

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONDICIONAMENTO BIOLÓGICO DE *Anticarsia gemmatalis*
HÜBNER, 1818 EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES DE
Bacillus thuringiensis BERLINER, 1915**

**Fabício Oliveira Fernandes
Engenheiro Agrônomo**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E
VETERINÁRIAS CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CONDICIONAMENTO BIOLÓGICO DE *Anticarsia gemmatalis*
HÜBNER, 1818 EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES DE
Bacillus thuringiensis BERLINER, 1915**

Discente: Fabrício Oliveira Fernandes

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antônio Polanczyk
Coorientadora: Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Entomologia Agrícola)**

F363c

Fernandes, Fabrício Oliveira

Condicionamento biológico de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818
exposta a concentrações de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 / Fabrício
Oliveira Fernandes. -- Jaboticabal, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Ricardo Antônio Polanczyk

Coorientadora: Janete Aparecida Desidério

1. Lagarta da soja. 2. Controle microbiano. 3. Efeito subletal. 4.
Progênie. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CONDICIONAMENTO BIOLÓGICO DE *Anticarsia gemmatilis* HÜBNER, 1818
EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1915

AUTOR: FABRÍCIO OLIVEIRA FERNANDES

ORIENTADOR: RICARDO ANTONIO POLANCZYK

COORDINADORA: JANETE APARECIDA DESIDERIO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. FERNANDO HERCOS VALICENTE (VIDEOCONFERÊNCIA)
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo-EMBRAPA / Sete Lagoas/MG

Pesquisador Dr. LUÍS GARRIGÓS LEITE (VIDEOCONFERÊNCIA)
Laboratório de Controle Biológico-Instituto Biológico de São Paulo / São Paulo/SP

Profª. Drª. RENATA DE LIMA (VIDEOCONFERÊNCIA)
Universidade de Sorocaba (UNISO) / Sorocaba/SP

Prof. Dr. DANIEL JUNIOR DE ANDRADE (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 23 de abril de 2020

Curriculares do Autor

Fabício Oliveira Fernandes, nascido no município de Corinto, MG, em 18 de setembro de 1989. Formado em Técnico em Meio ambiente pela Escola Técnica Municipal de Sete Lagoas (2007-2009), ingressou em agosto de 2009 nos cursos Bacharel em Biossistemas (2009-2012) e Engenharia Agrônômica (2009-2014) pela Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ - *campus* Sete Lagoas). Realizou iniciação científica em entomologia agrícola (2010-2012), sob orientação do Prof. Dr. Marcos Antonio Matiello Fadini (UFSJ - *campus* Sete Lagoas), com bolsa de iniciação científica (IC) (CNPq (PIBIC)), avaliando a abundância de ácaros fitófagos e predadores em seringueira *Hevea brasiliensis*, evidenciada principalmente a partir de resumos apresentados em congressos. Ingressou na Embrapa Milho e Sorgo (2012-2014), sob orientação do Prof. Dr. Fernando Hercos Valicente o estágio extracurricular (FUNARBE), desenvolvendo formulações a base de baculovírus para o controle da lagarta do cartucho, evidenciada com apresentação de resumos em congressos. O estágio obrigatório foi realizado na empresa de assistência técnica EMATER (2014-2014) em propriedades que produziam olerícolas, cereais e floresta. Em março de 2015, iniciou o Mestrado em Entomologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel - *campus* Capão do Leão), sob orientação da Profa. Dr. Ana Paula Schneid Afonso da Rosa com vigência entre março de 2015 a fevereiro de 2017 (CAPES), período no qual desenvolveu pesquisas de campo avaliando o desempenho de cultivares de milho e soja para resistência a noctuídeos e pentatomídeos e análise econômica. Durante o Mestrado em Entomologia auxiliou em outras pesquisas desenvolvidas pela equipe da referida orientadora, além da apresentação de trabalhos em congressos relacionados com entomologia agrícola e publicações de artigos em revistas científicas. Em março de 2017 ingressou no Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola) (CAPES) pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV - Unesp), sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, avaliando o condicionamento biológico da lagarta-da-soja exposta a concentrações de *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 com vigência até março de 2020.

“Tudo vale a pena quando a
alma não é pequena”

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Salustriano Fernandes e Francisca Fernandes, e a minha irmã Fabiana Fernandes, que me proporcionaram a oportunidade de alcançar meus sonhos e participarem de todas as minhas conquistas. Por todo amor, carinho e confiança! Aos meus avós Manoel Oliveira e Edite Vieira que nem tenho palavras suficientes para descrever o carinho e bondade!

DEDICO

Agradecimentos

A Deus por me orientar e me dar forças para seguir em frente ultrapassando inúmeros obstáculos.

Aos meus familiares, minha mãe Francisca Fernandes, meu pai Salustriano Fernandes e minha irmã Fabiana Fernandes, pelo amor e carinho durante todos estes anos de estudo e dedicação exclusiva a pesquisa.

As minhas amigas Tamires Doroteo, Ariadne Sanches, Tamiris Souza e Andressa Vilela que serei eternamente grato, por acreditar e confiar em meus objetivos e estarem sempre comigo mesmo em momentos difíceis.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal (FCAV - Unesp), por oferecer todo o suporte técnico, científico e de infraestrutura para minha formação profissional.

Ao Departamento de Fitossanidade (FCAV - Unesp), que possibilitou o pleno desenvolvimento de minhas pesquisas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) (FCAV - Unesp), pela oportunidade concedida para o desenvolvimento do Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da modalidade da bolsa de estudos de Doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Aos Professores do Departamento de Fitossanidade (FCAV - Unesp), responsáveis pela formação profissional dentro do contexto da área de Entomologia Agrícola.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk pelo incentivo profissional, responsáveis pelo meu amadurecimento profissional e pessoal, que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

Aos Servidores do Departamento de Fitossanidade (FCAV - Unesp). Aos integrantes do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas (LCMAP) (FCAV - Unesp), que contribuíram de alguma forma pelo meu aprendizado profissional e pessoal.

Ao Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária (FCAV - Unesp), que possibilitou o pleno desenvolvimento de minhas pesquisas, funcionários, discentes e docentes.

A Profa. Dr. Janete Aparecida Desidério que me acolheu como filho e auxiliou no desenvolvimento do conhecimento na área de biologia molecular e, acabou despertando meu interesse.

Ao técnico de laboratório Rodrigo Takeshi Uchiyama pelo incentivo, ensinamentos e amizade, meu eterno obrigado.

A equipe do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA) que se tornou minha segunda família e responsáveis por gerar um maior conhecimento na área de biologia molecular, além dos incentivo e amizade.

E aos demais colegas que de alguma forma participaram dessa caminha o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. A lagarta-da-soja <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner, 1818)	18
2.1.1. Distribuição Geográfica e Plantas Hospedeiras	18
2.1.2. Aspectos Bioecológicos de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	19
2.2. A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner, 1915	20
2.2.1. Histórico	20
2.2.2. Aspectos gerais.....	22
2.2.3. Modo de ação	24
2.3. Efeitos subletais em artrópodes-praga.....	27
2.4. Efeitos fisiológicos.....	28
2.4.1. Parâmetros de desenvolvimento	28
2.4.2. Longevidade de adultos e fecundidade.....	30
2.4.3. Imunidade	32
2.5. Efeitos no comportamento	34
2.6. Resistência de insetos-praga às toxinas	35
3. REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2 - GERAÇÕES DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> HÜBNER, 1818 APRESENTAM DIFERENTES RESPOSTAS A <i>Bacillus thuringiensis</i> BERLINER, 1911?	57
RESUMO.....	57
ABSTRACT	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.1. Criação dos insetos.....	61
2.2. Estimativas das Concentrações letais (CL).....	61
2.3. Avaliação dos efeitos subletais	62
2.4. Delineamento experimental.....	62
3. RESULTADOS.....	63
4. DISCUSSÃO	68
5. CONCLUSÃO	73
6. REFERÊNCIAS.....	74

CAPÍTULO 3 - CONDICIONAMENTO BIOLÓGICO DE <i>Anticarsia gemmatalis</i>	
HÜBNER, 1818 EXPOSTA A SUBDOSES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	
BERLINER, 1911	81
RESUMO.....	81
ABSTRACT	82
1. INTRODUÇÃO	83
2. MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1. Criação dos insetos.....	84
2.2. Concentrações letais (CL).....	84
2.3. Estudo dos efeitos subletais.....	85
2.4. Delineamento experimental.....	86
3. RESULTADOS.....	87
4. DISCUSSÃO	97
5. CONCLUSÃO	100
6. REFERÊNCIAS.....	101
CAPÍTULO 4 - MORFOMETRIA DE ADULTOS DE <i>Anticarsia gemmatalis</i>	
HÜBNER, 1818 EXPOSTOS A SUBDOSES DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	
BERLINER, 1911	107
RESUMO.....	107
ABSTRACT	108
1. INTRODUÇÃO	109
2. MATERIAIS E MÉTODOS	110
2.1. Criação dos insetos.....	110
2.2. Concentrações letais (CL).....	111
2.3. Estudo dos efeitos subletais.....	112
2.4. Obtenção dos dados	112
2.5. Análise dos dados.....	113
3. RESULTADOS.....	114
4. DISCUSSÃO	123
5. CONCLUSÃO	127
6. REFERÊNCIAS.....	128
CAPÍTULO 5 - EFEITO SUBLETAL DE <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner, 1915 NA	
ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE <i>Anticarsia gemmatalis</i> HÜBNER, 1818	
RESUMO.....	134
ABSTRACT	135
1. INTRODUÇÃO	136
2. MATERIAIS E MÉTODOS	137
2.1. Criação dos insetos.....	137

2.2. Concentrações letais (CL) para o bioinseticida Dipel SC	138
2.3. Expressão e extração de Cry1Ac.....	139
2.4. Concentração letal (CL ₅₀) para protóxina Cry1Ac	140
2.5. Avaliação da atividade proteolítica	140
2.6. Eletroforese SDS-PAGE 12% e quantificação das protóquinas	141
2.7. Delineamento experimental.....	142
3. RESULTADOS.....	143
4. DISCUSSÃO	150
5. CONCLUSÃO	153
6. REFERÊNCIAS.....	154
CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	160

CONDICIONAMENTO BIOLÓGICO DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 EXPOSTA A CONCENTRAÇÕES DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1915

RESUMO - O objetivo desse trabalho foi avaliar o condicionamento biológico de *A. gemmatalis* submetido a subdoses do bioinseticida Dipel SC. A partir da estimativa da curva resposta de *A. gemmatalis* ao Dipel SC pela análise de Probit os tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅ foram utilizados em 10 repetições com 10 lagartas de 2º instar, totalizando 100 lagartas. O delineamento inteiramente casualizado foi utilizado para as variáveis índice de adaptação, peso, longevidade e viabilidade das fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa, adultos e pré-oviposição; e confeccionar a tabela de vida. Os parâmetros morfométricos foram dispostos em arranjo fatorial 3 (F1, F2, F3) x 5 (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e a testemunha) x 22 (largura, comprimento e área das asas anterior e posterior, peso do tegumento, tórax, abdome, asas e o adulto inteiro de ambos os sexos). E o teste de proteólise da protóxina Cry1Ac verificou a degradação pelo suco intestinal dos insetos sobreviventes. As amostras foram incubadas a 30°C a 100 rpm sendo coletados 15 µl em diferentes intervalos (0, 60, 180 minutos) acondicionado tampão de amostra utilizado em preparações para gel SDS-PAGE. O índice de adaptação apresentou uma associação entre o aumento da concentração subletal com a redução do nível de adaptação na 3ª geração. Alterações na razão sexual foram observados nos tratamentos CL₂₀ e CL₅. Nos parâmetros da tabela de vida, houve associação do aumento da concentração do bioinseticida com redução nos parâmetros taxa líquida de reprodução e taxa finita de aumento. O parâmetro tegumento + adultos íntegros (TEG+T) em ambos os sexos repetiram ao longo das três gerações avaliadas. O tratamento CL₅ apresentou um aumento na atividade proteolítica após 60 minutos em relação ao tratamento CL₂₅ e ao controle. O condicionamento biológico de *A. gemmatalis* foi afetado apresentando um custo para sobreviver as subdoses, refletindo na biologia, morfologia e fisiologia da espécie.

Palavras-chave: lagarta da soja, controle microbiano, efeito subletal, progênie.

BIOLOGICAL CONDITIONING OF *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 EXPOSED TO CONCENTRATIONS OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1915

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the biological conditioning of *A. gemmatalis* submitted to underdoses of the bioinsecticide Dipel SC. From the estimate of the response curve of *A. gemmatalis* to Dipel SC by Probit analysis, treatments LC₅, LC₁₀, LC₁₅, LC₂₀, LC₂₅ were used in 10 repetitions with 10 caterpillars of 2nd instar, totaling 100 surviving caterpillars. The completely randomized design was used for the variables adaptation index, weight, longevity and viability of the egg, caterpillar, pre-pupa, pupa, adults and pre-oviposition phases; and the life table was made. The morphometric parameters were arranged in a factorial arrangement 3 (F1, F2, F3) x 5 (LC₅, LC₁₀, LC₁₅, LC₂₀ and the control) x 22 (width, length and area of the anterior and posterior wings, weight of the integument, chest, abdomen, wings and the adult of both sexes). The Cry1Ac protein proteolysis test was performed to verify the degradation by the intestinal juice of the surviving insects. The samples were incubated at 30°C at 100 rpm and 15 µl were collected at different intervals (0, 60, 180 minutes) containing sample buffer used in preparations for SDS-PAGE gel. The adaptation index showed an association between an increase in sublethal concentration and a reduction in the level of adaptation in the 3rd generation. Changes in sex ratio were observed in treatments LC₂₀ and LC₅. In the parameters of the life table, an association with the increase in the concentration of the bioinsecticide there was a reduction in the parameters net reproduction rate and finite rate of increase. The tegument parameter + healthy adults (TEG + T) in both sexes were repeated over the three generations evaluated. The CL5 treatment showed an increase in proteolytic activity after 60 minutes compared to the CL25 treatment and the control. The biological conditioning of *A. gemmatalis* was affected, presenting a cost to survive the underdoses, reflecting in the biology, morphology and physiology of the species.

Keywords: soybean caterpillar, microbial control, sublethal effect, progeny.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de soja com 122,1 milhões de toneladas comercializadas na safra 2019/2020. A cultura da soja representa crescimento na área de 2,7% em relação à última temporada, continuando a tendência de aumento das últimas safras (Conab, 2019). Entretanto, existem fatores abióticos e bióticos que limitam a produção agrícola, entre estes se destacam os artrópodes-praga que proporcionam cerca de 19% de redução na produtividade (Moscardi et al., 2012).

O controle químico é o mais utilizado para reduzir as perdas causadas pelos artrópodes-praga. Esta preferência se deve ao fato desses produtos apresentarem efeito de choque e alta persistência (Melo et al., 2018). No entanto, a sua utilização de forma inadequada afeta a saúde humana, inimigos naturais e organismos não alvo como os polinizadores, além de contribuir na seleção de indivíduos resistentes no campo (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Bueno et al., 2017).

O controle biológico é uma alternativa ao controle químico, apresentando como vantagens especificidade e seletividade (Glare et al., 2012; Parra, 2014; Lacey, 2017). *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 é uma bactéria utilizada na forma de bioinseticida ou na biotecnologia com inserção dos genes *cry* da bactéria em plantas para a obtenção de resistência a insetos, conhecidas como plantas transgênicas ou plantas Bt (Konecka et al., 2018). Logo, a bactéria é estudada com outras finalidades como controle de doenças fúngicas em plantas (Deepak e Jayapradha, 2015), biorremediação (Aceves-Diez et al., 2015; Ferreira et al., 2016) ou tratamento de células cancerígenas humanas (Sathishkumara et al., 2018; Chubicka et al., 2018).

Apesar do uso tradicional do *B. thuringiensis* como bioinseticida, o surgimento das plantas Bt com alta eficiência de controle, especificidade e facilidade de implementação reduziu a adoção dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, pois acreditava-se que esta biotecnologia dominaria completamente a produção de alimentos (Schünemann et al., 2014; Polanczyk et al., 2017).

Com a alta adoção de áreas comerciais com inserção de genes *cry* do *B. thuringiensis*, cultivadas em cerca de 2,15 bilhões de hectares (ISAAA, 2018), a resistência de populações de insetos às plantas Bt tem sido relatada em *Pectinophora gossypiella* Saunders, 1844 (Lepidoptera: Gelechiidae) na Índia (Dhurua e Gujar, 2011), *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808 (Lepidoptera: Noctuidae) (Zhang et al., 2011) na China, *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae) em Porto Rico, Brasil e Carolina do Norte (Storer et al., 2012; Monnerat et al., 2015; Li et al., 2016) e *Helicoverpa zea* Boddie, 1850 (Lepidoptera: Noctuidae) em Louisiana (Kaur et al., 2019).

Por outro lado, bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, foram imprescindíveis para conter surtos de *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) e *H. armigera* nas safras 2012/2013 e 2013/2014 no Brasil (Polanczyk et al., 2017). Essas espécies são importantes pragas da soja, assim como *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebididae) que pode ocorrer em todas as regiões produtoras de soja do Brasil. Na fase larval, a espécie pode consumir cerca de 85 cm² a 150 cm² de área foliar causando a desfolha total da planta (Moscardi et al., 2012; Céleres, 2018; Embrapa, 2018).

Com a adoção da soja Bt em grandes áreas expressando uma única toxina (Cry1Ac) sem ou pouca adoção de áreas de refúgio, há uma grande chance da evolução da resistência, processo governado por fatores genéticos e bioecológicos que se inter-relacionam (Ferré e Van-Rie, 2002; Maia, 2003; Andow, 2008). Estudos demonstram que a sucessão de cultivos de algodão e soja expõe populações de *H. virescens* à intensa pressão de seleção a toxina Cry1Ac, o qual apresentou razão de resistência > 10.000 vezes, após 19 gerações de pressão de seleção com Cry1Ac incorporada em dieta artificial (Gould et al., 1995).

Além disso, existem discussões sobre a utilização de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* em área de plantas transgênicas desde que as toxinas presentes nos bioinseticidas não ocupam o mesmo sítio de ação, nos insetos-praga, daqueles presentes nas plantas Bt (Jakka et al., 2014). Desta forma é possível compatibilizar o controle biológico e a tecnologia das plantas Bt, que pode ser bem sucedido no manejo integrado de pragas, desde que a escolha do produto seja feita corretamente (Fernandes et al., 2018; Fernandes et al., 2019; Fernandes et al., 2020a).

Em adição, a capacidade de lepidópteros praga evoluírem resistência a toxinas Cry foi reportada para linhagens de laboratório de *Spodoptera exígua* Hübner, 1808 e *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 a Cry1Ac (Moar et al., 1995; Muller-Cohn et al., 1996) e a campo para *S. frugiperda* a Cry1F (Storer et al., 2010). Resistência pode ser definida como um fenômeno evolucionário com alterações genéticas que ocorre em resposta à contínua pressão de seleção exercida por diferentes agentes de controle (Storer et al., 2010; Bernardi et al., 2011).

E para que ocorra esse fenômeno, a frequência como a espécie é exposta à concentração de *B. thuringiensis* vai definir a evolução da resistência ou ocasionar efeitos subletais a praga, não eliminando a possibilidade de ocorrer efeitos subletais na espécie resistente (Eizaguirre et al., 2005; Herrero et al., 2016).

Efeitos subletais são definidos como interferências nos processos fisiológicos e comportamentais nos indivíduos que sobrevivem, como por exemplo, exposição a um bioinseticida. O resultado pode ser um aumento no gasto energético que terá consequências negativas ou positivas nos parâmetros de desenvolvimento biológico da espécie-praga (Osman et al., 2018).

O espécime que apresenta efeitos subletais pode causar uma diversidade de respostas. O fenômeno é conhecido como hormese e, pode trazer consequências como contribuir para surtos de insetos-praga, ressurgência de pragas secundárias ou até mesmo interposição em interações entre organismos (Guedes e Cutler, 2014).

Condições ambientais e a tecnologia de aplicação adotada são os principais fatores que impedem a administração de uma dose letal a uma população de inseto-praga (Sedaratian et al., 2013). Portanto, são necessários estudos que avaliem a interação patógeno x hospedeiro ao longo do tempo para fornecer subsídios ao manejo da praga.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o condicionamento biológico de *A. gemmatilis* submetido a concentrações do bioinseticida Dipel SC ao longo das gerações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818)

2.1.1. Distribuição Geográfica e Plantas Hospedeiras

A lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) é uma espécie de climas tropicais e sub-tropicais com ocorrência restrita ao continente americano (Haase et al., 2015 a; b). É uma das principais pragas desfolhadora da cultura da soja nos Estados Unidos, México, Colômbia, Venezuela e Argentina (Hoffman-Campo et al., 2000). No entanto, a dinâmica populacional e a bioecologia podem variar de forma significativa de acordo com as condições de temperatura e disponibilidade do alimento (Milano et al., 2008).

No Brasil, *A. gemmatalis* foi considerada durante muito tempo, a principal praga na cultura da soja. A partir da safra 2003/2004 a lagarta falsa-medideira, *C. includens* deixou de ser praga secundária e atingiu junto com a *A. gemmatalis* o status de praga primária (Carvalho, 2015).

Os surtos de *C. includens*, tornaram-se frequentes devido ao uso excessivo de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd., 1914) que contribuiu para a eliminação de fungos entomopatogênicos que mantinham a população do inseto em equilíbrio (Sosa-Gómez et al., 2014). Em pouco tempo, a ocorrência de ambas lagartas desfolhadoras começou a ser relatada nos principais estados produtores de soja do Brasil, de forma isolada ou associada (Bueno et al., 2007). Os ataques dessas pragas têm sido relatados, mais frequentemente, nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do Brasil (Moscardi et al., 2012; Botelho et al., 2019).

A permanência do inseto no campo pode ser atribuída ao seu amplo espectro de plantas hospedeiras, incluindo cultivadas e silvestres. A contínua produção de alimentos nas regiões tropicais e subtropicais levou à formação de pontes verde, ou seja, a sequência ininterrupta de culturas que beneficiam pragas polífagas (Oliveira et al., 2014). Estudos realizados exemplificam a permanência de pragas polífagas como *Spodoptera frugiperda* (J E Smith), 1797

(Lepidoptera: Noctuidae), *H. armigera* e *A. gemmatalis* no sistema de produção do Brasil (Dias et al., 2016; Abreu et al., 2018; Fernandes et al., 2020b).

Além disso, a capacidade de migrar de uma região para outra com o intuito de colonizar novas áreas com maior disponibilidade de alimento também é outro fator determinante (Pashley e Johnson, 1986; Ford et al., 1975). A alimentação de *A. gemmatalis* é preferencialmente realizada em leguminosas como a soja, entretanto, foi encontrado lagartas alimentando em arroz, algodão, begônia, cornichão, girassol, quiabo, trigo entre outras espécies (Panizzi et al., 2004; Moscardi et al., 2012; Specht et al., 2015; Abreu et al., 2018).

2.1.2. Aspectos Bioecológicos de *Anticarsia gemmatalis*

A espécie *A. gemmatalis* oviposita preferencialmente durante a noite, sendo que as posturas se tornam maiores com a diminuição da temperatura e aumento da umidade (Greene et al., 1973). Os ovos são depositados isolados (2/3 inferior da planta) e, geralmente, na face abaxial das folhas (Ferreira e Panizzi, 1978).

O desenvolvimento embrionário dura cerca de dois a três dias e a lagarta após a eclosão apresenta coloração verde, variando do verde claro ao escuro, em especial após o segundo ínstar (Guyton, 1940; Fugì, 2003). As lagartas podem apresentar de cinco a seis ínstaes larvais, sendo que seis é o mais comum. Entretanto, a duração de cada ínstar pode ser influenciada por fatores bióticos e abióticos (Fugì et al., 2005; Milano, 2008). As lagartas de primeiro instar locomovem-se medindo palmos, podendo ser confundida com *C. includens*. Em ínstaes mais avançados apresentam três linhas longitudinais brancas no dorso e quatros pares de falsas pernas abdominais, além de um par anal, diferentemente da *C. includens* que apresenta dois pares de falsas pernas abdominais (Sosa-Gomez et al., 2014).

A duração da fase larval por variar entre 12 a 15 dias, onde essa alternância pode ser atribuída a cultivar de soja em que as lagartas se desenvolveram ou as condições de temperatura e umidade relativa (Machado et al., 1999; Franco et al., 2016).

A intensidade de danos causados pelas lagartas é variável e depende da densidade populacional e do estágio de desenvolvimento da planta (Degrande e

Vivan, 2007). O consumo da folha pela lagarta resulta na redução da área foliar fotossinteticamente ativa, podendo ter sua produtividade comprometida dependendo do percentual de desfolhamento, tempo de permanência da injúria ou até mesmo o estágio fenológico da planta (Moscardi et al., 2012).

Após o último instar larval, a lagarta encolhe de tamanho e apresenta o dorso de cor rosada, permanecendo sem alimentar, esta fase é denominada pré-pupa com duração de um até dois dias (Praça et al., 2006). A fase de pupa apresenta uma duração de sete a 22 dias de coloração marrom, usualmente localizadas no solo (Sosa-Gómez et al., 2014). Destas pupas emergem as mariposas, que apresentam envergadura de asas aproximadamente de 30 a 38 mm e coloração de cinza ao marrom-escuro. Sendo que, os adultos apresentam sempre uma linha diagonal de cor marrom unindo as pontas do primeiro par de asas, o que auxilia em seu reconhecimento (Herzog e Todd, 1980).

Logo após o pôr do sol, as mariposas iniciam voos curtos, localizando parceiros para o acasalamento ou plantas para a oviposição. Nesse processo de reprodução, a emissão do feromônio sexual pelas fêmeas é muito importante para a orientação e localização pelos machos. A viabilidade dessa fase pode variar 12 a 20 dias, além das fêmeas de *A. gemmatalis* depositar aproximadamente 400 ovos durante toda vida (Heath et al., 1988; Leppla et al., 1987; Pietrowski, 2000; Fugi et al., 2003).

2.2. A bactéria *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915

2.2.1. Histórico

A bactéria *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) pertence à família Bacillaceae e foi isolada pela primeira vez em 1901, do bicho da seda, *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Foi descoberto por Shigetane Ishiwata que nomeou como “sotto disease bacillus” e descreveu como um bacilo que após a ingestão, multiplicava-se dentro do inseto e causava a morte (Ishiwata, 1901; Steinhaus, 1961; Heimpel e Angus, 1963). Em 1911 a mesma bactéria foi isolada de *Ephestia kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae) pelo alemão Ernst Berliner, coletada na província de Thuringe, que assim, atribuiu o nome de *B. thuringiensis* (Habib e Andrade, 1998).

As primeiras tentativas de usar a bactéria *B. thuringiensis* para o controle de artrópodes-praga ocorreu em 1920, com o intuito de controlar a mariposa cigana, *Lymantria dispar* L., 1758 (Lepidoptera: Erebidae) uma das mais destrutivas pragas florestais do Hemisfério Norte (Metalnikov e Chorine, 1929). Em 1930, houve relatos da utilização de *B. thuringiensis* no controle da broca européia do milho, *Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796 (Lepidoptera: Crambidae) na região da Hungria (Husz, 1930).

O desenvolvimento de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* ocorreu somente por volta de 1938 na França para o controle de *E. kuehniella*. Entretanto, os avanços para a produção de bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* foram interrompidos com a descoberta do DDT em 1939, pelo químico suíço Othmar Müller (Entwistle et al., 1993; Ramos, 2008).

Sendo assim, somente na década de 1950 houve a renovação no interesse no uso de *B. thuringiensis* como bioinseticida para o controle de lepidópteros (Beegle e Yamamoto, 1992). O pesquisador Edward Steinhaus em 1951 contribuiu com diversas descobertas com a utilização do *B. thuringiensis* no controle de artrópodes-praga (Steinhaus, 1951). Em 1964, "Biospor" tornou-se o primeiro bioinseticida à base de *B. thuringiensis* licenciado na Alemanha (Sanchis, 2010).

No ano de 1970, Dulmage isolou uma estirpe de *B. thuringiensis* em lagartas de *Pectinophora gossypiella* Saunders, 1844 (Lepidoptera: Gelechiidae), e descreveu como Bt *alesti* HD-1. A cepa tornou-se a base para produtos competitivos com inseticidas químicos em termos de desempenho, custo e benefício. Esta cepa estabeleceu comercialmente através da empresa Abbott Laboratories (Atual Sumitomo) como Dipel® (Dulmage, 1970). Até a década de 1990, somente três produtos comerciais estavam disponíveis no mercado consumidor, sendo: Dipel®, Thuricide® e o Bactospeine® (Habib e Andrade, 1991).

No Brasil, a partir da década de 1960, iniciou estudos com a utilização de produtos à base de *B. thuringiensis*, devido a incentivos no setor de desenvolvimento e pesquisa (Capalbo et al., 2008).

Segundo o Sistema Integrado de Informações sobre Agrotóxicos (SIA) o primeiro bioinseticida à base de *B. thuringiensis* foi registrado somente em 1981 no Brasil, considerado oficialmente o mais antigo ingrediente ativo biológico

registrado (Capalbo et al., 2005). Como era de se esperar a demora para registrar devido uma série de dúvidas gerada pelos órgãos reguladores de todo o mundo, em função da maneira mais adequada para avaliar o Dipel Técnico solicitado pela empresa Sumitomo. Afinal, este diferia significativamente dos tradicionais produtos químicos sintéticos (Oliveira-Filho et al., 2004).

Em 2010 bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* representaram aproximadamente 53% de todos os bioinseticidas comercializados mundialmente (Polanczky et al., 2017), e o produto Dipel® (*B. thuringiensis kurstaki* HD-1) apresentou o maior destaque no mercado internacional, pelo fato de ser altamente eficiente para 170 lepidópteros-praga que causam desfolhas em diversas culturas (Glare e O'Callaghan, 2000).

O mercado mundial de bioinseticidas alcançou 3.738,00 milhões de dólares em 2015 e, estima-se que em 2022 alcance 11.176,00 milhões de dólares, registrando um CAGR de 16,9% de 2016 a 2022. A demanda por produtos sustentáveis e que possam ser utilizados tanto para a agricultura convencional quanto orgânica são os principais fatores que impulsionam o mercado de bioinseticidas. Além disso, o aumento nos custos de aplicação de inseticidas sintéticos ajuda a impulsionar o mercado e, fornece aos fabricantes uma oportunidade de ganhar representatividade no mercado internacional (Research and Market, 2017; 2018).

Até o momento, existem 22 produtos registrados no ministério da agricultura pecuária e abastecimento (MAPA), sendo que 13 são para o controle de *A. gemmatilis* (Agrofit, 2019). Os bioinseticidas fornecem alternativas viáveis em situações em que os inseticidas e as plantas Bt possam perder a eficiência, devido a rápida evolução da resistência. Como por exemplos surtos de insetos que ocorreram nas safras 2012/2013 e 2013/2014 no Brasil (Polanczky et al., 2017).

2.2.2. Aspectos gerais

B. thuringiensis é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete, de tamanho aproximado, na fase vegetativa de 1,0 a 1,2 µm de largura e 3,0 a 5,0 µm de comprimento e apresenta mobilidade por meio de flagelos (Zhang et al., 1995). A temperatura ótima para o desenvolvimento na forma aeróbica é entre

28°C a 32°C, podendo também crescer em anaerobiose em uma faixa de 10°C a 45°C (Habib e Andrade, 1998; Moraes e Capalbo, 1986).

O esporo dessa bactéria na maioria das vezes, apresenta a forma cilíndrica e está localizado na região paracentral, quando dentro da célula mãe. A principal característica que difere esta espécie das demais do mesmo gênero, é a presença intracelular do cristal protéico (Habib e Andrade, 1998; Glare e O'Callaghan, 2000).

O ciclo de desenvolvimento do *B. thuringiensis* pode ser dividido em duas fases, sendo um de crescimento vegetativo, na qual a bactéria multiplica por bipartição. E a outra, conhecida como esporulação, que consiste na diferenciação da bactéria em esporos (Monnerat e Praça, 2006).

A característica de toxicidade desta bactéria está interligado a produção de inclusões cristalinas denominadas δ endotoxinas ou mais conhecidas como proteínas Cry na fase estacionária (Yamamoto e Dean, 2000). A classificação é feita pela sequência primária de aminoácidos de genes Cry classificadas em 75 grupos sendo de Cry1 ao Cry 75 (Crickmore, 2019). Uma das características interessantes destas toxinas é a especificidade, determinada pela ligação das toxinas a superfície localizada nas microvilosidades apicais das células colunares do mesêntero (Bravo et al., 2017).

Além das toxinas citadas, a bactéria tem a capacidade de produzir outras: como Vip, Cyt com efeito inseticida e os esporos que contribuem com a patogenicidade da bactéria pelo sinergismo entre esporos e cristais (Johnson e Mcgaughey, 1996; Souza, 2016).

Atualmente, estão registradas 946 variedades de soja (MAPA, 2019), destas, há 11 variedades transgênicas que confere tolerância ao glifosato (*Roundup Ready*) para o manejo de plantas daninhas que competem com a cultura e, quatro resistentes tanto ao glifosato quanto a insetos-praga devido a inserção do genes *cry* da bactéria *B. thuringiensis* (CTNBio, 2018).

No território brasileiro, a área cultivada de soja transgênica ocupa aproximadamente 96,5% do total semeado, divididos em 59,8% para tecnologia com resistência a insetos e tolerância a herbicidas e 36,7% para os genes com tolerância a herbicida (Céleres, 2017). O evento de soja liberado comercialmente RR2 PRO (MON 87701 (produção da proteína Cry1Ac) x MON 89788 (cp4 epsps) apresenta um controle contra as principais lagartas desfolhadoras, sendo

a *A. gemmatilis*, *C. includens*, *Heliothis virescens* Fabricius, 1777 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Crociosema aporema* Walsingham, 1914 (Lepidoptera: Tortricidae), além de supressão às lagartas de *Elasmopalpus lignosellus* Zeller, 1848 (Lepidoptera: Pyralidae), *H. zea* e *H. armigera* (Bernardi et al., 2012). A soja RR2 PRO é a segunda geração da soja transgênica (portanto, uma evolução da soja RR1) e foi desenvolvida especialmente para o mercado brasileiro (Carvalho, 2015; CIB, 2019).

2.2.3. Modo de ação

As δ endotoxinas são formadas por protoxinas que, depois de ingeridas são solubilizadas para que sejam liberadas em solução e iniciar o processo de intoxicação (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017). A solubilização do cristal parasporal é favorecida pelas condições físico-químicas do suco intestinal do hospedeiro, principalmente pelo pH alcalino do mesêntero. (Angus, 1954; Schnepf et al., 1998; De-Maagd et al., 2001).

A diferença na solubilização pode ser responsável por distinção quanto ao grau de toxicidade de cada cristal proteico, que é atribuído a diferenças nas pontes de dissulfeto (Du et al., 1994) e blocos de aminoácidos altamente conservados entre as δ endotoxinas semelhantes (Wang et al., 2012) que contribuem para a estabilidade da estrutura do cristal do *B. thuringiensis* (Aronson et al., 1991; Du et al., 1994).

O primeiro desafio é a probabilidade da δ endotoxinas específicas encontrar um hospedeiro. O fato das toxinas se apresentarem como cristais insolúveis limita a disponibilidade a certos hospedeiros, como por exemplo, a ordem Hemiptera que alimentam da seiva elaborada. Outra observação pertinente é que algumas toxinas apresentam atividade entre ordens, o que foi documentado em 6 das 68 famílias de δ endotoxinas (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017).

Após o processo de solubilização, a protoxina é proteolizada por enzimas que se encontram no mesêntero, denominadas proteases (Bravo et al., 2017; Fatoretto, 2017). As principais enzimas no mesêntero da ordem Lepidoptera são as tripsinas e as quimotripsinas, distintamente da ordem Coleoptera,

relacionadas às cisteína-proteases e aspártico-proteases (Schnepf et al., 1998; De-Maagd et al., 2001).

No entanto, dependendo da família da δ endotoxina, esse processamento proteolítico pode ser mais ou menos extenso. Para exemplificar, a maioria das protoxinas Cry1 tem o tamanho de 120 kDa, enquanto as protoxinas Cry2 ou Cry3 não contêm um domínio extenso de protoxina no terminal C e são aproximadamente 70 a 73 kDa. Embora as toxinas menores, como Cry2 e Cry3, não sejam submetidas a um processamento extensivo no terminal C, elas são clivadas no terminal N e há evidências de que essa clivagem é necessária para toxicidade e pode potencialmente determinar especificidade (Bravo et al., 2002; Morse et al., 2001).

Sendo assim, propõe-se que uma clivagem N-terminal adicional ocorra como parte do mecanismo de ação de algumas toxinas, e os mutantes onde as toxinas foram pré-clivadas nesse local mostram uma especificidade alterada, pois podem superar parcialmente um fenótipo resistente (Soberón et al., 2007).

Vale ressaltar que, embora as toxinas maiores expressas em culturas transgênicas sejam geralmente truncadas no terminal C, elas geralmente não são truncadas no terminal N e, portanto, não podem ser consideradas como a forma totalmente ativada (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017).

Algumas pesquisas relatam que o mecanismo de resistência desenvolvido por *P. xylostella* pode estar interligado com o decréscimo da solubilidade e também com as proteases envolvidas no processo de ativação da prótoxina (Chang et al., 2012; Hernández-Martínez et al., 2013).

Uma vez processada, a δ endotoxina resultante deve permanecer estável no suco intestinal do hospedeiro para ser ativa. Estudo realizado com o suco intestinal do mesêntero de *Choristoneura fumiferana* Clemens, 1865 (Lepidoptera: Tortricidae) demonstrou que a presença de elastase é capaz de ligar e precipitar especificamente formas de toxinas e protoxina de Cry1A, contribuindo para a atividade reduzida contra o hospedeiro (Milne et al., 1998).

Este fato também foi observado em *H. armigera*, onde o sequestro de toxinas por esterases ou hexamerinas no suco intestinal do mesêntero impediram o avanço do processo de intoxicação a Cry1Ac (Gunning et al., 2005; Ma et al., 2005).

A toxina precisa passar pela membrana peritrófica do hospedeiro que é composto principalmente de quitina, incluindo também proteínas fortemente glicosiladas (Brandt et al., 1978; Moskalyk et al., 1996). As dobras semelhantes a lectina em dois dos três domínios da maioria das δ endotoxinas podem ser reconhecidas como resíduos glicosídicos pela membrana peritrófica e serem sequestradas interrompendo o processo de intoxicação (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017). A atividade de algumas cepas também foram reduzidas devido a presença de inibidores de quitinase, o que acredita-se que a membrana peritrófica determina a especificidade a δ endotoxinas (Regev et al., 1996; Sampson e Gooday, 1998; Lertcanawanichakul et al., 2004; Ding et al., 2008).

As ligações aos receptores do mesêntero é a próxima etapa e é considerada crítica devido a mudanças que ocorre na atividade da δ endotoxina (Wolfersberger, 1990). Diversos receptores funcionais da δ endotoxina foram identificados, incluindo proteínas e glicolipídios (Pigott e Ellar, 2007).

E espera-se que exista interações entre proteína-proteína e proteína-carboidratos entre domínios e receptores da δ endotoxina. O descobrimento de estruturas únicas de carboidratos presentes em invertebrados foi proposto para elucidar a especificidade das toxinas para insetos e nematoides (Dean et al., 1996).

Outros estudos identificaram que os domínios II e III como os principais determinantes da especificidade de ligação à toxina Cry (Xu et al., 2014). Sendo que a resistência cruzada entre as toxinas Cry é frequentemente associada a semelhanças de sequência nesses domínios (Carriere et al., 2015).

Por fim, ocorre a formação de poros devido a ligação de alta afinidade proporcionando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocele (Copping e Menn, 2000; Praça et al., 2004). As características de intoxicação nos insetos é a interrupção da alimentação, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e posterior septicemia, proporcionando o inseto à morte (Monnerat e Bravo, 2000; Bravo et al., 2017).

2.3. Efeitos subletais em artrópodes-praga

Condições ambientais e a tecnologia de aplicação adotada são os principais fatores que impedem a administração de uma dose letal a uma população de inseto-praga. Com aparecimento de indivíduos sobreviventes, devido serem exposta a subdoses, problemas como reinfestação e sobreposições do ciclo biológico da espécie-praga, atualmente, são comuns em condições de campo (Sedaratian et al., 2013).

Determinados patógenos necessitam de condições favoráveis de temperatura, umidade luminosidade, radiação além da tecnologia de aplicação adotada para serem eficientes. Os produtos microbianos funcionam somente quando aplicados corretamente, fornecendo um potencial de inóculo adequado e suficiente para provocar doença por ingestão ou contato. Usando-se estratégias previamente selecionadas que devem ser planejadas de acordo com o período de incubação do patógeno, de modo que o inseto possa ser eliminado antes de prejudicar economicamente a cultura. Além de exigir maiores cuidados no armazenamento, visando manter a viabilidade para melhor aproveitamento do potencial desses entomopatógenos (Alves, 1998).

A tecnologia de aplicação preocupa em utilizar tecnologias e conhecimentos científicos capazes de atingir o alvo na quantidade necessária, de forma econômica e com o mínimo de contaminação ao ambiente (Matuo, 1990).

O sucesso de uma aplicação depende dos seguintes fatores: seleção das pontas, ajuste do volume de calda, parâmetros operacionais, condições ambientais favoráveis e momento correto da aplicação, devendo sempre ser levado em consideração às recomendações agronômicas de cada produto. Sendo imprescindível que se conheça a biologia e o comportamento do alvo biológico a ser atingido para que se possa ter o máximo de eficiência no seu controle (Balan et al., 2012).

No entanto, devido a falta de conhecimento pelos produtores a tecnologia de aplicação o controle se torna ineficaz e subdoses do produto são pulverizados nos insetos alvo, causando a permanência no campo (Andef, 2010).

Os primeiros estudos avaliando os efeitos subletais iniciaram em 1956 com lagartas de lepidópteros e larvas de himenópteros submetidos à toxina de

B. thuringiensis (Angus, 1956). Desde então, o número de estudos vem aumentando devido à importância dos efeitos subletais no manejo integrado de pragas (Fast e Régnière, 1984; Moreau e Bauce, 2003; Sedaratian et al., 2013).

Métodos para testar os efeitos subletais dos bioinseticidas ainda estão sendo desenvolvidos em função dos artrópodes-praga, baseados nos métodos utilizados para inseticidas sintéticos. Em cada país, avaliação regulatória do risco e uso e o registro de agroquímicos segue orientações específicas como exemplo na Europa segue as Normas do Conselho Europeu 91/414, no Estados Unidos a Lei Federal de Fungicida, Inseticida e Rodenticida e no Brasil a Lei Federal nº 7.802, de julho de 1989.

Efeitos subletais são definidos como interferências nos processos fisiológicos e comportamentais nos indivíduos que sobrevivem a exposição a um bioinseticida. Esses efeitos sobre artrópode pragas podem ser divididos em dois grandes grupos: fisiologia e comportamento (Desneux et al., 2007; Sedaratian et al., 2013).

