga possui. Práticas de manejo integrado de pragas, incluindo planejamento pré-plantio, amostragens e pertinentes tomadas de decisão de controle devem ser utilizadas para adequado uso da tecnologia Bt em cultivos de soja e algodão Bt. Isso é importante principalmente nos cultivares Bt com toxinas a que as pragas possuem baixa suscetibilidade de modo a evitar mudança de status de praga secundária para praga-chave.

7. Referências

- Adamczyk, J. J. et al. Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *Journal of Economic Entomology*, v.94, n.6, p.1589-1593, 2001.
- Bavaresco, Alvimar. et al. Adequação de uma dieta artificial para a criação de *Spodoptera cosmioides* (Walk.)(Lepidoptera: Noctuidae) em laboratório. *Neotropical Entomology*, v. 33, n. 2, p. 155-161, 2004.
- Bertels, A. Pragas de solanáceas cultivadas. *Agros*, v. 6, n. 4, p. 154-160, 1953.
- Bueno, R. C. O. F. et al. Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. *Pest Management Science*, v. 67, n. 2, p. 170-174, 2011.
- Bravo, A. et al. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1667, p.38-46, 2004.
- Calow, P. & R.M. Sibly. 1990. A physiological basis of populations processes: ecotoxicological implications. *Funct. Ecol.* 4: 283-288.
- Céleres (2016) Informativo Céleres - Projeção de Safra 2015/16. <http://www.celerescombr/ic16-03-projecao-de-safra-soja-marco-2016/>.
- Ceolin-Bortolotto, O. et al. Larval development of *Spodoptera eridania* (Cramer) fed on leaves of Bt maize expressing Cry1F and Cry1F + Cry1A.105 + Cry2Ab2 proteins and its non-Bt isoline. *Revista Brasileira de Entomologia*, n. 59, p. 7-11, 2015.
- Desneux, N. et al. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, v.52, p.81–106, 2007.
- Efron B (1982) *The Jackknife, the Bootstrap and other resampling plans*. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- Finney D (1971) *Probit analysis* 3rd edition Cambridge University Press London.

- Gallo, D. et al. Manual de entomologia agrícola. 2a ed. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, p.649, 1988.
- Gallo, D. et al. Entomologia agrícola. Piracicaba :FEALQ, 2002. 920p.
- Greene, G. L. et al. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium 1 2 3. Journal of Economic Entomology, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.
- Gill, S.S. et al. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology, v.37, p.615-636, 1992.
- Habib, M.E.M. et al. Effect of three larval diets on the development of the armyworm, *Spodoptera latifascia* Walk., 1856 (Noctuidae, Lepidoptera). Revista Brasileira de Zoologia, São Paulo, v.1, n.3, p.177-182, 1983.
- Hoffmann, Christina et al. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 85, n. 21, p. 7844-7848, 1988.
- Karim, S. et al. Toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins to the midgut brush border membrane vesicles of the rice leaf folders, *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis*. Curr Microbiol, v. 41, n. 4, p. 276–283, 2000.
- Knowles, B. H. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxins. Advances in Insect Physiology, v.24, p.275-308, 1994.
- Kranthi, K.R. et al. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in Bt-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). Current Science, v. 89, n.2, p.291-298, 2005.
- Luckey, T. D. Insecticide hormoligosis. J. Econ. Entomol. 61: 7Ð12 1968.
- Link, D. Escuras e abundantes. Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, v. 129, p. 18-20, 2010

- Maia, ADN, Luiz AJB, Campanhola C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, v. 93, p. 511–518, 2000.
- Meyer, J.S. et al. Estimating Uncertainty in Population-Growth Rates - Jackknife Vs Bootstrap Techniques. *Ecology* 67:1156-1166, 1986.
- Olsen, K.M. et al. Season-long variation in expression of Cry1Ac gene and efficacy of *Bacillus thuringiensis* toxin in transgenic cotton against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, v.98, n.3, p. 1007-1017, 2005.
- Pardo-López, L. et al. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: Mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 37, n. 1, p. 3–22, 2013.
- Quintela, E.D. et al. Desafios do manejo integrado de pragas de soja em grandes propriedades do Brasil Central. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2007. 6 p (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 149).
- Ribeiro, A. et al. Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação Viçosa. Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais: 359, 1999.
- Robertson, J.L., Savin, N., Russell, R.M. & Preisler, H.K. (2007) . Bioassays with arthropods. CRC press
- Santos, W.J. Manejo Integrado de pragas do algodoeiro no Brasil. In: Algodão, Fundação MT, Rondonópolis, MT, Boletim 02, pp. 48–71, 107p. 1997.
- Santos, G.P. et al. Biologia de *Spodoptera latifascia* (Walk., 1856) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre folhas de eucalipto. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.24, n.2, p.153-155, 1980.
- Santos, W.J. Complexo de pragas do algodoeiro no sistema de plantio direto, p.128-133. In: Anais do 8º Encontro Plantio Direto no Cerrado, Tangará da Serra, MT, 217p, 2005.

