

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MORTALIDADE E EFEITOS SUBLETAIS DE *Bacillus  
thuringiensis* Berliner EM *Spodoptera albula* (Walker, 1857)**

**Kelly Cristina Gonçalves**

Engenheira Agrônoma

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MORTALIDADE E EFEITOS SUBLETAIS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner EM *Spodoptera albula* (Walker, 1857)**

**Kelly Cristina Gonçalves**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk**

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

**2015**

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**KELLY CRISTINA GONÇALVES** - Filha de José Luis Gonçalves e Doralina Maria Fiuza de Barros Gonçalves, nascida em Tatuí/SP, no dia 06 de outubro de 1975, estudou o ensino fundamental no Centro Educacional Sesi e médio no Colégio Objetivo, ingressou em março de 1994 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP) – Campus de Jaboticabal, onde foi bolsista de extensão e monitora por 4 anos, e em agosto de 2001, recebeu o título de Engenheira Agrônomo. Em março de 2013 iniciou o mestrado na UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV). Trabalhou com criação de *Spodoptera albula* e sua suscetibilidade a agentes de controle microbiano de pragas, especialmente *Bacillus thuringiensis*. Também auxiliou na orientação da aluna de iniciação científica Lais Fernanda Moreira.

*Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda  
todas as perguntas.*

*Luis Fernando Veríssimo*

*DEDICO*

*Meus Pais*

*José Luis e Doralina*

*Minhas irmãs Ivana e Maria Isabel*

*A minha filha Natalia*

*As lembranças mais antigas que tenho são com vocês...*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela presença e proteção constante em minha vida, por me conceder serenidade necessária para aceitar as coisas que não posso mudar, coragem para mudar as que posso e sabedoria para distinguir uma das outras.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk, pela dedicação, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade e por todo o suporte dado para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, José Luiz e Doralina, razão de tanto orgulho e amor, fonte de força e renovação, pelo amor incondicional e pelo incentivo constante.

Às minhas irmãs Ivana e Maria Isabel pelo incentivo de sempre.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, especialmente ao Departamento de Fitossanidade e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela oportunidade de realização deste trabalho.

À todos os professores que encontrei durante os dois anos de mestrado, que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação e crescimento.

Enfim, minha homenagem e gratidão a todos que, pela amizade e respeito, ou pelo simples convívio ao longo destes anos, a mim se ligaram e de alguma forma contribuíram para que esta conquista se realizasse.

## SUMÁRIO

	Página
LISTAS DE FIGURAS.....	i
LISTAS DE TABELAS .....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 <i>Spodoptera albula</i> (Walker, 1858) .....	2
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner.....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1 Criação de <i>Spodoptera albula</i> .....	7
3.1 Bioensaios de mortalidade .....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	10
4.1 Bioensaios de mortalidade e estimativa da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) .....	10
4.2 Efeitos subletais .....	17
5. CONCLUSÕES.....	22
6. REFERÊNCIAS .....	23

**LISTAS DE FIGURAS**

	Página
Figura 1. Adulto (a) e lagarta (b) de <i>Spodoptera albula</i> . (Panizzi et al., 2012).....	2
Figura 2. Cristais de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bacillales: Bacillaceae) (Fonte: Fernando Hercos Valicente).....	5
Figura 3. Criação de lagartas (a) e adultos (b) de <i>Spodoptera albula</i> .....	7
Figura 4. Mortalidade corrigida (%) causada por diferentes bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> em lagartas de segundo instar de <i>Spodoptera albula</i> na concentração $3 \times 10^8$ esporos/mL.....	10
Figura 5. Mortalidade corrigida (%) causada por diferentes isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> em lagartas de segundo instar de <i>Spodoptera albula</i> na concentração $3 \times 10^8$ esporos/mL.....	11
Figura 6. Conteúdo de toxinas de Cry de bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> e seu espectro de ação. (Fonte: IHARABRAS).....	12



**LISTAS DE TABELAS**

Página

Tabela 1. Bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizados nos bioensaios com <i>Spodoptera albula</i> .....	8
Tabela 2. Estimativa da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) de bioinseticidas à base de <i>Bacillus thuringiensis</i> para lagartas de segundo instar de <i>Spodoptera albula</i> (26 ± 1° C, U.R. 65± 5% e fotofase de 14h).....	14
Tabela 3. Peso de pré-pupas de <i>Spodoptera albula</i> sobreviventes à diferentes concentrações dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> (26 ± 1° C, U.R. 65± 5% e fotofase de 14h).....	18
Tabela 4. Peso de pupas de <i>Spodoptera albula</i> sobreviventes à diferentes concentrações dos isolados de <i>Bacillus thuringiensis</i> (26 ± 1° C, U.R. 65± 5% e fotofase de 14h).....	18

## MORTALIDADE E EFEITOS SUBLETAIS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner EM *Spodoptera albula* (Walker, 1857)