2.4. Efeitos fisiológicos

2.4.1. Parâmetros de desenvolvimento

Efeitos subletais causados pelas toxinas de *B. thuringiensis* no desenvolvimento larval de artrópodes-praga pode resultar em interferências nos tecidos do sistema digestivo apresentando diferentes respostas (Janmaat et al., 2014). Estudos avaliando a atividade proteolítica de *H. armigera* submetido a diferentes concentrações letais de *B. thuringiensis kurstaki* comprova que os danos que ocorreram nas células epiteliais do mesêntero é compensada, às vezes, com o aumento da taxa de alimentação das lagartas como também o melhor processamento pelo sistema digestivo do alimento ingerido (Fathipour et al., 2019).

Resultados semelhantes são relatados para lagartas de *Trichoplusia ni* Hubner, 1803 (Lepidoptera: Noctuidae) resistentes tratadas com diferentes concentrações subletais de *B. thuringiensis kurstaki*. Nesse caso, há um aumento no processamento do alimento contribuindo no aumento da absorção de nutrientes o que favorece no ganho de peso do indivíduo. Entretanto, não foi

possível observar o mesmo efeito na população suscetível, no qual, o efeito da ingestão da bactéria na mortalidade e crescimento aumentou de acordo com a concentração (Janmaat et al., 2014).

Na maioria dos estudos que avaliam os efeitos subletais, os artrópodes-praga apresentam diminuição no peso corporal (Kullik et al., 2011; Costa et al., 2000), redução no consumo do alimentar (Costa et al., 2000; Nathan et al., 2005; Ramalho et al., 2011), utilização de outras plantas hospedeiras como suplemento alimentar (Costa et al., 2000; Nathan et al., 2005; Prutz e Dettner, 2005) e, até mesmo, há o prolongamento no ciclo biológico de desenvolvimento da espécie (Arshad e Suhail, 2011; Ramalho et al., 2011).

Em contraste, estudos em uma população resistente a *B. thuringiensis* em campo demonstrou que *P. xylostella* acelerou o desenvolvimento e produziu maiores pupas quando alimentadas com dieta tratada com *B. thuringiensis* (Sayyed et al., 2003). Os autores sugerem que a população de *P. xylostella* resistente pode ter utilizado as toxinas da bactéria como uma proteína alimentar suplementar, o que pode ter levado a um efeito estimulante.

A eficiência na absorção de nutrientes a partir da alimentação é um processo dinâmico e se interferido, altera as taxas de desenvolvimento. Os ajustes nesses processos devido a interferência como concentrações de bioinseticidas podem ser responsáveis pelas respostas de compensação (Wheeler e Halpern, 1999). Essa resposta de compensação pode resultar em um aumento na assimilação ou digestibilidade, que é observado na quantidade de alimento ingerido que é digerido. Uma forma que pode ser utilizada para avaliar esse efeito é por meio da quantidade produzida de fezes pelo artrópode-praga (Leo et al., 1998; Campero et al., 2007).

Estudos avaliando a eficiência de assimilação e digestão de *T. ni* a toxinas de *B. thuringiensis* demonstraram que a eficiência de convenção alimentar aumentou quando as lagartas foram alimentadas com concentrações da bactéria, isso refletiu na diminuição da produção de fezes pelo inseto (Janmaat et al., 2014). Outros estudos demonstram o aumento na eficiência de assimilação quando as larvas foram expostas a concentrações subletais de *B. thuringiensis* (Deml et al., 1999; Prutz e Dettner, 2005; Chen et al., 2007).

A conversão alimentar realizada pelo artrópode-praga é exercida pelas enzimas digestivas que se encontram no mesêntero. Essa atividade pode ser

alterada de acordo com a alimentação, em respostas podem ocorrer alterações na composição e tipo das enzimas que se encontram no mesêntero (Harsulkar et al., 1999; Brandt et al., 2004), aumento na produção enzimática por células que não foram danificadas pelas toxinas da bactéria (Broadway e Duffey, 1986) ou ativação de processos que regenere as células epiteliais danificadas (Spies e Spence, 1985; Loeb et al., 2001).

Estudos realizados com *H. armigera* submetido a subdoses de *B. thuringiensis kurstaki* exemplificam que os parâmetros da tabela de vida também podem ser alterados. A taxa líquida de reprodução (R_0), taxa intrínsecas (r_m) e a taxa finita de aumento (X) foram significativamente mais baixas em insetos tratados com concentrações subletais em comparação ao controle (Sedaratian et al., 2013). Essas observações destacam a importância de considerar o papel dos efeitos subletais ao tentar avaliar o impacto do tratamento com *B. thuringiensis* em uma população de artrópodes-praga afetando até mesmo na progênie. Tais efeitos fisiológicos também podem causar distúrbios na longevidade e fecundidade, devido a alteração da vitelogenina, que é uma lipoproteína fundamental em cada uma dessas processos (Amdam et al., 2003).

2.4.2. Longevidade de adultos e fecundidade

Padrões evolutivos surgem a partir da aptidão manifestada no fenótipo que é determinada por um genótipo (Forbes, 2000). A teoria do princípio de alocação baseado no modelo energético fisiológico julga que trocas na alocação de recursos entre diferentes processos fisiológicos são uma característica central no controle dos fenótipos do organismo, ou seja, para um determinado nível de entrada de recursos, os organismos serão selecionados com base em como eles alocam os recursos (Sibly e Calow, 1986). Indivíduos expostos a alterações ambientais, podem manifestar distintos padrões de alocação (Calow e Sibly, 1990). Fisiologicamente, espera-se uma maior alocação para processos como crescimento e resulte em menor alocação para metabolismo e/ou reprodução. A mudança no padrão de alocação pode ter consequências positivas ou negativas dependendo da capacidade de cada indivíduo (Forbes, 2000).

Em condições de estresse como insetos submetidos a concentrações de bioinseticida, há um aumento nos gastos de energia como resposta para a desintoxicação, esses gastos energéticos adicionais devem ser pagos por decréscimo na energia dedicada à reprodução. Ao invés de investir em mecanismos de defesa, como produção de proteínas que melhora a sobrevivência, uma alternativa pode ser o investimento na produção de prole devido a possibilidade de se dispersarem e aumentar a probabilidade de sobrevivência da espécie. Esse investimento em prole reflete diretamente na longevidade dos adultos, pois leva ao surgimento de indivíduos pequenos mas com a capacidade de reproduzirem para investirem na perpetuação da espécie a partir dos descendentes (Forbes, 2000; Parsons, 2000).

No entanto, caso a alocação de recurso não atinja o suficiente de energia necessária para que ocorra o desenvolvimento, interferências no parâmetro de fecundidade podem ser observados. Estudos realizados avaliando efeitos subletais em *H. armigera* revelaram que o potencial reprodutivo foi afetado significativamente na geração parental e progênie. As mariposas que emergiram exibiram curta longevidade e baixa produção de ovos. Esses resultados foram encontrados para as espécies *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 (Lepidoptera: Noctuidae) e *C. fumiferana* (Salama e Zaki, 1986; Pedersen et al., 1997).

Os resultados indicaram reduções no período de oviposição de *H. armigera* em duas gerações subsequentes com impacto considerável na taxa de fecundidade, e na eclosão de ovos da espécie praga. A eclodibilidade reduzida dos ovos induzida por *B. thuringiensis* foi relatada por outros autores estudando os insetos *S. littoralis* e *C. fumiferana* (Salama e Zaki, 1986; Bauce et al., 2006). Essas informações sugerem que o tratamento com a bactéria tem um efeito direto no sistema reprodutivo dos artrópodes-praga, ou que os custos de alocação de recursos tiveram um impacto considerável na reprodução (Sedaratian et al., 2013).

2.4.3. Imunidade

Os bioinseticidas podem interagir no sistema imunológico dos artrópodes-praga e, dependendo da concentração podem diminuir ou aumentar o potencial inseticida. Os artrópodes têm plasmatócitos que apresentam um papel na resposta imune dos insetos permitindo o encapsulamento de corpos estranhos. Estudos evidenciaram que a redução no número de plasmatócitos associados causa um aumento na taxa de hemócitos granulares, que desempenham um papel na desintoxicação por fagocitose (George e Ambrose, 2004).

O sistema imunológico dos artrópodes é baseado em reações mediadas por moléculas ou células de defesa contra microrganismos. Várias funções imunes são atribuídas aos hemócitos que são células específicas dispersas na hemolinfa que reconhecem e agem contra corpos estranhos (Strand, 2008; Hillyer, 2016).

Estudo realizado com *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) exemplifica a capacidade do sistema imunológico se responder a invasão do microrganismo. Os resultados indicaram que insetos submetidos ao *B. thuringiensis* podem regular a resposta imune sem diferenças no desenvolvimento, tamanho dos teratócitos, peso de pupa e número de adultos (Pinto et al., 2019).

Em muitos organismos, a resposta imunológica das fêmeas pode ser transferida para a prole e protegê-la contra futuras infecções. Esse fato, provavelmente, é uma capacidade adaptativa ao longo das gerações. A capacidade de transferir essa imunidade materna de anticorpos para progênie em invertebrados foi considerada impossível. No entanto, existe o efeito transgeracional, também denominado como imunidade transgeracional que foi observado em muitos artrópodes como *S. frugiperda* e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) (Sadd e Schmid-Hempel, 2007; Roth et al., 2010; Tidbury et al., 2011; Boots e Roberts, 2012; Trauer e Hilker, 2013; Hernandez-Lopez et al., 2014; Souza et al., 2018).

Os efeitos transgeracionais foram revelados através da atividade imunológica aprimorada ou aumento da sobrevivência à infecção a concentrações de entomopatógenos em ovos (Moreau et al., 2012; Zanchi et al.,

2012; Dubuffet et al., 2015), juvenis (Rahman et al., 2004; Moret, 2006; Freitak et al., 2009; Rosengaus et al., 2017) e adultos (Sadd e Schmid-Hempel, 2009; Roth et al., 2010; Zanchi et al., 2011; Castro-Vargas et al., 2017).

Embora os efeitos transgeracionais sejam benéficos contra-ataques de microrganismos, há um aumento nos custos de condicionamento físico, sendo o investimento em imunidade oneroso em múltiplos níveis (Schmid-Hempel, 2003), e sua atividade, pode ser impactada negativamente quando ativada na prole nos parâmetros de crescimento (Lorenz e Koella, 2011; Roth et al., 2010) e reprodução (Trauer e Hilker, 2013).

No entanto, a magnitude da imunidade transgeracional recebido pela prole depende dos patógenos bacterianos que infectam as fêmeas (Dhinaut et al., 2018). Como exemplo, a prole do *Tenebrio molitor* paga um custo menor utilizando a imunidade transgeracional fornecida pelas fêmeas quando foram infectados por *B. thuringiensis* (Dubuffet et al., 2015; Dhinaut et al., 2018). No entanto, quando as fêmeas apresentam deficiência na transferência da imunidade transgeracional e transferem para a prole podem ficarem suscetível ao patógeno (Moreau et al., 2012).

Estudos comprovam que fêmeas submetidas a microorganismos como *B. thuringiensis* produziram ovos que continham maiores níveis de atividade microbiana (Dubuffet et al., 2015; Moreau et al., 2012; Sadd e Schmid-Hempel, 2007; Trauer-Kizilelma; Hilker, 2015; Zanchi et al. 2012). Por um outro lado, os ovos também podem receber de forma passiva substâncias antibacterianas produzida pelas fêmeas (Berry, 1982).

Ovos podem exibir níveis de atividade antibacteriana elevados logo após serem ovipositados. Essa atividade antibacteriana pode perpetuar ou reduzir durante a incubação, pois essas substâncias podem ser metabolizadas e degradadas ao longo do tempo (Moreau et al., 2012).

Fêmeas que podem apresentar deficiência imunológica podem também proporcionar ativação de genes imunes no embrião, uma vez que os ovos podem ativar sua própria resposta imune (Freitak et al., 2014; Jacobs et al., 2014; Jacobs et al., 2017). A resposta pode ser induzida pela transferência pela fêmea de fragmentos bacterianos para o ovo (Freitak et al., 2014; Knorr et. al., 2015; Salmela et al., 2015) ou por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA ou modificações de histonas (Castro-Vargas et al., 2017; Sysoev et al.,

2016). Nesse caso, os ovos exibem um aumento no nível de atividade antibacteriana à medida que a resposta imune do embrião é ativada. Entretanto, como os ovos apresentam escassez de recursos o desenvolvimento do embrião e a sobrevivência das larvas resultantes podem ser afetados reduzindo a taxa de eclosão, prolongando o tempo de incubação ou interferindo na sobrevivência nos estágios posteriores (Geister et al., 2008; Dhinaut et al., 2018).

2.5.Efeitos no comportamento

A capacidade de herbivoria dos artrópodes-praga em conjunto com o sistema sensorial possibilita a percepção da composição do agroecossistema. Essa percepção proporciona ao indivíduo a capacidade de escolha dos alimentos a serem ingeridos de acordo com os voláteis químicos emitidos. Caso o indivíduo não tenha a opção de escolha, três fenômenos podem ocorrer. O primeiro, as lagartas podem ingerir o alimento e, após alguns dias cessarem a alimentação, cuja duração do período dependerá das condições de temperatura, exposição, concentração e principalmente da qualidade do alimento (Van-Frankenhuyzen e Nystrom, 1987; Fast e Régnière, 1984; Bauce et al., 2002).

Consequentemente, o tempo que as lagartas ficariam com a alimentação interrompida o sistema de defesa teria a capacidade de regenerar as células epiteliais do intestino que foram lesadas pela ação das toxinas de *B. thuringiensis* (Retnakaran et al., 1983; Spies e Spence, 1985).

O segundo fenômeno seria, a necessidade no ganho energético para prosseguir o ciclo de desenvolvimento, nesse caso, as lagartas se alimentariam da dieta com o intuito de compensar o tempo perdido, prolongando a fase larval de desenvolvimento para suprir a demanda energética requerida durante o período de inanição (Bauce et al., 2002). O último fenômeno, mais observado em campo, é o período de anorexia, que quando acontece, interfere no ciclo biológico do indivíduo alvo e acaba dessincronizando os ciclos de desenvolvimento, tanto da praga quanto da planta hospedeiro, consequentemente, a fonte alimentar pode estar em estágio de senescência desfavorecendo o ato da herbivoria (Bauce et al., 2006).

A capacidade de voo é outro parâmetro que pode ser alterado. Indivíduos que alimentaram de dietas com baixa qualidade mudam de fase com deficiência

nutricional e, devido a isso são mais suscetíveis aos intemperes do ambiente e aos inimigos naturais (Von-Frisch, 1967; Ferraz, 1998).

2.6. Resistência de insetos-praga às toxinas

A evolução da resistência é um dos maiores problemas no controle de artrópodes-praga. Tal fato, pode ser acompanhado avaliando os possíveis efeitos subletais no ciclo de desenvolvimento do indivíduo. Entretanto, os casos de resistência não limitam somente a inseticidas sintéticos, pois existem relatos de resistência com produtos biológicos (Hawthorne, 1998). Entre os métodos de controle biológico, algumas pragas evoluíram em relação as toxinas produzidas pela bactéria *B. thuringiensis* em resposta à seleção natural imposta pelo método de controle, limitando sua eficiência e viabilidade a longo prazo (Lemes, 2012; Martinelli et al., 2017).

Os casos de evolução da resistência de insetos as δ endotoxina atingem toda a cadeia produtiva, desde a utilização dos bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* aplicado em pulverização, quanto a plantas com genes de resistência a insetos. A adoção de formulações contendo a toxina de *B. thuringiensis* foram usadas durante quarenta anos como agentes de controle sem nenhuma evidencia de resistência em situações de campo. Contudo, o primeiro relato de falhas de formulações a base de *B. thuringiensis* ocorreu nas Filipinas com a traça das crucífera, *P. xylostella* (Van-Rie e Ferré, 2000).

Um limiar imprescindível, que determina a capacidade de uma espécie desenvolver resistência é a variabilidade genética, tanto interespecífica quanto intraespecífica (Ferré; Van-Rie, 2002). Este fato foi relatado em diferentes espécies de insetos como *H. virescens*, *H. armigera* e *S. frugiperda* (Ali et al., 2006; Monnerat et al., 2006; Saeglitz et al., 2006; Ali e Lutrell, 2007).

Quando a evolução da resistência numa população de inseto é por meio de plantas transgênicas, são atribuídos a diversos fatores que se interagem. As alterações podem ser no sítio de ligação da toxina à membrana, modificação da atividade proteolítica ou até mesmo o aumento na velocidade de reparação do tecido epitelial (Lemes, 2012; Lemes et al., 2017; Martinelli et al., 2017).

A alteração no sítio de ligação da toxina à membrana é a que gera os maiores níveis de resistência. Além disso, esta alteração tem sido observadas

em artrópodes resistentes a uma ou várias toxinas da família Cry1Ac nos insetos da traça-indiana-da-farinha [*Plodia interpunctella* Hübner, 1813 (Lepidoptera: Pyralidae)] (Van-Rie et al., 1990), na traça-das-crucíferas [*P. xylostella*] (Ferré et al., 1991) e na lagarta-da-maça [*H. virescens*] (Lee et al., 1995).

Quando é o mecanismo que implica na alteração da atividade proteolítica do intestino do inseto, mostra que há relação genética entre a resistência a proteína Cry1Ac e a ausência de uma protease intestinal, quando inseto adquire a capacidade de degradação da proteína altera também a atividade proteolítica do mesmo, aumentando a resistência. Em lagartas de *P. interpunctella* foi constatada a ligação genética entre a resistência a Cry1Ac e a ausência de uma protease intestinal (Oppert et al., 1994). Em *H. virescens* observa-se que as lagartas resistentes mostram rápida recuperação do tecido epitelial após sua intoxicação com doses subletais da toxina Cry1Ac (Martínez-Ramírez et al., 1999).

Esses fatores citados envolvem a capacidade da resposta dos indivíduos frente a concentração de *B. thuringiensis* submetida e qualquer alteração que ocorra como por exemplo genética, fisiológica ou até mesmo comportamental refletem em um aumento no gasto energético que refletirá nos parâmetros de desenvolvimento dos artrópodes-praga (Herrero et al., 2016; Osman et al., 2018).

3. REFERÊNCIAS

- Abreu JA, Rosa APSA, Gobbi P, Carvalho IF, Machado LL, Araújo MB, Mendes SM (2018) **Cultivos de inverno no agroecossistema de terras baixas do sul do Rio Grande do Sul como ponte verde para *Anticarsia gemmatilis* e *Helicoverpa armigera***. Pelotas: Embrapa Clima Temperado 27p.
- Aceves-Diez AE, Estrada-Castañeda KJ, Castañeda-Sandoval LM (2015) Use of *Bacillus thuringiensis* supernatant from a fermentation process to improve bioremediation of chlorpyrifos in contaminated soils. **Journal of Environmental Management** 157:213-219. DOI: 10.1016/j.jenvman.2015.04.026
- Agrofit - **Sistema de agrotóxicos fitossanitários** (2019) Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 de março de 2019.
- Ali MI, Luttrell RG (2007) Susceptibility of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. **Journal Economic Entomology** 100:921-931. DOI: 10.1093/jee/100.3.921
- Ali MI, Luttrell RG, Young S (2006) Susceptibilities of bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) and tobacco budworm, *Heliothis virescens* F. (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal Economic Entomology** 99:164-175. DOI: 10.1093/jee/100.3.921
- Alves SB (1998) Patologia e controle microbiano: vantagens e desvantagens. In.: Alves SB (Eds.) **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba: Felaq p. 21-37.
- Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2003) Social exploitation of vitellogenin. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 100:1799-802. DOI: 10.1073/pnas.0333979100
- Andef, Associação nacional de defesa vegetal (2010) **Manual de tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários**. Campinas: Linea Creativa 52p.
- Andow DA (2008) The risk of resistance evolution in insects to transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews** 4:142-199.
- Angus TA (1954) A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. **Nature** 173:545-546. DOI: 10.1038/173545a0
- Angus TA (1956) The reaction of certain lepidopterous and hymenopterous larvae to *Bacillus sotto* toxin. **Canadian Entomologist** 88:280-283. DOI: 10.4039/Ent88280-6
- Aronson AI, Han E, Mcgaughey W, Johnson D (1991) The solubility if the inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is depend upon protoxin composition and is a factoring toxicity to insects. **Applied and Environmental Microbiology** 57:981-986.

Arshad M, Suhail A (2011) Field and laboratory performance of transgenic Bt cotton containing cry 1Ac against Beet Armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Pakistan Journal of Zoology** 43:529-535.

Balan MG, Saab OJGA, Maciel CDG, Oliveira GM (2012) Diagnóstico e proposta de descrição metodológica para artigos técnico-científicos que tratam da avaliação de aplicações de herbicidas. **Revista Brasileira de Herbicidas** 11:126-138. DOI: 10.7824/rbh.v11i1.174

Bauce E, Bidon Y, Berthiaume R (2002) Effects of food nutritive quality and *Bacillus thuringiensis* on feeding behaviour, food utilization and larval growth of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) when exposed as fourth and sixth-instar larvae. **Agriculture and Forest Entomology** 4:1–14. DOI: 10.1046/j.1461-9563.2002.00123.x

Bauce E, Carisey N, Dupont A (2006) Carry over effects of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* on *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny under various stressful environmental conditions. **Agricultural and Forest Entomology** 8:63-76. DOI: 10.1111/j.1461-9555.2006.00283.x

Beegle CC, Yamamoto T (1992) Invitation paper (C.P. Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Canadian Entomologist** 124:587-616. DOI: 10.4039/Ent124587-4

Bernardi O (2012) **Avaliação do risco de resistência de lepidópteros-praga (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac expressa em soja MON 87701 X MON 89788 no Brasil**. 144f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Esalq, Piracicaba. DOI: 10.11606/T.11.2012.tde-25042012-153518

Bernardi O, Albernaz KC, Valicente FH, Omoto C (2011) Resistência de inseto-praga à plantas geneticamente modificadas. In.: Borém A, Almeida GD (Eds.) **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa p.179-204.

Berry SJ (1982) Maternal direction of oogenesis and early embryogenesis in insects. **Annual Review Entomology** 27:205-227. DOI: 10.1146/annurev.en.27.010182.001225

Boots M, Roberts KE (2012) Maternal effects in disease resistance: poor maternal environment increases offspring resistance to an insect virus. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 279:4009-2014. DOI: 10.1098/rspb.2012.1073

Botelho ABRZ, Silva IF, Ávila CJ (2019) Control of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) using Chin-IA (I-A) isolate as integrate component of management in soybean crops. **Arquivo do Instituto Biológico** 86:1-8. DOI: 10.1590/1808-1657000712018

Brandt CR, Adang MJ, Spence KD (1978) The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection

in *Orgyia pseudotsugata*. **Journal of Invertebrate Pathology** 32:12-24. DOI: 10.1016/0022-2011(78)90169-6

Brandt SL, Coudron TA, Habibi J, Brown GR, Ilagan OM, Wagner RM, Wright MK, Backus EA, Huesing JE (2004) Interaction of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with the digestive system of *Lygus hesperus*. **Current Microbiology** 48:1-9. DOI: 10.1007/s00284-003-4056-y

Bravo A, Pacheco S, Gómez I, Garcia-Gómez B, Onofre J, Soberón M (2017) Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action (Eds.) In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol**. London: Springer p. 53-66. DOI: [https://10.1007/978-3-319-56678-8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8)

Bravo A, Sanchez J, Kouskoura T, Crickmore N (2002) N-terminal activation is an essential early step in the mechanism of action of the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal toxin. **Journal of Biological Chemistry** 277:23985-23987. DOI: 10.1074/jbc.C200263200

Broadway RM, Duffey SS (1986) Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology** 32:827-833. DOI: 10.1016/0022-1910(86)90097-1

Bueno AF, Carvalho GA, Santos AC, Sosa-Gómez DR, Silva DM (2017) Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. **Ciência Rural** 47:1-10. DOI: 10.1590/0103-8478cr20160829

Bueno RCOF, Parra JRP, Bueno AF, Moscardi F, Oliveira JRG, Camillo MF (2007) Sem barreira. **Revista Cultivar** 93:12-15.

Calow P, Sibly RM (1990) A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. **Functional Ecology** 4:283-288. DOI: 10.2307/2389587

Campero M, Slos S, Ollevier F, Stoks R (2007) Sublethal pesticide concentrations and predation jointly shape life history: Behavioural and physiological mechanisms. **Ecological Applications** 17:2111-2122. DOI: 10.1890/07-0442.1

Capalbo DMF, Moraes IO, Arantes OMN, Regis LN, Vega OFL, Benintende GB, Guimarães SE, Arruda ROM, Moraes RO (2008) Produção de bactérias entomopatogênicas na América Latina. In.: Alves SB, Lopes RB (Eds.) **Controle microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ p. 239-256.

Capalbo DMF, Vilas-Bôas GT, Arantes OMN, Suzuki MT (2005) *Bacillus thuringiensis*: Formulações e plantas transgênicas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 76-83.

Carriere Y, Crickmore N, Tabashnik BE (2015) Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. **Nature Biotechnology** 33:161-168. DOI: 10.1038/nbt.3099

Carvalho LC (2015) **Análise Econômica da Produção de Soja RR2 Pro e Soja RR1: Estudo de Caso no Estado de Mato Grosso**. 55f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Unesp, Botucatu.

Castro-Vargas C, Linares-Lopez C, Lopez-Torres A, Wrobel K, Torres-Guzman JC, Hernandez GAG, Wrobel K, Lanz-Mendoza H, Contreras-Garduno J (2017) Methylation on RNA: a potential mechanism related to immune priming within but not across generations. **Frontiers in Microbiology** 8:1-11. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00473

Céleres (2017). **Departamento de pesquisa**. Uberlândia: Informativo biotecnologia – IB17.01. Disponível em: <<http://www.celeres.com.br/30-levantamento-de-adocao-da-biotecnologia-agricola-no-brasil-safra-201617/>>. Acesso em: 5 de março de 2019.

Céleres (2018) **20 Anos da adoção da biotecnologia agrícola no brasil: Lições aprendidas e novos desafios**. Uberlândia: Céleres 53p.

Chang X, Wu Q, Wang S, Wang R, Yang Z, Chen D, Jiao X, Mao Z, Zhang Y (2012) Determining the involvement of two aminopeptidase Ns in the resistance of *Plutella xylostella* to the Bt toxin Cry1Ac: cloning and study of in vitro function. **Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology** 26:60-70. DOI: 10.1002/jbt.20401

Chen F, Wu G, Parajulee MN, Ge F (2007) Long-term impacts of elevated carbon dioxide and transgenic Bt cotton on performance and feeding of three generations of cotton bollworm. **Experimental and Applied Entomology** 124:27-35. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2007.00563.x

Chubicka T, Girija D, Deepa K, Salini S, Meera N, Raghavamenon AC, Divya MK, Babu TD (2018) A parasporin from *Bacillus thuringiensis* native to Peninsular India induces apoptosis in cancer cells through intrinsic pathway. **Journal of Bioscience** 43:407-416. DOI: 10.1007/s12038-018-9759-0

CIB - Conselho de Informação Sobre Biotecnologia (2019) **Soja transgênica**. Disponível em: <<https://cib.org.br/soja-transgenica/>>. Acesso em: 5 de março de 2019.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento (2020) **Observatório agrícola: Acompanhamento da safra brasileira 2019/2020 (Grãos)**. Brasília, 7:1-66. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em 05 de abril de 2020.

Copping LG, Menn JJ (2000) Review biopesticides: A review of their action, applications and efficacy. **Pest Management Science** 56:651-676. DOI: 10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U

Costa SD, Barbercheck ME, Kennedy GG (2000) Mortality of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) after sublethal stress with the CryIIIA deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* and subsequent exposure to *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology** 77:173-179. DOI: 10.1006/jipa.2001.5017

Crickmore N (2019) Access in: <<http://www.btnomenclature.info/>>. Available in: 17 de outubro de 2019.

CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (2018) **Tabela de plantas aprovadas para comercialização**. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/liberacao-comercial?p_p_id=110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=3&_110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU_struts_action=%2Fdocument_library_display%2Fview_file_entry&_110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU_redirect=http%3A%2F%2Fctnbio.mcti.gov.br%2Fliberacao-comercial%2F%2Fdocument_library_display%2FSqhWdohU4BvU%2Fview%2F1684467&_110_INSTANCE_SqhWdohU4BvU_fileEntryId=2238117#/liberacao-comercial/consultar-processo>. Acesso em: 5 de março de 2019.

Dean DH, Rajamohan F, Lee MK, Wu SJ, Chen XJ, Alcantara E, Hussain SR (1996) Probing the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins by site-directed mutagenesis – A minireview. **Gene** 179:111-117. DOI: 10.1016/S0378-1119(96)00442-8

Deepak R, Jayapradha R (2015) Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus thuringiensis* pak2310: A potential antagonist against *Fusarium oxysporum*. **Journal de Mycologie Médicale** 25:15-24. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.10.011

Degrande PE, Vivian LM (2007) **Pragas da Soja**. Rondonópolis: Boletim de Pesquisa da Soja - Fundação MT 274p.

De-Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. **Trends in Genetics** 17:193-199. DOI: 10.1016/S0168-9525(01)02237-5

Deml R, Meise T, Dettner K (1999) Effects of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins on food utilization, growth and survival of phytophagous insects. **Journal of Applied Entomology** 123:55–64. DOI: 10.1046/j.1439-0418.1999.00312.x

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81-106. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440

Dhinaut J, Chogne M, Moret Y (2018) Trans-generational immune priming in the mealworm beetle protects eggs through pathogen-dependent mechanisms imposing no immediate fitness cost for the offspring. **Developmental and Comparative Immunology** 79:105-112. DOI: 10.1016/j.dci.2017.10.017

Dhurua S, Gujar GT (2011) Field-evolved resistance to Bt toxin Cry1Ac in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera: Gelechiidae), from India. **Pest Management Science** 67:898-903. DOI: 10.1002/ps.2127

Dias AS, Marucci RC, Mendes SM, Moreira SG, Araújo OG, Santos CA, Barbosa TA (2016) Bioecology of *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1757) in different cover crops. **Bioscience Journal** 32:337-345. DOI: 10.14393/BJ-v32n2a2016-29759

Ding X, Luo Z, Xia L, Gao B, Sun Y, Zhang Y (2008) Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology** 56:442-446. DOI: 10.1007/s00284-008-9112-1

Du C, Martin PAW, Nickerson KW (1994) Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. **Applied and Environmental Microbiology** 60:3847-3853.

Dubuffet A, Zanchi C, Boutet G, Moreau J, Teixeira M, Moret Y (2015) Transgenerational immune priming protects the eggs only against gram-positive bacteria in the mealworm beetle. **PLoS Pathogens** 1:1-18. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005178

Dulmage HD (1970) Insecticidal activity of HD1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. alesti. **Journal of Invertebrate Pathology** 15:232-239. DOI: 10.1016/0022-2011(70)90240-5

Eizaguirre M, Tort S, Lopez C, Albajes R (2005) Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. **Journal Economic Entomology** 98:464-470. DOI: <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.2.464>

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Soja (2018) **Soja**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1>>. Acesso em: 23 de outubro de 2018.

Entwistle PF, Cory JS, Bailey, MJ, Higgs S (1993) ***Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice**. Chichester: John Wiley & Sons 330 p.

Fast GP, Régnière J (1984) Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian Entomologist** 116:123-130. DOI: 10.4039/Ent116123-2

Fathipour Y, Sedaratian A, Bagheri A, Talaei-Hassanlouei R (2019) Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology** 23:1-9. DOI: 10.1111/phen.12288

Fatoretto JC (2017) **Molecular characterization of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) resistant to Vip3Aa20 Protein Expressed in Corn**. 168f. Dissertação (Mestrado em Entomologia – Esalq, Piracicaba. DOI: 10.11606/T.11.2017.tde-24082017-185006

Fernandes FO, Abreu JA, Christ LM, Rosa APSA, Mendes SM (2020) Development of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) and *Spodoptera frugiperda*

(Smith, 1797) in winter forages. **Bioscience Journal** 36:844-856b. DOI: 10.14393/BJ-v36n3a2020-47782

Fernandes FO, Abreu JA, Christ LM, Silva AF, Rosa APSA (2018) Insecticides Management Used in Soybean for the Control of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Eriidae). **Journal of Agricultural Science** 10:223-230. DOI: 10.5539/jas.v10n11p223

Fernandes FO, Abreu JA, Christ LM, Silva AF, Rosa APSA, Belarmino LC, Martins JFS (2019) Impact of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the performance of corn crops associated to insecticides in lowland environment. **Journal of Agricultural Science** 11:155-165. DOI: 10.5539/jas.v11n18p155

Fernandes FO, Rosa APSA, Abreu JA, Christ LM, Belarmino LC, Martins JFS (2020) Performance of soybean cultivars in integrated pest management in lowland agroecosystem. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences** 15:1-6a. DOI: 10.5039/agraria.v15i1a5726

Ferraz LCCB (1998) Nematóides entomopatogênicos. In.: Alves SB (Eds.) **Controle microbiano de Insetos**. São Paulo: Editora FEALQ 234p.

Ferré J, Real MD, Van Rie J, Jansens S, Peferoen M (1991) Resistance to *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. **Proceedings National Academy Science** 88:5119-5123. DOI: 10.1073/pnas.88.12.5119

Ferré J, Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 47:501-533. DOI: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145234

Ferreira BSC, Panizzi AR (1978) Distribuição de ovos e lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner em plantas de soja. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** 7:54-59.

Ferreira L, Rosalesa E, Danko AS, Sanromána MA, Pazos MM (2016) *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. **Process Safety and Environmental Protection** 101:19-26. DOI: 10.1016/j.psep.2015.05.003

Fobes VE (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology** 14:12-24. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2000.00392.x

Ford BJ, Strayer JR, Reid J, Godfrey GL (1975) **The literature of arthropods associated with soybeans**. Illinois: Natural History Survival.

Franco AA, Queiroz MS, Peres AR, Rosa ME, Campos ZR, Campos RA (2016) Resistência de Cultivares de Soja a *Anticarsia gemmatalis*. **Revista Inova Ciência & Tecnologia** 3:7-13.

Freitak D, Heckel DG, Vogel H (2009) Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 276:2617-2624. DOI: 10.1098/rspb.2009.0323

Freitak D, Schmidtberg H, Dickel F, Lochnit GN, Vogel H, Vilcinskas A (2014) The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. **Virulence** 5:547-554. DOI: 10.4161/viru.28367

Fugi CGQ (2003) **Aspectos Biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos.** 59f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – IAC, Campinas.

Fugi, CGQ, Lourenção AL, Parra JRP (2005) Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola** 62:31-35. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162005000100006>

Geister TL, Lorenz MX, Hoffmann KH, Fisher K (2008) Adult nutrition and butterfly fitness: Effects of diet quality on reproductive output, egg composition, and egg hatching success. **Frontiers in Zoology** 5:1-13. DOI: 10.1186/1742-9994-5-10.

George PJE, Ambrose DP (2004) Impact of insecticides on the haemogram of *Rhynocoris kumarii* Ambrose and Livingstone (Hem., Reduviidae). **Journal of Applied Entomology** 128:600-604. DOI: 10.1111/j.1439-0418.2004.00896.x

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Kohl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, 30:250-258. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003

Glare TR, O'Callaghan M (2000) ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety.** United Kingdom: John Wiley & Sons 350p.

Gould F, Anderson A, Reynolds AL, Bungarner L, Moar W (1995) Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology** 88:1545-1559. DOI: 10.1093/jee/88.6.1545

Greene GL, Reid JC, Blount VN, Riddle TC (1973) Mating and oviposition behavior of the velvetbean caterpillar in soybeans. **Environmental Entomology** 2:1113-1115. DOI: 10.1093/ee/2.6.1113

Guedes RNC, Cutler GC (2014) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70:690-697. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3669>

Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology** 71:2558-2563. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2558-2563.2005

Guyton FE (1940) An outbreak of the velvetbean caterpillar in Alabama with data on control. **Journal of Economic Entomologic** 33:635-639. DOI: 10.1093/jee/33.4.635

Haase S, McCarthy CB, Ferrelli ML, Pidre ML, Sciocco-Cap A, Romanowski V, (2015). Development of a recombination system for the generation of occlusion

positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* multiple Nucleopolyhedrovirus. **Viruses** 7:1599e1612a. DOI: 10.3390/v7041599

Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses** 7:2230-2267b. DOI: 10.3390/v7052230

Habib ME, Andrade CFS (1991) Controle microbiano de insetos com o uso de bactérias. **Informe Agropecuário** 15:21-26.

Habib MEM, Andrade CFS (1998) Bactérias entomopatogênicas (Eds.) In: Alves SB **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq 1:383-446.

Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK, Deshpande VV (1999) Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. **Plant Physiology** 121:497-506. DOI: 10.1104/pp.121.2.497

Hawthorne D (1998) Predicting pest evolution predicting insect adaptation to a resistant crop. **Journal Economic of Entomology** 91:565-571. DOI: 10.1093/jee/91.3.565

Heath RR, Landolt PJ, Leppla NC, Dueeben BD (1988) Identification of a male-produced pheromone of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) attractive to conspecific males. **Journal of Chemical Ecology** 14:1121-1130. DOI: 10.1007/BF01019340

Heimpel AM, Angus TA (1963) Diseases caused by certain spore-forming bacteria. In.: Steinhaus, EA (Eds.). **Insect pathology: an advanced treatise**. New York: Academic Press p. 21-73.

Hernandez-Lopez J, Schuehly W, Crailsheim K, Riessberger-Gall U (2014) Transgenerational immune priming in honeybees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 281:1-8. DOI: 10.1098/rspb.2014.0454

Hernández-Martínez P, Hernández-Rodríguez CS, Van Rie J, Escriche B, Ferré J (2013) Insecticidal activity of Vip3Aa, Vip3Ad, Vip3Ae, and Vip3Af from *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran corn pests. **Journal of Invertebrate Pathology** 113:78-81. DOI: 10.1016/j.jip.2013.02.001

Herrero S, Bel Y, Hernández-Martínez P, Ferré J (2016) Susceptibility, mechanisms of response and resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Spodoptera* spp. **Current Opinion in Insect Science** 15:89-96. DOI: 10.1016/j.cois.2016.04.006

Herzog DC, Todd JH (1980) Sampling velvetbean carterpillar on soybean. In.: Kogan M, Herzog DC (Eds.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer-Verlag p. 107-140.

Hillyer JF (2016) Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental & Comparative Immunology** 58:102-118. DOI:10.1016/j.dci.2015.12.006

Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Oliveira LJ, Sosa-Gómez DR, Panizzi AR, Corso IC, Gazzoni DL, Oliveira EB (2000) **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 70p.

Husz B (1930) Field experiments on the application of *Bacillus thuringiensis* against the corn borer. **International Corn Borer Investment Science Reports**, 3:91–98.

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (2017) **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years**. ISAAA Brief n° 53: Ithaca 153p.

Ishiwata S (1901) On a kind of severe flacherie (sotto disease). **Dainihon Sanshi Kaiho** 114:1-5.

Jacobs C, Wang Y, Vogel H, Vilcinskis A, Van Der Zee M, Rozen D (2014) Egg survival is reduced by grave-soil microbes in the carrion beetle, *Nicrophorus vespilloides*. **BMC Evolutionary Biology** 14:1-8. DOI: 10.1186/s12862-014-0208-x

Jacobs CGC, Gallagher JD, Evison SEF, Heckel DG, Vilcinskis A, Vogel H (2017) Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). **Developmental and Comparative Immunology** 70:1-8. DOI: 10.1016/j.dci.2016.12.007

Jakka SRK, Knight JL, Fuentes J (2014) *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) with field-evolved resistance to Bt maize are susceptible to Bt pesticides. **Journal of Economic Entomology** 122:52-54. DOI: 10.1016/j.jip.2014.08.009

Janmaat AF, Bergmann L, Ericsson J (2014) Effect of low levels of *Bacillus thuringiensis* exposure on the growth, food consumption and digestion efficiencies of *Trichoplusia ni* resistant and susceptible to Bt. **Journal of Invertebrate Pathology** 119:32-39. DOI: 10.1016/j.jip.2014.04.001

Johnson DE, Mcgaughey WH (1996) Natural mortality among Indianmeal moth larvae with resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 68:170-172. DOI: 10.1006/jipa.1996.0076

Jurat-Fuentes J, Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5-10. DOI: 10.1016/j.jip.2016.07.018

Kaur G, Guo J, Brown S, Head GP, Price PA, Paula-Moraes S, Ni X, Dimase M, Huang F (2019) Field-evolved resistance of *Helicoverpa zea* (Boddie) to transgenic maize expressing pyramided Cry1A.105/ Cry2Ab2 proteins in northeast Louisiana, the United States. **Journal of Invertebrate Pathology** 163:11-20. DOI: 10.1016/j.jip.2019.02.007

Knorr E, Schmidtberg H, Arslan D, Bingsohn L, Vilcinskis A (2015) Translocation of bacteria from the gut to the eggs triggers maternal transgenerational immune

priming in *Tribolium castaneum*. **Biology Letters** 11:20150885. DOI: 10.1098/rsbl.2015.0885

Konecka E, Czarniewska E, Adam-Kaznowski A, Grochowska J (2018) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystals and thymol mixtures. **Industrial Crops and Products** 117:272-277. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.03.010

Kullik SA, Sears MK, Schaafsma AW (2011) Sublethal effects of Cry 1F Bt corn and clothianidin on black cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development. **Journal of Economic Entomology** 104:484-493. DOI: 10.1603/ec10360

Lacey LA (2017) **Insect and Mite Pests: From Theory to Practice**. Amsterdam, Academic Press 484p.

Lee MK, Rajamohan F, Gould F, Dean DH (1995) Resistance to *Bacillus thuringiensis* CryIA -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. **Applied and Environmental Microbiology** 61:3836-3842.

Lemes ARN (2012) **Proteínas Cry1 e Vip3A de *Bacillus thuringiensis*: sinergismo e efeito subletal no controle de *Heliothis virescens***. 76f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – UNESP, Jaboticabal.

Lemes ARN, Figueiredo CS, Sebastião I, Silva LM, Alves RC, Siqueira HAA, Lemos MVF, Fernandes AO, Desidério JA (2017) Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. **PeerJ** 5:e2866. DOI: 10.7717/peerj.2866

Leo F, Bonade-Bottino MA, Ceci LR, Gallerani R, Jouanin L (1998) Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiology** 118:997-1004. DOI: 10.1104/pp.118.3.997

Leppla NC, Guy RH, Heath RR, Dueben B (1987) Courtship and chemical communication of the velvetbean caterpillar moth. **Annals of the Entomological Society of America** 80:734-738.

Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH (2004) Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered B. thuringiensis subsp. aizawai toward *Lymantria dispar* larvae. **Current Microbiology** 48:175-181. DOI: 10.1007/s00284-003-4119-0

Li G, Reisig D, Miao J, Gould F, Huang F, Feng H (2016) Frequency of Cry1F non-recessive resistance alleles in North Carolina field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Plos one** 11:1-14. DOI: 10.1371/journal.pone.0154492

Loeb MJ, Martin PAW, Hakim RS, Goto S, Takeda M (2001) Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains

of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Insect Physiology** 47:599-606. DOI: 10.1016/s0022-1910(00)00150-5

Lorenz LM, Koella JC (2011) Maternal environment shapes the life history and susceptibility to malaria of *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Malaria Journal** 10:1:8. DOI: 10.1186/1475-2875-10-382.