- Santos, K. B. et al. Characterization of the damage of *Spodoptera eridania* (Cramer) and *Spodoptera cosmioides* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) to structures of cotton plants. *Neotropical Entomology*, v. 39, n. 4, p. 626-631, 2010.
- SAS INSTITUTE. SAS user's manual, version 9.1. Cary, NC: SAS Institute, 2002.
- Siebert, M. W. et al. Evaluation of corn hybrids expressing Cry1Fa (Herculex[®] I Insect Protection) against Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern United States. *Journal of Entomological Science*, 43:41-51, 2008.
- Silva, A.G.A. et al. Quarto catálogo dos insetos que vivem nas plantas do Brasil, seus parasitos e predadores. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Tomo 1, Parte II, 1968.
- Stark, J.D. et al. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. *Ann Rev Entomol*, v.48, p.505–519, 2003.
- Software L (1987) POLO-PC: a user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software Berkeley, CA.
- Van Wyk, A. Comparative phenology of lepidoptera on genetically modified bt- and non-bt maize. Dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree Masters of Environmental Science at the North-West University. Potchefstroom, South Africa. 2006.
- Vohlk, Paulo Henrique Fernandes; et al. Avaliação e manejo de pragas dos Algodoeiros Bt, primeira safra no Mato Grosso, Brasil. In :XXI Congresso Brasileiro de Entomologia. Primavera do Leste –MT 2016.

Tabela 1. Inibição de crescimento e mortalidade larval de *Spodoptera cosmioides* obtidas pela regressão concentração-resposta às toxinas, Cry1Fa, Cry2Aa e Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis*.

Variável	Toxina	n ^c	Inclinação ± EP	CE ₅₀ ou CL ₅₀ ^{a,b} (IC 95%)	CE ₉₉ ou CL ₉₉ ^{a,b} (IC 95%)	χ ²	P
Inibição de crescimento	Cry1F	505	1.26 ± 0,10	9.4 (6.2 - 13.2)	650.8 (336.2 - 1745.9)	5.05	0.40
	Cry2Aa	512	1.86 ± 0.20	689.5 (488.3 - 1046.0)	12233.0 (5328.6 - 58354.0)	6.67	0.57
	Cry1Ac	192	0.72 ± 0.07	273.1 (96.3 – 601.7)	> 10000	8.9	0.11
Mortalidade	Cry1F	473	2.13 ± 0.36	853.4 (454.91 – 1289.67)	10492.4 (4769.79 – 89724.98)	6.18	0.28
	Cry2Aa	512	1.66 ± 0.19	1132.1 (795.4 -1497.4)	28359.0 (16428.0 - 65964.0)	3.80	0.57
	Cry1Ac	192	nc	> 10000	> 10000	nc	-

^a ng (nanogramas).cm⁻² de toxina na superfície da dieta / CE: Concentração Efetiva para causar inibição em 50 ou 99 % dos indivíduos testados durante o período de 7 dias. CL: Concentração Letal para causar mortalidade em 50 ou 99 % dos indivíduos testados durante o período de 7 dias / n: Número de insetos testados / nc: Não calculado por falta de resposta mesmo na maior concentração testada