**RESUMO** – *Spodoptera albula* é uma praga polífaga e cosmopolita sendo que no Brasil não existem produtos registrados para o seu controle embora recentemente alguns agricultores tenham relatados surtos desta espécie em lavouras de soja no estado do Mato Grosso. Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de táticas de controle eficientes para esta praga e que ao mesmo tempo sejam pouco agressivas ao meio ambiente e à sociedade. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria entomopatogênica altamente eficiente no controle de lepidópteros praga e apresenta toxicidade para várias espécies do gênero *Spodoptera*. A atividade tóxica de isolados e bioinseticidas à base de *Bt* foi avaliada utilizando lagartas de segundo instar de *S. albula* em bioensaios de mortalidade e virulência, bem com os efeitos subletais do *Bt* nas lagartas sobreviventes aos tratamentos. Os bioinseticidas Agree, Xentari e Dipel SC foram selecionados para os bioensaios de virulência, sendo que o primeiro foi o mais virulento e, portanto o mais promissor para o manejo desta praga. Também foi observada diferença na toxicidade entre as formulações do Dipel. Entre os isolados nenhum se destacou no controle desta praga e o isolado Bt05 afetou o desenvolvimento das lagartas resultando em menor peso de pré-pupa e pupa em relação a testemunha.

**Palavras-chave:** Toxicidade, Entomopatógeno, Noctuidae, MIP, Efeitos não letais.

## MORTALITY AND SUBLETHAL EFFECTS OF *Bacillus thuringiensis* Berliner ON *Spodoptera albula* (Walker, 1857)

**ABSTRACT** - *Spodoptera albula* is a polyphagous and cosmopolitan pest and in Brazil there are no products registered for their control although some farmers have recently been reported outbreaks of this specie in soybean in the Mato Grosso state. Thus, it is extremely important to developing effective tactics to control this pest that are less harmful to the environment and society. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is a highly efficient entomopathogenic bacterium in lepidopterous pest control and it is toxic to several species of *Spodoptera* genus. The toxic activity of *Bt* isolates and *Bt* biopesticides was evaluated using *S. albula* second instar larvae in mortality and virulence bioassays, and evaluating the sublethal *Bt* effects on larvae surviving to treatment. The biopesticides Agree, Xentari and Dipel SC were selected for bioassay virulence. Agree was the most virulent and therefore the most promising for the *S. albula* management. It was also observed differences in toxicity between Dipel formulations. All *Bt* isolates tested were not good for the control of this pest and the isolate BT05 affected the development of larvae resulting in lower weight of pre-pupa and pupa compared to control.

**Keywords:** Toxicity, Entomopathogen, Nocuidae, IPM, Non lethal effects.

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da produção agrícola brasileira para atender à crescente demanda por alimentos, exportação de grãos e seus subprodutos têm impactos diretos sobre o agroecossistema, pois está ligado ao uso intenso de insumos visando diminuir as perdas, causadas por fatores bióticos e abióticos, durante o processo produtivo. Os inseticidas, embora de grande importância no controle de pragas, são frequentemente, utilizados em grandes quantidades, sem orientação técnica, causando uma série de problemas ao ambiente e aos agricultores.

*Spodoptera albula* (Walker, 1857) é um noctuídeo polífono e cosmopolita e por isso é uma espécie que necessita o desenvolvimento de táticas de controle, uma vez que não existem inseticidas químicos ou biológicos registrados para o controle desta espécie no Brasil.

Normalmente o agricultor brasileiro escolhe o controle químico como opção de controle pela sua rápida eficiência e baixo custo. Esse tipo de controle pode, também, contaminar os grãos deixando resíduos nos alimentos, prejudicar a entomofauna benéfica, impedindo a atuação do controle biológico natural, favorecendo o surgimento de novas pragas ou ressurgência de outras.

Devido a estes fatores, a busca por alternativas que possam minimizar ou até mesmo substituir os inseticidas convencionais foi intensificada e, atualmente, as novas táticas abrangem uma série de alternativas: plantas resistentes, inseticidas seletivos, parasitóides e micro-organismos entomopatogênicos. Entre os entomopatogênicos, o *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner destaca-se pela sua ampla utilização no combate dos insetos praga, especialmente lepidópteros.

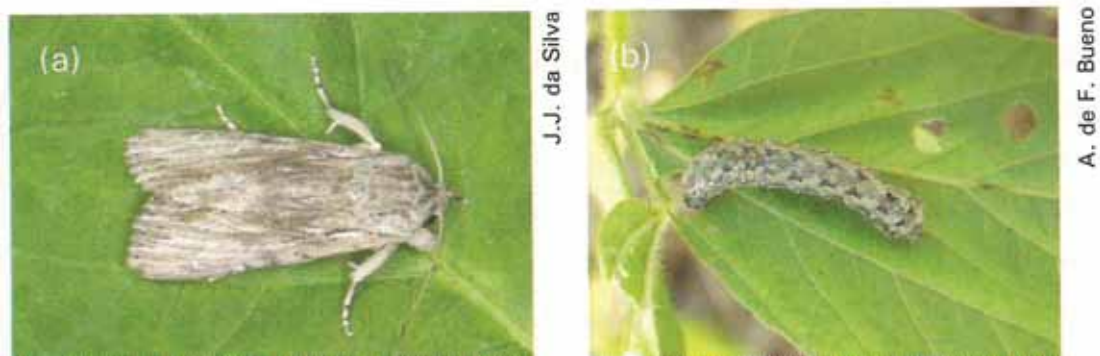
Esta pesquisa foi conduzida com o objetivo de isolar e selecionar, em laboratório, bioinseticidas e isolados de *Bt* eficientes para *S. albula*, bem como seu efeito no desenvolvimento das lagartas sobreviventes aos tratamentos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Spodoptera albula* (Walker, 1858)