Ma G, Roberts H, Sarjan M, Featherstone N, Lahnstein J, Akhurst R, Schmidt O (2005) Is the mature endotoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* inactivated by a coagulation reaction in the gut lumen of resistant *Helicoverpa armigera* larvae? **Insect Biochemistry and Insect Molecular Biology** 35:729-379. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.02.011

Machado VOF, Ferreira GA, Rosa SRA, Garcia AH, Pinheiro JB, Veloso VRS (1999) Aspectos biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de soja (*Glycine max* Merrill) **Pesquisa Agropecuária Tropical** 29:39-41. DOI: 10.5216/pat.v29i1.2888

Maia AHN (2003) **Modelagem da evolução da resistência de pragas a toxinas Bt expressas em culturas transgênicas: quantificação de risco utilizando análise de incertezas**. 108f. Tese (Doutorado em Entomologia) - Esalq, Piracicaba. DOI: 10.11606/T.11.2003.tde-19012004-100211

Mapa - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2019). **Sistema nacional de proteção de cultivares**. Disponível em: <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php>. Acesso em: 5 de março de 2019.

Martinelli S, Carvalho RA, Dourado PM, Heard GP (2017) Resistance of *Spodoptera frugiperda* to *Bacillus thuringiensis* proteins in the western hemisphere. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol**. New York: Springer International Publishing p. 273-288. DOI: 10.1007/978-3-319-56678-8

Martínez-Ramírez AC, Gould F, Ferré J (1999) Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science Technology** 9:239-246. DOI: 10.1080/09583159929811

Matuo T (1990) **Técnicas de aplicação de defensivos agrícolas**. Jaboticabal: Funep 139 p.

Melo M, Brandão A, Lima J (2018) Relação entre sociedade e natureza e desdobramentos do agronegócio na contemporaneidade. **Revista Geográfica Acadêmica** 12:36-49.

Metalnikov S, Chorine V (1929) On the infection of the gypsy moth and certain other insects with *Bacterium thuringiensis*. **International Corn Borer Investment Science Reports** 2:60–61.

Milano P, Berti-Filho E, Parra JRP, Cõnsoli FL (2008) Influência da temperatura na frequência de cópula de *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology** 37:528-535. DOI: 10.1590/S1519-566X2008000500005

Milne R, Wright T, Kaplan H, Dean D (1998) Spruce budworm elastase precipitates *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by specifically recognizing the C-terminal region. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 28:1013-1023. DOI: 10.1016/s0965-1748(98)00090-3

Moar WJ, Pusztai-Carey M, Van-Faassen H, Bosch D, Frutos R, Rang C, Luo K, Adang MJ (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance. **Microbiology** 61:2086-2092. DOI: 10.1128/AEM.61.6.2086-2092.1995

Monnerat R, Martins E, Macedo C, Queiroz P, Praça LB, Soares M, Moreira H, Grisi I, Silva J, Soberon M, Bravo A (2015) Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **Plos One** 10:e0119544. DOI: 10.1371/journal.pone.0119544

Monnerat R, Martins E, Quieroz P, Ordúz S, Jaramillo G, Benintende G, Cozzi J, Real MD, Martínez-Ramírez A, Rausell C, Cerón J, Ibarra JE, Rincon-Castro MC, Espinoza AM, Mezabasso L, Cabrera L, Sánchez J, Soberon M, Bravo A (2006) Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. **Applied Environmental Microbiology** 72:7029-7035. DOI: 10.1128/AEM.01454-06

Monnerat RG, Bravo A (2000) Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. In.: Melo IS, Azevedo JL (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente p. 163-200.

Monnerat RG, Praça LB (2006) *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*. In.: Oliveira-Filho, E. C.; Monnerat, R. G. (Eds.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina: Embrapa Cerrado p. 121-155.

Moraes IO, Capalbo DMF (1986) Produção de bactérias entomopatogênicas. In.: Alves SB (Eds.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Manole p. 127-170.

Moreau G, Baucé E (2003) Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety *kurstaki* on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Journal Economic Entomology** 96:280-286. DOI: 10.1603/0022-0493-96.2.280

Moreau J, Martinaud G, Troussard JP, Zanchi C, Moret Y (2012) Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. **Oikos** 121:1828-1832. DOI: 10.1111/j.1600-0706.2011.19933.x

Moret Y (2006) Trans-generational immune priming: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 273:1399-1405. DOI: 10.1098/rspb.2006.3465

Morse RJ, Yamamoto T, Stroud RM (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. **Structure** 9:409-417. DOI: 10.1016/s0969-2126(01)00601-3

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gomez DR, Roggia S, Hoffman-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: Hoffmann-Campo CB, Ferreira BSC, Moscardi F (Eds.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa p. 213-334.

Moskalyk LA, Oo MM, Jacobs-Lorena M (1996) Peritrophic matrix proteins of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. **Insect Molecular Biology** 5:261-268. DOI: 10.1111/j.1365-2583.1996.tb00100.x

Muller-Cohn J, Chaufaux J, Buisson C, Gilois N, Sanchis V, Lereclus D (1996) *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology** 89:791-797. DOI: 10.1093/jee/89.4.791

Nathan SS, Chung PG, Murugan K (2005) Effect of biopesticides applied separately or together on nutritional indices of the rice leafhopper, *Cnaphalocrocis medinalis*. **Phytoparasitica** 33:187-195. DOI: 10.1007/BF03029978

Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L (2016) Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Public Health** 18:1-8. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00148

Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizza SMR (2014). Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection** 56:50-54. DOI: 10.1016/0167-8809(83)90038-5

Oliveira-Filho EC, Faria MR, Castro MLMP (2004) **Regulamentação de produtos biológicos para o controle de pragas agrícolas**. Brasília: Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia 33p.

Oppert B, Kramer KJ, Johnson DE, Macintosh SC, Mcgaughey WH (1994) Altered protoxin inactivation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. **Biochemical and Biophysical Research** 198:940-947. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1134

Osman GH, Altaf W, Saleh IAS, Soltane R, Abulreesh HH, Arif IA, Ramadan AM, Osman YA (2018) First report of detection of the putative receptor of *Bacillus thuringiensis* toxin Vip3Aa from black cutworm (*Agrotis ipsilon*). **Saudi Journal of Biological Sciences** 25:441-445. DOI: 10.1016/j.sjbs.2018.01.006

Panizzi AR, Oliveira LJ, Silva JJ (2004) Survivorship, larval development and pupal weight of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on potential leguminous host plants. **Neotropical Entomology** 33:563-567. DOI: 10.1590/S1519-566X2004000500004.

Parra JRP (2014) Biological Control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, 71:420-429. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0167

Parsons PA (2000) Hormesis: an adaptive fitness response and an evolutionary expectation in stressed free-living populations, with particular reference to ionizing radiation. **Journal of Applied Toxicology** 20:103-112. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1263(200003/04)20:23.O.CO;2-O

Pashley DP, Johnson SJ (1986) Genetic population structure of migratory moths: the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America** 79:26-29. DOI: 10.1093/aesa/79.1.26

Pedersen A, Dedes J, Gauthier D, Van-Frankenhuyzen K (1997) Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Experimental and Applied Entomology** 83:253-26. DOI: 10.1046/j.1570-7458.1997.00180.x

Pietrowski V (2000) **Avaliação dos mecanismos genéticos da resistência de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu vírus de poliedrose nuclear**. 110f. Tese (Doutorado em Entomologia) – UFPA, Belém.

Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 71:255–281. DOI: 10.1128/MMBR.00034-06

Pinto CPG, Azevedo EB, Santos ALZ, Cardoso CP, Fernandes FO, Rossi GD, Polanczyk RA (2019) Immune response and susceptibility to *Cotesia flavipes* parasitizing *Diatraea saccharalis* larvae exposed to and surviving an LC₂₅ dosage of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 166:1-6. DOI: 10.1016/j.jip.2019.107209

Polanczyk RA, Van-Frankenhuyzen KV, Pauli G (2017) The American *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.). ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol**. New York: Springer International Publishing p. 173-184. DOI: 10.1007/978-3-319-56678-8

Praça LB, Batista AC, Martins ES, Siqueira CB, Dias DGS, Gomes ACMM, Falcão R, Monnerat RG (2004) Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39:11-16. DOI: 10.1590/S0100-204X2004000100002

Praça LB, Silva-Neto SP, Monnerat RG (2006) ***Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae): Biologia, amostragem e métodos de controle**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 18p.

Prutz G, Dettner K (2005) Effects of various concentrations of *Bacillus thuringiensis* corn leaf material on food utilization by *Chilo partellus* larvae of different ages. **Phytoparasitica** 33:467-479. DOI: 10.1007/BF02981396

Rahman MM, Roberts HLS, Sarjan M, Asgari S, Schmidt O (2004) Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephesia kuehniella*. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 101:2696-2699. DOI: 10.1073/pnas.0306669101

Ramalho FD, Azeredo TL, Nascimento ARB, Fernandes FS, Nascimento Jr, JL, Malaquias JB, Sliva CAD, Zanuncio JC (2011) Feeding of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, on Bt transgenic cotton and its isoline. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 139:207-214. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2011.01121.x

Ramos FR (2008) **Avaliação a campo de uma estirpe de *Bacillus thuringiensis* tóxica à lepidoptera e seu possível efeito adverso sobre espécies não-alvo**. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – UNB, Brasília.

Regev A, Keller M, Strizhov N, Sneh B, Prudovsky E, Chet I, Ginzberg I, Koncz-Kalman Z, Koncz C, Schell J, Zilberstein A (1996) Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Applied and Environmental Microbiology** 62:3581-3586. DOI: 10.1128/AEM.62.10.3581-3586.1996

Research and Market (2018) **Biopesticides: Global markets to 2022**. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/3773391/world-biopesticides-market-opportunities-and#rela2-2855568>>. Acesso em: 16 de março de 2019.

Research and Markets (2017) **World biopesticides market – Opportunities and forecasts, 2014-2022**. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/4559385/biopesticides-global-markets-to-2022#rela1-2855568>>. Acesso em: 16 de março de 2019.

Retnakaran A, Lauzon H, Fast P (1983) *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 34:233-239. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1983.tb03327.x

Rosengaus RB, Hays N, Biro C, Kemos J, Zaman M, Murray J, Gezahegn B, Smith W (2017) Pathogen-induced maternal effects result in enhanced immune responsiveness across generations. **Ecology Evolution** 7:2925-2935. DOI: 10.1002/ece3.2887

Roth O, Joop G, Eggert H, Hilbert J, Daniel J, Schmid-Hempel P, Kurtz J (2010) Paternally derived immune priming for offspring in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Animal Ecology** 79:403-413. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2009.01617.x

Sadd BM, Schmid-Hempel P (2007) Facultative but persistent trans-generational immunity via the mother's eggs in bumblebees. **Current Biology** 17:1046-1047. DOI: 2007.11.007

Sadd BM, Schmid-Hempel P (2009) A distinct infection cost associated with transgenerational priming of antibacterial immunity in bumble-bees. **Biology Letters** 5:798-801. DOI: 10.1098/rsbl.2009.0458

Saeglitz C, Bartsch D, Eber S, Gathmann A, Priesnitz KU, Schuphan I (2006) Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer in Germany. **Journal Economic Entomology** 99:1768-1773. DOI: 10.1603/0022-0493-99.5.1768

Salama HS, Zaki FN (1986) Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on prepupal and pupal stages of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science** 7:747-749. DOI: 10.1017/S1742758400011838

Salmela H, Amdam GV, Freitak D (2015) Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. **PLoS Pathogens** 11:e1005015. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005015

Sampson MN, Gooday GW (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. **Microbiology** 144:2189-2194.

Sanchis V (2010) From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*: A review. **Agronomy for sustainable development** 31:217-231. DOI: 10.1051/agro/2010027

Sathishkumara R, Ananthana G, Senthil L, Moovendhan M, Arun J (2018) Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*. **Carbohydrate Polymers** 190:113-120. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.02.047

Sayyed AH, Cerda H, Wright D (2003) Could Bt transgenic crops have nutritionally favourable effects on resistant insects? **Ecology Letters** 6:167-169. DOI: 10.1046/j.1461-0248.2003.00424.x

Schmid-Hempel P (2003) Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 270:357-366. DOI: 10.1098/rspb.2002.2265

Schnepf HE, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62:775–806.

Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM (2014) Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **ISRN Microbiology** 1:1-12. DOI: 10.1155/2014/135675

Sedaratian A, Fathipour Y, Talaei-Hassanloui R, Jurat-Fuentes JL (2013) Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology** 137:540-549. DOI: 10.1111/jen.12030

Sibly RM, Calow P (1986) **Physiological Ecology of Animals – An Evolutionary Approach**. Blackwell: Scientific Publications 243p.

Soberón M, Pardo-López L, López I, Gómez I, Tabashnik BE, Bravo A (2007) Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. **Science** 318:1640-1642. DOI: 10.1126/science.1146453

Sosa-Gómez DR, Corrêa-Ferreira BS, Hoffmann-Campo CB, Corso IC, Oliveira LJ, Moscardi F, Panizzi AR, Bueno AF, Hirose E (2014) **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja 90p.

Souza CSF, Silveira LCP, Paula DP, Andow DA, Mendes SM (2018) Transfer of Cry1F from Bt maize to eggs of resistant *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 13:e0203791. DOI: 10.1371/journal.pone.0203791

Souza FML (2016) **Sinergismo entre esporos e cristais de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* contra larvas e mariposa cigana (*Lymantria díspar* Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae)**. 36f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Agrônômica) – UFSJ, Sete Lagoas.

Specht A, Paula-Moraes SV, Sosa-Gómez DR (2015) Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia** 59:343-345. DOI: 10.1016/j.rbe.2015.09.002

Spies AG, Spence KD (1985) Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth *Manduca* scanning electron microscopic study. **Tissue and Cell** 17:379-394. DOI: 10.1016/0040-8166(85)90056-4

Spies AG, Spence KD (1985) Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth *Manduca* scanning electron microscopic study. **Tissue and Cell** 17:379-394. DOI: 10.1016/0040-8166(85)90056-4

Steinhaus EA (1951) Possible use of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. **Hilgardia** 20:359-381. DOI:10.3733/hilg.v20n18p359

Steinhaus EA (1961) On the correct author of *Bacillus sotto*. **Journal of Insect Pathology** 3:97-100.

Storer NP, Babcock JM, Schlenz M, Meade T, Thompson GD, Bing JW, Huckaba RM (2010) Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology** 103:1031-1038. DOI: 10.1603/ec10040

Storer NP, Kubiszak ME, King JE, Thompson GD, Santos AC (2012) Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology** 110:294-300. DOI: 10.1016/j.jip.2012.04.007

Strand MR (2008) The insect cellular immune response. **Insect Science** 15:1-14. DOI: 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x

Sysoev VO, Fischer B, Frese CK, Gupta I, Krijgsveld J, Hentze MW, Castello A, Ephrussi A (2016) Global changes of the RNA-bound proteome during the maternal-to-zygotic transition in *Drosophila*. **Nature Communications** 7:121-128. DOI: 10.1038/ncomms12128

Tidbury HJ, Pedersen AB, Boots M (2011) Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 278:871-876. DOI: 10.1098/rspb.2010.1517.

Trauer U, Hilker M (2013) Parental legacy in insects: variation of transgenerational immune priming during offspring development. **PLoS ONE** 8:e63392. DOI: 10.1371/journal.pone.0063392.

Trauer-Kizilelma U, Hilker M (2015) Impact of transgenerational immune priming on the defence of insect eggs against parasitism. **Developmental and Comparative Immunology** 51:126-133. DOI: 10.1016/j.dci.2015.03.004

Van-Frankenhuyzen K, Nystrom CW (1987) Effect of temperature on mortality and recovery of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Canadian Entomologist** 119:951-954. DOI: 10.4039/Ent119941-10

Van-Rie J, Ferré J (2000) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In.: Charles JF, Delecluse A, Nielsen-Leroux (Eds.) **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications p. 219-237.

Van-Rie J, Jansens S, Hofte H, Degheele D, Van Mellaert H (1990) Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin. **Applied and Environmental Microbiology** 56:1378-1385.

Von-Frisch K (1967) **The Dance Language and Orientation of Bees**. Cambridge: Harvard University Press 566 p.

Wang F, Liu Y, Zhang F, Chai L, Ruan L, Peng D, Sun M (2012) Improvement of crystal solubility and increasing toxicity against *Caenorhabditis elegans* by asparagine substitution in block 3 of *Bacillus thuringiensis* crystal protein Cry5Ba. **Applied and Environmental Microbiology** 78:7197-7204. DOI: 10.1128/AEM.01048-12

Wheeler GS, Halpern MD (1999) Compensatory responses of *Samea multiplicalis* larvae when fed leaves of different fertilization levels of the aquatic weed *Pistia stratiotes*. **Experimental and Applied Entomology** 92:205-216. DOI: 10.1046/j.1570-7458.1999.00539.x

Wolfersberger MG (1990) The toxicity of two *Bacillus thuringiensis* deltaendotoxins to gypsy moth larvae is inversely related to the affinity of binding sites on midgut brush border membranes for the toxins. **Experientia** 46:475-477. DOI: 10.1007/bf01954236

Xu C, Wang BC, Yu Z, Sun M (2014) Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. **Toxins** 6:2732–2770. DOI: 10.3390/toxins6092732

Yamamoto T, Dean DH (2000) Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In.: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Le Roux C (Eds.) **Entomopathogenic bacteria: From laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher p. 81-100.

Zanchi C, Troussard JP, Martinaud G, Moreau J, Moret Y (2011) Differential expression and costs between maternally and paternally derived immune priming for offspring in an insect. **Journal of Animal Ecology** 80:1174-1183. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2011.01872.x

Zanchi C, Troussard JP, Moreau J, Moret Y (2012) Relationship between maternal transfer of immunity and mother fecundity in an insect. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 279:3223-3230. DOI: 10.1098/rspb.2012.0493

Zhang H, Yin W, Zhao J, Jin L, Yang Y, Wu S, Tabashnik BE, Wu Y (2011) Early warning of cotton bollworm resistance associated with intensive planting of Bt cotton in China. **Plos One** 6:e22874. DOI: 10.1371/journal.pone.0022874

Zhang MY, Lovgren A, Lauden R (1995) Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* to cultured *Spodoptera* and *Drosophila* cells. **Journal of Invertebrate Pathology** 66:4651. DOI: 10.1006/jipa.1995.1059

CAPÍTULO 2 - GERAÇÕES DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 APRESENTAM DIFERENTES RESPOSTAS A *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911?

RESUMO - *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) causa perdas em todas as regiões produtoras de soja e bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 podem ser utilizados para o controle dessa praga, mas além dos efeitos letais (mortalidade) a compreensão dos efeitos subletais é um importante avanço para o conhecimento da relação patógeno e hospedeiro. O objetivo deste estudo foi avaliar o índice de adaptação da *A. gemmatalis* em laboratório submetidas a diferentes concentrações letais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações. O peso de lagartas sobreviventes ao Dipel SC na primeira geração foi inferior em relação as demais gerações, mas o peso das pupas ao longo das gerações não foi afetado, com exceção da primeira geração onde todos os tratamentos diferiram da testemunha. Em relação ao peso dos adultos, somente os indivíduos dos tratamentos CL₁₀ e CL₂₅ não diferiram da testemunha na primeira geração; na segunda geração os indivíduos dos tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₂₀ e CL₂₅ não diferiram da testemunha e os adultos provenientes da última geração não apresentaram diferença significativa entre ambos os tratamentos e a testemunha. A razão sexual foi afetada somente nos tratamentos CL₂₀ na primeira geração e CL₅ na segunda geração. O índice de adaptação e o índice relativo de adaptação indicaram diferença nas respostas das lagartas tanto entre os tratamentos quanto nas gerações. Na primeira geração não houve diferença entre os tratamentos, exceto para o CL₁₅. Quando as lagartas foram avaliadas na segunda geração as populações CL₁₅ e CL₂₅ apresentaram níveis superiores de adaptação em relação aos outros tratamentos, diferenciando da terceira geração que apresentou uma associação entre o aumento da concentração subletal com a redução do nível de adaptação. Houve uma redução na suscetibilidade ao Dipel na maioria dos tratamentos ao longo das gerações.

Palavras-chave: Efeito subletal, Lagarta da soja, Entomopatógeno, Controle biológico, *Glycine max*, hormese

CHAPTER 2 - DO GENERATIONS OF *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 PRESENT DIFFERENT RESPONSES TO *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1915?

ABSTRACT - *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) causes losses in all soybean producing regions, and bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* can be used to control this pest, but in addition to the lethal effects (mortality) the understanding of sublethal effects is an important advance in understanding the pathogen and host relationship. The aim of this study was to evaluate the adaptation index of *A. gemmatalis* in the laboratory subjected to underdoses of the bioinsecticide Dipel SC over three generations. The weight of caterpillars surviving Dipel SC in the first generation was lower compared to the other generations, but the weight of the pupae over the generations was not affected, except for the first generation where all treatments differed from the control. Regarding the weight of adults, only individuals from treatments LC₁₀ and LC₂₅ did not differ from the control in the first generation; in the second generation, individuals from treatments LC₅, LC₁₀, LC₂₀ and LC₂₅ did not differ from the control and adults from the last generation showed no significant difference between both treatments and the control. The sex ratio was affected only in the treatments LC₂₀ in the first generation and LC₅ in the second generation. The adaptation index and the relative adaptation index indicated differences in the responses of the caterpillars both between treatments and across generations. In the first generation there was no difference between treatments, except for LC₁₅ treatment. When the caterpillars were evaluated in the second generation, the LC₁₅ and LC₂₅ populations showed higher levels of adaptation compared to other treatments, different from the third generation that showed an association between the increase in sublethal concentration and the reduction in the level of adaptation. There has been a reduction in susceptibility in most treatments over the generations.

Keywords: Sublethal effect, Soybean caterpillar, Entomopathogen, Biological control, Glycine max, hormone.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) é uma das principais pragas da cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill, Fabaceae) nas Américas (Haase et al., 2015). Esta espécie pode ocorrer em todas as regiões produtoras de soja, proporcionando perdas de 3 a 75% na produtividade (Moscardi et al., 2012; Castro et al., 2019).

O controle químico e as plantas transgênicas são os principais métodos adotados no controle da lagarta da soja, todavia, o seu uso incorreto favorece a rápida evolução da resistência (Zhu et al., 2015; Mushtaq et al., 2017; Wang et al., 2019). Por outro lado, bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, foram imprescindíveis para conter surtos de *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808 (Lepidoptera: Noctuidae) nas safras 2012/2013 e 2013/2014 no Brasil (Polanczyk et al., 2017).

O uso tradicional do *B. thuringiensis* como bioinseticida, passou a ser considerada uma tecnologia superada, devido ao surgimento das plantas transgênicas com alta eficiência de controle, facilidade de uso e ausência de efeitos nocivos ao meio ambiente. Essa nova tecnologia dominou completamente o mercado e os bioinseticidas caíram em desuso (Schünemann et al., 2014; Polanczyk et al., 2017). A crença de que as plantas transgênicas seriam a solução no controle dos insetos alvo resultou na redução dos estudos de patologia dessa bactéria e a pesquisa foi direcionada principalmente para a compreensão dos mecanismos do modo de ação das toxinas Cry, visando ao desenvolvimento de estratégias no manejo de resistência (Tabashnik et al., 2013;2014).

Atualmente, pesquisas voltadas ao uso de bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* vêm sendo retomadas, devido aos frequentes e crescentes relatos de resistência de espécies praga as plantas transgênicas com genes de resistência (Bentivenha et al., 2018; Amaral et al., 2019; Horikoshi et al., 2019). A evolução da resistência dos insetos a tecnologia das plantas transgênicas pode estar relacionada a expressão de baixa dose das toxinas presentes nos eventos transgênicos com resistência a insetos e ao aumento da pressão de seleção (Arias et al., 2019).

Um dos parâmetros chave que influencia a evolução de resistência é a frequência da dose que os organismos estão expostos ao longo das gerações (Eizaguirre et al., 2005). Portanto, são necessários estudos que avaliem a interação patógeno-hospedeiro ao longo do tempo para fornecer subsídios ao manejo de resistência da praga.

O espécime sobrevivente pode apresentar efeitos subletais da toxina, o que causa uma diversidade de respostas. O fenômeno é conhecido como hormese e ocorre entre as gerações, podendo levar a consequências positivas ao organismo de grande relevância, pois pode contribuir para surtos de insetos-praga, ressurgência de pragas secundárias ou até mesmo interposição em interações entre organismos (Guedes e Cutler, 2013; Van-Rie e Ferré, 2000).

As formulações contendo toxinas e esporos do *B. thuringiensis* foram usadas quarenta anos como agentes de controle com poucas casos de resistência em situações de campo diferentemente das plantas transgênicas com genes de resistência a insetos (Escriche et al., 1995; Gong et al., 2010; Zago et al., 2014). No entanto, essas formulações comerciais ainda enfrentam desafios relacionados a aplicação correta o produto biologicamente ativo no alvo, em quantidade necessária, de forma econômica e com o mínimo de desperdício. Condições ambientais e a tecnologia de aplicação adotada são os principais fatores que impedem a administração de uma dose letal a uma população de inseto-praga (Sedaratian et al., 2013).

Desta forma, o manejo integrado da *A. gemmatilis* baseado no controle biológico com *B. thuringiensis* constitui um importante método de controle, porém, o uso dessa ferramenta deve ser bem planejado, e para isso é importante conhecer o efeito do patógeno ao longo das gerações do inseto-praga (Zago et al., 2014; Sedaratian et al., 2013; De Bortoli et al., 2013). Sendo assim, devido à falta de informações sobre os efeitos subletais por *B. thuringiensis* o objetivo deste estudo foi avaliar o índice de adaptação de gerações da lagarta da soja em laboratório submetidas a subdoses do bioinseticidas Dipel SC ao longo de três gerações.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Criação dos insetos

Os insetos foram obtidos do Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ - Piracicaba) e a criação de insetos foi estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Jaboticabal), mantidos em dieta artificial (Greene et al., 1976).

Para o estabelecimento da criação foram separados cerca de 2000 ovos de *A. gemmatalis*, acondicionados em placas de Petri de (9 cm Ø), com papel filtro umedecido com água destilada na parte inferior e na parte superior filme plástico (PVC) perfurado com um alfinete. O material foi mantido em sala climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas até a eclosão das lagartas. Para os bioensaios utilizaram-se lagartas de segundo instar alimentadas com dieta artificial (Greene et al., 1976).

2.2. Estimativas das Concentrações letais (CL)

As suspensões do bioinseticida à base de *B. thuringiensis* (Dipel SC) foram realizadas a partir da quantificação do número de esporos, por meio de contagem direta ao microscópio com auxílio de câmara de Neubauer (Brand et al., 1976). Para estimar a curva resposta pela análise de Probit seis concentrações foram definidas, micropipetando 200 μL na superfície da dieta artificial ($4,8 \text{ cm}^3$) previamente distribuída em copos de polietileno ($3,5 \text{ cm}$ Ø). Para cada concentração 10 lagartas de 2º instar de *A. gemmatalis* foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por concentração. No lote correspondente ao controle foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados. A partir da estimativa da curva resposta pela análise de Probit as concentrações subletais CL_5 , CL_{10} , CL_{15} , CL_{20} e CL_{25} ($2,7 \times 10^4$; $3,8 \times 10^4$; $5,1 \times 10^4$; $6,5 \times 10^4$; $1,7 \times 10^5$ esporos. mL^{-1}) foram escolhidas para serem utilizadas como tratamentos no bioensaio (Sedaratian et al., 2013).

Para a montagem do bioensaio uma alíquota de 200 μL dos tratamentos CL_5 , CL_{10} , CL_{15} , CL_{20} e CL_{25} foi aplicada na superfície da dieta artificial ($4,8 \text{ cm}^3$)

previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø). Cada vez que o ciclo biológico da espécie chegava ao fim as lagartas sobreviventes que eclodiam dos ovos de cada tratamento foram realimentados com dieta artificial contendo suas respectivas concentrações subletais (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅), esse procedimento foi executado durante três ciclos biológicos (F₁, F₂ e F₃) da espécie praga. Para cada geração de *A. gemmatilis* (F₁, F₂ e F₃) 10 lagartas de 2º instar foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por tratamento. No lote correspondente ao controle foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

2.3. Avaliação dos efeitos subletais

As lagartas sobreviventes nas gerações F₁, F₂ e F₃ aos tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅ e controle foram avaliadas diariamente e ao atingirem a fase de pupa foram sexadas. Os adultos recém emergidos foram separados em casais e acondicionados em gaiolas de PVC com 10 cm de diâmetro por 20 cm de altura, forradas com papel sulfite A4 branco (utilizado como substrato de oviposição) no seu interior. Na parte inferior foi utilizada uma placa de Petri com papel filtro e a parte superior vedada com tecido *voile*.

Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% umedecido em algodão hidrófilo colocado em placa de Petri de polietileno (49 x 12 mm) no fundo das gaiolas (Fernandes et al., 2017). Os papéis utilizados como substrato de postura foram retirados, trocados diariamente, acondicionados em potes plásticos (14,0 cm Ø, 10 cm altura) e com a eclosão das larvas essas foram utilizadas para originar as gerações subsequentes (Kalvnadi et al., 2018).

2.4. Delineamento experimental

Os dados de mortalidade foram submetidos a análise de regressão de Probit e estimados os valores das concentrações subletais CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ utilizando o software SAS (P > 95%) (Sas University, 2014). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) para as variáveis peso (g) de lagartas do sétimo dia, pupas após 24 horas e adultos recém emergidos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Foi

realizado o teste de Kruskal-Wallis e o teste *post hoc* de Dunn ($P \leq 0,05$) nas gerações F₁, F₂ e F₃ (Graphpad Prism 6, 2012).

Para avaliar o desempenho larval de *A. gemmatilis* utilizou-se o índice de adaptação (IA) proposto por Penco; Martin (1982) adaptado por Boregas et al. (2013), que avalia o desempenho larval, em que: $IA = \text{sobrevivência larval (\%)} \times \text{peso de pupas (mg)} / \text{período de desenvolvimento larval (dias)}$; no cálculo do índice de adaptação, o peso das pupas fêmeas foi utilizada para estimar a fecundidade dos adultos (Barah e Sengupta, 1991).

Com base neste índice, também foi calculado o índice relativo de adaptação, por meio da divisão do índice de adaptação de cada tratamento pelo índice de adaptação da testemunha para expressar o valor em percentagem. O resultado dessa divisão foi multiplicado por cem para facilitar a visualização dos resultados. Para o cálculo da razão sexual para cada tratamento, foram anotados o número e o sexo dos adultos emergidos nos três bioensaios utilizados para estimar os índices de adaptação. A expressão usada para calcular a razão sexual (RS) foi: $RS = \text{número de fêmeas} / (\text{número de machos} + \text{fêmeas})$. Os dados foram comparados em relação a proporção de 1:1 de acordo com a teoria de Fisher pelo teste do qui-quadrado no software R 3.6.1 (Boregas et al., 2013; Fisher et al., 1930; Waquil et al., 2016).

3. RESULTADOS

O parâmetro peso na primeira geração atingiu limiares inferiores em relação as demais gerações. Todos os tratamentos com exceção CL₅, apresentaram redução no peso de acordo com o aumento da concentração utilizada, sendo observado na CL₂₅ uma redução de 60,0% no peso das lagartas. Na segunda geração todos os tratamentos apresentaram peso superior à primeira geração. O tratamento CL₂₀ obteve a maior peso entre todos os tratamentos, com diferença de 33,3% em relação ao peso da testemunha. Na terceira geração os tratamentos CL₁₀ e CL₁₅ não apresentaram diferença significativa com a testemunha. No entanto, CL₅ e CL₂₀ atingiram índices inferiores, aproximadamente 35,0% no peso das lagartas comparado aos outros tratamentos. As lagartas expostas a CL₂₅ na terceira geração não sobreviveram (Figura 1).

Na fase pupal, houve pouca variação no parâmetro peso ao longo das gerações, ao contrário da primeira geração onde todos os tratamentos diferiram da testemunha. Na segunda geração as CL₅, CL₁₀ e CL₂₀ não diferiram da testemunha, entretanto, houve significância da CL₂₅ com o menor valor no peso. As pupas que alcançaram a terceira geração, na CL₁₅ apresentaram diferença significativa entre CL₁₀ e a testemunha com redução de aproximadamente 15,3% do peso pupal (Figura 1).

Ao atingirem a fase adulta na primeira geração, somente os indivíduos dos tratamentos CL₁₀ e CL₂₅ não diferiram da testemunha. Após completarem a segunda geração apenas CL₁₅ obteve o menor valor com diferença de 21,4% em relação ao peso da testemunha. Os outros tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₂₀ e CL₂₅ não diferiram da testemunha. Ao final, os adultos provenientes da última geração não apresentaram diferença significativa entre ambos os tratamentos e a testemunha (Figura 1).

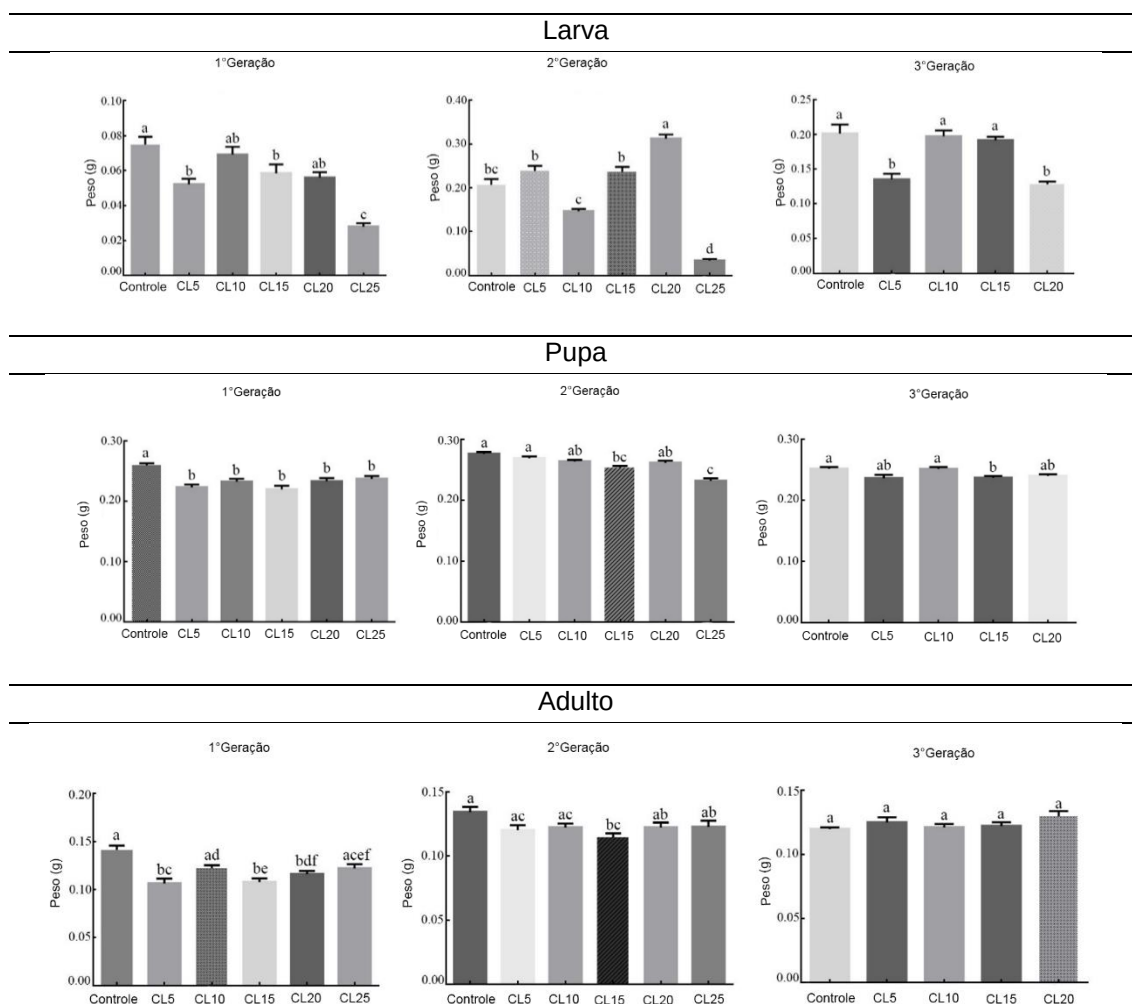


Figura 1. Peso (g) entre os tratamentos das fases de desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h. As médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

O peso das lagartas de *A. gemmatalis* de cada tratamento apresentou diferença significativa entre as gerações, com exceção ao tratamento CL₂₅. Nas avaliações realizadas na primeira geração evidenciam o menor valor do peso aos tratamentos CL₅, CL₁₅ e CL₂₀, no entanto, quando as lagartas foram avaliadas na segunda geração os resultados demonstraram aumento no peso de *A. gemmatalis* entre todas as gerações. O tratamento CL₁₀ foi diferente com aumento no peso ao longo das gerações tendo da primeira geração a terceira geração uma adição de 75,0% no peso (Figura 2).

Ao atingirem a fase de pupa os resultados foram iguais, onde a segunda geração atingiu os maiores valores em todos os tratamentos, com exceção a CL₂₅ que não apresentou diferença significativa (Figura 2).

Na fase adulta a CL₅ na primeira geração apresentou a maior média no peso, diferindo das gerações subsequentes, CL₁₀ e CL₂₅ que não diferiram entre si e, CL₁₅ e CL₂₀ apresentaram maiores valores do peso na primeira e terceira geração (Figura 2).

A razão sexual observada comparada à proporção de 1:1 esperada apresentou alteração somente nos tratamentos CL₂₀ na primeira geração e CL₅ na segunda geração, uma vez que a média nas gerações foi de 0,47 entre a primeira geração e segunda geração e de 0,54 na terceira geração, respectivamente (Tabela 1).

O índice de adaptação e o índice relativo de adaptação indicou diferença nas respostas das lagartas tanto entre os tratamentos quanto nas gerações. Na primeira geração não houve diferença entre os tratamentos, exceto para o tratamento CL₁₅. Quando as lagartas foram avaliadas na segunda geração as populações CL₁₅ e CL₂₅ apresentaram níveis superiores de adaptação em relação aos outros tratamentos, diferente da terceira geração onde houve uma associação entre o aumento da concentração subletal com a redução do nível de adaptação (Tabela 1).

Ao se comparar os índices em relação às gerações, houve similaridade nos resultados atribuído ao período de exposição entre a primeira e a segunda geração, com a melhor resposta no índice na segunda geração em todos os tratamentos. Nos tratamentos CL₁₅ e CL₂₀ o comportamento do índice de adaptação e o índice relativo de adaptação respondeu de forma diferente, onde todas as gerações na CL₁₅ diferiram e, no tratamento CL₂₀ não houve diferença significativa entre as gerações (Tabela 1).

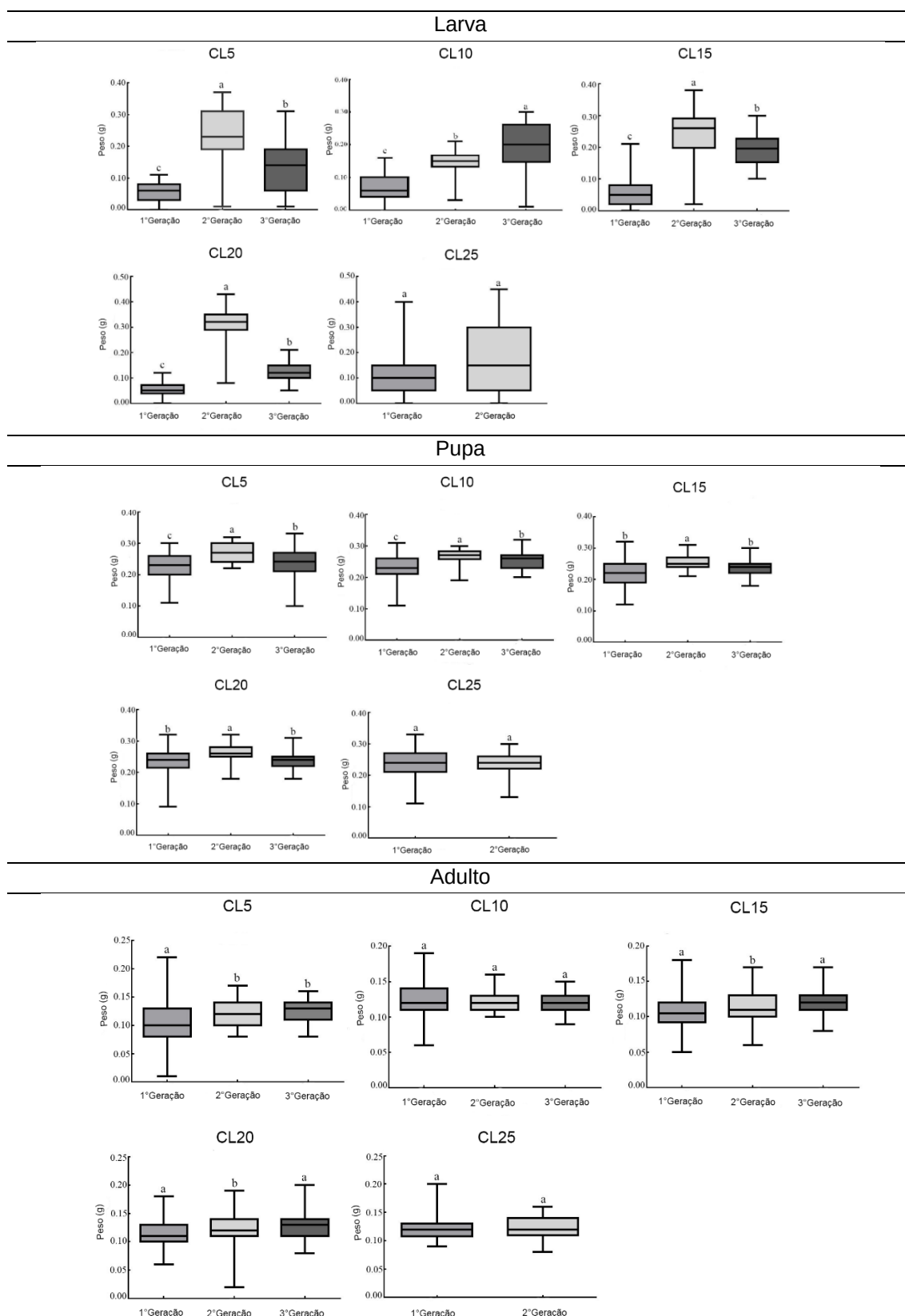


Figura 2. Peso (g) entre as gerações das fases de desenvolvimento de *Anticarsia gemmatilis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

Tabela 1. Razão sexual, índice adaptação e índice de adaptação relativo de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

Tratamentos	Razão Sexual (fêmea/fêmea+macho)	Índice de adaptação	Índice de adaptação relativo
1º Geração			
Controle	$0,55 \pm 0,04$	$2,57 \pm 0,07 \text{ aA}^2$	$100,00 \pm 0,00 \text{ aA}$
CL ₅	$0,46 \pm 0,04$	$1,55 \pm 0,08 \text{ bB}$	$60,16 \pm 0,48 \text{ bB}$
CL ₁₀	$0,61 \pm 0,04$	$1,59 \pm 0,07 \text{ bB}$	$61,97 \pm 0,44 \text{ bB}$
CL ₁₅	$0,43 \pm 0,04$	$1,10 \pm 0,07 \text{ cC}$	$42,85 \pm 0,43 \text{ cC}$
CL ₂₀	$0,26 \pm 0,04^1$	$1,50 \pm 0,07 \text{ bA}$	$58,33 \pm 0,44 \text{ bA}$
CL ₂₅	$0,62 \pm 0,04$	$1,50 \pm 0,06 \text{ bB}$	$58,39 \pm 0,39 \text{ bB}$
2º Geração			
Controle	$0,45 \pm 0,00$	$2,81 \pm 0,06 \text{ aA}$	$100,00 \pm 0,00 \text{ aA}$
CL ₅	$0,38 \pm 0,04^1$	$2,00 \pm 0,05 \text{ cA}$	$71,34 \pm 0,32 \text{ cA}$
CL ₁₀	$0,54 \pm 0,04$	$1,87 \pm 0,05 \text{ cA}$	$66,42 \pm 0,32 \text{ cA}$
CL ₁₅	$0,52 \pm 0,04$	$2,09 \pm 0,06 \text{ bA}$	$74,22 \pm 0,35 \text{ bA}$
CL ₂₀	$0,47 \pm 0,03$	$1,59 \pm 0,05 \text{ dA}$	$56,68 \pm 0,32 \text{ dA}$
CL ₂₅	$0,48 \pm 0,03$	$1,94 \pm 0,06 \text{ bA}$	$69,08 \pm 0,38 \text{ bA}$
3º Geração			
Controle	$0,48 \pm 0,01$	$2,61 \pm 0,09 \text{ aA}$	$100,00 \pm 0,00 \text{ aA}$
CL ₅	$0,50 \pm 0,04$	$2,61 \pm 0,09 \text{ bA}$	$72,34 \pm 0,47 \text{ bA}$
CL ₁₀	$0,51 \pm 0,04$	$1,89 \pm 0,08 \text{ bA}$	$74,77 \pm 0,36 \text{ bA}$
CL ₁₅	$0,57 \pm 0,03$	$1,95 \pm 0,06 \text{ cB}$	$60,62 \pm 0,31 \text{ cB}$
CL ₂₀	$0,57 \pm 0,03$	$1,58 \pm 0,05 \text{ cA}$	$59,71 \pm 0,30 \text{ cA}$
CL ₂₅	-	-	-

¹Diferença estatística em relação à razão sexual de 1:1, de acordo com a teoria de Fisher (1930), pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$). ²Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos e maiúsculas entre gerações não diferem significativamente pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

O peso na fase larval foi afetado de de acordo com a subdose utilizada ao longo das gerações, sendo que a primeira geração sofreu maior influência dos tratamentos.