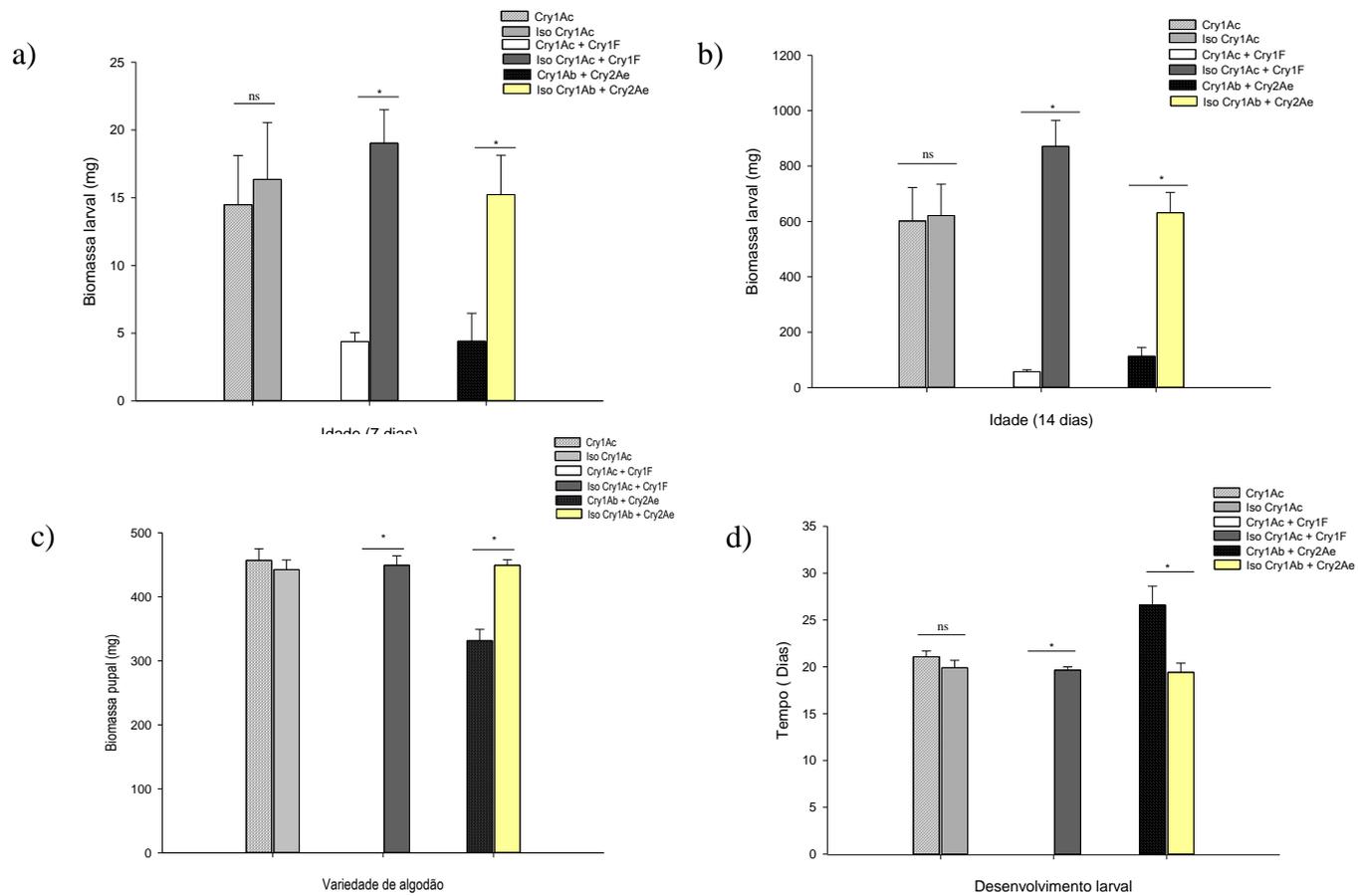


Figura 1. Características de histórico de vida de *S. cosmioides* expostas a folhas de diferentes cultivares de algodão Bt. (a) Biomassa larval aos 7 e (b) 14 dias. (c) Biomassa pupal (d) tempo de desenvolvimento. Dados são médias \pm SE. Asterisco acima das barras de erro indicam diferença estatística entre as médias pelo teste de tukey a 5% de significância. *ns* indica diferença não significativa entre tratamentos.

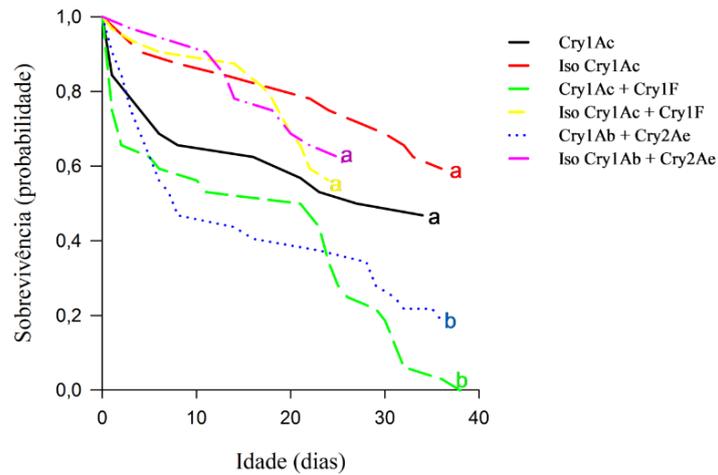


Figura 2. Sobrevivência de *S. cosmioides* em diferentes cultivares de algodão Bt e seus cultivares isogênicos não-Bt. Curvas de sobrevivência seguidas por diferentes letras são estatisticamente diferentes pelo teste de qui-quadrado tipo log-Rank ($P < 0,05$).