O gênero *Spodoptera* Guenée, 1852 (Lepidoptera: Noctuidae) inclui muitas pragas agrícolas importantes (POGUE, 2002). *Spodoptera albula* (Walker, 1858) é conhecida como “mariposa grisalha” (Gray-streaked armyworm moth) e possui várias sinonímias como *Spodoptera sunia* Guenée, *Spodoptera orbicularis* (Walker) e *Spodoptera caudata* (Walker).

As mariposas adultas medem entre 26 e 37 mm de envergadura, suas asas anteriores e o corpo são acinzentados e as asas posteriores são brancas (Figura 1a). A característica marcante dessa espécie é a presença de uma faixa longitudinal escura na base da asa anterior. A cor das lagartas varia de preto acinzentado a castanho-acinzentado, com duas fileiras dorsais de manchas triangulares pretas ou escuras, cada uma com um ponto branco no centro (Figura 1b). A cabeça é castanha com manchas pretas e as lagartas tem o hábito noturno e podem se esconder no solo (PANIZZI et al., 2012).



**Figura 1.** Adulto (a) e lagarta (b) de *Spodoptera albula*. (Panizzi et al., 2012).

As posturas das fêmeas consistem em massas irregulares, podendo conter até 1.400 ovos (NOVO PADRINO et al., 1985), normalmente em duas camadas sobrepostas, mas podendo ocorrer até quatro e geralmente são recobertos por escamas do corpo da fêmea. Após a eclosão as lagartas dos primeiros instares raspam as folhas, e conforme vão se desenvolvendo as destroem completamente

(MONTEZANO, 2012). Essas lagartas têm hábitos noturnos e escondem-se no solo sob as plantas durante o dia (POGUE, 2002).

Montezano et al. (2013) relataram que a viabilidade das fases de ovo, larva, pré-pupa e pupa de *S. albula* é de 94,54; 97,33; 93,84 e 92,34%, respectivamente. A duração média das fases de ovo, larva, pré-pupa e pupa é de 4,14; 16,37; 1,69; e 9,34 dias, respectivamente. Na fase de larva observou-se que 80,85% das fêmeas e 93,99% dos machos passaram por seis ínstaes e os demais por sete, com protandria larval significativa. As lagartas que passaram por seis e sete ínstaes apresentaram razão média de crescimento de 1,58 e 1,48, respectivamente.

*S. albula* é cosmopolita ocorrendo a partir da Flórida e sul do Texas, em todo o Caribe, América Central e da Venezuela ao Sul do Paraguai e Sul do Brasil (POGUE, 2002; ZENKER et al., 2010), e Chile (ANGULO et al., 2008). Montezano et al. (2013) citaram 55 espécies de plantas pertencentes a 29 famílias botânicas como hospedeiras dessa espécie. Além de se alimentar de folhas, frutos e do caule de plantas de interesse econômico, as lagartas de *S. albula* também se alimentam de várias ervas daninhas que crescem entre as linhas e podem ser suas plantas hospedeiras (HALLMAN, 1979), bem como ao longo das bordas (GONZÁLEZ, 1966) o que aumenta seu potencial de dano.

No Brasil, o primeiro relato de altas populações de *S. albula* ocorreu na cultura do amendoim (*Arachis hypogaea*) no estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2001). Os autores relataram um surto de lagartas dessa espécie chegando a atingir 70 lagartas por metro linear em fevereiro de 2000, na safra das águas, no município de Tupã (SP).

Piotto & Sosa-Gomez (2013) realizaram levantamento populacional de noctuídeos em soja em Londrina (PR) entre agosto de 2012 e março de 2013. Os autores constaram que *S. albula* foi a espécie mais abundante do gênero *Spodoptera*, sendo coletadas um total de 308 mariposas contra 74 espécimens de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Além disso, das nove espécies de noctuídeos coletadas, *S. albula* foi a quarta mais abundante, sendo superada apenas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae), *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Helicoverpa* spp. Panizzi et al. (2012) salientam que as

características morfológicas dessa espécie são muito próximas a *Spodoptera eridania*, sendo esta a possível razão dos escassos relatos de *S. albula* em soja.