Essas alterações observadas no peso das lagartas podem ser atribuídas a uma combinação de três fenômenos comportamentais. Primeiro, quando as lagartas ingeriram a dieta contendo *B. thuringiensis*, após alguns dias a alimentação pode ser inibida, cuja duração depende da temperatura, duração da exposição, dose ingerida e a qualidade do alimento disponível (Van-Frankenhuyzen e Nystrom, 1987; Fast e Régnière, 1984; Bauce et al., 2002). Como resposta a inibição, as lagartas degradariam a toxina e reparariam as células do epitélio intestinal devido a utilização das subdoses (Retnakaran et al., 1983; Spies e Spence, 1985) ou silenciaria genes que reduz a suscetibilidade a bactéria (Guo et al., 2015; Crickmore, 2016; Guo et al., 2019).

O segundo fenômeno seria atribuído as lagartas que voltariam a se alimentarem e, como resultado para compensação alimentar, prolongariam o tempo de desenvolvimento para suprir as reservas de energia gasta durante o período de inibição (Bauce et al., 2002). O terceiro fenômeno é aplicado em condições de campo, denominado período de anorexia, que é uma forma de inibição da alimentação que tende a dessincronizar a ecobiologia dos insetos com a ecofisiologia da planta atacada (Bauce et al., 2006). Estudos realizados com o *Choristoneura fumiferana* (Clemens, 1865) (Lepidoptera: Tortricidae) e a planta *Picea glauca* (Moench) (Pinales: Pinaceae) exemplificam o retardo na sincronia do inseto ao se alimentar da planta; os danos causados aos insetos são maior na fase larval apresentando maior mortalidade, maior tempo de desenvolvimento larval e menor peso na fase pupal (Lawrence et al., 1997).

Bauce et al. (2002) demonstraram que as lagartas que cessaram por um tempo e retornaram à alimentação tinham provavelmente menos tempo para recuperar e, presumivelmente, tiveram que alocar uma grande parte dos nutrientes assimilados no reparo de células epiteliais ao invés de utilizar os recursos para ganho de peso. Além disso, quando o desenvolvimento é comprometido os efeitos são percebidos nas fases subsequentes, como observado no tratamento CL₂₅ que não completou a terceira geração, com redução na fecundidade após exposição a dose subletal. Estudos realizados comprovam o observado no presente trabalho, com uma redução na fecundidade após exposição a subdose do *B. thuringiensis* (Golud e Anderson, 1991; Pedersen et al., 1997; Costa et al., 2000).

O processo fisiológico também é outro fator que pode ter contribuído para a variação no condicionamento físico dos insetos. Estudo realizado com o efeito do *B. thuringiensis* na atividade proteolítica de *H. armigera* comprova que os danos causados pelo patógeno as células epiteliais do intestino médio são compensados por diferentes mecanismos (Fathipour et al., 2019). O primeiro é, quando a produção de enzimas da protease do intestino é prejudicada, o inseto fisiologicamente compensará alterando a sua composição enzimática. Uma das principais razões para o sucesso de vários lepidópteros polípagos é a presença dessas proteases no intestino médio, além da capacidade de alterar o tipo e o nível de atividade como uma nova estratégia para suprir as necessidades energéticas e de aminoácidos (Harsulkar et al., 1999; Brandt et al., 2004).

Um segundo mecanismo, é o aumento na produção de enzimas digestivas por células que não foram comprometidas. A destruição das células do intestino médio faz com que as células sobreviventes aumentem a produção de enzimas digestivas e garantam que o inseto consiga explorar o recurso alimentar disponível (Broadway e Duffey, 1986).

O terceiro mecanismo seria a ativação de processos que substitua as células epiteliais danificadas. Esse processo foi observado no intestino médio de *Chloride virescens* Fabricius, 1777 (Lepidoptera: Noctuidae) submetida a toxinas do *B. thuringiensis*. No estudo foi visto que as lagartas após realizar a substituição das células epiteliais danificadas continuaram a crescer e alimentar normalmente (Spies e Spence, 1985; Loeb et al., 2001). Estudos realizados avaliando a capacidade dos insetos de repararem suas células intestinais danificadas depois de se alimentar com dieta infectada com *B. thuringiensis* mostraram resistência a algumas toxinas produzido pelo patógeno (Martinez-Ramirez et al., 1999; Loeb et al., 2001), o que torna o uso a longo prazo desse patógeno ineficaz.

Contudo, os resultados deste estudo indicam que o estresse nutricional causado pela utilização de subdoses de *B. thuringiensis* na primeira geração afeta o desenvolvimento biológico do inseto drasticamente, no entanto, as gerações subsequentes os insetos sobreviventes usam alterações comportamentais ou fisiológicas para sobreviver e perpetuar sua progênie.

A exposição de *A. gemmatalis* a subdoses de *B. thuringiensis* resultou em menor proporção de fêmeas na progênie. A teoria de Fisher (1930) prediz que espécies que se reproduzem sexualmente, metade dos genes é adquirido de cada sexo apresentando proporções sexuais de 1:1, o fato é atribuído ao mecanismo de seleção natural, onde a evolução caminha em direção à proporção de 1:1, independente do sistema de determinação do sexo, pois supõem que machos e fêmeas contribuem de forma igualitária para o *pool* genético (Carvalho et al., 1998). A evolução dos tratamentos CL₅ e CL₂₀ nas gerações subsequentes corrobora a teoria, no entanto, acredita que essas alterações na proporção de machos e fêmeas pode estar associada também à suscetibilidade diferencial entre os sexos e a efeitos fisiológicos na fertilização dos óvulos quando os adultos são expostos aos tratamentos (Alix et al., 2001; Desneux et al., 2007).

Outros estudos exemplificam a distorção na razão sexual diante de inseticidas sintéticos, como abamectina em *Ageniaspis citricola* (Longvinovskaya, 1998) (Hymenoptera: Encyrtidae) (Moraes et al., 2016), clorpirifós em *Trichogramma brassicae* (Bezdenko, 1968) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Delpuech e Meyet, 2003), no entanto, este é o primeiro relato sobre o efeito da subdose de um bioinseticida a base de *B. thuringiensis* na proporção entre machos e fêmeas.

Cabe salientar, que este estudo foi realizado em condições de laboratório, onde os insetos são submetidos a uma situação drástica, com exposição máxima dos insetos ao bioinseticida. Dessa forma, é possível que em condições de campo, os efeitos do bioinseticida sobre a razão sexual sejam inferiores aos observados no presente estudo. No entanto, estudos de campo devem ser realizados para verificar os efeitos subletais causados pelo bioinseticida na população de *A. gemmatilis* e em suas gerações subsequentes.

Tanto o índice de adaptação quanto o índice relativo de adaptação indicaram níveis distintos de suscetibilidade ao longo das gerações nas populações selecionadas artificialmente em condições de laboratório, com redução da suscetibilidade para a maioria dos tratamentos ao longo das gerações.

Estudos realizados em laboratórios com bioinseticidas à base de *B. thuringiensis*, exemplificam a capacidade de evolução de resistência quando lagartas de *A. gemmatilis* submetidas a subdose de Dipel WP. A pressão de seleção para obter aproximadamente 80% de resistência na população apresentou a necessidade de executar consecutivamente 144 gerações submetida a concentração de 16,000 IU.mg⁻¹, 32 g.kg⁻¹, e inerte 968 g.kg⁻¹ (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, US) (Sosa-Gómez e Miranda, 2012). Em condições de campo fatores ambientais e o manejo inadequado da aplicação do produto deve contribuir para acelerar o processo de evolução devido ao aumento da frequência de indivíduos sobreviventes.

Esta resposta é conhecida como hormese e pode levar a consequências positivas ao organismo sendo de grande relevância, uma vez que contribui para surtos de insetos-praga, ressurgência de pragas secundárias ou até mesmo interposição em interações entre organismos (Guedes e Cutler, 2013). Os padrões evolutivos surgem a partir da aptidão manifestada no fenótipo que é

determinada por um genótipo e é avaliada pela capacidade de difundir a característica em uma população (Fobes, 2000).

A teoria do princípio de alocação proposta por Sibly; Calow (1986) baseado no modelo energético fisiológico infere que trocas na alocação de recursos entre diferentes processos fisiológicos são uma característica central no controle dos fenótipos do organismo, ou seja, para um determinado nível de entrada de recursos, os organismos serão selecionados com base em como eles alocam recursos entre metabolismo, crescimento, reprodução e dispersão, cuja combinação determina a aptidão. Mudanças ambientais, como a exposição ao bioinseticida para o controle do inseto, podem alterar o padrão de alocação de várias maneiras (Calow e Sibly, 1990). Fisiologicamente, espera-se uma maior alocação para processos como crescimento e resulte em menor alocação para metabolismo e/ou reprodução (Fobes, 2000). A mudança no padrão de alocação pode ter consequências positivas ou negativas para a adequação, visto ao tratamento CL₂₅ que não atingiu a 3^o geração.

A sobrevivência quanto a reprodução são atividades que requer entrada de energia e, espera-se que haja equilíbrio entre os componentes. Em condições de estresse como a utilização do bioinseticida, há um aumento nos gastos de energia como resposta para a desintoxicação e esses gastos energéticos adicionais devem ser pagos por decréscimo na energia dedicada à reprodução. Ou em vez de investir em mecanismos de defesa, como produção de proteínas que melhora a sobrevivência, uma alternativa pode ser o investimento na produção de prole devido a possibilidade de se dispersarem e aumentar a probabilidade de sobrevivência da espécie (Fobes, 2000; Parsons, 2000).

Apesar da *A. gemmatilis* apresentar suscetibilidade as toxinas de *B. thuringiensis* (Fernandes et al., 2018) os resultados do estudo afirmam a possibilidade do inseto utilizar métodos de escape do efeito inseticida da bactéria. Em condições de campo ainda não houve relatos dessa evolução tanto com a utilização de plantas transgênicas (Tabashnik, 1994; Caprio et al., 2000) quanto a bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* (Embrapa, 2019). Contudo, o panorama agrícola atual comprova que o uso inadequado dos métodos de controle como o uso de subdoses contribui expressivamente para o aumento da frequência de insetos sobreviventes em campo, justificando o aumento populacional do inseto-praga.

Países que se localizam em regiões tropicais e subtropicais geralmente apresentam uma agricultura intensa, devido as condições ambientais favoráveis com produção de alimento todo o ano, o resultado da abundância de alimentos é a constância das pragas em campo. Em estudos realizados com *A. gemmatalis*, Botelho et al. (1999) observou a possibilidade de nove gerações por ano, o que pode contribuir para agilizar o processo de adaptação a tecnologia. Essas tecnologias tanto plantas transgênicas quanto bioinseticidas são provenientes de regiões com clima temperado, fato errôneo pois há necessidade de desenvolver tecnologias adaptadas a regiões tropicais e subtropicais que ocorre de forma contínuo os processos de produção de alimento, diferindo das condições bióticas e abióticas de regiões temperadas.

5. CONCLUSÃO

Houve uma redução na suscetibilidade na maioria dos tratamentos ao longo das gerações.

6. REFERÊNCIAS

- Alix A, Cortesero AM, Nénon JP, Anger JP (2001) Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. **Environmental Toxicology and Chemistry** 20:2530-2536. DOI: 10.1897/1551-5028(2001)020<2530:saocrb>2.0.co;2
- Amaral FSA, Guidolin AS, Salmeron E, Kanno RH, Padovez FEO, Fatoletto JF, Omoto C (2019) Geographical distribution of Vip3Aa20 resistance allele frequencies in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Pest Management Science** 76:169-178. DOI: 10.1002/ps.5490
- Arias O, Cordeiro E, Corrêa AS, Domingues FA, Guidolin AS, Omoto C (2019) Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. **Pest Management Science** 75:2948-2957. DOI: 10.1002/ps.5407
- Barah A, Sengupta AK (1991) Correlation and regression studies between pupal weight and fecundity of muga silkworm *Antheraea assama* Westwood (Lepidoptera: Saturniidae) on four different foodplants. **Acta Physiologica Hungarica** 78:261-264.
- Bauce É, Bidon Y, Berthiaume R (2002) Effects of food nutritive quality and *Bacillus thuringiensis* on feeding behaviour, food utilization and larval growth of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) when exposed as fourth and sixth-instar larvae. **Agricultural Forest Entomology** 4:1-14. DOI: 10.1046/j.1461-9563.2002.00123.x
- Bauce É, Carisey N, Dupont A (2006) Carry over effects of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* ssp. Kurstaki on *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny under various stressful environmental Conditions. **Agricultural Forest Entomology** 8:63-76. DOI: 10.1111/j.1461-9555.2006.00283.x
- Bentivenha JPF, Rodrigues JG, Lima MF, Marçon P, Popham HJR, Omoto C (2018) Baseline Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to SfMNPV and Evaluation of Cross-Resistance to Major Insecticides and Bt Proteins. **Journal Economic Entomology** 112:91-98. DOI: 10.1093/jee/toy342
- Boregas KGB, Mendes SM, Waquil JM, Fernandes GAW (2013) Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia** 72:61-70. DOI: 10.1590/S0006-87052013000100009
- Botelho PSM, Silveira-Neto S, Magrini EA (1999) Fator chave para *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de soja, para o estado de São Paulo. **Scientia Agrícola** 56:1-9. DOI: 10.1590/S0103-90161999000400014

Brand RJ, Pinnock DE, Jackson KJ, Milstead JE (1976) Viable Spore Count as an Index of Effective Dose of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 27:141-148. DOI: 10.1016/0022-2011(76)90139-7

Brandt SL, Coudron TA, Habibi J, Brown GR, Ilagan OM, Wagner RM, Wright MK, Backus E, Huesing JE (2004) Interaction of two *Bacillus thuringiensis* d-endotoxins with the digestive system of *Lygus hesperus*. **Current Microbiology** 48:1-9. DOI: 10.1007/s00284-003-4056-y

Broadway RM, Duffey SS (1986) Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal Insect Physiology** 32:827-833. DOI: 10.1016/0022-1910(86)90097-1

Calow P, Sibly RM (1990) A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. **Journal Functional Ecology** 4:283-288. DOI: 10.2307/2389587

Caprio MA, Summeford DV, Sims SR (2000) Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In.: Lacey LA, Kaya HK (Eds.) **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic p. 805-828.

Carvalho AB, Sampaio MC, Varandas FR, Klaczko LB (1998) An Experimental Demonstration of Fisher's Principle: Evolution of Sex Ratio by Natural Selection. **Genetics** 148:719-731.

Castro BMC, Martinez LC, Barbosa SG, Serrão JE, Wilcken CF, Soares MA, Silva AA, Carvalho AG, Zanuncio JC (2019) Toxicity and cytopathology mediated by *Bacillus thuringiensis* in the midgut of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Scientific Reports** 9:6667. DOI: 10.1038/s41598-019-43074-0

Costa SD, Barbercheck ME, Kennedy GG (2000) Sublethal acute and chronic exposure of colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology** 93:680-689. DOI: 10.1603/0022-0493-93.3.680

Crickmore N (2016) *Bacillus thuringiensis* resistance in Plutella - too many trees? **Current Opinion in Insect Science** 15:84-88. DOI: 10.1016/j.cois.2016.04.007

De Bortoli SA, Polanczyk RA, Vacari AM, De Bortoli CP, Duarte RT (2013) *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): Tactics for integrated pest management in Brassicaceae. In.: Soloneski S, Larramendy M (Eds.) **Weed and pest control – conventional and new challenges**. Croatia: InTech p. 31-52.

Delpuech JM, Meyet J (2003) Reduction in the sex ratio of the progeny of a parasitoid wasp (*Trichogramma brassicae*) surviving the insecticide chlorpyrifos. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 45:203-208. DOI: 10.1007/s00244-002-0146-2

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81-106. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440

Eizaguirre M, Tort S, Lopez C, Albajes R (2005) Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. **Journal Economic Entomology** 98:464-470. DOI: 10.1093/jee/98.2.464

Embrapa (2004) **South Region Soybean Research Meeting**. Passo Fundo: Embrapa Wheat. Disponível em: <<http://www.cnpt.embrapa.br/publicacoes/sist-prod/soja04/tab8-2.htm> [accessed 3 november 2019].

Escriche B, Tabashnik B, Finson N, Ferre J (1995) Immunohistochemical Detection of Binding of CryIA Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis* in Highly Resistant Strains of *Plutella xylostella* (L.) from Hawaii. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 212:388-395. DOI: 10.1006/bbrc.1995.1982

Fast GP, Régnière J (1984) Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist** 116:123-130. DOI: 10.4039/Ent116123-2

Fathipour Y, Sedaratian A, Bagheri A, Talaei-Hassanlouei R (2019) Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology** 1-9. DOI: 10.1111/phen.12288

Feng WB, Bong LJ, Dai SM, Neoh KB (2019) Effect of imidacloprid exposure on life history traits in the agricultural generalist predator *Paederus* beetle: Lack of fitness cost but strong hermetic effect and skewed sex ratio. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 174:390-400 (2019). DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.003

Fernandes FO, Abreu JA, Christ L, Rodrigues-Filho JA, Martins A, Afonso da Rosa APS (2017) **Development of *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1791) in laboratory maize cultivars**. Pelotas: Embrapa Temperate Weather 264:1-35.

Fernandes FO, Abreu JA, Christ LM, Rosa APSA (2018) Insecticides Management Used in Soybean for the Control of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidæ). **Journal of Agricultural Science** 10:223-230. DOI: 10.5539/jas.v10n11p223

Fisher RA (1930) **The Genetical Theory of Natural Selection**. Oxford: Clarendon Press p. 1-3.

Fobes VE (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology** 14:12-24. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2000.00392.x

Gong YJ, Wang CL, Yang YH, Wu SW, Wu YD (2010) Characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in *Plutella xylostella* from China. **Journal of Invertebrate Pathology** 104:90-96. DOI: 10.1016/j.jip.2010.02.003

Gould F, Anderson A (1991) Effects of *Bacillus thuringiensis* and HD-73 delta-endotoxin on growth, behavior, and fitness of susceptible and toxin-adapted strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology** 20:30-38. DOI: 10.1093/ee/20.1.30

Graphpad Prism 6 (2012) GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal Economic Entomology** 69:487-497. DOI: 10.1093/jee/69.4.487

Guedes RNC, Cutler GC (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70:690-697. DOI: 10.1002/ps.3669

Guo Z, Kang S, Zhu X, Xia J, Wu Q, Wang Q, Xie W, Zhang Y (2015) Down-regulation of a novel ABC transporter gene (Pxwhite) is associated with Cry1Ac resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 59:30-40. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.009

Guo Z, Sun D, Kang S, Zhou Z, Gong L, Qin J, Guo L, Zhu L, Bai Y, Luo L, Zhang Y (2019) CRISPR/Cas9-mediated knockout of both the PxABCC2 and PxABCC3 genes confers high-level resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 107:31-38. DOI: 10.1016/j.ibmb.2019.01.009

Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. **Viruses** 7:2230-2267. DOI: 10.3390/v7052230.

Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar, Deshpande VV (1999) Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. **Plant Physiology** 121:497-506. DOI: 10.1104/pp.121.2.497

Horikoshi RJ, Bernardi O, Amaral FSA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistant to Bt maize. **Journal of Invertebrate Pathology** 161:1-6. DOI: 10.1016/j.jip.2018.12.008

Kalvnadi E, Mirmoayedi A, Alizadeh M, Pourian H (2018) Sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* increase fitness costs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) offspring. **Journal of Invertebrate Pathology** 158:32-42. DOI: 10.1016/j.jip.2018.08.012

Krespi L, Rabasse JM, Dedryver CA, Nenon JP (1991) Effect of three insecticides on the life cycle of *Aphidius uzbekistanicus* Luz. (Hym., Aphidiidae). **Journal of Applied Entomology** 111:113-19 (1991). DOI: 10.1111/j.1439-0418.1991.tb00302.x

Lawrence RK, Mattson WJ, Haack RA (1997) White spruce and the spruce budworm: Defining the phenological window of susceptibility. **Canadian Entomologist** 129:291-318. DOI: 10.4039/Ent129291-2

Loeb MJ, Martin PAW, Hakim RS, Takeda M (2001) Regeneration of cultured midgut cells after exposure to sublethal doses of toxin from two strains of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Insect Physiology** 47:599-606. DOI: 10.1016/s0022-1910(00)00150-5

Martinez-Ramirez AC, Gould F, Ferre J (1999) Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science and Technology** 9:239-246. DOI: 10.1080/09583159929811

Morais MR, Zanardi OZ, Rugno GR, Yamamoto PT (2016) Impact of five insecticides used to control citrus pests on the parasitoid *Ageniaspis citricola* Longvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae). **Ecotoxicology** 25:1011-1020. DOI: 10.1007/s10646-016-1658-2

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: Hoffmann-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F. (Eds.) **Manejo Integrado e Insetos e outros Artrópodes Praga**. Brasília: Embrapa, p. 213-334.

Mushtaq R, Behle R, Liu R, Niu L, Song P, Shakoori AR, Jurat-Fuentes JL (2017) Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ie2, Cry2Ac7, Vip3Aa11 and Cry7Ab3 proteins against *Anticarsia gemmatilis*, *Chrysodeixis includes* and *Ceratoma trifurcate*. **Journal of Invertebrate Pathology** 150:70-72. DOI: 10.1016/j.jip.2017.09.009

Negreiro MCC, Andrade FG, Falleiros AMF (2004) Sistema imunológico de defesa em insetos: uma abordagem em lagartas da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), resistentes ao AgMNPV. **Semina: Ciências Agrárias** 25:293-308. DOI: 10.5433/1679-0359.2004v25n4p299

Parsons PA (2000) Hormesis: an adaptive fitness response and an evolutionary expectation in stressed free-living populations, with particular reference to ionizing radiation. **Functional Ecology** 20:103-112. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2000.00392.x

Pedersen A, Dedes J, Gauthier D, Van-Frankenhuyzen K (1997) Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 83:253-262. DOI: 10.1046/j.1570-7458.1997.00180.x

Pencoe NL, Martin PB (1982) Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larval development and adult fecundity on five grass hosts. **Environmental Entomology** 11:720-724. DOI: 10.1093/ee/11.3.720

Polanczyk RA, Van-Frankenuyzen KV, Pauli G (2017) The American *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N. (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus***. New York: Springer International Publishing p. 173-184. DOI: 10.1007/978-3-319-56678-8

Retnakaran A, Lauzon H, Fast P (1983) *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* **Entomologia Experimentalis et Applicata** 34:233-239. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1983.tb03327.x

Sas University (2014) **SAS® 9.4 Statements**. Third Edition SAS Instit. Inc., USA.

Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM (2014) Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. **Microbiology** 2014:1-12. DOI: 10.1155/2014/135675

Sedaratian A, Fathipour Y, Talaei-Hassanloui R, Jurat-Fuentes JL (2012) Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology** 137:540-549. DOI: 10.1111/jen.12030

Sibly RM, Calow P (1986) **Physiological ecology of animals: An evolutionary approach**. Blackwell: Scientific Publications 190p.

Sosa-Gómez D, Moscardi F (2001) Resistencia de lepidópteros a los nucleopoliedrovirus: el caso de *Anticarsia gemmatilis*-AgMNPV. In.: Caballero P, López-Ferber M, Williams T (Eds.) **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas**. Espanha: Universidad Pública de Navarra p.451-478.

Sosa-Gómez DR, Miranda JE (2012) Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Entomologia** 56:359-362. DOI: 10.1590/S0085-56262012005000050

Spies AG, Spence KD (1985) Effect of sublethal *Bacillus thuringiensis* crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth *Manduca* scanning electron microscopic study. **Tissue Cell** 17:379-394. DOI: 10.1016/0040-8166(85)90056-4

Tabashnik B (1994) Evolution to resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology** 39:47-79. DOI: 10.1146/annurev.en.39.010194.000403

Tabashnik BE, Mota-Sanchez D, Whalon ME, Hollingworth RM, Carrière Y (2014) Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal Economic Entomology** 107:496-507. DOI: 10.1603/ec13458

Tabashnik BE, Brevault T, Carriere Y (2013) Insect resistance to Bt crops: Lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology** 3:510-521. DOI: 10.1038/nbt.2597

Van-Frankenhuyzen K, Nystrom CW (1987) Effect of temperature on mortality and recovery of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) exposed to *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Canadian Entomologist** 119:951-954. DOI: 10.4039/Ent119941-10

Van-Rie J, Ferré J (2000) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In.: Charles JF, Delecluse A, Leroux N (Eds.) **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications p. 219-237.

Wang X, Lou L, Su J (2019) Prevalence and stability of insecticide resistances in field population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Huizhou, Guangdong Province, China. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 22:728-732. DOI: 10.1016/j.aspen.2019.05.009

Waquil MS, Pereira EJG, Carvalho SSS, Pitta RM, Waquil JM, Mendes SM (2016) Índice de adaptação e tempo letal da lagarta - do - cartucho em milho Bt. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51:563-570. DOI: 10.1590/S0100-204X2016000500017

Yang F, Williams J, Porter P, Huang F, Kernsa DL (2019) F2 screen for resistance to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa51 protein in field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) from Texas, USA. **Crop Protection** 126:104915. DOI: 10.1016/j.cropro.2019.104915

Zago HB, Siqueira HAA, Pereira EJG, Picanco MC, Barros R (2014) Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. **Pest Management Science** 70:488-495. DOI: 10.1002/ps.3600

Zhu YC, Blanco CA, Portilla M, Adamczyk J, Luttrell R, Huang F (2015) Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 122:15-21. DOI: 10.1016/j.pest

CAPÍTULO 3 - CONDICIONAMENTO BIOLÓGICO DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 EXPOSTA A SUBDOSES DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911

RESUMO - *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) é um dos principais insetos-praga desfolhadores na cultura da soja. Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 são uma estratégia interessante visando ao controle dessa praga, no entanto, problemas como temperatura, radiação solar, chuva e a falta de informações sobre tecnologia de aplicação de produtos microbianos são importantes entraves a sua utilização, por limitarem a eficiência no controle do inseto-alvo. Tais fatores podem atuar de forma conjunta ou individual de forma que o alvo biológico receba uma dose inferior a recomendada em campo; isso pode resultar em efeitos subletais do bioinseticida. O objetivo desse trabalho foi avaliar o condicionamento biológico de *A. gemmatalis* submetido a subdoses do bioinseticida Dipel SC. A partir da estimativa da curva resposta de *A. gemmatalis* ao Dipel SC pela análise de Probit as concentrações letais CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅ foram escolhidas. Para cada concentração subletal 10 lagartas de 2º instar de *A. gemmatalis* foram distribuídas em 10 repetições em recipientes com dieta artificial, totalizando 100 lagartas por concentração avaliado durante três gerações. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado para as variáveis duração do ciclo biológico e viabilidade das fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa, adultos e pré-oviposição. Para a confecção da tabela de vida foi utilizado o programa Two sex. Os tratamentos não influenciaram o período de incubação dos ovos, pré-pupa e pupa. No entanto, nas fases larval CL₂₅ e adulta CL₁₀ foram os mais afetados. Alterações na razão sexual foram observados nos tratamentos CL₂₀ e CL₅. Nos parâmetros da tabela de vida, uma associação com o aumento da concentração do bioinseticida houve uma redução nos parâmetros duração média de uma geração, taxa líquida de reprodução, taxa reprodutiva bruta, taxa intrínseca de aumento, taxa finita de aumento. A biologia de *A. gemmatalis* foi afetada por subdoses do Dipel SC, interferindo nos parâmetros de fecundidade, razão sexual, taxa líquida de reprodução e taxa bruta de reprodução.

Palavras-chave: Progenie, condicionamento biológico, desfolhadora, subdoses, lagarta da soja, bioinseticida.

CHAPTER 3 - BIOLOGICAL CONDITIONING OF *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 EXPOSED TO UNDERDOSES OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911

ABSTRACT - *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) is one of the main defoliating insect pests in soybean crops. Bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 are an interesting strategy aimed at controlling this pest, however, problems such as temperature, solar radiation, rain and the lack of information on application technology for microbial products are important barriers to its use, for limit efficiency in controlling the target insect. Such factors can act jointly or individually so that the biological target receives a dose lower than that recommended in the field; this may result in sublethal effects of the bioinsecticide. The objective of this work was to evaluate the biological conditioning of *A. gemmatalis* submitted to underdoses of the bioinsecticide Dipel SC. From the estimate of the response curve of *A. gemmatalis* to Dipel SC by Probit analysis, sublethal concentrations LC₅, LC₁₀, LC₁₅, LC₂₀, LC₂₅ were chosen. For each sublethal concentration, 10 2nd instar caterpillars of *A. gemmatalis* were distributed in 10 repetitions in containers with artificial diet, totaling 100 caterpillars per concentration evaluated over three generations. The design used was completely randomized for the variables duration of the biological cycle and viability of the egg, caterpillar, pre-pupa, pupa, adults and pre-oviposition phases. The Two sex program was used to make the life table. The treatments did not influence the incubation period of the eggs, pre-pupa and pupa. However, in the larval LC₂₅ and adult LC₁₀ phases, they were the most affected. Changes in sex ratio were observed in treatments LC₂₀ and LC₅. In the parameters of the life table, an association with the increase in the concentration of the bioinsecticide there was a reduction in the parameters average duration of a generation, net reproductive rate, crude reproductive rate, intrinsic rate of increase, finite rate of increase. The biology of *A. gemmatalis* was affected by underdoses of Dipel SC, interfering in the parameters of fertility, sex ratio, net reproduction rate and gross reproduction rate.

Keywords: Progeny, biological conditioning, defoliator, underdoses, soybean caterpillar, bioinsecticide.

1. INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Erebidae) conhecida como lagarta da soja é um dos principais insetos-praga desfolhadores na cultura da soja (Haase et al., 2015). No Brasil, a severa desfolha causada pelas lagartas a cultura foi reduzida na década de 1970 com a utilização de inseticidas organoclorados e organofosforados. Com o surgimento do MIP soja o uso de inseticidas foi reduzido e atualmente o controle dessa praga é feito com inseticidas menos agressivos ao meio ambiente e com a soja Bt que expressa a toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 (Bernardi et al., 2012; Moscardi et al., 2012).

A tendência de reduzir a dependência de inseticidas químicos na agricultura aliado aos crescentes relatos de resistência de insetos-praga a plantas transgênicas renovou o interesse mundial em bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* (Lacey, 2017; Konecka et al., 2018; Amaral et al., 2019; Horikoshi et al., 2019).

No entanto, fatores bióticos e abióticos são importantes limitantes para a eficiência dos bioinseticidas à base de *B. thuringiensis* por limitarem a eficiência no controle do inseto-alvo (Sedaratian et al., 2013). Estudos comprovaram a redução do efeito inseticida da bactéria em campo de forma gradual pelos fatores como chuva, radiação solar e temperatura considerados os principais agentes (Pinnock et al., 1971; Becker et al., 1992; Manasherob et al., 2002; Hadapad et al., 2009).

No momento da aplicação da calda em campo, outros problemas também podem contribuir para a colocação incorreta do produto biológico no alvo como incompatibilidade com outros produtos, qualidade da água utilizada na calda, calibragem dos equipamentos de aplicação, deriva do produto biológico e treinamento inadequado do aplicador (Andef, 2010; Matthews et al., 2015; Adapar, 2019).

Portanto, esses fatores podem atuar de forma conjunta ou individual para que o alvo biológico receba uma dose abaixo da recomendada. Isto precisa ser considerado melhor compreensão da eficácia e do impacto ecológico gerados por bioinseticidas a base de *B. thuringiensis* em campo (Frye et al., 1973; Sedaratian et al., 2013). O inseto-praga sobrevivente a subdose apresenta

efeitos no condicionamento biológico, o que causa uma diversidade de respostas. O fenômeno é conhecido como hormese e ocorre nos sobreviventes e seus descendentes e, pode levar a consequências positivas ou negativas ao inseto-praga (Van-Rie e Fereé, 2000; Guedes e Culter, 2013).

Os efeitos de subdoses de *B. thuringiensis* na biologia de insetos-praga é pouco conhecido, e os resultados podem ser altamente variáveis devido a variabilidade biológica e às diferenças nos padrões de alimentação. O objetivo desse trabalho foi avaliar o condicionamento biológico de *A. gemmatalis* submetido a subdoses do bioinseticida Dipel SC por meio dos parâmetros de tabela de vida para detectar e quantificar efeitos no desenvolvimento e fecundidade do inseto-praga.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Criação dos insetos

A população de *A. gemmatalis* foi obtido no Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ - Piracicaba) e a criação de insetos foi estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP - Jaboticabal), mantidos em dieta artificial (Greene et al., 1976).

Para o estabelecimento da criação foram separados 2000 ovos de *A. gemmatalis*, acondicionados em placas de Petri de (9 cm Ø), com papel filtro umedecido com água destilada na parte inferior e na parte superior filme plástico (PVC) perfurado com um alfinete. A criação dos insetos foi mantida em sala climatizada sobre as condições de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

2.2. Concentrações letais (CL)

As suspensões do bioinseticida à base de *B. thuringiensis* (Dipel SC) foram realizadas a partir da quantificação do número de esporos, por meio de contagem direta ao microscópio com auxílio de câmara de Neubauer (Brand et al., 1976). Para estimar a curva resposta pela análise de Probit seis

concentrações foram definidas, micropipetando 200 µL na superfície da dieta artificial (4,8 cm³) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø). Para cada concentração subletal 10 lagartas de 2º instar de *A. gemmatalis* foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por concentração.

No lote correspondente ao controle foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados. A partir da estimativa da curva resposta pela análise de Probit as concentrações subletais CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ (2,7x10⁴; 3,8x10⁴; 5,1x10⁴; 6,5x10⁴; 1,7x10⁵) foram escolhidas para serem utilizadas como tratamentos no bioensaio (Sedaratian et al., 2013).

Para a montagem do bioensaio uma alíquota de 200 µL dos tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ foi aplicada na superfície da dieta artificial (4,8 cm³) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø). Cada vez que o ciclo biológico da espécie chegava ao fim as lagartas sobreviventes que eclodiam dos ovos de cada tratamento eram realimentados com dieta artificial contendo suas respectivas concentrações subletais (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅), esse procedimento foi executado durante três ciclos biológicos (F₁, F₂ e F₃) da espécie praga. Para cada geração de *A. gemmatalis* (F₁, F₂ e F₃) 10 lagartas de 2º instar foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por tratamento. No lote correspondente ao controle foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

2.3. Estudo dos efeitos subletais

Nas gerações F₁, F₂ e F₃ os tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅ e controle foram avaliados diariamente até as lagartas atingirem a fase de pupa. As pupas com até 24 horas foram sexadas (Butt e Cantu, 1962).

Os adultos recém emergidos foram separados em casais e acondicionados em gaiolas de PVC com 10 cm de diâmetro por 20 cm de altura, forradas com papel sulfite A4 branco (utilizado como substrato de oviposição) no seu interior. Na parte inferior foi utilizada uma placa de Petri com papel filtro e a parte superior vedada com tecido *voile*.

Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% umedecido em algodão hidrófilo colocado em placa de Petri de polietileno (49 x 12 mm) no fundo das gaiolas. Os papéis utilizados como substrato de postura foram retirados

diariamente e os ovos contabilizados com auxílio de um microscópio estereoscópico (Leica - S8 APO).

2.4. Delineamento experimental

Os dados de mortalidade dos testes de virulência foram submetidos a análise de regressão de Probit e obtidos os valores das concentrações letais CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e CL₂₅ utilizando o software SAS (P > 95%) (Sas University, 2014). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) para as variáveis duração do ciclo biológico e viabilidade das fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa, adulto e pré-oviposição.

Os seguintes parâmetros foram registrados em cada tratamento (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀, CL₂₅ e controle) e geração (F₁, F₂ e F₃): período de pré-oviposição do adulto (APOP = o período entre a emergência da fêmea adulta até a primeira postura), período total de pré-oviposição (TPOP = intervalo de tempo entre o nascimento e o início da postura), período de oviposição e fecundidade diária (Colinet et al., 2015).

Utilizou-se o programa de tabela de vida de fertilidade Two-Sex (Chi e Liu, 1985) para analisar os parâmetros biológicos ovo, larva, pupa, período de pré-oviposição de adultos, período total de pré-oviposição e fecundidade (Chi, 1988; 2019). No estágio etário, os valores de tabela de vida de fertilidade Two-Sex, o l_x , m_x e Ro são calculados como:

$$l_x = \sum_{j=1}^k S_{xj} \quad (1)$$

$$m_x = \sum_{j=1}^k S_{xj} f_{xj} / \sum_{j=1}^k S_{xj} \quad (2)$$

$$Ro = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x \quad (3)$$

Onde k é um número de estágios, s_{xj} é a taxa de sobrevivência da lagarta da soja onde x = idade em dias e j = estágio, f_{xj} é a fecundidade específica do estágio, l_x é taxa de sobrevivência específica do estágio, m_x é fecundidade específica do estágio, e_{xj} expectativa de vida, v_{xj} valor reprodutivo no estágio

estário, R_0 é a taxa líquida reprodutiva, k taxa finita de aumento e T é a geração média.

Neste estudo, o método de bissecção iterativa da fórmula de Euler-Lotka foi usado para estimar r (r é a taxa intrínseca de aumento) está usando o com a idade indexada a 0 (Goodman, 1982), como mostrado na Equação (2).

O e_{xj} é definido como o período de duração ou tempo que um indivíduo ou inseto de x e j é previsível à viver (Chi e Su, 2006) como:

$$e_{xj} = \sum_{i=x}^{\infty} \sum_{y=j}^k S'_{iy} \quad (4)$$

Onde S'_{iy} é definida como a probabilidade de os indivíduos e os indivíduos sobreviverem até a idade y e o estágio i , e é encontrada assumindo $s'_{iy} = 1$. O v_{xj} foi estimado seguindo a metodologia de Abbas et al. (2014) e foi calculado como:

$$v_{xj} = \frac{e^{-r(x+1)}}{S_{xj}} \sum_{i=x}^{\infty} e^{-r(x+1)} \sum_{y=j}^k S'_{iy} f_{iy} \quad (5)$$

Finalmente, os erros-padrão as médias de diferentes parâmetros foram comparados tecnicamente com LSD e bootstrap (Efron e Tibshirani, 1994).

3. RESULTADOS

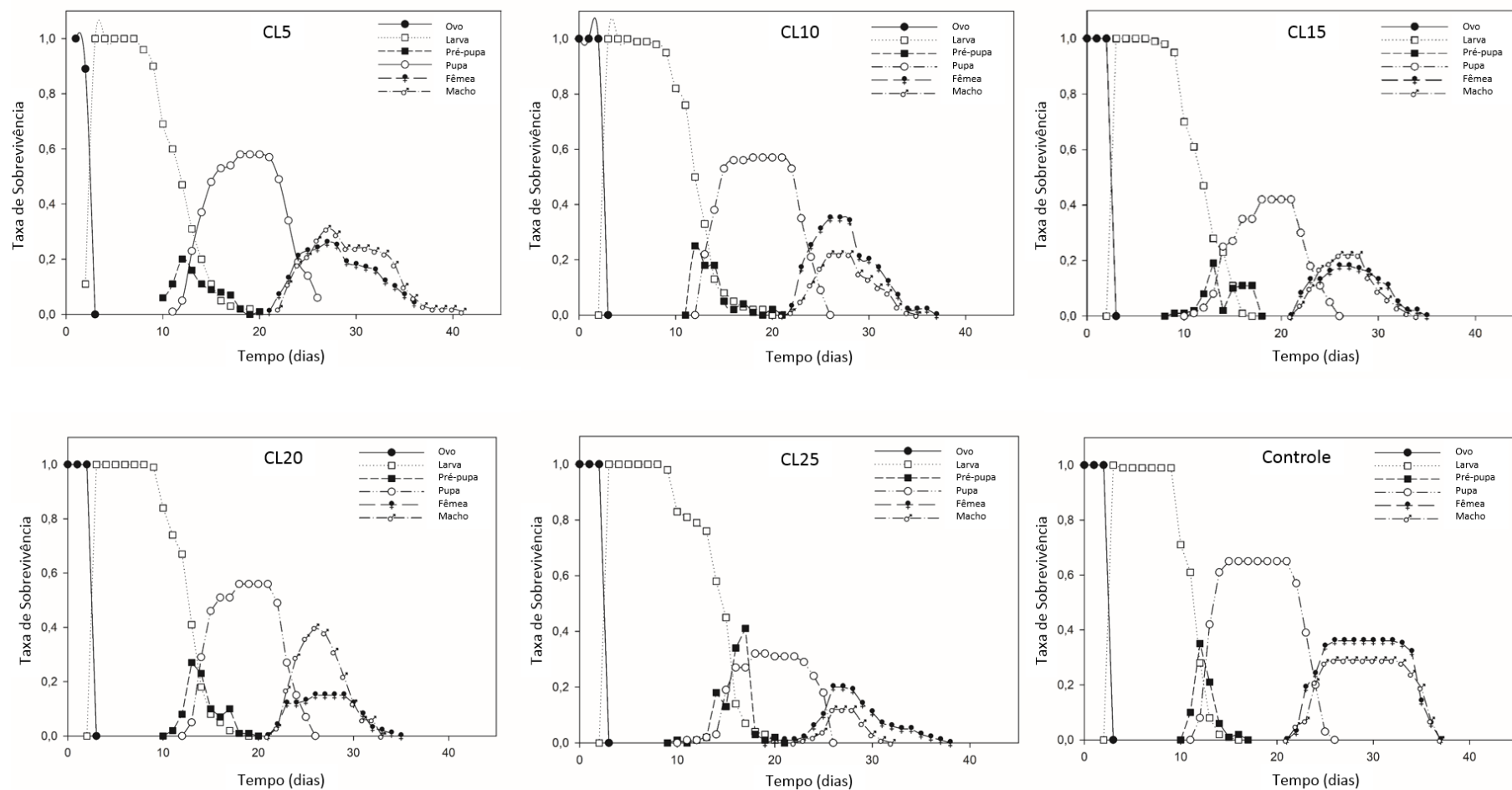
Anticarsia gemmatalis submetida aos tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e a testemunha completou o desenvolvimento biológico nas três gerações avaliadas com diferentes respostas no condicionamento biológico da espécie. As lagartas submetidas ao tratamento CL₂₅ não atingiram a terceira geração.