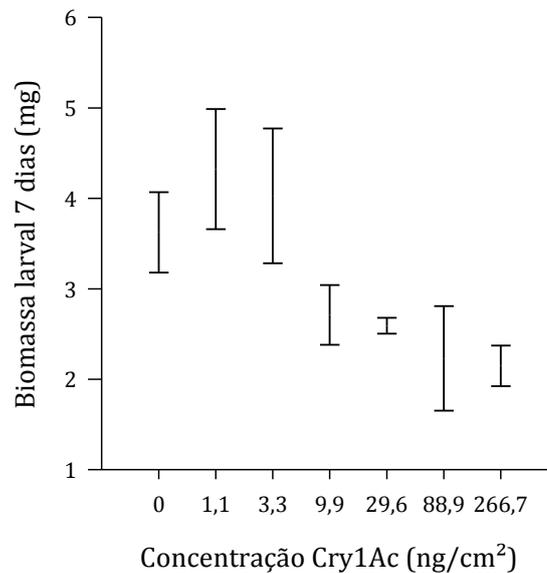


Figura 3. Biomassa larval de *S. cosmioides* aos 7 dias de idade em dieta artificial contendo a toxina Cry1Ac. Dados são médias \pm SE.

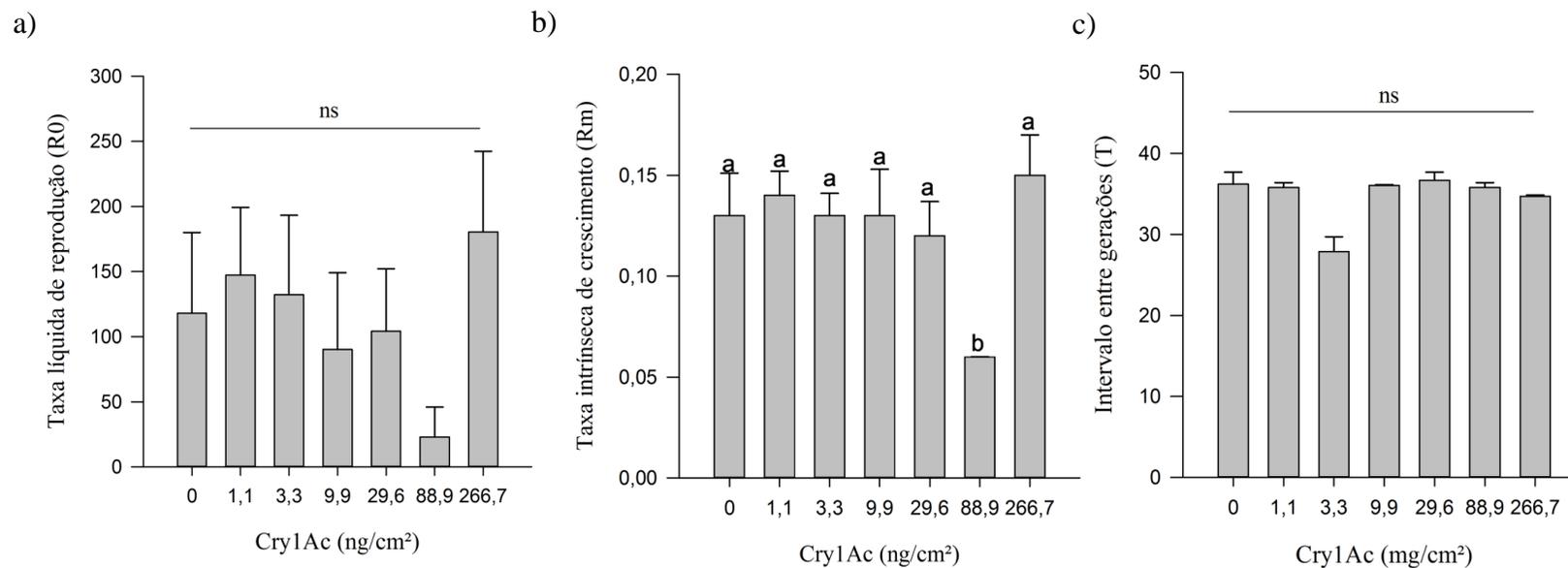


Figura 4. Parâmetros reprodutivos de *S. cosmioides* criada em diferentes concentrações da toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*. Os dados são médias e erros padrão obtidos pelo método de Jackknife. Letras semelhantes nas colunas representam igualdade entre os tratamentos. *ns* representa diferença não significativa entre médias.