O manejo dessa espécie precisa ser desenvolvido com um enfoque mais sustentável de acordo com as premissas do Manejo Integrado de Pragas, pois além de sua voracidade e grande capacidade reprodutiva, existem relatos de populações de *S. albula* que são resistentes a diversos inseticidas químicos (MONTEZANO, 2012).

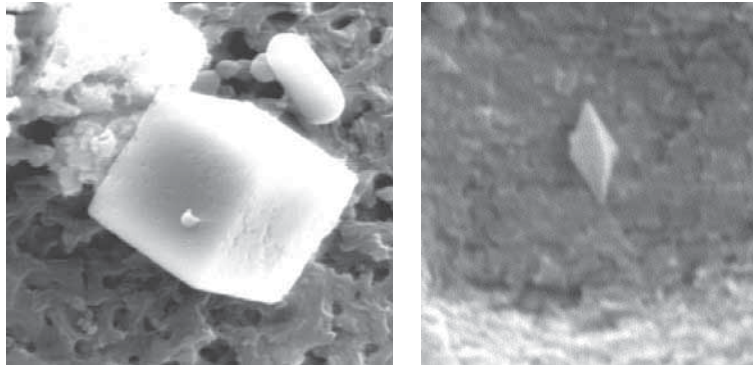
Além disso, a ausência de produtos registrados para o controle desta praga no Brasil (ANDREI, 2013; AGROFIT, 2015) torna necessário o estudo de estratégias de controle eficientes, mas ao mesmo tempo pouco agressivas ao meio ambiente, uma vez que surtos desta praga podem levar ao uso desenfreado de agrotóxicos sem registro com elevado impacto sobre o meio ambiente, agricultores e consumidores, como foi recentemente relatado para *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (THOMAZONI et al., 2013).

Entre os principais agentes de controle microbiano de pragas destaca-se a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Bioinseticidas à base de *Bt* são utilizados com sucesso no controle de pragas desde a segunda metade do século XX (ROSAS-GARCIA, 2009; SANAHUJA et al., 2011; POLANCZYK; DE BORTOLI; DE BORTOLI, 2012). A atividade tóxica de *Bt* para espécies do gênero *Spodoptera* é bem conhecida na literatura (AGUIAR et al., 2006; SANTOS et al., 2009; Van FRANKENHUYZEN, 2009) embora somente recentemente Bergamasco et al. (2013) tenham relatado a eficiência de toxinas Cry de *Bt* no controle de *S. albula*.

## **2.2 *Bacillus thuringiensis* Berliner**

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é uma bactéria entomopatogênica que está presente em amostras de solos de áreas cultivadas, áreas desérticas, ambientes aquáticos, superfície e interior de plantas, restos vegetais, insetos e pequenos mamíferos mortos, teias de aranha, grãos armazenados e locais inabitados (POLANCZYK, 2015).

Esta bactéria é conhecida pela sua habilidade de produzir inclusões cristalinas (ou cristais) com atividade inseticida (SCHNEPF et al., 1998) (Figura 2). Desde a clonagem e sequenciamento dos primeiros genes das proteínas Cry (denominados de *cry*) na década de 1980, muitos outros foram caracterizados e classificados de acordo com a nomenclatura de Crickmore et al. (1998).



**Figura 2.** Cristais de *Bacillus thuringiensis* (Fonte: Fernando Hercos Valicente).

Após a ingestão do esporo mais cristal pelo inseto, o cristal é dissolvido pelo pH alcalino formando as pró-toxinas que são proteoliticamente convertidas em polipeptídios menores e estáveis no intestino médio do inseto. Estas toxinas ativadas ligam-se a receptores específicos nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio, permitindo que as proteínas se insiram na membrana e formem poros que rompem as células do intestino médio, levando a posterior septicemia e morte do inseto (CARROLL & ELLAR, 1993; KIROUAC et al., 2002).

Bioinseticidas à base de *Bt* são utilizados com sucesso no controle de pragas desde a segunda metade do século XX (ROSAS-GARCIA, 2009; SANAHUJA et al., 2011; SANCHIS, 2011; POLANCZYK et al., 2012). Esta bactéria entomopatogênica tem efeito letal e/ou subletal na fase jovem e/ou adulta de diversas ordens de insetos de importância agrícola e para algumas espécies de ácaros praga, nematoides, *Ascaris suum* (Goeze, 1782) (Ascaridida: Ascarididae); *Blatta orientalis* Linnaeus, 1758 (Blattaria: Blattidae); *Leishmania major* Yakimoff & Schokhor, 1914 (Trypanosomatida: Trypanosomatida); *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904) (Strigeiformes: Schistosomatidae) (POLANCZYK, 2015).



Embora os produtos comerciais à base de *Bt* sejam utilizados somente contra lepidópteros, dípteros e coleópteros, mais de 1.000 espécies de insetos, pertencentes a diversas ordens, são suscetíveis a este patógeno (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Dos 572 lepidópteros suscetíveis ao *Bt* elencados por estes autores, 83 (14,5%) são noctuídeos. O bioinseticida à base de *Bt* com maior alcance no mercado mundial é o Dipel (*Bt kurstaki* HD-1). Este produto, pouco tóxico para ácaros, coleópteros, dípteros e hemípteros é altamente eficiente contra mais de 170 lepidópteros-praga (BEEGLE & YAMAMOTO, 1992; GLARE & O'CALLAGHAM, 2000).