As curvas de sobrevivência mostram a proporção de *A. gemmatalis* em cada estágio de desenvolvimento em relação ao número inicial de ovos. As sobreposições observadas entre proporções dos estágios são devidas à diferenças na velocidade de desenvolvimento entre indivíduos. As proporções atingiram seus valores máximos, com posterior redução em função de muda para a próxima fase ou mortalidade, ou por causa de sua morte na fase adulta (Figura 1).

A maior variação foi observada na proporção de indivíduos em cada estágio do desenvolvimento no tratamento CL₂₅ na primeira geração. Na segunda geração para os tratamentos CL₅ e CL₁₅ os indivíduos machos adultos

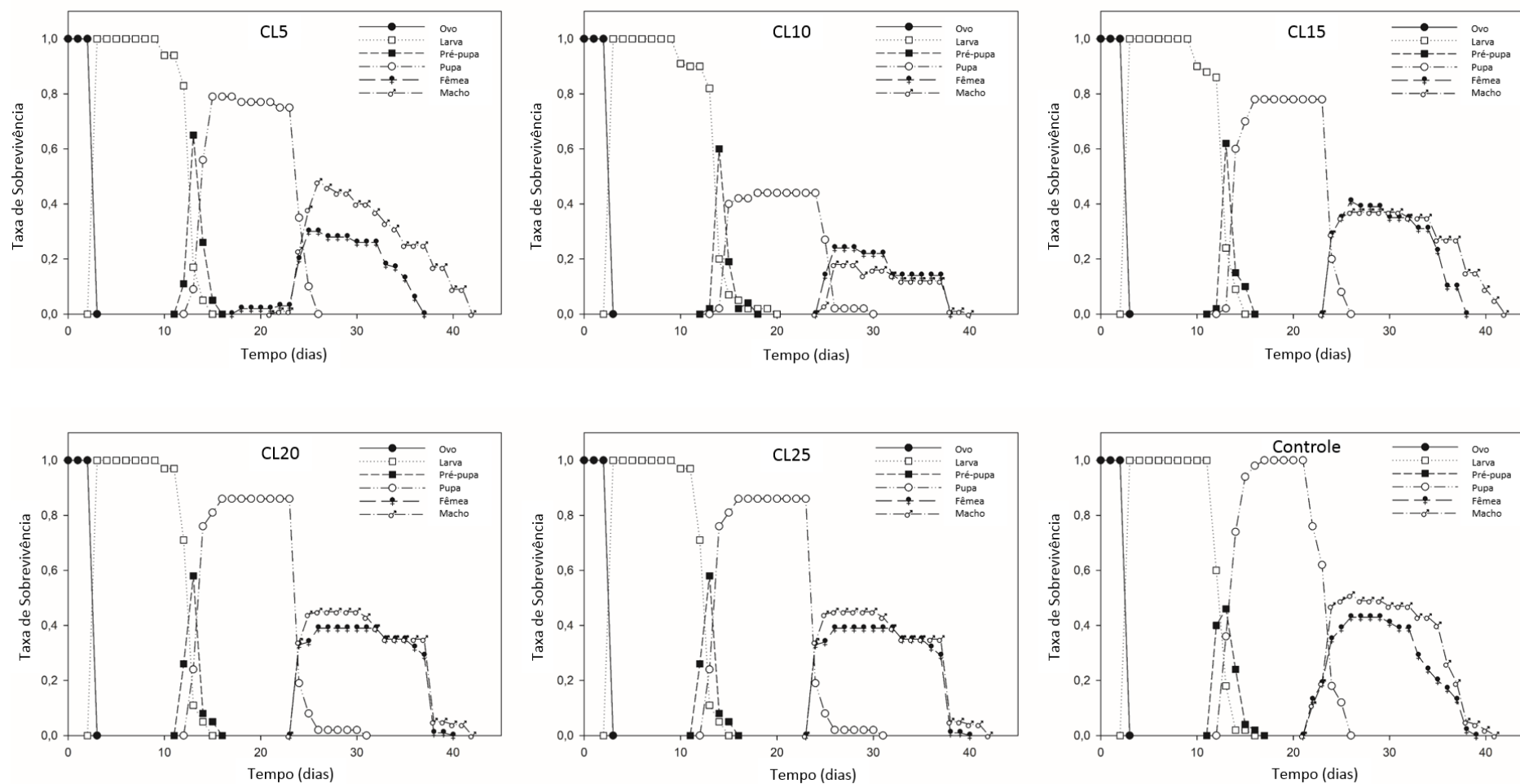
apresentaram um maior tempo de sobrevivência do que as fêmeas. E na última geração os resultados evidenciam um aumento na sobrevivência da espécie praga em nos tratamentos CL₁₅ e CL₂₀ (Figura 1).

1º Geração



Continua...

2ª Geração



Continua...

3ª Geração

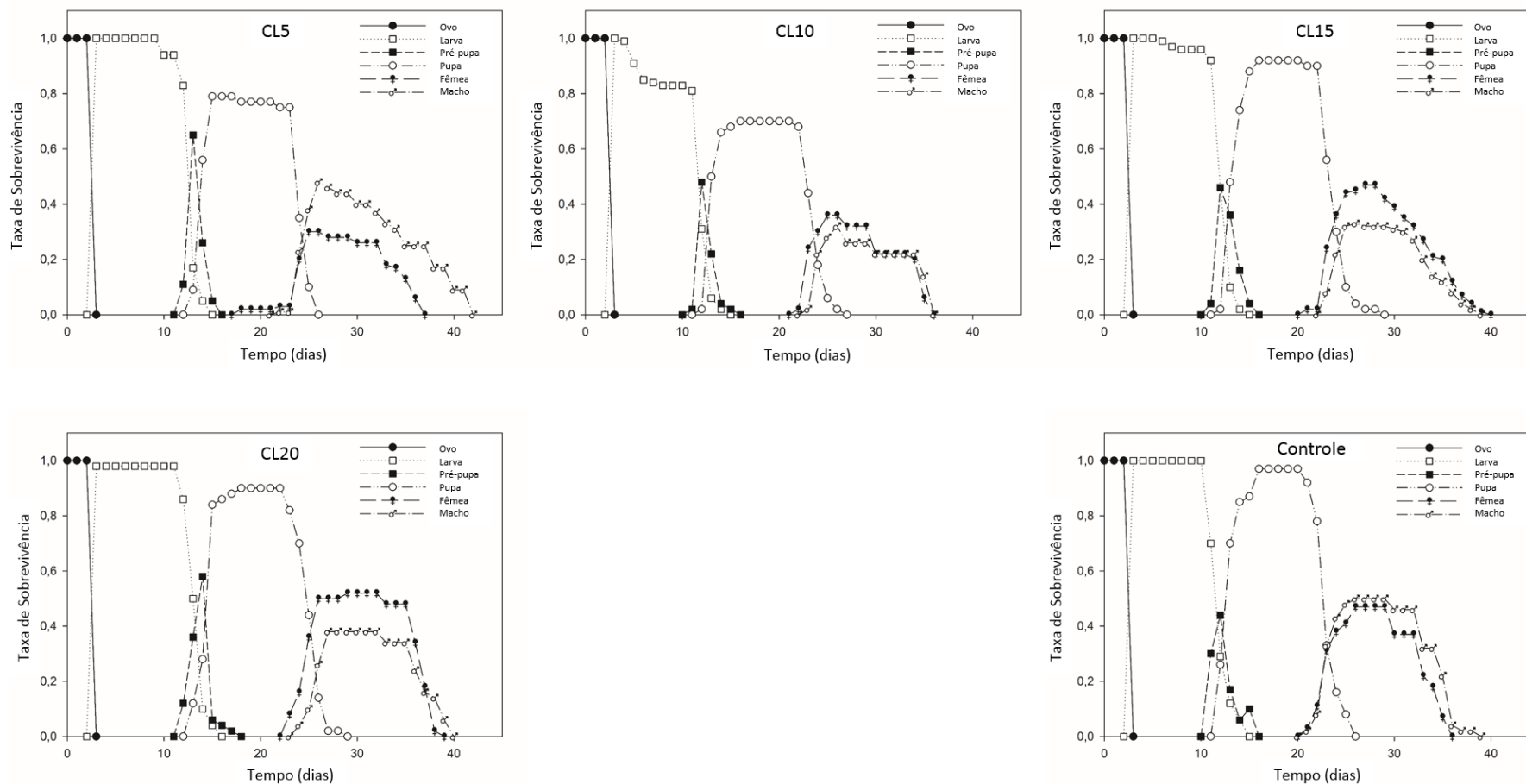


Figura 1. Curva de sobrevivência de *Anticarsia gemmatilis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h. Os dados para cada parâmetro foram calculados usando o procedimento de autoinicialização com 100.000 amostras.

Os tratamentos não influenciaram o período de incubação dos ovos de *A. gemmatilis*, aproximadamente 3,00 dias. Na fase larval a testemunha apresentou o menor tempo de desenvolvimento com média de 9,46 dias nas três gerações avaliadas. A duração das fases de pré-pupa e pupa não foi afetada pelos tratamentos. Na fase adulta os tratamentos CL₂₅ na primeira geração e CL₁₀ na segunda e terceira geração atingiram os menores valores (Tabela 1).

Tabela 1. Duração (dias) das fases de desenvolvimento de *Anticarsia gemmatilis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

1º Geração					
Tratamentos	Ovo	Larva	Pré-pupa	Pupa	Adulto
CL ₅	2,89 $\pm$ 0,03 aA ¹	10,44 $\pm$ 0,23 abB	1,3 $\pm$ 0,07 aA	9,86 $\pm$ 0,13 aA	9,36 $\pm$ 0,42 aB
CL ₁₀	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,50 $\pm$ 0,21 abB	1,02 $\pm$ 0,02 aA	10,02 $\pm$ 0,15 aA	7,25 $\pm$ 0,25 aC
CL ₁₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,75 $\pm$ 0,23 abB	1,17 $\pm$ 0,06 aA	8,71 $\pm$ 0,21 aA	7,34 $\pm$ 0,34 aC
CL ₂₀	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,87 $\pm$ 0,17 aB	1,16 $\pm$ 0,06 aA	9,00 $\pm$ 0,07 aA	6,55 $\pm$ 0,23 bC
CL ₂₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	12,48 $\pm$ 0,18 aA	1,16 $\pm$ 0,07 aA	9,62 $\pm$ 0,20 aA	5,88 $\pm$ 0,46 bD
Controle	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,41 $\pm$ 0,12 bC	1,05 $\pm$ 0,03 aA	10,54 $\pm$ 0,07 aA	12,71 $\pm$ 0,12 aA
2º Geração					
Tratamentos	Ovo	Larva	Pré-pupa	Pupa	Adulto
CL ₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,12 $\pm$ 0,07 abB	1,18 $\pm$ 0,04 aA	10,18 $\pm$ 0,15 aA	11,06 $\pm$ 0,46 aA
CL ₁₀	3,00 $\pm$ 0,00 aA	11,27 $\pm$ 0,08 aA	1,05 $\pm$ 0,03 aA	10,66 $\pm$ 0,09 aA	9,43 $\pm$ 0,53 bB
CL ₁₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,35 $\pm$ 0,07 abB	1,01 $\pm$ 0,01 aA	10,05 $\pm$ 0,04 aA	12,15 $\pm$ 0,37 aA
CL ₂₀	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,82 $\pm$ 0,08 bC	1,04 $\pm$ 0,00 aA	10,51 $\pm$ 0,11 aA	12,60 $\pm$ 0,29 aA
CL ₂₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,89 $\pm$ 0,08 bC	1,00 $\pm$ 0,00 aA	10,53 $\pm$ 0,11 aA	12,63 $\pm$ 0,29 aA
Controle	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,82 $\pm$ 0,08 bC	1,16 $\pm$ 0,04 aA	9,70 $\pm$ 0,07 aA	12,49 $\pm$ 0,31 aA
3º Geração					
Tratamentos	Ovo	Larva	Pré-pupa	Pupa	Adulto
CL ₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,32 $\pm$ 0,20 aB	1,09 $\pm$ 0,04 aA	10,55 $\pm$ 0,07 aA	10,91 $\pm$ 0,31 aA
CL ₁₀	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,44 $\pm$ 0,08 abC	1,00 $\pm$ 0,00 aA	10,63 $\pm$ 0,08 aA	8,91 $\pm$ 0,41 bB
CL ₁₅	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,57 $\pm$ 0,08 abC	1,13 $\pm$ 0,04 aA	10,38 $\pm$ 0,09 aA	9,83 $\pm$ 0,31 abB
CL ₂₀	3,00 $\pm$ 0,00 aA	10,53 $\pm$ 0,09 aB	1,22 $\pm$ 0,04 aA	10,69 $\pm$ 0,08 aA	11,62 $\pm$ 0,19 aA
CL ₂₅	-	-	-	-	-
Controle	3,00 $\pm$ 0,00 aA	9,17 $\pm$ 0,11 bC	1,08 $\pm$ 0,03 aA	10,10 $\pm$ 0,10 aA	12,68 $\pm$ 0,26 aA

Média (dias) $\pm$ Erro padrão. ¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos e maiúsculas entre gerações não diferem significativamente. (Teste de inicialização emparelhado: $P < 0,05$).

Os erros padrão foram estimados usando 100.000 bootstraps e comparados usando o teste de bootstrap emparelhado com base no IC de diferenças.

O período de pré-oviposição dos adultos (APOP) na primeira geração não foi afetado pelos tratamentos, diferente da 2º geração com o tratamento CL₁₀ e na 3º geração os tratamentos CL₅, CL₁₀ e o controle que atingiram as menores médias diferindo dos outros tratamentos. O período total de pré-oviposição (TPOP) foi diferente na terceira geração com o tratamento CL₁₀ (Tabela 2).

A maior longevidade de fêmeas e machos na primeira geração foi observada na testemunha na segunda e terceira geração. Os parâmetros

período de oviposição e fecundidade foram afetados pelos tratamentos CL₂₀ e CL₂₅ ao longo das gerações avaliadas (Tabela 2).

A razão sexual foi afetada somente nos tratamentos CL₂₀ na primeira geração e CL₅ na segunda geração, uma vez que a média nas gerações foram de 0,47 entre a primeira geração e segunda geração e de 0,54 na terceira geração, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Duração (dias) dos parâmetros de desenvolvimento, fecundidade (ovo/fêmea) e razão sexual (fêmea/fêmea+macho) de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a 25 ± 1 ° C, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

1ª Geração								
Tratamentos	APOP (dias)	TPOP (dias)	Longevidade de adultos fêmeas (dias)	Longevidade adultos macho (dias)	Longevidade total (dias)	Oviposição (dias)	Fecundidade (ovos/fêmea)	Razão sexual (fêmea/fêmea+macho)
CL ₅	3,04 ± 0,17 aA ¹	26,80 ± 0,34 aB	32,67 ± 0,64 bC	34,13 ± 0,64 bB	24,44 ± 1,12 abD	3,52 ± 0,30 aB	299,63 ± 38,62 bB	0,46 ± 0,04 aA
CL ₁₀	2,91 ± 0,15 aA	26,70 ± 0,25 aB	31,34 ± 0,41 bC	31,27 ± 0,43 cC	23,24 ± 0,97 bE	3,17 ± 0,21 aB	277,63 ± 28,68 bB	0,61 ± 0,04 aA
CL ₁₅	2,27 ± 0,19 aB	25,50 ± 0,44 aB	31,67 ± 0,44 bC	30,17 ± 0,46c dC	19,65 ± 0,97 dF	4,00 ± 0,22 aB	264,00 ± 15,54 bC	0,43 ± 0,04 aA
CL ₂₀	3,26 ± 0,11 aA	26,53 ± 0,37 aB	31,73 ± 0,37 bC	29,78 ± 0,28 dD	22,59 ± 0,91 bcE	3,73 ± 0,26 aB	232,67 ± 16,20 bC	0,26 ± 0,04 bB
CL ₂₅	2,20 ± 0,19 aB	27,15 ± 0,31 aA	31,65 ± 0,67 bC	29,92 ± 0,29 dD	20,61 ± 0,79 dE	2,80 ± 0,31 bC	139,95 ± 14,44 cD	0,62 ± 0,04 aA
Controle	2,63 ± 0,15 aB	26,41 ± 0,23 aB	35,42 ± 0,16 aB	35,96 ± 0,21 aB	26,86 ± 1,20 aD	4,58 ± 0,20 aA	472,86 ± 22,59 aA	0,55 ± 0,04 aA
2ª Geração								
Tratamentos	APOP (dias)	TPOP (dias)	Longevidade de adultos fêmeas (dias)	Longevidade adultos macho (dias)	Longevidade total (dias)	Oviposição (dias)	Fecundidade (F) (ovos/fêmea)	Razão sexual (fêmea/fêmea+macho)
CL ₅	2,86 ± 0,09 aB	26,73 ± 0,32 aB	34,20 ± 0,51 bB	36,21 ± 0,67 bA	30,68 ± 0,98 cC	4,76 ± 0,33 aA	414,80 ± 53,22 aA	0,38 ± 0,04 bB
CL ₁₀	1,91 ± 0,05 bC	27,33 ± 0,12 aA	35,25 ± 0,70 bB	35,20 ± 0,88 bB	23,62 ± 1,07 dE	5,08 ± 0,46 aA	235,00 ± 27,23 bB	0,54 ± 0,04 aA
CL ₁₅	2,97 ± 0,05 aA	27,44 ± 0,13 aA	34,98 ± 0,46 bB	38,22 ± 0,46 aA	31,18 ± 1,05b cB	4,78 ± 0,20 aA	150,66 ± 11,29 bD	0,52 ± 0,04 aA
CL ₂₀	3,29 ± 0,15 aA	27,90 ± 0,22 aA	37,00 ± 0,33 aA	37,11 ± 0,43 abA	33,70 ± 0,12 abB	3,68 ± 0,21 abB	104,46 ± 9,19 bD	0,47 ± 0,03 aA
CL ₂₅	3,70 ± 0,23 aA	28,31 ± 0,27 aA	37,00 ± 0,33 aA	37,11 ± 0,43 abA	30,70 ± 0,87 abC	1,28 ± 0,23 bC	50,93 ± 4,37 cE	0,48 ± 0,03 aA
Controle	2,97 ± 0,02 aA	26,60 ± 0,20 aB	34,80 ± 0,47 bB	35,47 ± 0,52 bB	35,17 ± 0,35 aA	5,60 ± 0,26 aA	454,87 ± 26,93 aA	0,45 ± 0,00 aA
3ª Geração								
Tratamentos	APOP (dias)	TPOP (dias)	Longevidade de adultos fêmeas (dias)	Longevidade adultos macho (dias)	Longevidade total (dias)	Oviposição (dias)	Fecundidade (F) (ovos/fêmea)	Razão sexual (fêmea/fêmea+macho)
CL ₅	2,00 ± 0,00 bB	27,12 ± 0,42 aA	36,15 ± 0,50 aA	35,48 ± 0,42 aB	28,75 ± 1,02 cC	5,81 ± 0,55 aA	352,39 ± 42,21 aB	0,50 ± 0,04 aA
CL ₁₀	2,22 ± 0,07 bB	25,68 ± 0,13 bB	32,83 ± 0,52 bC	32,94 ± 0,66 bC	25,74 ± 1,15 dD	4,77 ± 0,39 aA	253,67 ± 26,90 abB	0,51 ± 0,04 aA
CL ₁₅	3,45 ± 0,10 aA	27,21 ± 0,20 aA	33,94 ± 0,48 bB	33,86 ± 0,52 bC	31,22 ± 0,74 bB	3,39 ± 0,25 aB	176,10 ± 19,26 bC	0,57 ± 0,03 aA
CL ₂₀	4,75 ± 0,34 aA	29,43 ± 0,38 aA	36,81 ± 0,19 aA	37,26 ± 0,34 aA	34,58 ± 0,76 aA	2,93 ± 0,21 bC	98,92 ± 12,59 cD	0,57 ± 0,03 aA
CL ₂₅	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle	2,00 ± 0,00 bB	25,30 ± 0,19 bB	33,36 ± 0,30 bB	34,64 ± 0,29 abB	35,40 ± 0,41 aA	5,93 ± 0,39 aA	434,04 ± 34,43 aA	0,48 ± 0,01 aA

Média ± Erro padrão. ¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos e maiúsculas entre gerações não diferem significativamente. (Teste de inicialização emparelhado: P <0,05).

Os erros padrão foram estimados usando 100.000 bootstraps e comparados usando o teste de bootstrap emparelhado com base no IC de diferenças.

APOP período de pré-oviposição dos adultos, TPOP período total de pré-oviposição.

Para caracterizar os possíveis custos adaptativos foi realizado a confecção da tabela de vida de fertilidade usando descendentes tratados com as respectivas concentrações letais. A testemunha apresentou média superior em todos os parâmetros avaliados ao longo das três gerações. No parâmetro tempo de geração (T) o tratamento CL₁₅ atingiu aproximadamente 27,93 dias representando a menor média entre todos os tratamentos nas três gerações avaliadas (Tabela 3).

Os parâmetros da tabela de vida apresentaram uma associação com a concentração aplicada do bioinseticida; com o aumento da concentração há uma redução para a taxa líquida de reprodução (R_0) (80,64%), taxa reprodutiva bruta (GRR) (75,87%), taxa intrínseca de crescimento populacional (r) (35,85%) e a taxa finita de crescimento populacional (λ) (5,87%) (Tabela 3).

Tabela 3. Tabela de vida de fertilidade de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a 25 ± 1 ° C, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

1° Geração					
Tratamentos	T (dia)	R_0 (descendente individual ⁻¹)	GRR (descendente)	r (n° dia ⁻¹)	λ (n° dia ⁻¹)
CL ₅	28,88 ± 0,34 aB ¹	80,90 ± 16,79 bC	166,49 ± 31,54 bB	0,15 ± 0,01 bB	1,16 ± 0,01 bB
CL ₁₀	28,72 ± 0,32 aB	97,17 ± 16,50 bB	232,17 ± 36,87 aA	0,15 ± 0,00 bB	1,17 ± 0,01 bB
CL ₁₅	27,34 ± 0,41 bB	47,52 ± 10,48 cD	132,32 ± 23,70 bC	0,14 ± 0,01 bB	1,15 ± 0,01 bB
CL ₂₀	28,59 ± 0,31 aB	34,90 ± 8,64 dE	89,09 ± 19,39 cD	0,12 ± 0,01 cC	1,13 ± 0,01 cC
CL ₂₅	28,98 ± 0,51 aB	27,99 ± 6,28 dE	148,51 ± 20,93 bB	0,11 ± 0,01 cC	1,12 ± 0,01 cC
Controle	29,53 ± 0,22 aA	170,23 ± 24,16 aA	261,92 ± 31,83 aA	0,18 ± 0,00 aA	1,19 ± 0,01 aA
2° Geração					
Tratamentos	T (dia)	R_0 (descendente individual ⁻¹)	GRR (descendente)	r (n° dia ⁻¹)	λ (n° dia ⁻¹)
CL ₅	29,47 ± 0,52 aA	124,44 ± 24,79 bB	178,51 ± 33,74 bB	0,16 ± 0,01 aA	1,17 ± 0,01 aB
CL ₁₀	31,17 ± 0,15 aA	56,4 ± 11,87 cD	163,55 ± 27,62 bB	0,12 ± 0,01 bC	1,13 ± 0,01 bC
CL ₁₅	27,35 ± 0,41 cC	47,51 ± 10,48 cD	84,29 ± 10,94 cD	0,14 ± 0,001 bB	1,15 ± 0,01 bB
CL ₂₀	28,61 ± 0,31 bB	34,89 ± 8,64 cE	50,87 ± 7,21 dE	0,12 ± 0,01 bC	1,13 ± 0,01 bC
CL ₂₅	28,99 ± 0,51 bB	27,99 ± 6,28 dE	26,13 ± 3,59 eF	0,11 ± 0,01 cC	1,12 ± 0,01 cC
Controle	30,54 ± 0,22 aA	170,14 ± 24,11 aA	232,86 ± 28,81 aA	0,17 ± 0,00 aA	1,19 ± 0,01 aA
3° Geração					
Tratamentos	T (dia)	R_0 (descendente individual ⁻¹)	GRR (descendente)	r (n° dia ⁻¹)	λ (n° dia ⁻¹)
CL ₅	30,32 ± 0,30 aA	116,29 ± 21,52 bB	189,57 ± 31,64 aB	0,15 ± 0,01 bB	1,16 ± 0,01 bB
CL ₁₀	29,24 ± 0,20 bA	91,32 ± 15,47 bB	168,75 ± 25,52 aB	0,15 ± 0,00 bB	1,16 ± 0,01 bB
CL ₁₅	29,11 ± 0,31 bA	84,53 ± 12,68 bC	131,37 ± 18,22 bC	0,14 ± 0,00 bB	1,16 ± 0,01 bB
CL ₂₀	30,66 ± 0,20 aA	51,44 ± 8,14 cD	58,55 ± 8,90 cE	0,12 ± 0,00 cC	1,13 ± 0,01 cC
CL ₂₅	-	-	-	-	-
Controle	31,44 ± 0,14 aA	204,00 ± 26,93 aA	215,26 ± 27,94 aA	0,18 ± 0,00 aA	1,20 ± 0,00 aA

Média ± Erro padrão. ¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos e maiúsculas entre gerações não diferem significativamente. (Teste de inicialização emparelhado: $P < 0,05$).

Os erros padrão foram estimados usando 100.000 bootstraps e comparados usando o teste de bootstrap emparelhado com base no IC de diferenças.

T duração média de uma geração (dia), R_0 taxa líquida de reprodução (descendente individual⁻¹), GRR taxa reprodutiva bruta (descendente), r taxa intrínseca de aumento (n° dia⁻¹), λ taxa finita de aumento (n° dia⁻¹).

4. DISCUSSÃO

O efeito da concentração subletal em *A. gemmatalis* variou de acordo com os tratamentos. Esta observação sugere que os efeitos subletais precisam ser tomados em consideração e, podem ser utilizados como uma ferramenta no manejo integrado de pragas (Bauce et al., 2006).

A ingestão de diferentes concentrações letais de *B. thuringiensis* pelas lagartas de 2º instar de *A. gemmatalis* teve várias consequências no condicionamento biológico e resultou no prolongamento do período larval em alguns tratamentos. Estas observações ocorreram em outras espécies como *Lymantria dispar* L., 1758 (Erb et al., 2001), *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre, 1827 (Eizaguirre et al., 2005) e *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808 (Sedaratian et al., 2013).

Como estratégia de sobrevivência, os organismos podem passar a inibir à alimentação, prolongar o tempo de desenvolvimento ou até mesmo aumentar a incidência de polimorfismo com o intuito em compensação biológica (Moreau e Bauce, 2003). Fast e Régnière (1984) constataram que lagartas de quarto instar de *Lymantria dispar* L., 1758 (Lepidoptera: Erebidæ) são capazes de recuperar o desenvolvimento quando são expostas a subdoses do *B. thuringiensis*, com aumento do número de instares sem alteração do peso de pupas (Ramachandran et al., 1993). Os resultados do presente estudo evidenciam que após a segunda geração as lagartas expostas a subdose do *B. thuringiensis* apresentaram a capacidade de recuperar o desenvolvimento biológico e gerar progênie, perpetuando a espécie.

Em condições de campo, o comportamento das lagartas de *A. gemmatalis* podem ser similar ao presente estudo, devido a dificuldade do bioinseticida atingir o alvo na dose recomendada atribuídos a intempéries do ambiente ou até mesmo adoção da tecnologia de aplicação incorreta (Van-Frankenhuyzen et al., 2000).

A intoxicação causada pela bactéria *B. thuringiensis* pode resultar em alterações fisiológicas resultantes de interações complexas entre a δ endotoxina e o epitélio intestinal do inseto-praga (Fathipour et al., 2019). Um processo que pode ocorrer após a morte de enterócitos causada pela ação da δ endotoxina é a ativação do mecanismo de cicatrização nas regiões danificadas do intestino.

Esse processo é regulado por proteínas que controlam o desenvolvimento larval justificando o prolongamento da fase larval (Retnakaran et al., 1983; Sedaratian et al., 2013).

A redução da digestibilidade devido a alteração da quantidade de proteases no intestino da espécie é outra justificativa para o lento desenvolvimento. Larvas expostas a δ endotoxina podem ter o estadiol prolongado para compensar os custos associados a recuperação da exposição subletal, com o aumento do consumo alimentar (Martinez-Ramirez et al., 1999; Gujar et al., 2001; Dmitriew, 2011).

Outro fato que pode ocorrer é a alteração no número de instar da espécie em resposta a qualidade nutricional do alimento (Sehnal, 1985; Kidd e Orr, 2001; Mayntz et al., 2003; Verdinelli e Sanna-Passino, 2003). Estudos realizados com *S. nonagrioides* demonstraram que larvas alimentadas com doses subletais da toxina Cry1Ac aumentaram o número de mudas e tiveram um maior período de desenvolvimento. Este atraso larval pode interferir no surgimento de populações resistentes no agroecossistema, fornecendo insetos suscetíveis para acasalar com insetos resistentes (Liu et al., 1999; Eizaguirre et al., 2005).

Em condições de campo, quando o estágio larval é prolongado pode aumentar a probabilidade de predação ou parasitismo (Weseloh, 1984). Além disso, parâmetros de desenvolvimento como a sobrevivência e fecundidade podem ser comprometidos devido à redução na digestibilidade do alimento ingerido (Erb et al., 2001; Janmaat et al., 2014). No presente estudo, os resultados corroboram com redução dos parâmetros no tratamento CL₂₅.

Estudos realizados com *Choristoneura fumiferana* Clemens, 1865 submetido a subdoses de *B. thuringiensis* demonstraram que a fase de pupa não afetou a longevidade, pois a lagarta se recuperou da exposição a subdoses da bactéria (Fast e Regniere, 1984; Ramachandran et al., 1993). Esses resultados corroboram com os do presente estudo. Entretanto, mesmo com recuperação houve a redução na longevidade dos adultos.

As mariposas emergidas apresentaram redução na longevidade com variação na produção de ovos de acordo com o tratamento. Alterações na fecundidade após o tratamento com a bactéria *B. thuringiensis* também foram relatadas para outras espécies como *C. fumiferana* e *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 (Salama e Zaki, 1986; Pedersen et al., 1997).

A redução na fecundidade teve um impacto na população da espécie-praga o que pode afetar a dinâmica populacional da praga em campo. A redução na produção de ovos causada pela bactéria foi relatada em outras espécies como *S. littoralis* e *C. fumiferana* (Salama e Zaki, 1986; Bauce et al., 2006). Essas observações comprovam que os tratamentos tem um efeito direto no sistema reprodutivo de *A. gemmatalis*.

Fisiologicamente, espera-se uma maior alocação de energia para processos como crescimento com menor alocação para metabolismo e/ou reprodução. A mudança no padrão de alocação pode ter consequências positivas ou negativas dependendo da capacidade de cada indivíduo (Forbes, 2000).

Em condições de estresse, os insetos submetidos a concentrações de bioinseticida a base de *B. thuringiensis*, gastam mais energia como resposta à infecção. Esses gastos energéticos adicionais resultam em menos disponibilidade de energia para reprodução (Forbes, 2000; Parsons, 2000).

O período pré-oviposição do adulto (APOP) e período total pré-oviposição (TPOP) foram afetados pelos tratamentos e alterações na razão sexual entre machos e fêmeas foram observados. Acredita-se que essas alterações podem estar associadas a suscetibilidade diferencial entre os sexos e a efeitos fisiológicos na fertilização dos óvulos (Alix et al., 2001; Desneux et al., 2007). Outros estudos evidenciam a distorção sexual diante a inseticidas (Moraes et al., 2016; Delpuech e Meyet, 2003). No entanto, este é o primeiro relato sobre um bioinseticida a base de *B. thuringiensis* mudar a proporção razão sexual entre machos e fêmeas.

Cabe salientar, que este estudo foi realizado em condições de laboratório, onde os insetos são submetidos a exposição máxima ao bioinseticida. Dessa forma, é possível que em condições de campo, os efeitos do bioinseticida sobre a razão sexual sejam inferiores aos observados no presente estudo. Todavia, estudos de campo devem ser realizados para verificar os efeitos subletais causados pelo bioinseticida na população de *A. gemmatalis* e em suas gerações subsequentes.

Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade de dois sexos de *A. gemmatalis* utilizada para caracterizar possíveis custos de adequação foram significativamente afetados ao longo das três gerações avaliadas. Além disso,

esses parâmetros podem ser usados para estimar a eficácia do produto em relação ao alvo (Özgökçe et al., 2018; Rostami et al., 2018).

Quanto maior o tempo do período de desenvolvimento, menor a taxa de sobrevivência o que resulta em menor aumento populacional. A projeção populacional utilizando a tabela de vida de dois sexos auxilia a estimar as variações nas diferentes fases do desenvolvimento populacional da espécie em estudo, além de observar o comportamento separado entre ambos os sexos (Chi, 1990; Koner et al., 2019).

A taxa reprodutiva bruta (GRR) indica o rápido aumento da população que depende dos parâmetros número de ovos, ovos eclodidos e emergência dos adultos que são afetados pela qualidade nutricional do alimento ingerido (Khaliq et al., 2007).

A taxa intrínseca de crescimento populacional (r) é um parâmetro útil para descrever a dinâmica população da espécie-praga, que engloba sobrevivência, desenvolvimento e reprodução, e a taxa finita de crescimento populacional (λ) pode revelar o aumento total da população durante um período de tempo sob condições ambientais específicas (Farhadi et al., 2011; Rostami et al., 2018; Das et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

A biologia de *A. gemmatilis* foi afetada por subdoses do Dipel SC, interferindo nos parâmetros de fecundidade, razão sexual, taxa líquida de reprodução (R_0) e taxa bruta de reprodução (GRR).

6. REFERÊNCIAS

Abbas N, Khan HAA, Shad SA (2014) Resistance of the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to lambda-cyhalothrin: Mode of inheritance, realized heritability, and cross-resistance to other insecticides. **Ecotoxicology** 23:791-801. DOI: 10.1007/s10646-014-1217-7

Adapar (2019) **Dipel** Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/DIPEL.pdf>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2019.

Alix A, Cortesero AM, Nénon JP, Anger JP (2001) Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. **Environmental Toxicology and Chemistry** 20:2530-2536. DOI: 10.1897/1551-5028(2001)020<2530:saocrb>2.0.co;2

Amaral FSA, Guidolin AS, Salmeron E, Kanno RH, Padovez FEO, Fatoresso JF, Omoto C (2019) Geographical distribution of Vip3Aa20 resistance allele frequencies in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil. **Pest Management Science** 76:169-178. DOI: 10.1002/ps.5490

Andef, Associação nacional de defesa vegetal (2010) **Manual de tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários**. Campinas: Linea Creativa 52p.

Bauce E, Carisey N, Dupont A (2006) Carry over effects of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* on *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny under various stressful environmental conditions. **Agricultural and Forest Entomology** 8:63-76. DOI: 10.1111/j.1461-9555.2006.00283.x

Becker N, Zgomba M, Ludwig M, Petric D, Rettich F (1992) Factors influencing the efficacy of the microbial control agent *Bacillus thuringiensis israelensis*. **Journal of the American Mosquito Control Association** 8:285-289. DOI: 10.1093/jee/74.1.61

Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger U, Head GP, Omoto C (2012). Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68:1083-1091. DOI: 10.1002/ps.3271

Brand RJ, Pinnock DE, Jackson KJ, Milstead JE (1976) Viable Spore Count as an Index of Effective Dose of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 27:141-148. DOI: 10.1016/0022-2011(76)90139-7

Butt BA, Cantu E (1962) **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 7p.

Chi H (1988) Life-table analysis incorporating both sexes and variable development rates among individuals. **Environmental Entomology** 17:26-34. DOI: 10.1093/ee/17.1.26

Chi H (1990) Timing of control based on the stage structure of pest populations: a simulation approach. **Journal of Economic Entomology** 83:1143-1150. DOI: 10.1093/jee/83.4.1143

Chi H (2019) **TwoSex-MSChart: a computer program for the age-stage, two-sex life table analysis**. Disponível em: <<http://140.120.197.173/ecology/Download/TwoSex-MSChart.rar>>. Acesso em 20 de janeiro de 2020.

Chi H, Liu H (1985) Two new methods for the study of insect population ecology. **Bulletin of the Institute of Zoology** 24:225-240.

Chi H, Su HY (2006) Age-stage, two-sex life tables of *Aphidius gifuensis* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and its host *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) with mathematical proof of the relationship between female fecundity and the net reproductive rate. **Environmental Entomology** 35: 10-21. DOI: 10.1603/0046-225X-35.1.10

Colinet H, Sinclair BJ, Vernon P, Renault D (2015). Insects in fluctuating thermal environments. **Annual Review of Entomology** 60:123-140. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-021017

Das S, Koner A, Barik A (2019) Biology and life history of *Lema praeusta* (Fab.) (Coleoptera: Chrysomelidae), a biocontrol agent of two Commelinaceae weeds, *Commelina benghalensis* and *Murdannia nudiflora*. **Bulletin of Entomological Research** 109:463-471. DOI: 10.1017/S0007485318000731

Delpuech JM, Meyet J (2003) Reduction in the sex ratio of the progeny of a parasitoid wasp (*Trichogramma brassicae*) surviving the insecticide chlorpyrifos. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 45:203-208. DOI: 10.1007/s00244-002-0146-2

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81-106. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440

Dmitriew CM (2011) The evolution of growth trajectories: what limits growth rate? **Biological Reviews** 86:97-116. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2010.00136.x

Efron B, Tibshirani RJ (1994) **An introduction to the bootstrap**. Boca Raton: CRC Press 456p.

Eizaguirre M, Tort S, Lopez C, Albajes R (2005) Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. **Journal Economic Entomology** 98:464-470. DOI: 10.1093/jee/98.2.464

Erb SL, Bouchier RS, Van- Frankenhuyzen K, Smith SM (2001) Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner subsp. *kurstaki* on *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) and the Tachinid parasitoid *Compsilura concinnata* (Diptera: Tachinidae). **Environmental Entomology** 30:1174-1181. DOI: 10.1603/0046-225X-30.6.1174

Farhadi R, Allahyari H, Chi H (2011) Life table and predation capacity of *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) feeding on *Aphis fabae*

(Hemiptera: Aphididae). **Biological Control** 59:83-89. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2011.07.013

Fast PG, Regniere J (1984) Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian Entomologist** 116:123-130. DOI: 10.4039/Ent116123-2

Fathipour Y, Sedaratian A, Bagheri A, Talaei-Hassanlouei (2019) Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology** 1-9. DOI: 10.1111/phen.12288

Fobes VE (2000) Is hormesis an evolutionary expectation? **Functional Ecology** 14:12-24. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2000.00392.x

Frye RD, Scholl CG, Scholz EW, Funke BR (1973) Effect of weather on a microbial insecticide. **Journal Invertebrate Pathology** 22:50-54. DOI: 10.1016/0022-2011(73)90009-8

Goodman D (1982) Optimal life histories, optimal notation, and the value of reproductive value. **American Naturalist** 119:803-823.

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487-497. DOI: 10.1093/jee/69.4.487

Guedes RNC, Cutler GC (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70:690-697. DOI: 10.1002/ps.3669

Gujar GT, Kalia V, Kumari A (2001). Effect of sublethal concentration of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki on food and developmental needs of the american bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). **Indian Journal of Experimental Biology** 39:1130-1135.

Haase S, Sciocco-Cap A and Romanowski V (2015) Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. **Viruses** 7:2230-2267. DOI: 3390/v7052230

Hadapad AB, Hire RS, Vijayalakshmi N, Dongre TK (2009) UV protectants for the biopesticide based on *Bacillus sphaericus* Neide and their role in protecting the binary toxins from UV radiation. **Journal of Invertebrate Pathology** 100:147-152. DOI: 10.1016/j.jip.2008.12.003

Horikoshi RJ, Bernardi O, Amaral FSA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) resistant to Bt maize. **Journal of Invertebrate Pathology** 161:1-6. DOI: 10.1016/j.jip.2018.12.008

Janmaat AF, Bergmann L, Ericsson J (2014) Effect of low levels of *Bacillus thuringiensis* exposure on the growth, food consumption and digestion efficiencies of *Trichoplusia ni* resistant and susceptible to Bt. **Journal of Invertebrate Pathology** 119:32-39. DOI: 10.1016/j.jip.2014.04.001

Khaliq A, Attique M, Sayyed A (2007) Evidence for resistance to pyrethroids and organophosphates in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from Pakistan. **Bulletin of Entomological Research** 97:191-200. DOI: 10.1017/S0007485307004877

Kidd K A, Orr D B (2001) Comparative feeding and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on kudzu and soybean foliage. **Entomological Society of America** 94:219-225. DOI: 10.1603/0013-8746(2001)094[0219:CFADOP]2.0.CO;2

Konecka E, Czarniewska E, Adam-Kaznowski A, Grochowska J (2018) Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystals and thymol mixtures. **Industrial Crops and Products** 117:272-277. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.03.010

Koner A, Debnath R, Barik A (2019) Age-stage, two-sex life table and food utilization efficiencies of *Galerucella placida* Baly (Coleoptera: Chrysomelidae) on two Polygonaceae weeds. **Journal of Asia-Pacific Entomology** 22:1136-1144. DOI: 10.1002/ps.5490

Lacey LA (2017) **Insect and Mite Pests. From Theory to Practice**. Amsterdam: Academic Press 484p.

Liu YB, Tabashnik BE, Denehy TJ, Patin AL, Bartlett AC (1999) Development time and resistance to Bt crops. **Nature** 400:519. DOI: 10.1038/22919

Manasherob R, Ben-Dov E, Xiaoqiang W, Boussiba S, Zaritsky A (2002) Protection from UV-B damage of mosquito larvicidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis expressed in *Anabaena* PCC 7120. **Current Microbiology** 45:217-20. DOI: 10.1007/s00284-001-0106-5

Martinez-Ramirez AC, Gould F, Ferre J (1999) Histopathological effects and growth reduction in a susceptible and a resistant strain of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) caused by sublethal doses of pure Cry1A crystal proteins from *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Science and Technology** 9:239-246. DOI: 10.1080/09583159929811

Matthews GA, Bateman, R, Miller P, Andrei E (2015) **Métodos de aplicação de defensivos agrícolas**. São Paulo: Editora Andrei 630p.