Uma revisão feita pelo Cab International Centre (2010) relata que 322 produtos à base de *Bt* são responsáveis por 53% do mercado mundial de bioinseticidas o que gera um faturamento anual de US\$ 210 milhões, porém a participação destes produtos no mercado mundial de bioinseticidas vem diminuindo desde 2000. Naquele ano, a participação era de 90%, diminuindo para 60% em 2005 e para 53% em 2010. Esta redução ocorreu devido ao incremento no uso fungos entomopatogênicos e de vírus entomopatogênicos em cerca de 50% e 100%, respectivamente. Ao mesmo tempo o mercado de produtos à base de *Bt* aumentou apenas 36%.

Entre 2013 e 2015 o mercado de bioinseticidas à base de *Bt* no Brasil passou de cerca de 300 mil hectares para mais de 5 milhões de hectares, sendo que somente uma empresa comercializou quase 3 milhões de litros de Dipel na safra 2013/2014. Este aumento inesperado ocorreu devido à ineficiência dos produtos químicos convencionais no controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e *C. includens*, o que fez com que os agricultores passassem a utilizar em grande escala os bioinseticidas à base de *Bt*, principalmente o Dipel. Este fato reforça a importância dos bioinseticidas à base de *Bt* como uma tática importante de controle de pragas na agricultura brasileira, pois a área pulverizada somente com esses produtos cobre cerca de 10% da área cultivada no Brasil.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Criação de *Spodoptera albula*

A criação de *S. albula* iniciou-se a partir de 100 adultos coletados em lavoura de amendoim no município de Jaboticabal (SP) em janeiro de 2013. Os insetos foram identificados pelo Prof. Dr. Roberto Zucchi (ESALQ/USP) como *S. albula* pelo exame da genitália. A criação dos insetos foi realizada no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos da FCAV/UNESP, onde as lagartas foram alimentadas em dieta artificial (GREENE, 1976) e os adultos com solução de açúcar 10%. Os casais foram inseridos em gaiolas, constituídas de tubos de PVC (25 x 10 cm) com tampa plástica na base e ápice, revestidas internamente com papel sulfite para coleta dos ovos a cada dois dias, dos quais cerca de 10% foi utilizado para a manutenção da criação e o restante para a realização dos bioensaios (Figuras 3a e 3b).



**Figura 3.** Criação de lagartas (a) e adultos (b) de *Spodoptera albula*.

Para a criação dos insetos foi utilizada sala com temperatura ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade constante (70% UR) para o desenvolvimento uniforme dos mesmos e evitar contaminações.

### 3.1 Bioensaios de mortalidade

Para os bioensaios de mortalidade foram utilizados sete bioinseticidas à base de *Bt* (Tabela 1) e cinco isolados com perfil proteico desconhecido (Bt04, Bt05, Bt20, Bt27 e Bt29) escolhidos de forma aleatória da coleção de entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Praga da FCAV/UNESP. Para o bioinseticida Dipel foram testadas três formulações: suspensão concentrada (SC), pó molhável (WP) e granulado dispersível (WG).

**Tabela 1.** Bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* utilizados nos bioensaios com *Spodoptera albula*.

Bioinseticidas	Formulação	Composição	Potencia (endotoxina)
Agree	WP	<i>B. thuringiensis aizawai</i> CG 91	38g/kg
BacControl	WP	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	32g/kg
Btt090	SC	<i>B. thuringiensis tolworthi</i>	10 <sup>9</sup> /mL
Dipel	SC	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	33,60g/litro
Dipel	WG	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	540g/kg
Dipel	WP	<i>B. thuringiensis kurstaki</i>	32g/kg
Xentari	WG	<i>B. thuringiensis aizawai</i>	540g/kg

WP: pó molhável, SC: suspensão concentrada, WG: grânulo dispersível.

Os isolados foram multiplicados em meio de cultura BHI (Infusão de Cérebro e Coração – Caldo BHI da MBiolog) a 28 °C, e 180 rpm por 76 horas para um crescimento padrão dos mesmos. Após a lise bacteriana, a mistura contendo esporos, cristais e células vegetativas foi submetida a três centrifugações consecutivas (5.000 rpm por 20 minutos), a fim de eliminar o meio de cultura e lavar o concentrado obtido, eliminando toxinas extracelulares, como as  $\beta$ -exotoxinas.

As concentrações dos bioinseticidas e isolados foram ajustadas para  $3 \times 10^8$  esporos/mL em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio de contraste de

fase (aumento 1.000 vezes). Esta concentração é considerada discriminatória em testes de patogenicidade de *Bt* para insetos praga (POLANCZYK; ALVES; PADULLA, 2005). Para os bioensaios, uma alíquota de 500 µL desta concentração foi aplicada na superfície do disco de dieta artificial (4,8 cm<sup>3</sup>) previamente distribuída em placas de acrílico (3,5 cm Ø). Após a evaporação do excesso de umidade da dieta, 60 lagartas de segundo ínstar foram distribuídas em 6 repetições. No lote correspondente à testemunha foi aplicada água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

Uma câmara incubadora tipo Biological Oxygen Demand (B.O.D.), regulada para 25±0,5 °C, 65±10% de UR e 12 horas foi utilizada para acondicionamento do bioensaio. Nesses bioensaios os tratamentos foram avaliados até o 7º dia após a aplicação da bioinseticida. Após a análise da variância, os dados foram submetidos ao Teste de Tukey a 5%. Os bioinseticidas que foram patogênicos e causaram mortalidade ≥ 80% foram selecionados para os testes de virulência (estimativa da CL<sub>50</sub>).

Para os bioensaios de estimativa da CL<sub>50</sub> foram selecionados os bioinseticidas Agree, Dipel SC e Xentari, sendo escolhidas cinco concentrações logaritmicamente espaçadas mais a testemunha para cada bioinseticida, considerando que a concentração mais baixa e a mais alta causem 5 a 15% e 85 e 95% de mortalidade dos indivíduos, respectivamente. Desta forma as concentrações para o Agree variaram entre 1,1 x 10<sup>3</sup> a 9,1 x 10<sup>4</sup> esporos/mL, para o Dipel entre 1,1 x 10<sup>3</sup> e 3 x 10<sup>8</sup> esporos/mL e entre 3,1 x 10<sup>7</sup> a 3 x 10<sup>8</sup> esporos/mL para o Xentari. Para a determinação destas concentrações foram utilizados cerca de 10.500 insetos. Na estimativa da CL<sub>50</sub> foram testadas 150 lagartas de segundo ínstar distribuídas em três repetições para cada concentração, totalizando 900 insetos. No lote correspondente à testemunha foi aplicada água destilada e esterilizada, em volume equivalente aos lotes tratados.

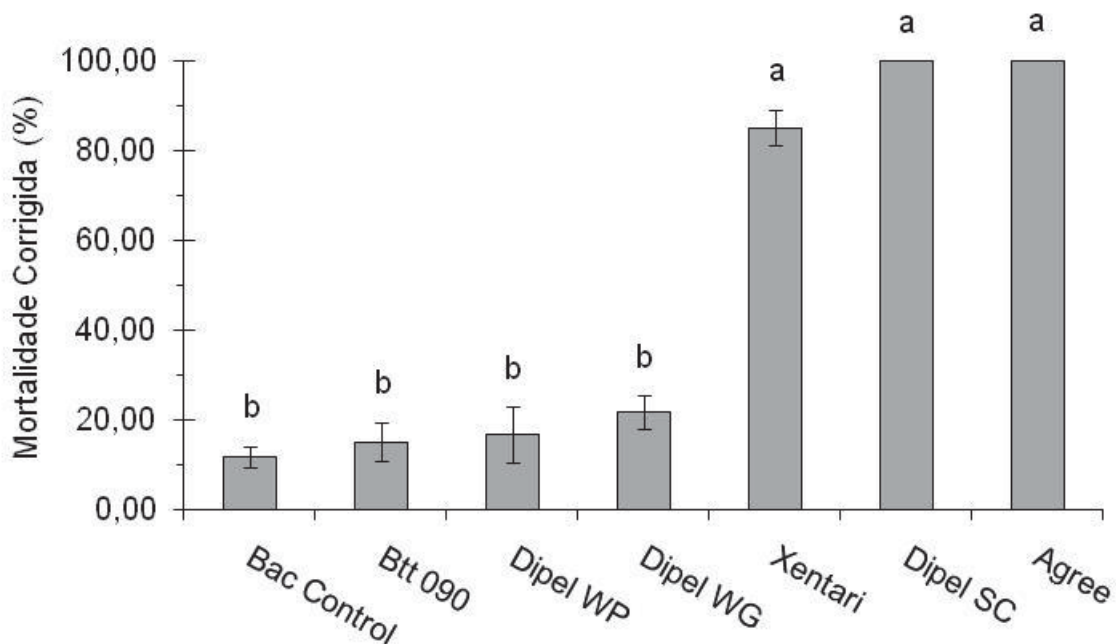
Uma câmara incubadora B.O.D., regulada para 25±0,5 °C, 65±10% de UR e 12 horas de fotofase foi utilizada para acondicionamento do bioensaio. Os bioensaios de estimativa da CL<sub>50</sub> foram avaliados a cada 24 horas, até o sétimo dia após a aplicação. A CL<sub>50</sub> foi estimada com a utilização do programa Polo-PC (Análise de Probit), conforme HADDAD (1998).