Mayntz D, Toft S, Vollrath F (2003) Effects of prey quality and availability on the life history of a trap-building predator. **Oikos** 101: 631-638. DOI: 10.1034/j.1600-0706.2003.12408.x

Morais MR, Zanardi OZ, Rugno GR, Yamamoto PT (2016) Impact of five insecticides used to control citrus pests on the parasitoid *Ageniaspis citricola* Longvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae). **Ecotoxicology** 25:1011-1020. DOI: 10.1007/s10646-016-1658-2

Moreau G, Bause E (2003) Lethal and sublethal effects of single and double applications of *Bacillus thuringiensis* variety kurstaki on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Journal Economic Entomology** 96:280-286. DOI: 10.1603/0022-0493-96.2.280

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: Hoffmann-Campo CB, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F. (Eds.) **Manejo Integrado e Insetos e outros Artrópodes Praga**. Brasília: Embrapa, p. 213-334.

Özgökçe MS, Chi H, Atlıhan R, Kara H (2018) Demography and population projection of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: Aphididae) on five pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. **Phytoparasitica** 46:153-167. DOI: 10.1007/s12600-018-0658-6

Parsons PA (2000) Hormesis: an adaptive fitness response and an evolutionary expectation in stressed free-living populations, with particular reference to ionizing radiation. **Journal of Applied Toxicology** 20:103-112. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1263(200003/04)20:23.O.CO;2-O

Pedersen A, Dedes J, Gauthier D, Van-Frankenhuyzen K (1997) Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 83:253-262. DOI: 10.1023/A:1002965901086

Pinnock DE, Brand RJ, Milstead JE (1971) The Field Persistence of *Bacillus thuringiensis* Spores. **Journal of Invertebrate Pathology** 18:405-411. DOI: 10.1016/0022-2011(71)90046-2

Ramachandran R, Raffa KF, Miller MJ, Ellis DD, Mccown BH (1993) Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) toxin in diet. **Environmental Entomology** 22:197-211. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/22.1.197>

Retnakaran A, Lauzon H, Fast PG (1983) *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 34:233-239. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1983.tb03327.x

Rostami N, Maroufpoor M, Sadeghi A, Ghazi MM, Atlıhan R (2018) Demographic characteristics and population projection of *Phytonemus pallidus fragariae* reared on different strawberry cultivars. **Experimental and Applied Acarology** 23:2224–2236. DOI: 10.1007/s10493-018-0326-z

Salama HS, Zaki FN, (1986) Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner on prepupal and pupal stages of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science** 7:747-749. DOI: 10.1017/S1742758400011838

Sas University (2014) **SAS® 9.4 Statements**. Third Edition SAS Instit. Inc., USA.

Sedaratian A, Fathipour Y, Talaei-Hassanloui R, Jurat-Fuentes JL (2013) Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology** 137:540-549. DOI: 10.1111/jen.12030

Sehnal F (1985) Growth and life cycles. In.: Kerkut GA, Gilbert LI (Eds.) **Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology**. Oxford: United Kingdom, p.121-123.

Van-Frankenhuyzen K, Nystrom C, Dedes J, Seligy V (2000) Mortality, feeding inhibition, and recovery of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) larvae following aerial application of a high-potency formulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Canadian Entomologist** 132:505-518. DOI: <https://doi.org/10.4039/Ent132505-4>

Van-Rie J, Ferré J (2000) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In.: Charles JF, Delecluse A, Leroux N (Eds.) **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications, p. 219-237.

Verdinelli M, Sanna-Passino G (2003) Development and feeding efficiency of *Malacosoma neustrium* larvae reared with *Quercus* spp. leaves. **Annals of Applied Biology** 143:161-167. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2003.tb00282.x

Weseloh RM (1984) Effects of the feeding inhibitor Plictran and low *Bacillus thuringiensis* Berliner doses on *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera; Lymantriidae): Implications for *Cotesia melanoscelus* (Ratzeburg) (Hymenoptera: Braconidae). **Environmental Entomology** 13:1371-1376. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2003.tb00282.x

CAPÍTULO 4 - MORFOMETRIA DE ADULTOS DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 EXPOSTOS A SUBDOSES DE *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911

RESUMO - Os insetos adultos obtidos a partir de lagartas sobreviventes infecções por entomopatogenos podem apresentar comportamento, biologia ou morfologia diferente dos insetos sadios. Os métodos morfométricos são boas ferramentas, quando usados em conjunto com os dados biológicos, para responder questões relacionadas as covariações de caracteres. O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfometria de adultos de *A. gemmatalis* expostos a subdoses do bioinseticida Dipel SC. A partir da estimativa da curva resposta pela análise de Probit os tratamentos subletais foram CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e o controle. Após alcançar a fase adulta as partes tegumento, tórax, abdome, asas e adultos íntegro foram separadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica de ponta fina e depois pesadas em balança analítica e as asas foram montadas em lamina e lamínulas. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições e tratamentos dispostos em arranjo fatorial 3 (F₁, F₂, F₃) x 5 (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e a testemunha) x 22 (largura, comprimento e área das asas anterior e posterior, peso do tegumento, tórax, abdome, asas e o adulto íntegro de ambos os sexos). Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância e analisados por correlação linear estratificada. Nas situações que houve significância foi feito o desmembramento das variáveis pelo teste de Tukey (P<0,05). O peso do tegumento, tórax, abdome, asas e adultos íntegro das fêmeas foram inferiores em relação aos machos em todas as gerações avaliadas. As maiores quantidades de correlações positivas nos machos e fêmeas adultos foram observadas na 1º e 3º geração. E os parâmetros abdome + tórax (A+TX) em machos, abdome + adultos íntegros (A+T), abdome + tegumento (A+TEG) em fêmeas e tegumento + adultos íntegros (TEG+T) em ambos os sexos repetiram ao longo das três gerações avaliadas. A morfometria dos adultos de *A. gemmatalis* foi alterada de acordo com subdose de *B. thuringiensis* sendo maiores em fêmeas adultas.

Palavras-chave: simetria, medida alometria, aerodinâmica, voo, lagarta da soja, plasticidade fenotípica.

CHAPTER 4 - ADULT MORPHOMETRY OF *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER, 1818 EXPOSED TO UNDERDOSES OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911

ABSTRACT - Adult insects obtained from surviving entomopathogenic infections caterpillars may present different behavior, biology or morphology than adult insects resulting from healthy caterpillars. Morphometric methods are good tools, when used in conjunction with biological data, to answer questions related to character covariations. The objective of this work was to evaluate the morphometry of adults of *A. gemmatalis* exposed to underdoses of the bioinsecticide Dipel SC. From the estimate of the response curve by the Probit analysis, the sublethal treatments CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ were chosen. After reaching adulthood, the integument, thorax, abdomen, wings and intact adults were separated with the aid of fine-tipped surgical scissors and then weighed on an analytical balance and the wings were mounted on a blade and coverslips. The design used was completely randomized with 10 repetitions and treatments arranged in a factorial arrangement 3 (F₁, F₂, F₃) x 5 (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ and the control) x 22 (width, length and wing area) anterior and posterior, tegument weight, chest, abdomen, wings and the full adult of both sexes). The results obtained were subjected to analysis of variance and analyzed by stratified linear correlation. In situations where there was significance, the variables were broken down using the Tukey test ($P < 0.05$). The weight of the integument, thorax, abdomen, wings and intact adults of females were lower in relation to males in all evaluated generations. The highest amounts of positive correlations in adult males and females were observed in the 1st and 3rd generation. And the parameters abdomen + thorax (A + TX) in males, abdomen + intact adults (A + T), abdomen + integument (A + TEG) in females and integument + intact adults (TEG + T) in both sexes repeated on over the three generations evaluated. The morphometry of the adults of *A. gemmatalis* was altered according to the subdose of *B. thuringiensis* with greater interference in adult females.

Keywords: symmetry, allometry, aerodynamics, flight, soybean caterpillar, phenotypic plasticity.

1. INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hünber, 1818 é uma espécie-praga desfolhadora, com ocorrência no continente americano (Haase et al., 2015). Na fase larval a alimentação é preferencialmente realizada em leguminosas como soja. Entretanto, por ser considerada uma espécie polífaga, migra para outras regiões com o intuito de colonizar novas áreas com maior disponibilidade de alimento (Ford et al., 1975; Pashley e Johnson, 1986; Fernandes et al., 2018).

Os danos causados pela espécie foram relatados em arroz, algodão, girassol, trigo entre outras (Panizzi et al., 2004; Moscardi et al., 2012; Specht et al., 2015; Abreu et al., 2018). A permanência do inseto-praga no agroecossistema é atribuído ao contínuo cultivo durante todo ano, que proporciona a formação de pontes verdes (Oliveira et al., 2014).

O controle químico e as plantas Bt são os métodos de controle mais utilizados, no entanto, devido aos custos e prejuízos no agroecossistema, o controle biológico vêm sendo uma alternativa viável, por apresentar vantagens como baixa toxicidade, especificidade e seletividade (Glare et al., 2012; Parra, 2014; Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Bueno et al., 2017; Lacey, 2017; Fernandes et al., 2018; Melo et al., 2018).

Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 é uma bactéria utilizada na forma de bioinseticida a mais de meio século, e pouco se sabe dos efeitos nos insetos adultos sobreviventes expostos a subdoses (Sanchis, 2010). O inseto-praga sobrevivente a subdose apresenta efeitos no condicionamento biológico, e pode causar uma diversidade de respostas durante a fase larval e adulta (Van-Rie e Feré, 2000; Guedes e Culter, 2013).

O tamanho corporal é um parâmetro quantitativamente importante, pois influencia o condicionamento físico e determina parâmetros como sobrevivência e reprodução (Schmidt-Nielsen, 1984). Indivíduos maiores tendem a apresentar maior longevidade, além de estar associado muitas vezes com maior fecundidade (Wang et al., 2009). Deste modo, espera-se que interações populacionais e relações bióticas estabelecidas em uma comunidade sejam influenciadas pela alteração no peso corporal do indivíduo (Vaz et al., 2004; Gorür et al., 2005).

Os métodos morfométricos são boas ferramentas, quando usados em conjunto com os conhecimentos biológicos, para responder questões relacionadas a covariações de caracteres dentro e entre populações, ou seja, são as variações que ocorrer em toda a morfometria de um indivíduo devido a uma simples alteração na proporção das asas (Gould e Jhnsoton 1972; Neff e Marcus, 1980; Reis, 1988). As modulações no tamanho e simetria corpórea em resposta a estresses ambientais como bioinseticidas, são produzidas pela plasticidade fenotípica, que descreve a habilidade do indivíduo de alterar seu fenótipo sem afetar o genótipo (Scheiner, 1993).

A plasticidade fenotípica pode ser considerada uma ferramenta de escape importante para a sobrevivência em ambientes instáveis ou perturbados pela ação humana (Gotthard e Nylin, 1995). Além de evidenciar o quanto o organismo consegue tamponar seu desenvolvimento frente às condições estressantes (Leung et al., 2000; Fuller e Houle, 2002; Cárcamo et al., 2008).

A habilidade do voo dos insetos está relacionado com a morfometria dos adultos. Dudley e Ellington (1990) comprovou correlações positivas entre a velocidade de vôo com o comprimento das asas (Palmer e Dingle, 1989; Fairbairn e Roff, 1990). O entendimento sobre a aerodinâmica e as forças necessárias ao voo de organismos alados são essenciais para explicar a capacidade de dispersão ou até mesmo migração (Weis-Fogh, 1956; Dudley e Ellington, 1990; Ellington et al., 1990; Schellhorn et al., 2014).

Estudos de morfometria são importantes para o manejo integrado de pragas pois auxiliam em estudos de ecologia, biologia e morfologia (Souza et al., 2004; Silva-Filho et al., 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar a morfometria de adultos de *A. gemmatalis* expostos a subdoses do bioinseticida Dipel SC.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Criação dos insetos

A população de *A. gemmatalis* foi obtida no Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ - Piracicaba) e a criação de insetos foi estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de

Artrópodes Pragas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Jaboticabal), mantidos em dieta artificial (Greene et al., 1976).

A partir disso, foram separados 2000 ovos de *A. gemmatilis*, acondicionados em placas de Petri de (9,0 cm Ø; 1,5 cm h), com papel filtro umedecido com água destilada na parte inferior e na parte superior filme plástico (PVC) perfurado com um alfinete. A criação dos insetos foi mantida em sala climatizada sobre as condições de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

2.2. Concentrações letais (CL)

As suspensões do bioinseticida à base de *B. thuringiensis* (Dipel SC) foram realizadas a partir da quantificação do número de esporos por meio de contagem direta ao microscópio com auxílio de câmara de Neubauer (Brand et al., 1976). Para estimar a curva resposta pela análise de Probit seis concentrações foram definidas, micropipetando 200 µL na superfície da dieta artificial (4,8 cm³) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø; 5,0 cm h). Para cada concentração subletal 10 lagartas de 2º instar de *A. gemmatilis* foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por concentração.

No lote correspondente a testemunha foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados. A partir da estimativa da curva resposta pela análise de Probit as concentrações subletais CL₅, CL₁₀, CL₁₅ e CL₂₀ ($1,5 \times 10^4$; $2,7 \times 10^4$; $3,8 \times 10^4$; $5,1 \times 10^4$; $6,5 \times 10^4$) foram escolhidas para serem utilizadas como tratamentos no bioensaio (Sedaratian et al., 2013).

Para a montagem do bioensaio uma alíquota de 200 µL dos tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅ e CL₂₀ foi aplicada na superfície da dieta artificial (4,8 cm³) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø; 5,0 cm h). Cada vez que o ciclo biológico da espécie chegava ao fim as lagartas sobreviventes que eclodiam dos ovos de cada tratamento eram realimentadas com dieta artificial contendo suas respectivas concentrações subletais (CL₅, CL₁₀, CL₁₅ e CL₂₀), esse procedimento foi executado durante três ciclos biológicos (F₁, F₂ e F₃) da espécie praga. Para cada geração de *A. gemmatilis* (F₁, F₂ e F₃) 10 lagartas de 2º instar foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por

tratamento. No lote correspondente a testemunha foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

2.3. Estudo dos efeitos subletais

Nas gerações F₁, F₂ e F₃ os tratamentos CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e a testemunha foram avaliados diariamente até as lagartas atingirem fase de pupa. As pupas com até 24 horas foram sexadas e separadas em recipientes de polietileno (14,0 cm Ø; 9,0 cm h) (Butt e Cantu, 1962).

Os adultos recém emergidos foram separados em casais e acondicionados em gaiolas de PVC (10,0 cm Ø; 20,0 cm h), forradas com papel sulfite A4 branco utilizado como substrato de oviposição no seu interior. Na parte inferior foi utilizada uma placa de Petri com papel filtro e a parte superior vedada com tecido *voile*.

Os adultos foram alimentados com solução de mel a 10% umedecido em algodão hidrófilo colocado em placa de Petri de polietileno (4,9 cm Ø; 1,2 cm h) no fundo das gaiolas (Fernandes et al., 2017). Os papéis utilizados como substrato de oviposição foram retirados diariamente e os ovos acondicionados em placas de Petri (9,0 cm Ø; 1,5 cm h) para prosseguir ciclo biológico do inseto-praga.

2.4. Obtenção dos dados

A pesagem dos adultos de *A. gemmatilis* expostos a subdoses da bactéria foi realizada com até 24 horas. As diferentes partes do corpo dos indivíduos foram separadas com o auxílio de uma tesoura cirúrgica de ponta fina e depois pesadas em uma balança analítica (Belmark - 210A). Foram realizadas pesagens com os adultos íntegros, somente o tegumento, tórax, abdome e asas.

Após serem montadas em lamina, lamínula e lacrada com uma fina camada de esmalte para unhas incolor seca por duas horas, as medidas do comprimento, largura e área das asas anterior e posterior foram obtidas com o auxílio de um microscópio estereoscópio com câmera acoplada (Leica S9 i) (Figura 1).

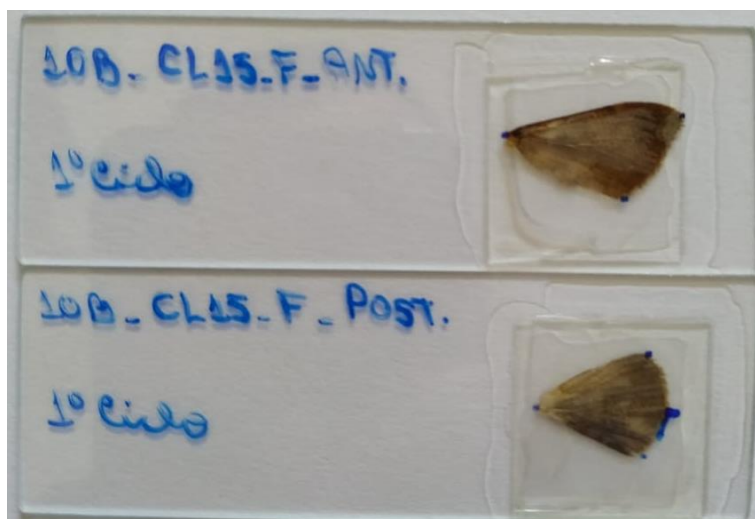


Figura 1. Asas de *Anticarsia gemmatalis* montadas em lamina, lámínula e lacrada com uma fina camada de esmalte para unhas incolor seca por duas horas.

O comprimento da asa anterior foi medido entre o limite final da veia radial R3 e a origem da veia anal 2A e a largura entre o limite final da veia anal 2A e a margem costal, passando pela origem da veia radial R1.

O comprimento na asa posterior foi medido entre o início da fusão das veias subcostal Sc1 e veia radial R1 e o limite terminal da veia mediana M2. A largura entre o limite final da fusão das veias subcostal Sc1 e R1 e o limite final da veia anal 2a. As áreas das asas anterior e posterior foram medidas usando o contorno total das asas.

2.5. Análise dos dados

Os dados de mortalidade dos testes de virulência foram submetidos a análise de regressão de Probit e obtidos os valores das concentrações subletal CL₅, CL₁₀, CL₁₅ e CL₂₀ utilizando o software SAS (P > 95%) (Sas University, 2014).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com 10 repetições e tratamentos dispostos em arranjo fatorial 3x5x22. Foram três gerações (F1, F2, F3), cinco tratamentos (CL₅, CL₁₀, CL₁₅, CL₂₀ e a testemunha) e 22 variáveis sendo largura, comprimento e área das asas anterior e posterior, peso do tegumento, tórax, abdome, asas e o adulto inteiro de ambos os sexos.

Foi realizada análise estatística no software GENES (Cruz, 2001), os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F e posteriormente foi realizado a correlação linear estratificada para ciclo e tratamento. Em caso de significância realizou-se o desmembramento das variáveis que evidenciaram interação entre tratamento e o ciclo pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Os machos da testemunha apresentaram as maiores médias de peso do tegumento (126,35 mg), tórax (57,30 mg), asas (26,49 mg) e adulto íntegro (150,84 mg) ao longo das três gerações avaliadas. No entanto, o peso do abdome atingiu maiores valores para o tratamento CL₂₀ na 1ª geração e CL₅, CL₁₅ e CL₂₀ na 2ª e 3ª geração, diferindo significativamente da testemunha (Tabela 1).

O peso do tegumento nos machos apresentou diferenças na 1ª, 2ª e 3ª geração, no entanto, ao longo das avaliações os valores aproximaram-se da testemunha (Tabela 1). Nas fêmeas adultas houve variações ao longo das gerações. As diferenças no peso do tegumento entre os sexos alcançou reduções de 5,76% nas fêmeas em comparação aos machos (Tabela 2).

O peso do tórax nos machos adultos da testemunha foi superior somente na 1ª geração, não diferindo nas avaliações subsequentes. Além disso, ao longo das gerações o peso dos tratamentos numericamente ultrapassa a testemunha (Tabela 1). O peso das fêmeas adultas, por outro lado, apresentaram significância em ambas as gerações (Tabela 2).

O peso do abdome dos machos no tratamento CL₁₀ não diferiu da testemunha ao longo das três gerações apresentando um condicionamento biológico similar. Os tratamentos CL₅ e CL₂₀ tiveram o mesmo comportamento do tratamento CL₁₀ com diminuição na 2ª geração e aumento do peso na 3ª geração, no entanto, obteve médias superiores. O tratamento CL₁₅ aumentou o peso a cada geração avaliada (Tabela 1). Nas fêmeas o comportamento é similar mas apresentou média geral inferior de 7,48% no peso do abdome comparado com os machos adultos (Tabela 2).

O peso das asas nos machos teve diferença somente na 1ª geração com o tratamento CL₁₀, não observando significância no condicionamento biológico nas gerações subsequentes (Tabela 1). Nas fêmeas não foi observado diferenças no peso das asas ao longo das três gerações (Tabela 2).

Houve diferença significativa para os parâmetros comprimento e largura da asa superior dos machos entre a testemunha e o tratamento CL₅, com uma diferença de 11,20% e 34,79% na 1ª geração e 9,05% e 6,45% na 2ª geração, respectivamente. O mesmo não foi observado, para o último ciclo avaliado. Esses mesmos parâmetros avaliados na asa inferior obteve maiores médias a testemunha somente na 2ª geração com 14,93 mm de comprimento e 10,54 mm de largura diferindo do tratamento CL₁₅, respectivamente (Tabela 1).

A área das asas anterior e posterior dos machos na testemunha revelou valores superiores em relação a todos os tratamentos de 4,74% e 5,11% na 1ª geração, 3,12% e 3,23% na 2ª geração, 16,12% e 7,40% na 3ª geração diferindo em grande parte dos tratamentos e gerações (Tabela 1).

As fêmeas da testemunha não apresentaram os mesmos parâmetros morfométricos observados nos machos. As maiores médias na 1ª geração foi no tratamento CL₅ diferindo da testemunha no peso do tegumento (131,81 mg), tórax (68,98 mg), abdome (62,82 mg) e adulto íntegro (150,42 mg). Na 2ª geração o tratamento CL₁₀ e a testemunha alcançaram as maiores médias diferindo significativamente do tratamento CL₅ nos parâmetros tegumento e abdome. Na última avaliação realizada o tratamento CL₁₅ teve uma maior significância entre os tratamentos com diferença entre a testemunha nos parâmetros peso do tegumento (114,24 mg), abdome (60,44 mg) e do adulto íntegro (128,15 mg) (Tabela 2).

O comprimento e largura da asa superior e inferior das fêmeas no tratamento CL₁₀ e na testemunha apresentou maiores médias entre os tratamentos nas três gerações avaliadas. Significância não foi observado entre os tratamentos no comprimento da asa superior na 3ª geração (Tabela 2).

A área das asas anterior das fêmeas revelou valores superiores da testemunha em relação aos tratamentos na 1ª e 2ª geração não apresentando significância na 3ª geração entre os tratamentos. No entanto, a área das asas posterior das fêmeas somente na 2ª geração a testemunha apresentou o maior

valor entre os tratamentos diferindo significativamente do tratamento CL₅ (Tabela 2).

A análise de correlação linear estratificada tem por objetivo medir a intensidade da relação entre as variáveis avaliadas. Com isso, foi definido a correlação mínima a partir de 0,6 e -0,6 consideradas correlações lineares positivas e negativas moderadas.

Na 1º geração, apresentaram um maior número de correlações lineares estratificadas em ambos os sexos. Nos machos adultos, os parâmetros tegumento + abdome (TEG+A), tórax + asa superior (TX+A-S), tórax + adulto íntegro (TX+T), asa + adulto íntegro (AS+T), asa + tamanho superior comprimento (AS+TSC) e tegumento + adulto íntegro (TEG+T) apresentaram em média correlações lineares positivas moderada (0,6) entre ambos os tratamentos e a testemunha.

As fêmeas adultas, no entanto, obtiveram em média correlações lineares positivas forte (0,7) nos parâmetros tegumento + tórax (TEG+TX), tamanho inferior comprimento + asa superior (TIC+A-S), área inferior + asa superior (AI+A-S), tamanho inferior largura + tamanho inferior comprimento (TIL+TIC), tegumento + abdome (TEG+A), adulto íntegro + abdome (T+A), tamanho inferior comprimento + tamanho superior largura (TIC+TSL), tórax + adulto íntegro (TX+T), adulto íntegro + tegumento (T+TEG), tamanho inferior largura + tamanho superior largura (TIL+TSL) com destaque para os tratamentos CL₁₅ e CL₂₀, respectivamente (Figura 2).

O mesmo não foi observado na 2º geração com correlações lineares moderadas (0,6) para os tratamentos CL₅ e CL₁₀ nas variáveis tegumento + abdome (TEG+A), tórax + abdome (T+A) e adultos íntegros + abdome (T+A). Nas fêmeas os tratamentos que apresentaram correlações lineares forte (0,8) foram CL₁₀ e CL₁₅ para as variáveis tegumento + abdome (TEG+A), tegumento + adultos íntegros (TEG+T) e adultos íntegros + abdome (T+A) (Figura 2).

Na 3º geração os machos da testemunha apresentaram aproximadamente correlações lineares moderada (0,6) entre as variáveis asa + adulto íntegro (AS+T), tegumento + asa superior (TEG+A-S), asa + tamanho superior largura (AS+TSL) e tamanho superior largura + adulto íntegro (TSL+T). Ao contrário das fêmeas que obteve correlações lineares negativas moderada (-0,6) na testemunha nos parâmetros tórax + tamanho superior largura (TX+TSL),

tamanho inferior comprimento + tórax (TIC+TX), tegumento + asa (TEG+AS), tegumento + adulto íntegro (TEG+T), asa + abdome (AS+A), adulto íntegro + abdome (T+A), tórax + abdome (TX+A); e maior número de correlações positivas moderadas (0,6) para o tratamento CL₅ no tegumento + abdome (TEG+A), tegumento + adulto íntegro (TEG+T), adulto íntegro + abdome (T+A), tórax + abdome (TX+A) e tegumento + tórax (TEG+TX) (Figura 2).

Tabela 1. Peso corporal, tamanho das asas e área da asa de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

Macho											
Tratamentos	Tegumento	Peso corporal (mg)				Tamanhos das asas (mm)				Área da asa (mm)	
		Tórax	Abdome	Asas	Total	Anterior		Posterior		Anterior	Posterior
						Comprimento	Largura	Comprimento	Largura		
1° Geração											
CL ₅	69,87±0,05cC ¹	40,22±0,03cC	29,65±0,05cB	44,36±0,05aA	114,22±0,07bAB	17,36±0,39cA	9,52±0,29bB	12,12±0,33cC	9,51±0,37bC	67,44±36,47cB	56,14±35,36dB
CL ₁₀	112,71±0,02bA	51,05±0,02bA	61,66±0,02bA	11,23±0,02bA	123,94±0,02bA	18,42±0,19bA	9,34±0,14cC	13,46±0,16bB	9,47±0,16bC	71,68±13,14bcC	57,53±10,54cdB
CL ₁₅	64,96±0,02cB	20,59±0,02dB	44,37±0,03bcA	41,49±0,02aA	106,45±0,01bA	17,51±0,17cB	10,52±0,17aA	13,51±0,17bA	10,52±0,16aAB	72,52±9,80bcC	64,45±8,97bcB
CL ₂₀	126,22±0,04aA	49,16±0,01bA	87,06±0,04aA	40,25±0,04aA	176,47±0,05aA	17,93±0,33bcA	9,83±0,23bB	11,83±0,37cB	9,81±0,30bB	75,98±30,68aB	64,68±30,94aB
Controle	129,75±0,04aA	67,34±0,04aA	56,42±0,04bB	39,72±0,04aA	163,47±0,04aA	19,55±0,18aA	14,60±0,14aA	14,54±0,16aA	9,54±0,16bB	75,49±17,28aB	63,97±16,27aB
2° Geração											
CL ₅	91,29±0,02cB	50,68±0,01aB	68,61±0,02aB	14,07±0,03aB	105,36±0,04bB	17,57±0,17bA	9,85±0,22bB	13,58±0,18cB	10,38±0,18abB	84,03±17,05aA	67,67±15,25cA
CL ₁₀	93,39±0,01cB	53,32±0,01aA	40,06±0,01bB	13,14±0,01aA	106,53±0,01bA	17,93±0,19bA	10,13±0,21abB	14,40±0,17abA	10,41±0,18abB	85,88±17,05aB	72,01±15,25bA
CL ₁₅	113,14±0,02abA	58,77±0,02aA	54,37±0,03abA	7,86±0,02aB	121,00±0,02bA	18,87±0,22aA	10,46±0,15aA	13,65±0,15bcA	9,96±0,25bB	89,78±21,85aA	74,54±17,02abA
CL ₂₀	106,02±0,03bcB	52,68±0,01aA	53,34±0,02abB	6,81±0,01aB	112,83±0,03bB	17,85±0,24bA	10,42±0,14aA	13,96±0,26bcA	10,86±0,21aA	88,56±9,10aA	76,88±19,58aA
Controle	127,22±0,05aA	58,52±0,00aB	40,70±0,05bAB	21,02±0,04aB	148,24±0,05aAB	19,32±0,14aA	10,53±0,16aB	14,93±0,22aA	10,54±0,20abA	89,87±13,51aA	75,21±17,05aA
3° Geração											
CL ₅	119,68±0,01aA	59,54±0,02aA	60,13±0,02abA	9,74±0,01aB	129,41±0,01abA	16,96±0,29cB	10,05±0,21bA	12,90±0,22cA	10,48±0,17bA	79,01±18,24bA	66,59±20,86cA
CL ₁₀	106,20±0,02abAB	50,97±0,02aA	55,22±0,03bAB	9,35±0,02aA	115,55±0,02bA	19,35±0,34aA	10,90±0,27aA	15,01±0,25aA	11,55±0,22aA	85,26±15,98bA	74,13±16,55bA
CL ₁₅	102,07±0,02bA	51,29±0,02aA	76,79±0,03aA	6,23±0,02aB	108,31±0,02bA	17,96±0,15bB	10,74±0,15aA	13,08±0,15cA	11,09±0,15abA	80,20±23,50bB	76,71±31,92abA
CL ₂₀	107,38±0,02abB	49,08±0,02aA	58,30±0,03abB	6,81±0,02aB	114,19±0,02bB	17,58±0,17bcA	10,47±0,16abB	13,59±0,24bcA	10,54±0,15bA	76,84±25,18bB	69,92±18,87bcB
Controle	122,09±0,02aA	46,05±0,01aC	50,04±0,02bA	18,73±0,03aB	140,82±0,02aB	17,40±0,23bcB	9,46±0,20cC	13,93±0,23bB	10,58±0,16bA	95,77±17,47aA	77,58±15,27aA

¹Média ± Erro padrão. ¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos e maiúsculas entre gerações não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P <0,05). N = 10 insetos avaliados

Tabela 2. Peso corporal, tamanho das asas e área da asa de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

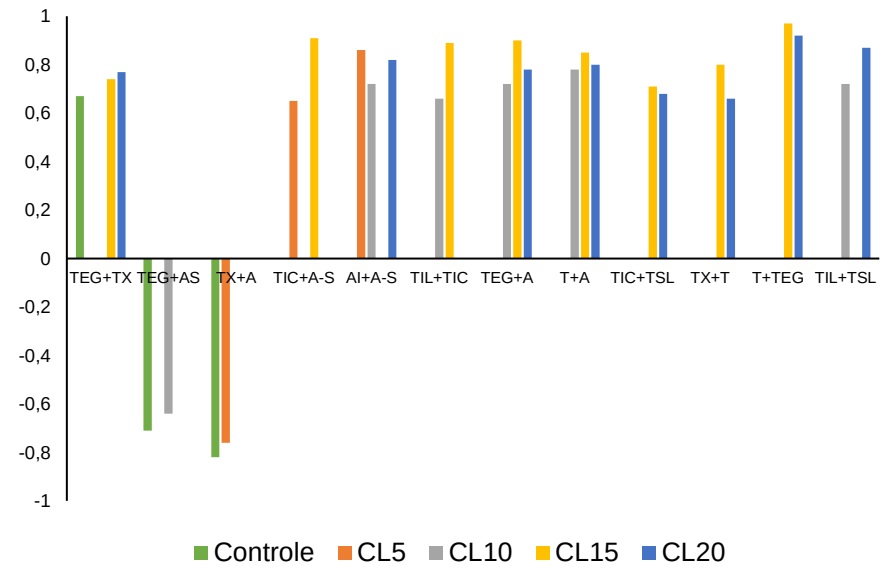
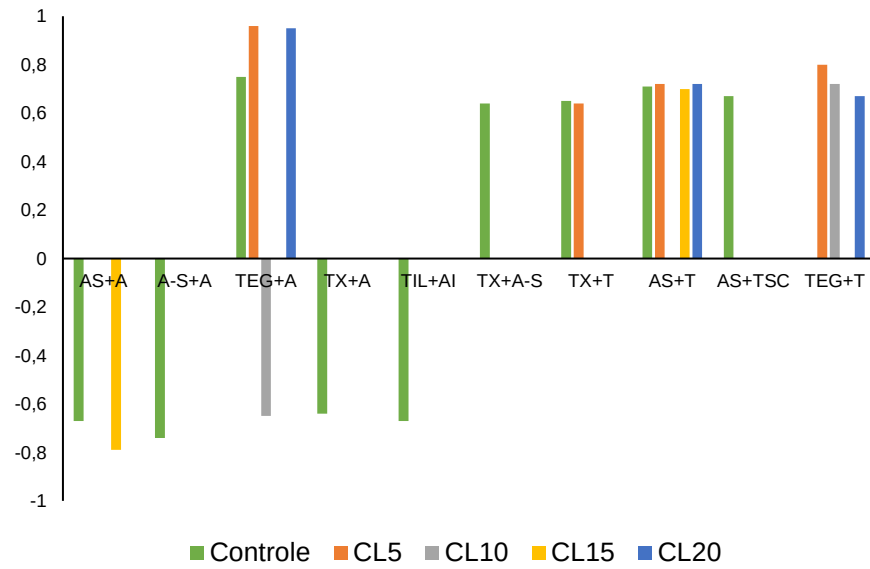
Fêmea											
Tratamentos	Tegumento	Peso corporal (mg)				Tamanhos das asas (mm)				Área da asa (mm)	
		Tórax	Abdome	Asas	Total	Anterior		Posterior		Anterior	Posterior
						Comprimento	Largura	Comprimento	Largura		
1° Geração											
CL ₅	131,81±0,03aA ¹	68,98±0,03aA	62,82±0,02aA	18,62±0,03aA	150,42±0,03aA	16,89±0,22bA	9,37±0,29bA	11,97±0,25bcB	9,06±0,28bB	57,63±22,25dC	69,54±23,64aA
CL ₁₀	108,05±0,03bA	49,56±0,02bcA	58,49±0,02abA	16,38±0,03aA	124,43±0,03bA	18,37±0,27aA	10,34±0,16aA	14,32±0,27aA	10,22±0,31aA	80,51±18,64aAB	62,52±23,00bA
CL ₁₅	78,50±0,4cB	35,87±0,03dB	42,63±0,03cB	5,31±0,01aA	83,81±0,04cC	17,16±0,35bA	9,09±0,32bB	12,70±0,31bA	10,38±0,29aAB	72,77±27,18bB	59,01±29,85bcB
CL ₂₀	86,96±0,03cA	42,93±0,02cdA	44,02±0,02cA	5,97±0,01aA	92,93±0,03cA	16,51±0,27bB	9,46±0,30bA	11,57±0,33cB	10,46±0,29aA	66,83±25,26cB	56,30±22,69cB
Controle	108,11±0,02bA	56,05±0,04bA	52,06±0,03bcB	14,87±0,02aA	122,98±0,02bA	19,03±0,33aA	10,77±0,38aA	14,22±0,24aA	10,27±0,33aA	81,59±19,25aAB	66,24±21,05bA
2° Geração											
CL ₅	87,79±0,00cA	44,28±0,01bB	43,51±0,03bB	7,81±0,01aA	95,60±0,03bC	17,50±0,16bA	9,83±0,23aA	12,57±0,17cAB	8,95±0,25cB	68,65±24,39bB	58,81±15,72bB
CL ₁₀	115,63±0,03abB	54,62±0,01aA	61,01±0,03aA	3,44±0,01aA	119,07±0,03aA	18,39±0,13aA	10,04±0,22aAB	13,47±0,18abB	10,32±0,14abA	84,42±8,08aA	66,46±6,43aA
CL ₁₅	101,35±0,03bcA	49,89±0,02abA	51,46±0,02abA	3,06±0,01aA	104,41±0,03abB	17,73±0,23abA	10,46±0,17aA	12,72±0,23bcA	9,77±0,23bcB	84,13±18,53aA	65,20±8,73aA
CL ₂₀	86,06±0,02cA	45,49±0,01abA	40,57±0,02bA	7,25±0,01aA	93,32±0,02bA	17,48±0,17bA	9,81±0,23aA	12,91±0,22bcA	10,36±0,15abA	82,11±7,71aA	64,67±9,92aA
Controle	117,32±0,00aA	52,90±0,00abAB	64,42±0,02aA	3,58±0,01aA	120,90±0,02aA	18,44±0,16aA	10,54±0,23aA	13,92±0,17aA	10,97±0,25aA	87,42±15,61aA	68,29±22,25aA
3° Geração											
CL ₅	98,18±0,03bA	47,14±0,03abB	51,04±0,02abB	16,20±0,03aA	114,38±0,04abB	17,48±0,28aA	9,54±0,25bA	13,10±0,23aB	9,51±0,20bA	76,75±11,05aA	55,79±10,53cB
CL ₁₀	86,14±0,03bB	39,39±0,02bB	46,75±0,02bB	24,84±0,01aA	110,99±0,03abA	17,39±0,22aB	9,86±0,16abB	13,11±0,15aA	11,00±0,17aA	78,92±20,01aB	65,08±16,44abA
CL ₁₅	114,24±0,03aA	53,80±0,02aA	60,44±0,02aA	13,91±0,01aA	128,15±0,03aA	16,85±0,16aA	9,49±0,16bA	12,62±0,23aC	10,45±0,15aA	75,24±15,76aB	62,70±21,31bAB
CL ₂₀	87,80±0,03bA	45,04±0,02abA	42,76±0,02bA	9,03±0,01aA	96,83±0,03bA	17,51±0,25aAB	10,40±0,24aA	13,01±0,15aA	10,58±0,31aB	79,72±18,88aA	68,62±14,62aA
Controle	92,25±0,02bB	46,11±0,01abC	46,14±0,02bB	38,32±0,03aA	130,57±0,03aA	17,19±0,18aB	9,95±0,17abB	12,57±0,23aA	11,07±0,15aB	74,36±16,52aB	60,50±22,97bA

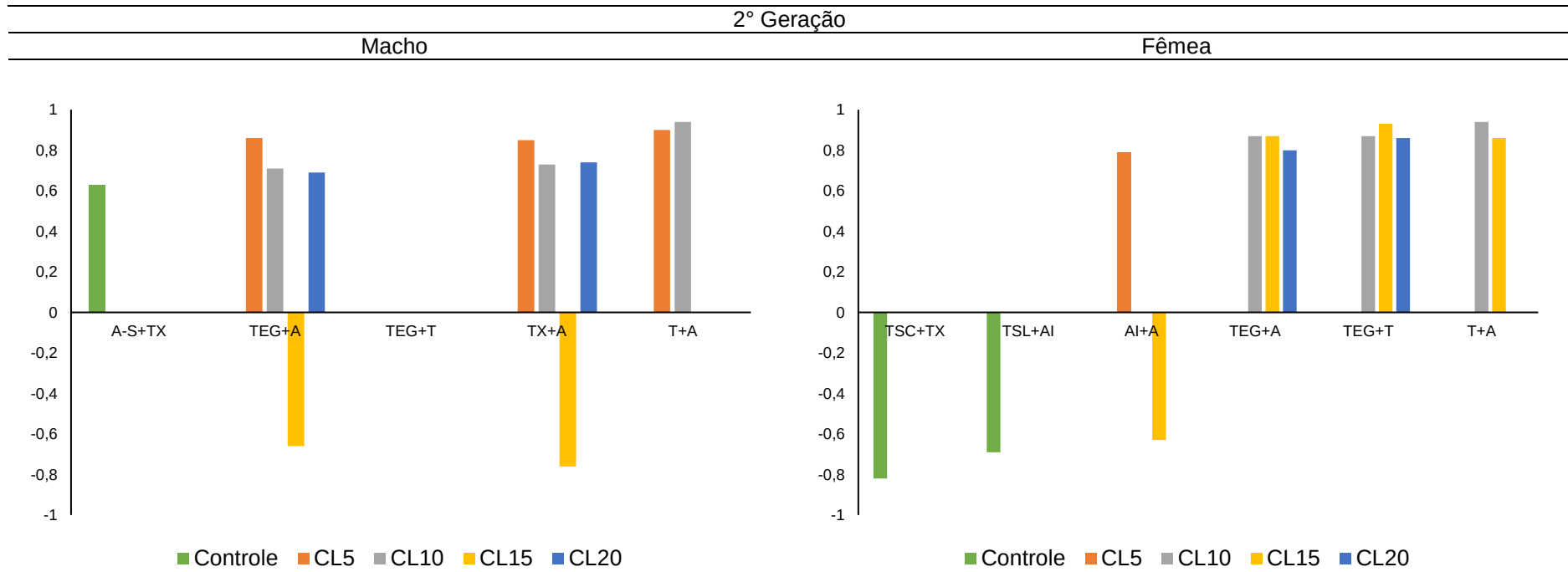
¹Média ± Erro padrão. ¹Médias seguidas pela mesma letra minúscula entre tratamentos e maiúsculas entre gerações não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P <0,05). N = 10 insetos avaliados

1° Geração

Macho

Fêmea





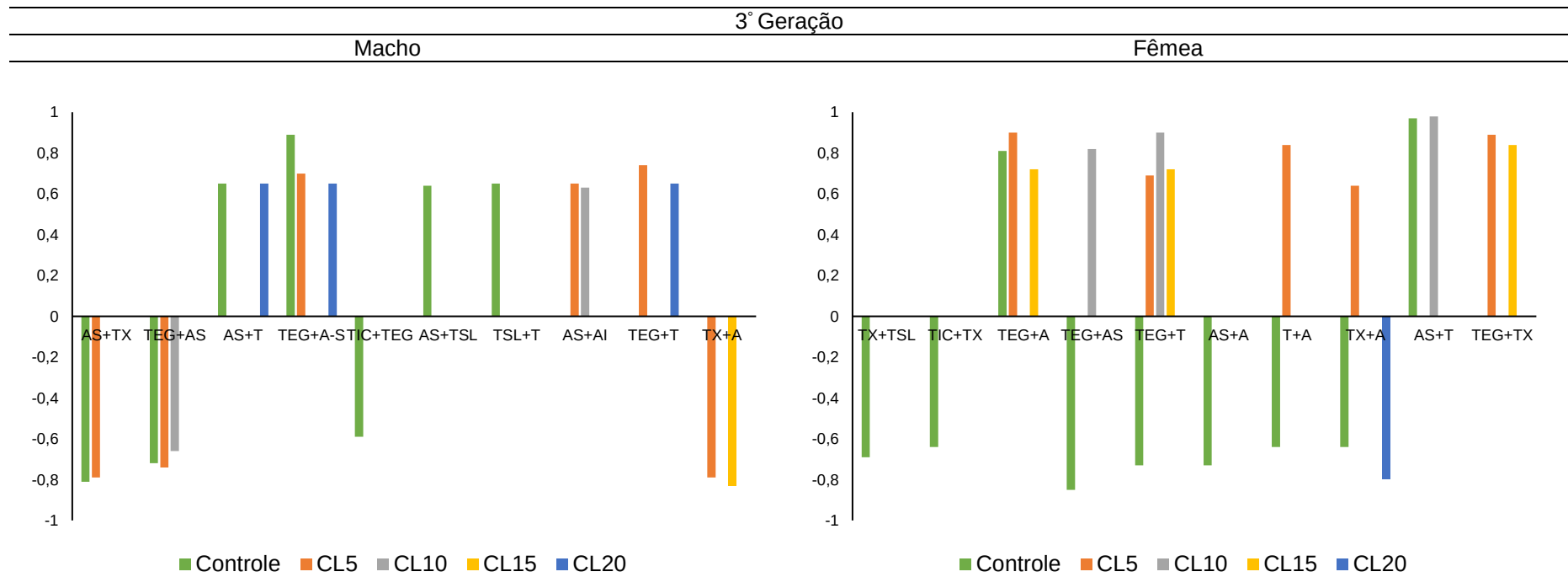


Figura 2. Correlação linear estratificada morfométrica de *Anticarsia gemmatilis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC ao longo de três gerações a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h. Tegumento (TEG), tórax (TX), abdome (A), asa (AS), asa superior (A-S), asa inferior (AI), adultos íntegros (T), tamanho superior comprimento (TSC), tamanho inferior comprimento (TIC), tamanho superior largura (TSL), tamanho inferior largura (TIL), área inferior (AI).

4. DISCUSSÃO

O efeito das subdoses do Dipel WP na morfometria de *A. gemmatilis* variam de acordo com a concentração do bioinseticida (Tanaka et al., 2012).

Essas variações observadas no peso do tegumento podem estar associadas a suscetibilidade diferencial entre os sexos expostos às subdoses do bioinseticida à base de *B. thuringiensis*, além das alterações fisiológicas que são refletidas na fase adulta (Retnakaran et al., 1983; Alix et al., 2001; Desneux et al., 2007; Sedaratian et al., 2013).

Os resultados evidenciam um maior peso torácico nos machos. Deve-se considerar o maior gasto energético destes para localizar e cortejar as fêmeas e portanto maior desenvolvimento dos músculos torácicos. A velocidade relativa do voo nos insetos está correlacionada com a massa torácica, pois nessa região concentra músculos fásicos, que comumente funcionam para mover apêndices na estrutura do exoesqueleto (Srygley e Chai, 1990; Batista, 1974; Gullan e Cranston, 2017).

Os músculos são organizados em unidade motoras inervadas de muitas maneiras podendo ser longos ou curtos. Músculos longos são capazes de produzir grande movimentação de alguns apêndices importantes como asas para localizar a fêmea já os músculos curtos produzem relativamente forças maiores utilizados por exemplo, em disputas intraespecífica pela fêmea ou interespecífica contra predadores (Batista, 1974; Gullan e Cranston, 2017).

Esse arranjo dos músculos dentro da caixa torácica dos insetos está relacionado diretamente com o peso pois quanto maior melhor o condicionamento físico da espécie para realizar diversas atividades (Srygley e Chai, 1990). Em condições de campo indivíduos que apresentam essas características morfométricas exibem por exemplo maior condicionamento biológico e frequência de cópulas (Mare e Corseuil, 2004).

O equilíbrio entre o tórax e o abdome devem ser considerados, pois estudos comprovam que existe uma correlação negativa entre o peso do tórax e do abdome. Devido ao peso da estrutura está interligado com a quantidade de reservas energéticas deve-se apresentar uma biomassa considerável para manutenção das atividades do corpo (Batista, 1974; Srygley e Chai, 1990; Gullan e Cranston, 2017).

Um exemplo é o voo pairado que os insetos apresentam e é um grande componente do custo energético (Srygley e Chai, 1990). Esse tipo de voo apresenta vantagens, pois permite o escapem de predadores, através de voos e erráticos onde devem ter altas velocidades (Marden e Chain, 1991; Howland, 1974).

Entre os tratamentos, CL₅ na 1ª geração e CL₁₀ na 2ª geração foram os que tiveram limiares inferiores em relação ao peso do tórax e abdome, considerados as proporções do corpo menores que as fêmeas. O tamanho corporal afeta significativamente a maioria dos caracteres fisiológicos ligados à sobrevivência e reprodução, sendo uma das características quantitativas mais importantes sujeita à evolução (Darwin, 1859; Schimidt-Nielsen, 1984, Roff, 1992, Stearns, 1992).

Indivíduos menores são, potencialmente, menos propensos em perpetuar sua prole devido a desvantagens competitivas em relação aos demais machos, além da menor aceitabilidade das fêmeas (Stearns, 1976; Borgia, 1979). Os resultados convergem com a hipótese da capacidade fisiológica dos insetos em definir padrões de medidas alométricas em regiões específicas do corpo.

Estudos de morfometria confirmam que as asas anteriores dos insetos apresentam uma medida alométrica importante na determinação do tamanho e forma das asas (Mare e Corseuil, 2004). Isso justifica a grande variação entre comprimento da asa anterior e posterior e a largura das asas anterior e posterior entre os tratamentos e a testemunha ao longo das três gerações. Com exceção ao comprimento da asa anterior na 3ª geração e a largura das asas anterior na 2ª geração nas fêmeas.

Esse fato pode ser atribuído a função que as asas anteriores desempenham na aerodinâmica e sua relação com a velocidade. Nas asas posteriores, a maior variabilidade observada entre os sexos podem ser conferido ao papel que elas exercem, funcionando como um aerofólio que regula a direção e a manobrabilidade do voo (Mare e Corseuil, 2004; Dudley, 2000).

Por mais que ocorra variações no peso corporal de cada parte avaliada, o peso do adulto íntegro macho da testemunha apresentou valores superiores em relação aos tratamentos. Nas fêmeas houve uma redução média geral de 10,49% em relação aos machos e, somente na 2ª e 3ª geração a testemunha apresentou valores superiores aos tratamentos.

Estudos demonstram que a escolha do tamanho do macho no processo de seleção sexual depende do tamanho da fêmea a ser cortejada (Jorge, 2007). Esta relação entre o peso de ambos os sexos pode influenciar a escolha da fêmea de acordo com o seu próprio tamanho (Andersson, 1994).

A escolha pela fêmea, neste caso, pode se dar de tal forma que cada fêmea tenha seu próprio tamanho ótimo de macho para copular. Esse tamanho ótimo seria o resultado de um *trade-off* entre as influências negativas que a fêmea tem com machos grandes sobre a fecundidade e as vantagens de machos grandes para o condicionamento biológico da prole (Clutton-Brock e Parker, 1992; Andersson, 1994; Jorge, 2007).

Por outro lado, os indivíduos que apresentaram tamanhos menores como CL₅ e CL₁₅ na 1ª geração, CL₅ e CL₁₀ na 2ª geração e CL₁₅ e CL₂₀ na 3ª geração podem não perpetuar sua prole, considerando que o maior tamanho corporal geralmente aumenta o sucesso no pareamento devido à competição intraespecífica (macho x macho) ou escolha pela fêmea (Clutton-Brock e Parker, 1992; Andersson, 1994).

As escolhas realizadas pelas fêmeas por machos maiores é comum nos insetos (Thornhill e Alcock, 1983; Choe e Crespi, 1997). Além de ser um papel importante no resultado da disputa intraespecífica e interespecífica (Thornhill e Alcock, 1983; Rasmussen, 1994). Machos que apresentam o peso corporal elevado geralmente têm vantagens em lutas com oponentes menores, o que repercute em maior frequência de cópulas (Rasmussen, 1994; Jorge, 2007).

A área das asas anterior e posterior dos machos na 1ª geração apresentou uma relação entre o aumento da subdose, aumentando a área das asas. Esse comportamento foi visto na 2ª e 3ª geração com exceção ao tratamento CL₂₀. Nas fêmeas o mesmo não ocorre, mas a partir da 2ª geração a área das asas anterior ficou mais estável não apresentando diferença significativa na 3ª geração. Em relação à asa posterior o fato ocorreu somente na 2ª geração.

A proporção da área das asas são influenciadas de acordo com o tamanho da caixa torácica, indivíduos que apresentam tamanho das asas maior, maior peso podem carregar, justificando os resultados do presente estudo. Além disso, essa proporção entre peso do tórax e tamanho das asas atinge a capacidade de um voo evasivo contra inimigos naturais (Marden e Chain, 1991).

A. gemmatalis vive em agroecossistemas abertos e realiza deslocamentos a longas distâncias, exige a área das asas relativamente maior (Mare e Corseuil, 2004). Estudos realizados monitorando populações de *A. gemmatalis* demonstrou que podem migrar grandes distâncias, chegando a atravessar estados inteiros nos EUA (Buschman et al., 1977).

Acredita-se que a espécie seja incapaz de sobreviver no inverno da região continental dos EUA. E em muitas ocasiões, populações do inseto-praga voam dezenas de quilômetros em busca de condições favoráveis para o desenvolvimento (Buschman et al., 1977; Mare e Corseuil, 2004).

Fluxos migratórios foram constatados entre o Brasil e EUA a partir de estudos de caracterização genética de populações de *A. gemmatalis* (Sosa-Gómez, 2004).

Os resultados do presente estudo demonstram a plasticidade fenotípica dos adultos de *A. gemmatalis* submetidas a subdoses do bioinseticida a base de *B. thuringiensis*. Acredita-se que devido a diferença da suscetibilidade entre os sexos, possivelmente, os machos apresentam uma plasticidade fenotípica mais acentuada que as fêmeas, uma vez que apresentaram menor variação nos parâmetros morfométricos (Gotthard e Nylin, 1995; Loh et al., 2008).

Ghalambor et al. (2007) afirmou que a plasticidade fenotípica pode diminuir a taxa de evolução, uma vez que, a maioria das variações do fenótipo é induzida por algum estresse (bioinseticida) e não hereditária (Ghalambor, 2007; Gibert et al., 2016; 2019). Esta observação sugere que os efeitos subletais precisam ser tomados em consideração e podem ser utilizado como uma ferramenta no manejo integrado de pragas (Bauce et al., 2006).

As maiores quantidades de correlações positivas nos machos e fêmeas adultos foram observadas na 1ª e 3ª geração. E os parâmetros abdome + tórax (A+TX) em machos, abdome + adultos íntegros (A+T), abdome + tegumento (A+TEG) em fêmeas e tegumento + adultos íntegros (TEG+T) em ambos os sexos repetiram ao longo das três gerações avaliadas. Isso demonstra a importância dos parâmetros por está intimamente correlacionados.

Estudos avaliando a morfometria de borboletas neotropicais evidenciaram correlações positivas entre a velocidade do voo e o peso do tórax, mas negativamente para o peso do abdome que apresentam a função de armazenamento de energia e dos órgãos reprodutivos (Srygley e Chai, 1990).

Acredita-se que a influência da distribuição do peso entre o tórax e abdome podem interferir nas medidas alométricas da espécie devido a exposição a subdose do bioinseticida a base de *B. thuringiensis* (Chai 1987; Sih, 1987; Chai e Srygley, 1990; Srygley e Chai, 1990). Isto, pode influenciar a ecologia e fisiologia da população e a organização da comunidade. Efeitos adicionais também podem ocorrer no tipo de defesa usado para evitar predadores, parasitoides, entomopatógenos, taxa de desenvolvimento e fecundidade do indivíduo (Srygley e Chai, 1990).

O estudo deixa evidente que o estresse nutricional causado pela utilização de subdose de *B. thuringiensis* influencia a morfometria dos adultos de *A. gemmatilis*.

5. CONCLUSÃO

A morfometria dos adultos de *A. gemmatilis* foi alterada de acordo com a subdose de *B. thuringiensis* com interferências maiores nas fêmeas adultos.

6. REFERÊNCIAS

Abreu JÁ, Rosa APSA, Gobbi P, Carvalho IF, Machado LL, Araújo MB, Mendes SM (2018) **Cultivos de inverno no agroecossistema de terras baixas do sul do Rio Grande do Sul como ponte verde para *Anticarsia gemmatalis* e *Helicoverpa armigera***. Pelotas: Embrapa Clima Temperado 27 p.

Alix A, Cortesero AM, Nénon JP, Anger JP (2001) Selectivity assessment of chlorfenvinphos reevaluated by including physiological and behavioral effects on an important beneficial insect. **Environmental Toxicology and Chemistry** 20:2530-2536. DOI: 10.1897/1551-5028(2001)020<2530:saocrb>2.0.co;2

Andersson M (1994) **Sexual selection**. Princeton: Princeton University Press.

Batista GC (1974) **Fisiologia dos insetos**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” 303p.

Bauce E, Carisey N, Dupont A (2006) Carry over effects of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* on *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) progeny under various stressful environmental conditions. **Agricultural and Forest Entomology** 8:63-76. DOI: 10.1111/j.1461-9555.2006.00283.x

Borgia G (1979) Sexual selection and the evolution of mating systems. In.: Blum AM, Blum NA (Eds.) **Sexual selection and reproductive competition in insects**. New York: Academic Press 45p.

Brand RJ, Pinnock DE, Jackson KJ, Milstead JE (1976) Viable Spore Count as an Index of Effective Dose of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 27:141-148. DOI: 10.1016/0022-2011(76)90139-7

Bueno AF, Carvalho GA, Santos AC, Sosa-Gómez DR, Silva DM (2017) Pesticide selectivity to natural enemies: challenges and constraints for research and field recommendation. **Ciência Rural** 47:1-10. DOI: 10.1590/0103-8478cr20160829

Buschman LL, Whitcomb WH, Neal TM, Mays DL (1977) Winter survival and hosts of the velvetbean caterpillar in Florida. **Florida Entomologist** 60:267-273. DOI: 10.2307/3493921

Butt BA, Cantu E (1962) **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 7p.

Cárcamo HA, Floate KD, Lee BL, Beres BL, Clarke FR (2008) Developmental instability in a stem-mimic sawfly: can fluctuating asymmetry detect plant host stress in model system? **Oecologia** 156:505-513. DOI: 10.1007/s00442-008-1009-y

Chai P (1987) **Patterns of prey selection by an insectivorous bird on butterflies in a tropical rainforest**. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - University of Texas at Austin, Texas.

Chai P, Srygley RB (1990) Predation and the flight, morphology, and temperature of Neotropical rainforest butterflies. **American Naturalist** 135:748-765.

Choe JC, Crespi BJ (1997) **Mating systems in insects and arachnids**. Cambridge: Cambridge University Press 34p.

Clutton-Brock TH, Parker GA (1992) Potential reproductive rates and the operation of sexual selection. **Quarterly Review of Biology** 67:437-456.

Cruz CD (2001) Programa GENES - Versão Windows. **Aplicativo computacional em Genética e Estatística**. Viçosa: Editora UFV 1:648.

Darwin C (1859) **The origin of species by means of natural selection**. London: John Murray 76p.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81-106. DOI: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440

Dudley R (2000) **The biomechanics of insect flight**. Princeton: Princeton University Press 476p.

Dudley R, Ellington CP (1990) Mechanics of forward flight in bumblebees. II. Quasi-steady lift and power requirements. **Journal of Experimental Biology** 148:53-88.

Ellington CP, Machin KE, Casey TM (1990). Oxygen consumption of bumblebees in forward flight. **Nature** 347:472-473. DOI: 10.1038/347472a0

Fairbairn DJ, Roff DA (1990) Genetic correlation among traits determining migratory tendency in the sand cricket *Gryllus firmus*. **Evolution** 44:1787-1795. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1990.tb05249.x

Fernandes FO, Abreu JA, Christ L, Rodrigues-Filho JA, Martins A and Afonso da Rosa APS (2017) Development of *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1791) in laboratory maize cultivars. **Pelotas: Embrapa Temperate Weather** 264:1-35.

Fernandes FO, Abreu JÁ, Christ LM, Rosa APSA (2018) Insecticides management used in soybean for the control of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae). **Journal of Agricultural Science** 10:223-230. DOI:10.5539/jas.v10n11p223

Ford BJ, Strayer JR, Reid J, Godfrey GL (1975) The literature of arthropods associated with soybeans. **Illinois: Natural History Survey** 92:1-21.

Fuller RC, Houle D (2002) Detecting genetic variation in developmental instability by artificial selection on fluctuating asymmetry. **Journal of Evolutionary Biology** 15:954-960. DOI: 10.1046/j.1420-9101.2002.00471.x

Ghalambor CK, McKay JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in

new environments. **Functional Ecology** 21:394-407. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x

Gibert P, Hill M, Pascual M, Plantamp C, Terblanche JS, Yassin A, Sgro CM (2016) *Drosophila* as models to understand the adaptive process during invasion. **Biological Invasions** 18:1089-1103. DOI: 10.1007/s10530-016-1087-4

Gibert, P, Debat V, Ghalambor CK (2019). Phenotypic plasticity, global change, and the speed of adaptive evolution. **Current Opinion in Insect Science** 35:34-40.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Kohl J, Marrone P, Morin L, Stewart A (2012) Have biopesticides come of age? **Trends in Biotechnology**, 30:250-258. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.01.003

Gorür G, Lomônaco C, Mackenzie A (2005) Phenotypic plasticity in host plant specialization in *Aphis fabae*. **Ecological Entomology** 30:657-664. DOI: 10.1111/j.0307-6946.2005.00742.x

Gotthard K, Nylin S (1995) Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. **Oikos** 74:3-17. DOI: 10.2307/3545669

Gould SJ, Jhnsoton RF (1972) Geographic variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** 3:457-498. DOI: 10.1146/annurev.es.03.110172.002325

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487-497. DOI: 10.1093/jee/69.4.487

Guedes RNC, Cutler GC (2014) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70:690-697. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3669>

Gullan PJ, Cranston PS (2017) **Insetos: Fundamentos da entomologia**. São Paulo: Roca 436p.

Haase S, McCarthy CB, Ferrelli ML, Pidre ML, Sciocco-Cap A, Romanowski V, (2015). Development of a recombination system for the generation of occlusion positive genetically modified *Anticarsia gemmatalis* multiple Nucleopolyhedrovirus. **Viruses** 7:1599-1612. DOI: 10.3390/v7041599

Howland HC (1974) Optimal strategies for predator avoidance: The relative importance of speed and maneuverability. **Journal of Theoretical Biology** 47:333-350. DOI: 10.1016/0022-5193(74)90202-1

Jorge AS (2007) **Comportamento de corte e cópula e papel do tamanho e simetria na seleção sexual de *Dydercus maurus* Distant, 1901 (Hemiptera: Pirrhocoridae)**. 37f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – UFU, Uberlândia.

Lacey LA (2017) **Insect and Mite Pests. From Theory to Practice**. Amsterdam, Academic Press 484p.

Leung B, Fobes MR, Houle D (2000) Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits. **The American Naturalist** 155:101-115. DOI: 10.2307/3079019

Loh R, David JR, Debat V, Bitner-Mathia BC (2008) Adaptation to different climates results in divergent phenotypic plasticity of wing size and shape in an invasive drosophilid. **Journal of Genetics** 87:209-217. DOI: 10.1007/s12041-008-0034-2

Marden JH, Chai P (1991) Aerial predation and butterfly design: How palatability, mimicry, and the need for evasive flight constrain mass allocation. **The American Naturalist** 137:15-36.

Mare RAD, Corseuil E (2004) Morfometria de Papilioninae (Lepidoptera, Papilionidae) ocorrentes em quatro localidades do Rio Grande do Sul, Brasil. II. Relação entre partes do corpo, aerodinâmica de voo e tipos de asas. **Revista Brasileira de Zoologia** 21:833–846. DOI: 10.1590/S0101-81752004000400018

Melo M, Brandão A, Lima J (2018) Relação entre sociedade e natureza e desdobramentos do agronegócio na contemporaneidade. **Revista Geográfica Acadêmica** 12:36-49.

Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gomez DR, Roggia S, Hoffman-Campo CB, Pomari AF, Corso IC, Yano SAC (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In.: Hoffmann-Campo CB, Ferreira BSC, Moscardi F (Eds.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília: Embrapa p. 213-334.

Neff NA, Marcus LF (1980) **A survey of multivariate methods for systematic**. New York: Privately Published 234p.

Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L (2016) Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Public Health** 18:1-8. DOI: 10.3389/fpubh.2016.00148

Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizza SMR (2014). Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection** 56:50-54. DOI: 10.1016/0167-8809(83)90038-5

Palmer JO, Dingle H (1989) Responses of selection on flight behaviour in a migratory population of milkweed bug (*Oncopeltus fasciatus*). **Evolution** 43:1805-1808. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1989.tb02629.x

Panizzi AR, Oliveira LJ, Silva JJ (2004) Survivorship, larval development and pupal weight of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on potential leguminous host plants. **Neotropical Entomology** 33:563-567. DOI: 10.1590/S1519-566X2004000500004

Parra JRP (2014) Biological Control in Brazil: An overview. **Scientia Agricola**, 71:420-429. DOI: 10.1590/0103-9016-2014-0167

Pashley DP, Johnson SJ (1986) Genetic population structure of migratory moths: the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America** 79:26-29. DOI: 10.1093/aesa/79.1.26

Rasmussen JL (1994) The influence of horn and body size on the reproductive behavior of the horned rainbow scarab beetle *Phanaeus difformis* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Insect Behavior** 7:67-82.

Reis SF (1988) Morfometria e estatística multivariada em biologia evolutiva. **Revista Brasileira de Zoologia** 5:35-68. DOI: 10.1590/S0101-81751988000400005

Retnakaran A, Lauzon H, Fast PG (1983) *Bacillus thuringiensis* induced anorexia in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 34:233-239. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1983.tb03327.x

Roff DA (1992) **The evolution of life histories**. New York: Chapman & Hall.

Sanchis V (2010) From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for sustainable development** 31:217-231. DOI: 10.1051/agro/2010027

Sas University (2014) **SAS® 9.4 Statements**. Third Edition SAS Instit. Inc., USA.

Scheiner SM (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annual Review of Entomology** 24:35-68. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.24.1.35

Schellhorn NA, Bianchi FJJA, Hsu CL (2014) Movement of Entomophagous Arthropods in Agricultural Landscapes: Links to Pest Suppression. **Annual Review of Entomology** 59:559-581. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-161952

Schmidt-Nielsen K (1984) **Scaling: Why is animal size so importante?** Cambridge: Cambridge University Press 256p.

Sedaratian A, Fathipour Y, Talaei-Hassanloui R, Jurat-Fuentes JL (2013) Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology** 137:540-549. DOI: 10.1111/jen.12030

Sih A (1987) Predators and prey lifestyles: An evolutionary and ecological overview. In.: Kerfoot WC, Sih A (Eds.) **Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities**. Hanover: University Press of New England p. 203-224.

Silva-Filho G, Bailez OE, Viana-Bailez AM (2007) Dimorfismo sexual do gorgulho-da-goiaba *Conotrachelus psidii* Marshall (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology** 36:520-524. DOI: 10.1590/S1519-566X2007000400006

Sosa-Gómez DR (2004) Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology** 27:378-384. DOI: 10.1590/S1415-47572004000300012

Souza WO, Rosado-Neto GH, Moreira MAB, Zarbin, PHG (2004) Description of the larva and pupa of the papaw borer weevil *Pseudopiazurus papayanus* (Marshall) (Coleoptera, Curculionidae, Piazurini). **Revista Brasileira de Entomologia** 48:331-334. DOI: 10.1590/S0085-56262004000300007

Specht A, Paula-Moraes SV, Sosa-Gómez DR (2015) Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia** 59:343-345. DOI: 10.1016/j.rbe.2015.09.002

Srygley RB, Chai P (1990) Flight morphology of Neotropical butterflies: palatability and distribution of mass to the thorax and abdomen. **Oecologia** 84:491-499. DOI: 10.1007/BF00328165

Stearns SC (1976) Life-history tactics: A review of the ideas. **Quarterly Review of Biology** 51:3-47.

Stearns SC (1992) **The evolution of life histories**. Oxford: University Press.

Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R (2012) Response of midgut epithelial cells to Cry1Aa is toxin-dependent and depends on the interplay between toxic action and the host apoptotic response. **FEBS Journal** 279:1071-1079. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08499.x

Thornhill R, Alcock J (1983) **The evolution of insect mating systems**. Cambridge: Harvard University Press 56p.

Van-Rie J, Ferré J (2000) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In.: Charles JF Delecluse A, Nielsen-Leroux (Eds.) **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications p. 219-237.

Vaz LAL, Tavares MT, Lomônaco C (2004) Diversidade e tamanho de Himenópteros parasitoides de *Brevicoryne brassicae* L. e *Aphis nerii* Boyer de Foscolombe (Hemiptera: Aphididae). **Netropical Entomology** 33:225-230. DOI: 10.1590/S1519-566X2004000200013

Wang XC, Jhonson MW, Dane KM, Yokoyama VY (2009) Larger olive fruit size reduces the efficiency of *Pstytalia concolor* as a parasitoid of the olive fruit fly. **Biology Control** 49:45-51. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.01.004

Weis-Foght (1956) **Biology and physics of locust flight. II. Flight performance of the desert locust (*Schistocerca gregaria*)**. London: Philosophical Transactions of the Royal Society of London p. 459-510.

CAPÍTULO 5 - EFEITO SUBLETAL DE *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Anticarsia gemmatalis* HÜNBER, 1818

RESUMO - *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) possui um conjunto de enzimas digestivas, que a permite ser polífaga. As atividades dessas enzimas podem ser inibidas por diversos fatores como os bioinseticidas que prejudicam utilizados no seu controle. Bioinseticidas a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 são utilizados no controle de *A. gemmatalis* e faltam estudos que avaliem a atividade proteolítica dos insetos sobreviventes. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais do *B. thuringiensis* na atividade proteolítica de *A. gemmatalis* sobreviventes a subdoses do bioinseticidas Dipel SC submetidas a toxina Cry1Ac. A partir da estimativa da curva resposta pela análise de Probit as concentrações letais CL₅, CL₂₅ e controle foram escolhidas para serem utilizadas como tratamentos no bioensaio. O teste de proteólise da protóxina Cry1Ac foi realizada para verificar a degradação pelo suco intestinal dos insetos sobreviventes submetidos ao bioinseticidas Dipel SC. Os intestinos das lagartas sobreviventes de 2º e 5º instar submetidas aos tratamentos (CL₅, CL₂₅ e a testemunha) foram retirados, centrifugados e o suco intestinal acondicionado em eppendorf no freezer -80°C. O ensaio de proteólise foi realizado em duplicata para cada tratamento (CL₅, CL₂₅ e controle). As amostras de que foram incubadas a 30°C a 100 rpm sendo coletados 15 µl em diferentes intervalos de tempo de ativação da protóxina (0, 60, 180 minutos). As alíquotas correspondentes a cada tratamento dos diferentes intervalos de tempo foram transferidas para novos tubos de e identificados, contendo tampão qual de amostra utilizado em preparações para gel SDS-PAGE, adicionado B-mercaptoetanol. As lagartas do tratamento CL₅ apresentaram aumento na atividade enzimática após 60 minutos em relação ao tratamento CL₂₅ e ao controle. A protóxina Cry1Ac foi ativada pelas enzimas presentes no suco do intestino de *A. gemmatalis* em ambos os tratamentos e lagartas de 2º instar apresentaram uma quantidade maior de protoxina a ser ativada de acordo com o perfil proteolítico em relação as de 5º instar.

Palavras-chave: lagarta da soja, enzima digestiva, mesêntero, células epiteliais, protóxina, bactéria entomopatogênica.

CHAPTER 5 - SUBLETHAL EFFECT OF *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1915 ON THE PROTEOLYTIC ACTIVITY OF *Anticarsia gemmatalis* HÜNBER, 1818

ABSTRACT - *Anticarsia gemmatalis* Hünber, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) has a set of digestive enzymes, which allows the ability to be polyphagous. The activities of these enzymes can be inhibited by several factors such as bioinsecticides that end up harming the development of the species. Bioinsecticides based on *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 are used in the control of *A. gemmatalis* and studies that evaluate the proteolytic activity of insects surviving underdoses are lacking. The aim of this study was to evaluate the sublethal effects of *B. thuringiensis* on the proteolytic activity of *A. gemmatalis* surviving underdoses of the bioinsecticides Dipel SC submitted to Cry1Ac toxin. From the estimate of the response curve by the Probit analysis, the sublethal concentrations CL₅, CL₂₅ and control were chosen to be used as treatments in the bioassay. The proteolysis test of the Cry1Ac protein was performed to verify the degradation by the intestinal juice of the surviving insects submitted to the bioinsecticides Dipel SC. The intestines of the surviving 2nd and 5th instar caterpillars submitted to treatments (CL₅, CL₂₅ and the control) were removed, centrifuged and the intestinal juice was packed in eppendorf at -80 ° C. The proteolysis assay was performed in duplicate for each treatment (CL₅, CL₂₅ and control). The samples were incubated at 30°C at 100 rpm and 15 µl were collected at different time intervals of protein activation (0, 60, 180 minutes). The aliquots corresponding to each treatment of the different time intervals were transferred to new duly identified tubes, containing sample buffer used in preparations for SDS-PAGE gel, added with B-mercaptoethanol. The CL₅ treatment showed an increase in enzyme activity after 60 minutes compared to the CL₂₅ treatment and the control. The protein Cry1Ac is activated by enzymes present in the intestine juice of *A. gemmatalis* in both treatments and 2nd instar caterpillars showed a higher amount of protoxin to be activated according to the proteolytic profile in relation to the 5th instar.

Keywords: soybean caterpillar, digestive enzyme, mesenteric, epithelial cells, protein, entomopathogenic bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Anticarsia gemmatalis Hubner, 1818 (Lepidoptera: Erebidæ) é uma espécie-praga desfolhadora com ocorrência em todo o continente americano (Haase et al., 2015; Fernandes et al., 2018). Esse lepidóptero possui um conjunto de enzimas digestivas como serina, tripsina, quiotripsina, elastase e carboxipeptidase, que a ser polífaga (Purcell et al., 1992; Patankar et al., 2001). As atividades dessas enzimas podem ser inibidas por diversos fatores como os bioinseticidas e/ou plantas transgênicas prejudicando o crescimento e o desenvolvimento da espécie *Sitotroga cerealella* Olivier, 1789 (Borzoui et al., 2017).

Bacillus thuringiensis Berliner, 1915 é uma bactéria utilizada no controle de *A. gemmatalis* na forma de bioinseticida ou plantas transgênicas (Polanczyk et al., 2017). A característica de toxidade da bactéria está ligada a produção de inclusões cristalinas denominadas δ endotoxinas (proteína Cry) (Yamamoto e Dean, 2000). As δ endotoxinas são formadas por protoxinas que depois de ingeridas, são solubilizadas para que sejam ativadas e iniciar o processo de intoxicação (Jurat-Fuentes e Crickmore, 2017).

A protoxina é proteolizada por enzimas que se encontram no mesêntero, denominadas proteases que tem a função de ativação da toxina. A toxina ativada, conecta a receptores no epitélio intestinal do mesêntero permite a, ocorrência da formação de poros devido a ligação de alta afinidade, proporcionando o extravasamento do conteúdo intestinal para a hemocoele, o que eventualmente leva à morte do inseto (Schünemann et al., 2014; Bravo et al., 2017).

A patogenicidade da bactéria é comprovada em *A. gemmatalis* (Bernardi et al., 2012; Fiuza et al., 2012; Sosa-Gomez e Miranda, 2012; Fiuza et al., 2013). Mas faltam estudos que avaliem a atividade proteolítica dos insetos sobreviventes a subdoses do *B. thuringiensis*. O inseto-praga sobrevivente a subdose apresenta efeitos no condicionamento biológico, e pode causar uma diversidade de respostas (Van-Rie e Fereé, 2000; Guedes e Culter, 2013).

O intestino dos insetos tem a principal função de digestão e absorção de alimentos, por outro lado, a regeneração e imunologia por meio de barreiras físicas impedindo a disseminação de patógenos ingeridos ou resposta fisiológica

à desintoxicação são essenciais para a sobrevivência (Lehane e Billingsley, 2012; Silva et al., 2016; Terra et al., 2018).

Fisiologicamente, os insetos têm a capacidade de alterar o tipo e o nível da atividade proteolítica como uma estratégia de defesa (Harsulkar et al., 1999; Brandt et al., 2004). Estudos avaliando o efeito do *B. thuringiensis* na atividade proteolítica de *Helicoverpa armigera* Hübner, 1808 comprovam que os danos causados pelo patógeno as células epiteliais do intestino médio não foi tóxico a espécie e qualquer dano eventualmente causado foi compensado. O entendimento da atividade proteolítica de *A. gemmatilis* é indispensável porque auxilia no entendimento dos possíveis efeitos subletais podendo ser utilizado como uma ferramenta no manejo integrado de pragas (Fathipour et al., 2019).

As formulações contendo toxinas de *B. thuringiensis* foram usadas quarenta anos como agentes de controle e ainda enfrentam desafios. Em colocar de forma correta o produto biologicamente ativo no alvo, em quantidade necessária, de forma econômica e com o mínimo de desperdício. Condições ambientais e a tecnologia de aplicação adotada são os principais fatores que impedem a administração de uma dose letal a uma população de inseto-praga (Sedaratian et al., 2013).

Desta forma, o manejo integrado da *A. gemmatilis* baseado no controle com *B. thuringiensis* constitui um importante método, porém, o uso dessa ferramenta deve ser bem planejado, e para isso, é importante conhecer a interação patógeno-hospedeiro (Sedaratian et al., 2013; De Bortoli et al., 2013; Zago et al., 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais do *B. thuringiensis* na atividade proteolítica de *A. gemmatilis* sobreviventes a subdoses do bioinseticidas Dipel SC submetidas a toxina Cry1Ac.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Criação dos insetos

A população de *A. gemmatilis* foi obtida no Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ - Piracicaba) e a criação de insetos foi estabelecida no Laboratório de Controle Microbiano de

Artrópodes Pragas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP – Jaboticabal), mantidos em dieta artificial (Greene et al., 1976).

Para o estabelecimento da criação foram separados 2000 ovos de *A. gemmatilis*, acondicionados em placas de Petri de (9 cm Ø), com papel filtro umedecido com água deionizada na parte inferior e na parte superior filme plástico (PVC) perfurado com um alfinete. A criação dos insetos foi mantido em sala climatizada sobre as condições de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

2.2. Concentrações letais (CL) para o bioinseticida Dipel SC

As suspensões do bioinseticida à base de *B. thuringiensis* (Dipel SC) foram realizadas a partir da quantificação do número de esporos, por meio de contagem direta ao microscópio com auxílio de câmara de Neubauer (Brand et al., 1976). Para estimar a curva resposta pela análise de Probit seis concentrações foram definidas, micropipetando 200 μL na superfície da dieta artificial ($4,8 \text{ cm}^3$) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø). Para cada concentração subletal 10 lagartas de 2º instar de *A. gemmatilis* foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por concentração.

No lote correspondente a testemunha foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados. A partir da estimativa da curva resposta pela análise de Probit as concentrações subletais CL_5 e CL_{25} ($2,7 \times 10^4$; $1,7 \times 10^5$ esporos. mL^{-1}) foram escolhidas para serem utilizadas como tratamentos no bioensaio (Sedaratian et al., 2013).

Para a montagem do bioensaio uma alíquota de 200 μL dos tratamentos CL_5 e CL_{25} foi aplicada na superfície da dieta artificial ($4,8 \text{ cm}^3$) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø). Para cada tratamento 10 lagartas de 2º instar foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por tratamento. No lote correspondente a testemunha foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

2.3. Expressão e extração de Cry1Ac

Os genes de *cry1Ac* (número de acesso AAA22331) estão no vetor recombinante pB03 clonados em linhagens de *E. coli* XL-1 Blue (Plant Research International, Wageningen, Holanda). As linhagens recombinantes foram acondicionadas a -80°C no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada (LGBBA). A expressão das protóxina Cry1Ac foi realizada utilizando o protocolo descrito por Herrero et al. (2004).

Para isso, foram inoculados 10 µL do clone em placa de Petri (90 x 15 mm) em meio de cultura Terrific Broth TB (12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 2,31 g de KH₂PO₄, 12,54 g de K₂HPO₄, 4 mL de glicerol, 15 g.L⁻¹ de ágar, q.s.p. 1000 mL), glicose 2% (v/v) e ampicilina (100 µg.mL⁻¹), e incubada por 24 h a 37°C.

Após o período de crescimento, uma colônia isolada foi selecionada e transferida para um pré-inóculo em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 20 mL de meio TB, glicose 2% (v/v) e ampicilina (10 µg.mL⁻¹) e incubadas a 37°C, sob agitação constante de 200 rpm por 16 h. Após a agitação, 2,5 mL desse cultivo foi realocado para um inóculo em Erlenmeyer com capacidade de 1 L em 250 mL de meio TB e ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e incubado durante 60 h, a 28°C sob agitação constante de 200 rpm.

As células cultivadas foram coletadas por centrifugação (Beckman®, Maryland, Estados Unidos) durante 8 min a 5.930 xg. Para o início da lise celular foram adicionados 3 mL de tampão de lise (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 5 mM de EDTA e 100 mM de NaCl pH 8) para cada grama de “pellet” e submetido a agitação em aparelho tipo ‘vortex’.

Em seguida, foi adicionado 800 µg de lisozima para cada grama de “pellet” e incubadas a temperatura ambiente por 20 min. Adicionou-se 4 mg de desoxicolato de sódio para cada grama de “pellet” e incubado por 10 min a 37°C. Logo após, adicionou-se 40 µL (de uma solução 1 mg. mL⁻¹ de DNase I) para cada grama de “pellet” seguida de incubação por 30 min a 37°C sob agitação.

O material foi centrifugado a 39.200 xg por 10 min a 4°C (Beckman®, Maryland, Estados Unidos). Após a lise celular, o material foi lavado com tampão de lavagem (20 mM Tris/HCl pH7,5 contendo 1M de NaCl e 1% de Triton X 100), misturado por agitação em aparelho do tipo ‘vortex’ e centrifugado três vezes a

39.200 xg por 10 min a 4°C. Uma solução de PBS (salina tamponada com fosfato - 10mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,4 dissolvidos em 0,8% (p/v) NaCl) foi utilizada como passo final nesta etapa para lavagem, seguido de agitação em vortex e centrifugado três vezes a 39.200 xg por 10 min a 4°C.

Para solubilização da protóxina, foi adicionado 10 mL (50 mM NaHCO₃, pH 10,0 contendo 100 mM NaCl + 10 mM DTT) por grama de “pellet” de tampão de solubilização seguida de incubação por 2 h a 37°C a 200 rpm em posição horizontal. Depois foi realizada a centrifugação por 15 min a 39.200 xg a 4°C. O sobrenadante contendo a protoxina solubilizada foi transferido para tubos de 2 mL e estocado a -20°C até sua utilização. A expressão das protóquinas foi verificada em SDS-PAGE 12%, segundo Laemmli (1970). Foram quantificadas com o *software* ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Suécia).

2.4. Concentração letal (CL₅₀) para protóxina Cry1Ac

Para estimar a curva resposta pela análise de Probit seis concentrações (0,2 ug, 0,4 ug, 0,6 ug, 0,8 ug e 1,0 ug) foram definidas, micropipetando 200 µL na superfície da dieta artificial (4,8 cm³) previamente distribuída em copos de polietileno (3,5 cm Ø). Para cada concentração subletal 10 lagartas de 2° instar de *A. gemmatalis* foram distribuídas em 10 repetições, totalizando 100 lagartas por concentração. No lote correspondente a testemunha foi aplicada água deionizada, em volume equivalente aos lotes tratados. As avaliações foram realizadas após cinco dias.

2.5. Avaliação da atividade proteolítica

O teste de proteólise da protóxina Cry1Ac foi realizado para verificar a degradação pelo suco intestinal do inseto em estudo. Os intestinos das lagartas sobreviventes de *A. gemmatalis* no 2° e 5° instar submetidas aos tratamentos (CL₅, CL₂₅ e a testemunha) foram retirados e lavados superficialmente com tampão MET (300 nM Manitol, 5 mM EGTA, 20 mM Tris). Os mesmos foram acondicionados em número de 10 para cada tubo de 1,5 mL e centrifugados a 6000 Xg por 10 minutos. O sobrenadante subsequente, foi transferido para um

novo tubo de 2,0 mL e, imediatamente congelado em nitrogênio líquido para o armazenamento a -80°C com o intuito de manter a atividade de serina proteases (enzimas proteolíticas) dos extratos gástricos (Lemes et al., 2012).

O ensaio de proteólise foi realizado em duplicata para cada tratamento (CL₅, CL₂₅ e controle), onde o suco intestinal foi diluído na proporção de 1:4 (Tris HCl 20 mM pH 8,6). Após, tubos de centrifuga contendo protoxinas e o suco intestinal diluído foram preparados na proporção de 1:1 (15 µl de protoxina com 15 µl de suco intestinal diluído 1:4) (Lemes et al., 2012).

As amostras foram incubadas a 30°C a 100 rpm sendo coletados 15 µL em diferentes intervalos de tempo de ativação da protóxina (0, 60, 180 minutos). As alíquotas correspondentes a cada tratamento dos diferentes intervalos de tempo foram transferidas para novos tubos devidamente identificados, contendo 5 µl de tampão de amostra utilizado em preparações para gel SDS-PAGE 12%, adicionado B-mercaptoetanol.

A reação foi interrompida pelo aquecimento das amostras a 99°C por 10 minutos sendo resfriadas por meio do acondicionamento em gelo por 5 minutos, logo após colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C em ultrafreezer. Os resultados dos bioensaios de proteólise foi visualizado, a partir da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).

2.6. Eletroforese SDS-PAGE 12% e quantificação das protóxinas

As amostras foram visualizadas em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%), segundo Laemmli (1970), em equipamento para eletroforese vertical Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, EUA). A solução “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” foi utilizada (Fermentas, Vilnius, Lituania) como marcador de massa molecular.

As soluções foram preparadas contendo 20 µl do sobrenadante de cada protóxina e 10 µl de tampão de amostra (62 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% Glicerol; 5% β-mercaptanol e 0,02% de Azul de bromofenol). Posteriormente, aquecidas por 5 minutos a 100°C e uma alíquota de 15 µl aplicada em gel de poliacrilamida. Os géis de empilhamento e de separação foram preparados a 5% e 12% de acrilamida, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Reagentes utilizados para a confecção dos géis de SDS-PAGE 12%.