Para avaliar os efeitos subletais do *Bt* sobre as lagartas sobreviventes aos tratamentos foram escolhidas as lagartas que sobreviveram a aplicação dos isolados de *Bt* (maior número) sendo que foi anotado o peso de pré-pupa e pupa. Os espécimens foram pesados com auxílio de uma balança de precisão UniBloc<sup>®</sup> recentemente calibrada. Após a análise da variância, os dados foram submetidos ao Teste de Tukey a 5%.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

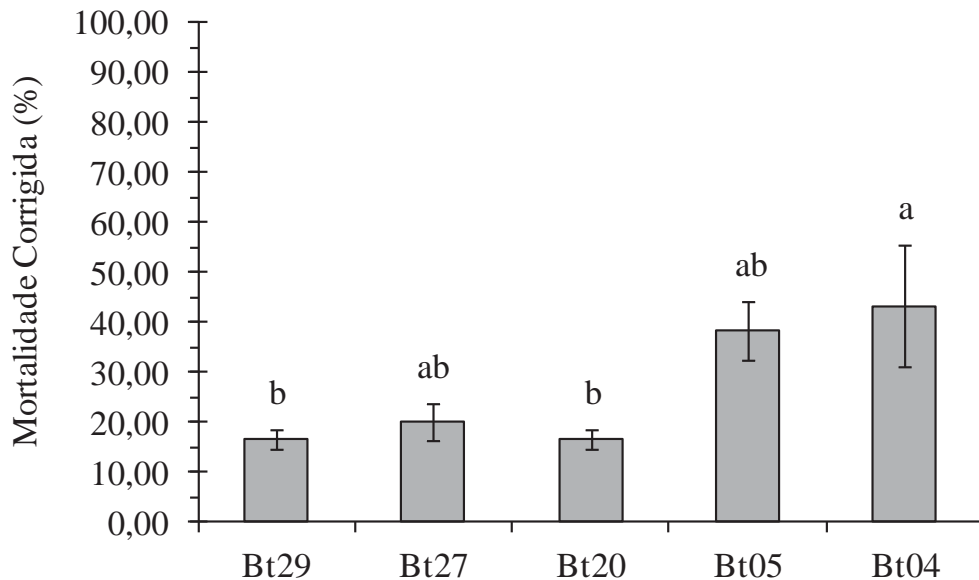
### 4.1 Bioensaios de mortalidade e estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>)

A mortalidade de *S. albula* submetida aos diferentes bioinseticidas variou de 12 a 100% (Figura 1), sendo que os bioinseticidas Agree<sup>®</sup>, Dipel SC<sup>®</sup> e Xentari<sup>®</sup> causaram mortalidade superior a 80% e também foram estatisticamente diferentes dos demais tratamentos (BacControl<sup>®</sup>, Btt090<sup>®</sup>, Dipel WP<sup>®</sup> e Dipel WG<sup>®</sup>).



**Figura 4.** Mortalidade corrigida (%) causada por diferentes bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de segundo instar de *Spodoptera albula* na concentração  $3 \times 10^8$  esporos/mL.

Entre os isolados de *Bt* a mortalidade variou entre 17% e 45% (Figura 5). Como a mortalidade de lagartas de segundo ínstar de *S. albula* ficou abaixo de 80% em todos os tratamentos, estes isolados não foram utilizados nos testes de estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>).



**Figura 5.** Mortalidade corrigida (%) causada por diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis* em lagartas de segundo instar de *Spodoptera albula* na concentração  $3 \times 10^8$  esporos/mL.

A mortalidade de lagartas de *S. albula* causada pelo Dipel SC foi superior (100%) a mortalidade causada pelas duas outras formulações de Dipel, a WG (grânulos dispersíveis) e WP (pó molhável), que ficou em torno de 20%. Embora todas as formulações do Dipel contenham as mesmas toxinas (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A e Cry2B), os inertes contidos na formulação podem influenciar na eficiência do produto (MOHAN & GUJAR, 2001). Estes autores constataram que o bioinseticida Biobit foi 6,7; 7,8 e 13,5 vezes mais tóxico para *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) do que os bioinseticidas Dipel, Halt e Hil, embora todos estes produtos tenham como princípio ativo as mesmas toxinas elencadas acima para o Dipel SC.

Esta variação de eficiência também foi constatada por Monteiro & Souza (2010) quando avaliaram a eficiência de Dipel WG e Dipel SC visando ao controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) e *Bonagota cranaoedes* (Lepidoptera:

Tortricidae) em maçã. O efeito dos inertes da formulação pode ter ocorrido também para o bioinseticida BacControl que causou mortalidade de 16% em lagartas de segundo instar de *S. albula* (Tabela 1) pois este produto possui as mesmas toxinas Cry que o Dipel.

Estas diferenças na toxicidade entre formulações podem ser devidas a presença ou ausência de toxinas Cry biologicamente ativas, devido à diferença na quantidade de toxinas entre os produtos (Figura 6), efeito dos aditivos e/ou adjuvantes, efeitos sinérgicos e aditivos entre as toxinas nos produtos e também diferentes lotes dos produtos podem variar quanto ao seu potencial biológico (TAKELAR & SHELTON, 1993).