Reagentes	Gel de empilhamento (mL)	Gel de separação (mL)
Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)	0,500	0,000
Tris-HCl (2,25 M pH 8,8)	0,000	0,800
Acrilamida - Bis (30:0,08%)	0,330	1,660
SDS (4 %)	0,125	0,115
TEMED (tetramethylethylenediamine)	0,006	0,015
Persulfato de amônio (10%)	0,020	0,065
Água	1,105	2,430

A cuba vertical Bio-Rad, modelo Miniprotean® II Cell foi preenchida com tampão de eletrodo (0,192 M glicina; 0,025 M Tris e 0,1% SDS) e submetida a corrente constante de 60 mA, 200 V por 90 min. Após, as bandas polipeptídicas serem detectadas por meio da coloração do gel com *Coomassie-Brilliant Blue* 0,02% (metanol 30%; ácido acético 10%; sulfato cúprico 0,1% e água) por 15 minutos e descorado com sucessivas lavagens de solução descorante (metanol 10%; ácido acético 10% e água). Os géis foram analisados e fotodocumentados em aparelho scanner (HP Scanjet 3570c).

Para a quantificação das protóquinas, géis de poliacrilamida foram preparados contendo cinco diferentes concentrações de BSA (0,88; 0,44; 0,22; 0,11 e 0,05 mg.mL⁻¹) e a respectiva protóquinas. Estas foram quantificadas com o auxílio do software Bionumerics, sendo o padrão para quantificação da concentração final a soroalbumina bovina (BSA).

Os géis foram digitalizados e os valores de BSA foram inseridos ao programa como concentrações conhecidas. Com base nestes valores o software gerou uma curva de densitometria das concentrações e estimou a concentração de cada amostra aplicada. Os valores de quantificação obtidos por essa metodologia foram apresentados em ng.µl⁻¹.

2.7. Delineamento experimental

Os dados de concentração-mortalidade dos testes de virulência foram submetidos a análise de regressão de Probit e obtidos os valores de concentração letal (CL₅ e CL₂₅) para o bioinseticida Dipel SC e a concentração letal CL₅₀ da protóquina Cry1Ac, utilizando o software SAS (P > 95%) (SAS University, 2014).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) no bioensaio de proteólise com comparações quantitativas para a taxa de ativação ao longo dos diferentes tempos de incubação (0, 60, 180 minutos) para determinar a quantidade de protóxina inativada (89 kDa) bem como a porção de protóxina ativa (62 kDa) através de parâmetros de densidade usando o software ImageQuant TL 8.

Foi realizada análise de regressão linear de Pearson para investigar a relação entre a quantidade de protóxina e tempo da proteólise no software R (R Core Team, 2013).

3. RESULTADOS

A técnica SDS-PAGE 12% confirmou a presença de uma banda com peso molecular de aproximadamente 135 kDa correspondente a protóxina Cry1Ac na canaleta 7 e 8, respectivamente (Figura 1).

Após a corrida eletroforética, as bandas referentes a protóxina foram quantificadas para uso no bioensaio. A concentração letal (CL_{50}) obtida para a população em estudo de *A. gemmatalis* foi $0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$ (IC 95%).

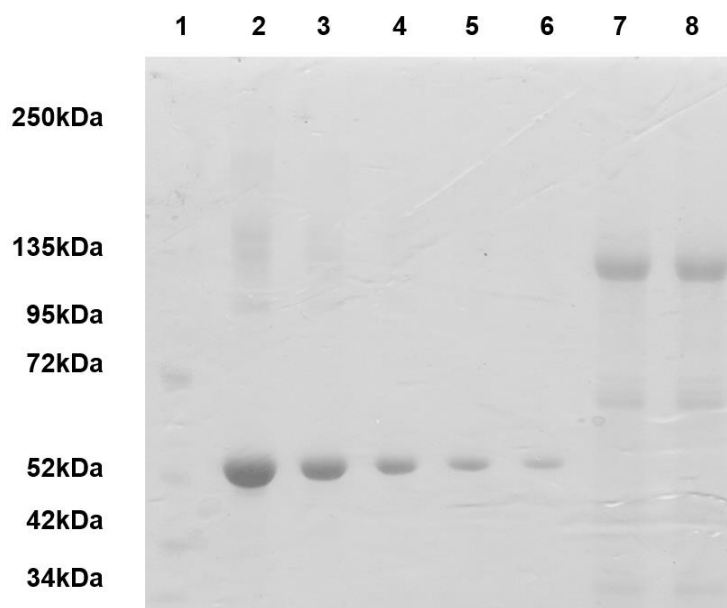
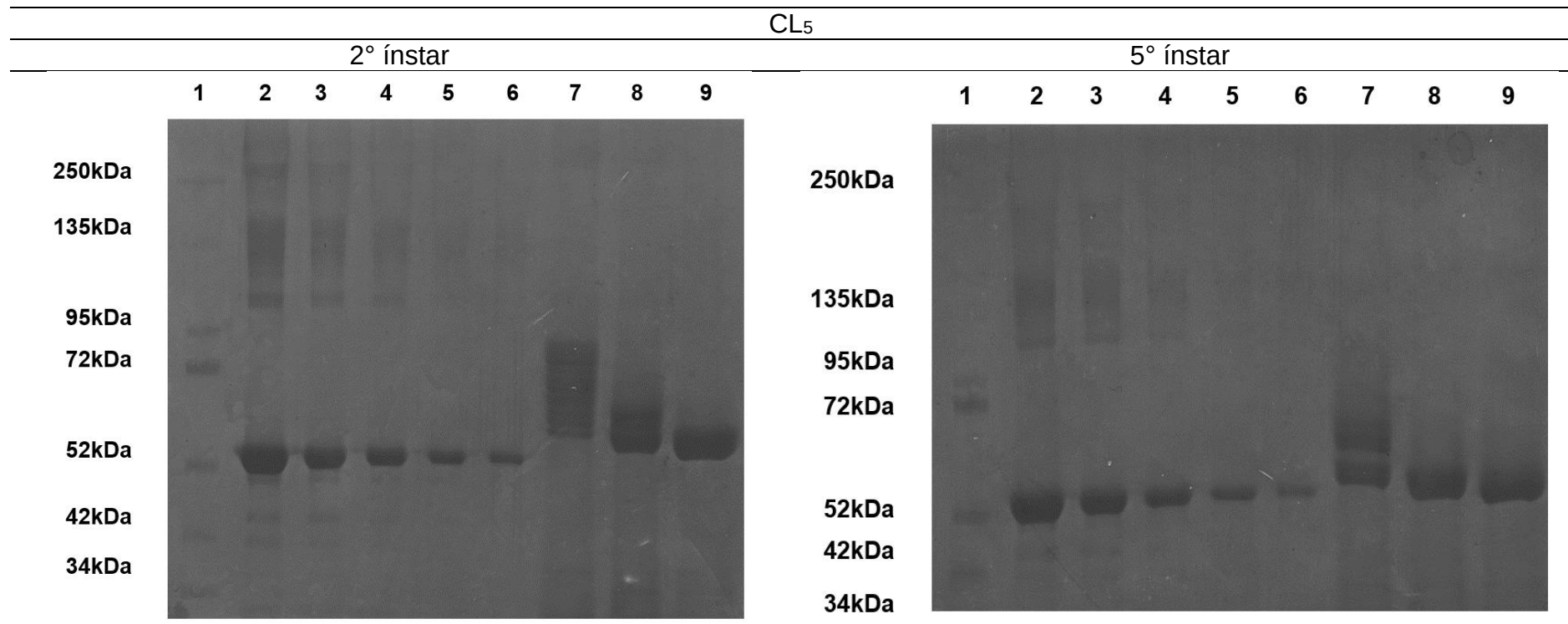


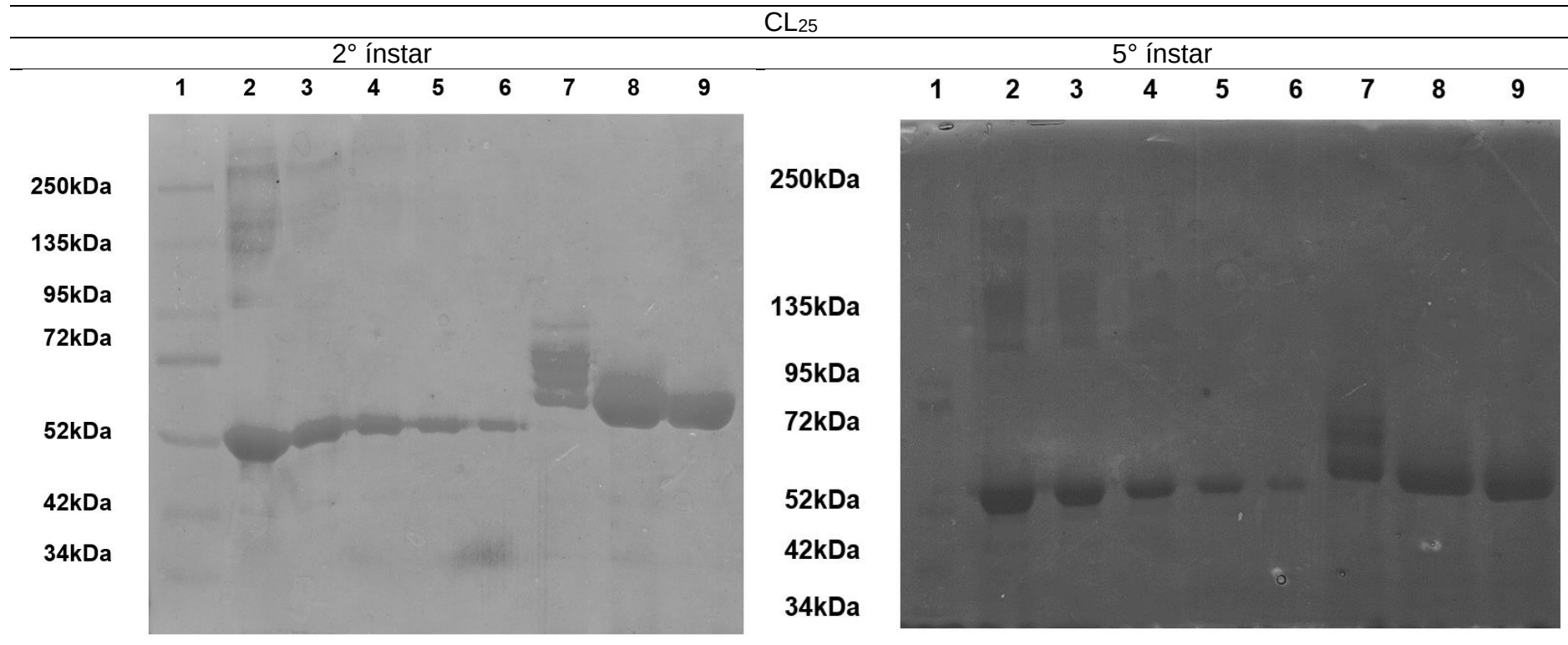
Figura 1. Eletroforograma evidenciando a expressão da protoxina Cry1Ac em gel SDS-PAGE 12%. Nas canaletas: 1- Marcador “Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder” (Fermentas); 2. BSA 0,88 mg.mL⁻¹, 3. BSA 0,44 mg.mL⁻¹, 4. BSA 0,22 mg.mL⁻¹, 5. BSA 0,11 mg.mL⁻¹, 6. BSA 0,05 mg.mL⁻¹, 7. e 8. Protoxina Cry1Ac com peso molecular de 135kDa.

A protoxina Cry1Ac começou a ser ativada ao entrar em contato com o suco intestinal a zero minutos em todos os tratamentos e instares avaliados.

Nos tratamentos CL₅ e CL₂₅, as lagartas de 2° instar no tempo zero apresentaram maior quantidade de protoxina sendo ativa do que em lagartas do 5° instar. A protoxina foi digerida passando de 135 kDa para um intervalo de 80 kDa a 52 kDa para lagartas de 2° instar e de 69 kDa a 55 kDa para lagartas de 5° instar. Após 60 minutos a proteólise ainda apresentavam protoxina sendo ativada em toxina com intervalos de aproximadamente 62-55 kDa a 59-55 kDa para lagartas de 2° e 5° instar em ambos os tratamentos. Ao final da avaliação, 180 minutos, os intervalos foram de 59-52 kDa a 57-52 kDa para lagartas de 2° e 5° instar tanto para CL₅ quanto CL₂₅, respectivamente (Figura 2).

A testemunha apresentou atividade proteolítica diferente, com intervalo superior que os tratamentos CL₅ e CL₂₅, com intervalos de aproximadamente 100-62 kDa zero minutos, 62-52 kDa 60 minutos e 62-52 kDa 180 minutos em lagartas de 2° instar e 62-55 kDa zero minutos, 62-52 kDa 60 minutos e 62-52 kDa 180 minutos em lagartas de 5° instar (Figura 2).





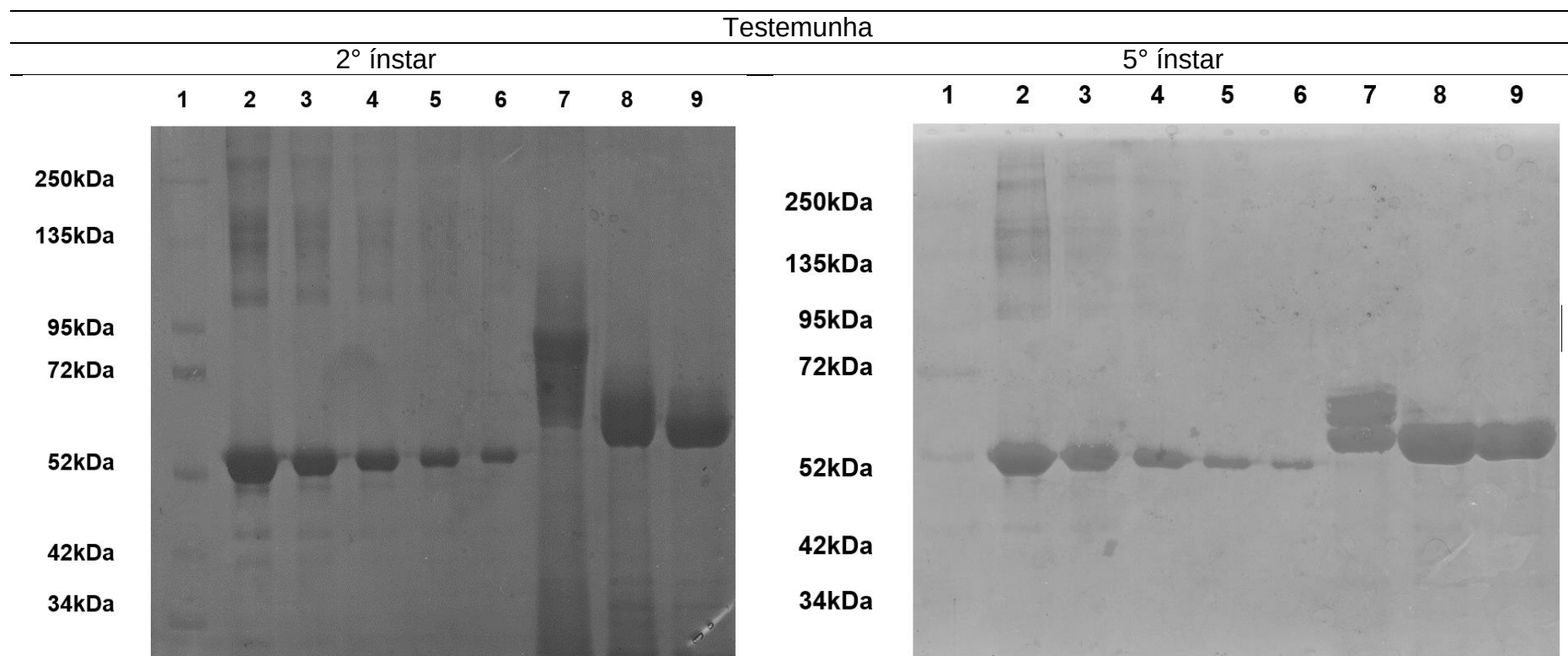


Figura 2. Eletroforograma evidenciando a atividade proteolítica (suco intestinal + Cry1Ac) de *Anticarsia gemmatalis* nos tempos 0, 60 e 180 minutos em gel SDS-PAGE 12%. Nas canaletas: 1. Marcador "Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder" (Fermentas); 2. BSA 0,88 mg.mL⁻¹, 3. BSA 0,44 mg.mL⁻¹, 4. BSA 0,22 mg.mL⁻¹, 5. BSA 0,11 mg.mL⁻¹, 6. BSA 0,05 mg.mL⁻¹, 7. Zero hora, 8. Uma hora, 9. Três horas.

O tratamento CL₅ apresentou uma curva mais acentuada em relação aos demais tratamentos no 2º instar. Com aumento na atividade proteolítica e ponto de intersecção em lagartas de 2º instar após 60 minutos. A correlação de Pearson demonstrou que as lagartas de 2º instar do tratamento CL₅ apresentaram uma forte correlação entre as variáveis proteína (ug) e tempo (minutos) (Coeficiente de Pearson = 0,98 e relação positiva expressa pela equação $Y = 0,2428571 + 0,0071726X$ (Significância do teste de Regressão: $p = 0,000167$) (Figura 3).

O mesmo não foi observado em lagartas de 5º instar para o tratamento CL₅ com uma inclinação da curva menos acentuada entre proteína e tempo. Forte correlação entre as variáveis (Coeficiente de Pearson = 0,88) foi observado expressa pela equação $Y = 0,519286 + 0,002113X$ (Significância do teste de Regressão: $p = 0,01843$) (Figura 3).

No tratamento CL₂₅ as lagartas mais jovens apresentaram menor capacidade proteolítica em relação a atividade das lagartas que estavam no final do estágio de desenvolvimento ao longo dos 180 minutos avaliados. As lagartas de 2º instar não apresentaram correlação entre as variáveis ($p > 0,05$), diferentemente das lagartas de 5º instar que obteve uma correlação positiva (Coeficiente de Pearson = 0,82) e a regressão linear expressa pela equação $Y = 0,505714 + 0,002095X$ (Significância do teste de Regressão: $p = 0,04547$). (Figura 3).

A testemunha demonstrou maior atividade proteolítica inicial em lagartas de 2º instar, comparativamente com as de 5º instar. No entanto, após alguns minutos as lagartas de 5º instar obteve um ponto de intersecção que acabou ultrapassando as lagartas de 2º instar, mantendo-se superior ao longo de toda avaliação. Na testemunha, tanto em lagartas de 2º instar quanto em 5º instar não apresentaram correlação entre as variáveis avaliadas ($p > 0,05$) (Figura 3).

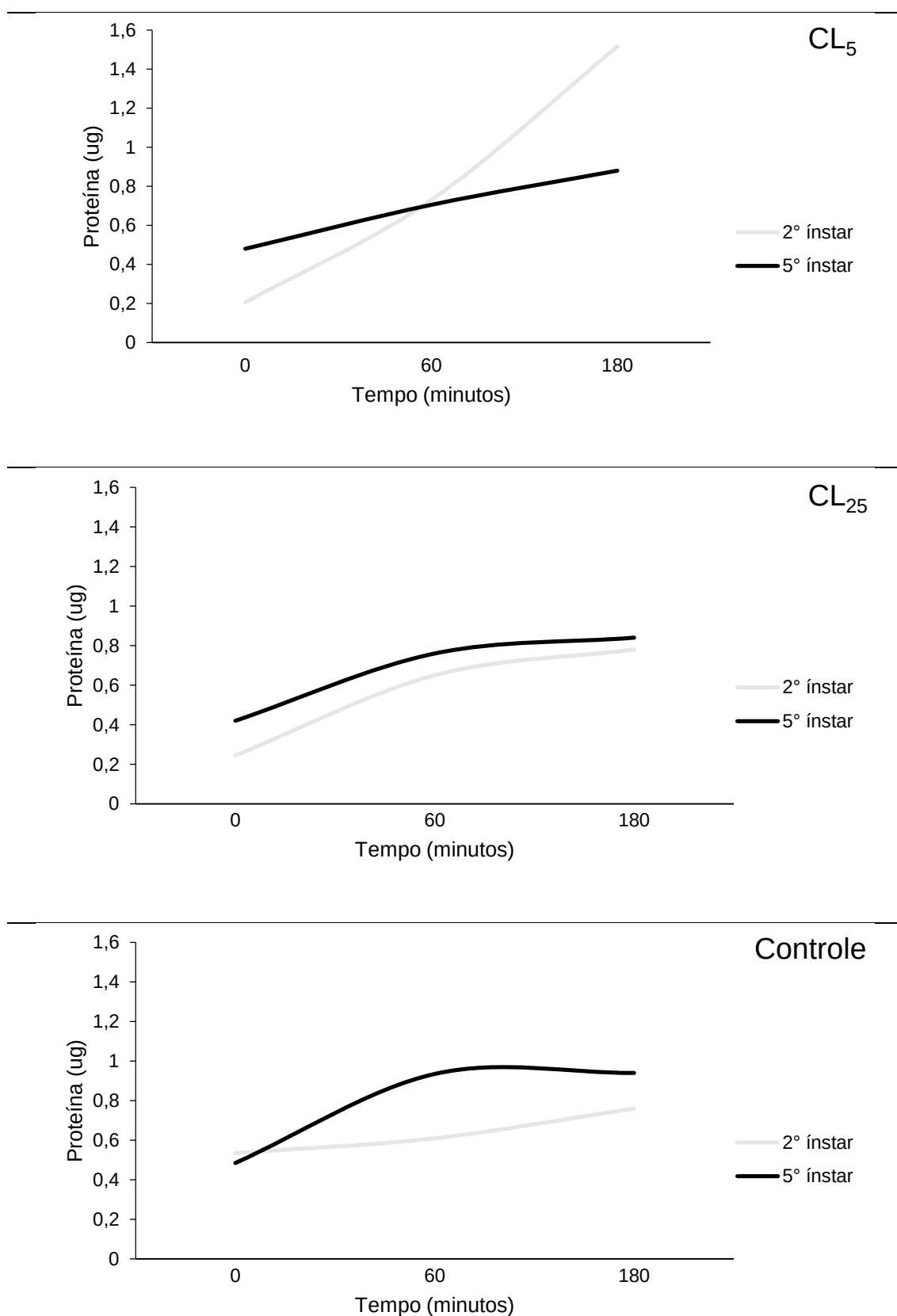


Figura 3. Correlação de Person (Cry1Ac (ug) x Tempo (minutos)) no 2° e 5° ínstar de *Anticarsia gemmatalis* submetidos a doses subletais do bioinseticida Dipel SC a $25 \pm 1^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ UR e fotoperíodo L12: D12 h.

4. DISCUSSÃO

O perfil e expressão da protóxina Cry1Ac encontrada, corrobora com outros estudos determinando a massa molecular de 130 kDa a 135 kDa (Lightwood et al., 2000; Bravo et al., 2007).

Em estudos com a proteína Cry1Ac purificada, verificou-se que a toxina foi extremamente ativa para *A. gemmatalis* com uma concentração letal (CL₅₀) de 0,23 ug.mL⁻¹ (IC 95%) (Bernardi et al., 2012).

A efetividade da toxina foi observada também para outras espécies-praga como *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (CL₅₀ 3,72 ug.mL⁻¹ (IC 95%)) e *Heliothis virescens* Fabricius, 1777 (CL₅₀ 0,021 ug.mL⁻¹ (IC 95%)) que demonstram o espectro de ação a lepidópteros praga que atacam culturas de importância econômica. Em geral, *A. gemmatalis* é altamente suscetível as proteínas Cry1 de *B. thurigiensis* (Bobrowski et al., 2002; Bernardi et al., 2012).

A variação na proporção da toxina pode ser explicada por uma série de fatores ligados ao modo de ação da bactéria, relação de como foram criadas as lagartas, oscilações que ocorre naturalmente na suscetibilidade das populações, tempo de exposição e se as populações são de laboratório ou campo (Dulmage et al., 1978; Luttrell et al., 1999; Wirth et al., 2004; Ali et al., 2006; Blanco et al., 2009).

O perfil e expressão da atividade proteolítica demonstrou que lagartas de 2º instar apresentaram uma quantidade menor de protoxina a ser ativada pelas enzimas do suco intestinal de *A. gemmatalis*, com exceção ao tratamento CL₅. O mesmo não foi observado em lagartas de 5º instar para os tratamentos e em relação ao tempo avaliado. Essa alteração na atividade proteolítica demonstra, que pelo fato, das lagartas serem maiores apresentam um balanço de enzimas digestivas diferente, ou até mesmo, na suscetibilidade entre os instares atribuído a idade do inseto (Huang et al., 1999; Rahman et al., 2012).

Estudos comprovam que ao longo do desenvolvimento do inseto-praga ocorre alteração ou diminuição na quantidade de receptores que, conseqüentemente, significa menor atividade toxica da proteína (Lorence et al., 1997; Schwartz et al., 1997; Huang et al., 1999; Bravo et al., 2004; Pardo-Lopez et al., 2006; Rahman et al., 2012; Gómez et al., 2015).

Os resultados de digestão *in vitro* observados por meio da técnica SDS-PAGE mostraram que as enzimas do intestino médio do inseto-praga em estudo são capazes de ativar Cry1Ac, mas com diferença no perfil proteolítico entre os tratamentos. A maioria das cepas utilizadas para o controle de lepidópteros praga produzem protoxinas compostos de 130 kDa a 140 kDa. Após a ingestão do *B. thuringiensis* pelas larvas, o suco intestinal entrar em contato com a protoxina. Essa protoxina é degradada e o subproduto gerado pela proteólise é a toxina ativa com massas de 55 kDa a 77 kDa (Whiteley e Schnepf, 1986). Esses valores, é devido as proteínas proteolíticas terem a capacidade de remover a metade do terminal C da protoxina (Nagamatsu et al., 1984).

A verificação da atividade proteolítica no suco do intestino de *A. gemmatilis* é importante, devido está envolvido com a ativação da protoxina em toxina, que após esse processo ocorre a ligação das toxinas aos receptores do intestino, promovendo a formação de poros e morte do inseto (Lemes et al., 2014).

O desafio atual é preservar o nível de suscetibilidade de *A. gemmatilis* a proteína Cry1Ac devido a grandes áreas de soja com o genes da toxina no Brasil. Estudos demonstram que a sucessão de cultivos de algodão e soja expõe populações de *H. virescens* à intensa pressão de seleção a toxina Cry1Ac, o qual apresentou razão de resistência > 10.000 vezes, após 19 gerações de pressão de seleção em laboratório com Cry1Ac incorporada em dieta artificial (Gould et al., 1995).

Em adição, a capacidade de lepidópteros praga evoluírem resistência a toxinas Cry foi reportada para linhagens de laboratório de *Spodoptera exigua* Hübner, 1808 e *Spodoptera littoralis* Boisduval, 1833 a Cry1Ac (Moar et al., 1995; Muller-Cohn et al., 1996) e a campo para *Spodoptera frugiperda* Smith, 1797 a Cry1F (Storer et al., 2012).

O monitoramento desta proteína para que não seja utilizada em subdose é uma parte importante dos programas de manejo integrado de pragas, e devem ser implementados em campo para garantir eficácia do método. No entanto, deve-se conhecer a interação patógeno-hospedeiro para traçar estratégias que prologue a viabilidade do *B. thuringiensis*. Assim, a atividade de toxinas Cry pode ser melhorada por meio da adição de inibidores de serina protease, quitinases, toxinas Cyt, fragmento do receptor caderina contendo um sítio de ligação da

toxina e principalmente uma proteína Vip, a qual tem sítio de ligação diferente das Cry, auxiliando no manejo da resistência da espécie (Pardo-López et al., 2009; Lemes et al., 2014).

Estudos avaliando a atividade proteolítica do intestino médio de *H. virescens* de uma linhagem suscetível e resistente revelou que ambas as populações apresentam a capacidade de ativar a protoxina. Mas somente a população resistente teve a capacidade de degradar a toxina testada (Forcada et al., 1996; 1999). Esses resultados não foram observados no presente estudo por meio da técnica SDS-PAGE.

As correlações lineares de Pearson demonstraram que o tratamento CL₅ foi positivo em ambos os instares avaliados, diferentemente, do tratamento CL₂₅ que foi somente em lagartas de 5º instar. Os insetos polípagos como *A. gemmatilis*, apresentam diversos mecanismos de defesa, e alterações fisiológicas que podem ocorrer para que atinjam o desenvolvimento biológico. Essas alterações fisiológicas ocorrem quando a produção de enzimas digestivas são comprometidas, alteram a composição das enzimas proteolíticas (Harsulkar et al., 1999; Brand et al., 2004).

Diferenças na curva de ativação da protoxina foram observadas no tratamento CL₅ em lagartas de 2º instar, com aumento considerável na inclinação da curva após 60 minutos. Os insetos que estão submetidos a estresses ambientais, como por exemplo, expostos a subdose de bioinseticidas capazes de digerir e, subsequentemente, produzir energia. Podem mudar o tipo e o nível da atividade das enzimas digestivas como uma nova estratégia de sobrevivência (Brand et al., 2004). Ou até mesmo, devido a destruição de algumas partes das células do intestino médio causado pela ingestão da proteína toxica, há um aumento do nível de enzimas digestivas produzidas por células saudáveis (Broadway e Duffey, 1986; Fathipour et al., 2019).

Essas evidências podem ter ocorrido no tratamento CL₅ em lagartas de 2º instar, no entanto, é evidente que após 60 minutos houve um aumento na atividade proteolítica da espécie. Possivelmente, devido ter ocorrido alterações na atividade das enzimas proteolíticas, o subproduto gerado após 60 minutos pode ter contribuído na alteração do pH, ou até mesmo, gerado um catalizador que favoreceu o aumento na atividade enzimática, justificando a diferença

observada na curva de ativação da toxina (Brand et al., 2004; García-Robles et al., 2012; Fathipour et al., 2019).

Contudo, os resultados do presente estudo incentivam investigações mais aprofundadas nas enzimas digestivas de *A. gemmatalis*, realizações em ensaios de competência com a proteína Cry1Ac por meio da técnica de BBMV (“Brush Border Membrane Vesicles”) e avaliações ao longo das gerações para melhor compreensão da interação patógeno-hospedeiro.

5. CONCLUSÃO

A proteína Cry1Ac é ativada pelas enzimas presentes no suco do intestino de *A. gemmatalis* em ambos os tratamentos, com aumento sua atividade proteolítica no 2º ínstar do tratamento CL₅ após 60 minutos.

6. REFERÊNCIAS

- Ali MI, Luttrell RG, Young SY (2006) Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal Economic Entomology** 99:164-175. DOI: 10.1093/jee/99.1.164
- Bernardi O, Albernaz KC, Valicente FH, Omoto C (2011) Resistência de inseto-praga à plantas geneticamente modificadas. In.: Borém A, Almeida GD (Eds.) **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 179-204.
- Bernardi O, Malvestiti GS, Dourado PM, Oliveira WS, Martinelli S, Berger U, Head GP, Omoto C (2012). Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 × MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 68:1083-1091. DOI: 10.1002/ps.3271
- Blanco CA, Gould F, Vega-Aquino P, Jurat-Fuentes JL, Perera OP, Abel CA (2009) Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. **Journal Economic Entomology** 102:1599-1606. DOI: 10.1603/029.102.0426
- Bobrowski VL, Pasquali G, Bodanese-Zanettini MH, Pinto LMN, Fiuza LM (2002) Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control** 25:129-135. DOI: 10.1016/S1049-9644(02)00055-5
- Borzoui E, Nouri-Ganbalani G, Naseri B (2017) In vitro and in vivo effects of α -amylase inhibitor from *Avena sativa* seeds on life history and physiological characteristics of *Sitotroga cerealella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Insect Science**, 17:1-7. DOI: 10.1093/jisesa/iex088
- Brand RJ, Pinnock DE, Jackson KJ, Milstead JE (1976) Viable spore count as an index of effective dose of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 27:141-148. DOI: 10.1016/0022-2011(76)90139-7
- Brandt SL, Coudron TA, Habibi J, Brown GR, Ilagan OM, Wagner RM, Wright MK, Backus EA, Huesing JE (2004) Interaction of two *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with the digestive system of *Lygus hesperus*. **Current Microbiology** 48:1-9. DOI: 10.1007/s00284-003-4056-y
- Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** 49:423-435. DOI: 10.1016/j.toxicon.2006.11.022
- Bravo A, Gomez I, Conde J, Sanchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberon M (2004) 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** 1667:38-46. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.08.013

Bravo A, Pacheco S, Gómez I, Garcia-Gómez B, Onofre J, Soberón M (2017) Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action In: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N. (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*: Characterization and use in the field of biocontrol**. London: Springer 1:53-66. DOI: 10.1007/978-3-319-56678-8

Broadway RM, Duffey SS (1986) Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology** 32:827-833. DOI: 10.1016/0022-1910(86)90097-1

De Bortoli SA, Polanczyk RA, Vacari AM, De Bortoli CP, Duarte RT (2013) *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae): tactics for integrated pest management in Brassicaceae. In.: Soloneski S, Larramendy M. (Eds.) **Weed and pest control – Conventional and new challenges**. Croatia: InTech p. 31-52.

Dulmage HT, Graham HM, Martinez E (1978) Interactions between the tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and the α -endotoxin produced by the HD-1 isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*: relationship between length of exposure to the toxin and survival. **Journal Invertebrate Pathology** 32:40-50.

Fathipour Y, Sedaratian A, Bagheri A, Talaei-Hassanlouei (2019) Increased food utilization indices and decreased proteolytic activity in *Helicoverpa armigera* larvae fed sublethal *Bacillus thuringiensis*-treated diet. **Physiological Entomology** 1-9. DOI: 10.1111/phen.12288

Fernandes FO, Abreu JÁ, Christ LM, Rosa APSA (2018) Insecticides management used in soybean for the control of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae). **Journal of Agricultural Science** 10:223-230. DOI: 10.5539/jas.v10n11p223

Fiuza LM, Knaak N, Silva, RFP, Henriques JAP (2013) Receptors and Lethal Effect of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins to the *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera, Noctuidae). **Microbiology** 2013:1-7. DOI: 10.1155/2013/940284

Fiuza LM, Schünemann R, Pinto LMN, Zanettini MHB (2012) Two new Brazilian isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Biology** 72:363-369. DOI: 10.1590/s1519-69842012000200018

Forcada C, Alcácer E, Garcerá MD, Tato A, Martínez R (1999) Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: Proteolytic and sem study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 42:51-63. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(199909)42:1<51::AID-ARCH6>3.0.CO;2-6

Forcada C, Alcicer E, Garceri MD, Martinez R (1996) Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Archives of Insect Biochemistry and**

Physiology 31:257-272. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:3<257::AID-ARCH2>3.0.CO;2-V

García-Robles I, Ochoa-Campuzano C, Sánchez J, Contreras E, Real, MD, Rausell C (2012) Functional significance of membrane associated proteolysis in the toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin against Colorado potato beetle. **Toxicon** 60:1063-1071. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.07.012

Gómez I, Flores B, Bravo A, Soberon M (2015) *Bacillus thuringiensis* Cry1AbMod toxin counters tolerance associated with low cadherin expression but not that associated with low alkaline phosphatase expression in *Manduca sexta*. **Peptides** 68:130-133. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.08.012

Gould F, Anderson A, Reynolds AL, Bungarner L, Moar W (1995) Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology** 88:1545-1559. DOI: 10.1093/jee/88.6.1545

Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology** 69:487-497. DOI: 10.1093/jee/69.4.487

Guedes RNC, Cutler GC (2013) Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. **Pest Management Science** 70:690-697. DOI: 10.1002/ps.3669

Haase S, Sciocco-Cap A, Romanowski V (2015) Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. **Viruses** 7:2230-2267. DOI: 10.3390/v7052230

Harsulkar AM, Giri AP, Patankar AG, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK, Deshpande VD (1999) Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of gut proteinases and larval growth of *Helicoverpa armigera*. **Plant Physiology** 121:497-506. DOI: 10.1104/pp.121.2.497

Herrero S, Gonzalez-Cabrera J, Ferré J, Bakker PL, De Maagd R (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domain II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. **Biochemical Journal** 384:507–513. DOI: 10.1042/BJ20041094

Huang F, Buschman LL, Higgins RA (1999) Susceptibility of different instars of european corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to diet containing *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology** 92:547-550. DOI: 10.1093/jee/92.3.547

Jurat-Fuentes J, Crickmore N (2017) Specificity determinants for Cry insecticidal proteins: Insights from their mode of action. **Journal of Invertebrate Pathology** 142:5-10. DOI: 10.1016/j.jip.2016.07.018

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685. DOI: 10.1038/227680a0

Lehane M, Billingsley P (2012) **Biology of the Insect Midgut**. Springer Science & Business Media 342p.

Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes AO, Ferré J, Lemos MVF, Desiderio JA (2014) Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Plos One** 9:e107196. DOI: 10.1371/journal.pone.0107196

Lightwood DJ, Ellar DJ, Jarrett P (2000) Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac delta-endotoxin. **Applied Environmental Microbiology** 66:5174-5181. DOI: 10.1128/aem.66.12.5174-5181.2000

Lorence A, Darszon A, Bravo A (1997) Aminopeptidase dependent pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin on *Trichoplusia ni* membranes. **FEBS Letters**, v. 414, p. 303–307, 1997. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01014-4

Luttrell RG, Wan L, Knighten K (1999) Variation in susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal Economic Entomology** 92:21-32. DOI: 10.1093/jee/92.1.21

Moar WJ, Pusztai-Carey M, Van-Faassen H, Bosch D, Frutos R, Rang C, Luo K, Adang MJ (1995). Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance. **Microbiology** 61:2086-2092. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3216-3219.2001

Muller-Cohn J, Chaufaux J, Buisson C, Gilois N, Sanchis V, Lereclus D (1996) *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera:Noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **Journal of Economic Entomology** 89:791-797. DOI: 10.1093/jee/89.4.791

Nagamatsu Y, Itai Y, Hatanaka C, Funatsu G, Hayashi K (1984) A toxic fragment from the entomocidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Agricultural and Biological Chemistry** 48:611-619. DOI: 10.1080/00021369.1984.10866193

Pardo-López L, Gómez I, Muñoz-Garay C, Jiménez-Juárez N, Soberón M (2006) Structural and functional analysis of the prepore and membrane-inserted pore of Cry1Ab toxin. **Journal of Invertebrate Pathology** 92:172-177. DOI: 10.1016/j.jip.2006.02.008

Pardo-López L, Muñoz-Garay C, Rodríguez-Almazán HC, Soberón M, Bravo A (2009) Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides** 30:589-595. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.07.027

Patankar AG, Giri AP, Harsulkar AM, Sainani MN, Deshpande VV, Ranjekar PK (2001) Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Insect Molecular Biology** 31:453-464. DOI: 10.1016/s0965-1748(00)00150-8

Polanczyk RA, Van-Frankenuyzen KV, Pauli G (2017) The American *Bacillus thuringiensis* based biopesticides market. In.: Fiuza LM, Polanczyk RA, Crickmore N (Eds.) ***Bacillus thuringiensis* and *Lysinibacillus sphaericus*. Characterization and use in the field of biocontrol**. New York: Springer International Publishing p. 173-184. DOI: 10.1007/978-3-319-56678-8

Purcell JP, Greenplate JT, Sammons RD (1992) Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. ***Insect Biochemistry and Molecular*** 22:41-47. DOI: 10.1016/0965-1748(92)90098-Y

R Core Team (2013) **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing Vienna.

Rahman K, abdullah MAF, Ambati S, Taylor MD, Adang MJ (2012) Differential protection of Cry1Fa toxin against *Spodoptera ferugiperda* larval gut proteases by cadherian orthologs correlates with increased synergism. ***Applied and Environmental Microbiology*** 78:354-362. DOI: 10.1128/AEM.06212-11

Sas University (2014) **SAS® 9.4 Statements**. Third Edition SAS Instit. Inc., USA.

Schünemann R, Knaak N, Fiuza LM (2014) Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. ***ISRN Microbiology*** 1:1-12. DOI: 10.1155/2014/135675

Schwartz JL, Lu YL, Sohnlein P, Brousseau R, Laprade R (1997) Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the presence of *Manduca sexta* midgut receptors. ***FEBS Letters*** 412:270-276. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)00801-6

Sedaratian A, Fathipour Y, Talaei-Hassanloui R, Jurat-Fuentes JL (2013) Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. ***Journal of Applied Entomology*** 137:540-549. DOI: 10.1111/jen.12030

Silva FWS, Serrão JE, Elliot SL (2016) Density-dependent prophylaxis in primary anti-parasite barriers in the velvetbean caterpillar. ***Ecological Entomology*** 41:451-458. DOI: 10.1111/een.12315

Sosa-Gómez DR, MIRANDA JE (2012) Fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera, Noctuidae). ***Revista Brasileira de Entomologia*** 56:359-362. DOI: 10.1590/S0085-56262012005000050

Storer NP, Kubiszak ME, King JE, Thompson GD, Santos AC (2012) Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. ***Journal of Invertebrate Pathology*** 110:294-300. DOI: 10.1016/j.jip.2012.04.007

Terra WR, Dias RO, Oliveira PL, Ferreira C, Venâncio TM (2018) Transcriptomic analyses uncover emerging roles of mucins, lysosome/secretory addressing and detoxification pathways in insect midguts. ***Current Opinion in Insect Science*** 29:34-40. DOI: 10.1016/j.cois.2018.05.015

Van-Rie J, Ferré J (2000) Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In.: Charles JF, Delecluse A, Leroux N (Eds.) **Entomopathogenic bacteria**. Netherlands: Kluwer Academic Publications p. 219-237.

Whiteley HR, Schnepf HE (1986) The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Microbiology** 40:549-576. DOI: 10.1146/annurev.mi.40.100186.003001

Wirth MC, Jiannino JA, Frederici BA, Walton WE (2004) Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis and *Bacillus sphaericus*. **Journal Medical Entomology** 5:935-941. DOI: 10.1603/0022-2585-41.5.935

Yamamoto T, Dean DH (2000) Insecticidal proteins produced by bacteria pathogenic to agricultural pests. In.: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Le RC (Eds.) **Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher p.81-100.

Zago HB, Siqueira HAA, Pereira EJG, Picanco MC, Barros R (2104) Resistance and behavioural response of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. **Pest Management Science** 70:488-495. DOI: 10.1002/ps.3600

CAPÍTULO 6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em condições de laboratório, os resultados revelaram suscetibilidade de *A. gemmatilis* as doses do *B. thuringiensis*, sendo que as concentrações CL₂₀ e CL₂₅ foram responsáveis por interferir na sobrevivência e principalmente nos parâmetros reprodutivos como fecundidade e taxa de reprodução.

Os tratamentos CL₅ e CL₂₀ apresentaram alterações na razão sexual. E as avaliações realizadas nos adultos, evidenciaram diferenças entre a morfometria das fêmeas e machos atribuído a plasticidade fenotípica dos sexos. O tratamento CL₅ apresentou um aumento na atividade proteolítica após 60 minutos. Assim, observa-se que para cada concentração utilizada o metabolismo da praga apresenta uma resposta, demonstrando a capacidade de sobrevivência da espécie.

Em condições de campo, quando o produtor não adota adequadamente a tecnologia de aplicação, utiliza outras doses da recomendada e aplica os produtos biológicos em condições ambientais desfavoráveis, está possibilitando a permanência da praga no agroecossistema para futuros surtos.

Além disso, Países que se localizam em regiões tropicais e subtropicais exibem desafios maiores porque geralmente apresentam uma agricultura intensa, devido as condições ambientais favoráveis com produção de alimento todo o ano, o resultado da abundância de alimentos é a constância das pragas em campo. E com a adoção de métodos de controle errôneos como aplicação de subdoses pode contribuir para o aumento populacional da praga. Com isso, faz necessário seguir as recomendações para que a população do insetos-praga fique abaixo do nível de dano, sempre levando em consideração o manejo integrado de pragas.