Cry toxin group:			1Aa	1Ab	1Ac	1C	1D	2
<b>Cry toxin content of Bt products</b>								
<i>Bt kurstaki</i> strains	SA-12	CoStar	+	++	++++	-	-	+
	SA-11	Delfin	+	++	+	-	-	+
	HD-1	DiPel	+	++	+	-	-	+
<i>Bt aizawai</i> strains	ABTS-1857	XenTari	+	++	-	+	+	-
	GC-91	Agree	-	-	++	+	+	+
<b>Cry toxin susceptibility of various target insects</b>								
<i>Trichoplusia, Pseudoplusia, etc.</i>			+	++	+++	++	-	++
<i>Plutella xylostella</i>			++	++	+++	++	++	-
<i>Heliothis, Helicoverpa</i>			+/-	+/-	+++	-	-	+
<i>Spodoptera spp.</i>			-	+/-	-	++	+	+/-
<i>Anticarsia gemmatalis</i>			?	?	+++	?	?	++

**Figura 6.** Conteúdo de toxinas de Cry de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e seu espectro de ação. (Fonte: IHARABRAS).

O bioinseticida Btt090, à base do *Bt tolworthi* causou reduzida mortalidade em lagartas de segundo instar de *S. albula* (Figura 4). Sem a informação de qual cepa foi utilizada na formulação deste bioinseticida é impossível fazer inferências sobre a baixa atividade para lagartas de segundo instar de *S. albula*. Embora tenham sido

feitos vários contatos com a empresa fabricante, esta informação não foi repassada aos autores deste artigo.

Os bioinseticidas Xentari e Agree foram aqueles que além do Dipel SC causaram mortalidade acima de 80%. O Agree possui as toxinas Cry1Ac, Cry1C, Cry1D e Cry2, enquanto que o Xentari possui as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1C e Cry1D (Figura 6). Estas toxinas podem atuar individualmente ou em conjunto, o que pode potencializar a toxicidade individual de cada toxina (XUE et al., 2005; WEI et al., 2015) ou pode ocorrer o contrário, onde a combinação das toxinas reduz o efeito inseticida (AMEEN et al., 1998; GARBUTT et al., 2011), provavelmente pela competição por um mesmo receptor (GÓMEZ et al., 2007).

Além disso, Aranda et al. (1996) em estudo realizado para avaliar a interação entre as toxinas Cry e as células epiteliais do intestino médio de *S. frugiperda* observaram que, embora as toxinas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac e Cry2 B se liguem aos receptores, esta ligação não implica em toxicidade para o inseto. Isto se deve ao fato dessas toxinas apresentarem reduzida especificidade, resultando numa ligação pouco estável e reversível com o receptor, ou seja, a toxina apenas reconhece o receptor, mas não se liga irreversivelmente a ele. O contrário foi verificado para as toxinas Cry1C e Cry1D, altamente tóxicas para a lagarta-do-cartucho. Nestes casos, a ligação é estável e altamente específica, sendo suficiente para a formação do poro no epitélio e conseqüente morte do inseto.

Conforme mencionado anteriormente, a combinação das toxinas Cry1C e Cry 2 pode ser o motivo pelo qual o Agree foi o produto mais virulento entre os três selecionados para os bioensaios de CL<sub>50</sub> (Tabela 2, Figura 6), uma vez que segundo Van Frankenhuyzen (2009) e Ibrahim et al. (2008) estas toxinas tem atividade tóxica para outros noctuídeos como *Spodoptera litura*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* e *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) mas sua atividade tóxica ainda não foi relatada para a espécie do presente estudo.

Bergamasco et al. (2013) relataram a atividade tóxica das toxinas Cry1Ia e Vip3Aa para várias espécies de *Spodoptera*, inclusive *S. albula*. Os autores ressaltam ainda que a interação entre estas toxinas resultam em aumento da atividade inseticida, devido a ausência de competição por receptor(es). A CL<sub>50</sub> de



cada toxina foi estimada em 15,03 e 3,90 ng de proteína/cm<sup>2</sup>, respectivamente, enquanto que a CL<sub>50</sub> estimada para a interação foi de 1,47 ng de proteína/cm<sup>2</sup>.

**Tabela 2.** Estimativa da concentração letal média (CL50) de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* para lagartas de segundo instar de *Spodoptera albula* (26 ± 1° C, U.R. 65± 5% e fotofase de 14h).

Tratamentos	n <sup>(1)</sup>	Slope ± EP	CL50 (IC95%) x 10 <sup>5</sup>	χ <sup>2(2)</sup>
Agree	900	0,84 ± 0,05	0,022 (0,008 - 0,097)	12,64
Dipel SC	900	0,52 ± 0,05	0,38 (0,30 - 0,49)	13,61
Xentari	900	1,01 ± 0,07	1164,64 (1054,06 - 1288,66)	3,83

<sup>(1)</sup>n = número de insetos testados

<sup>(2)</sup>Qui-Quadrado (P > 0,05).

Santos et al. (2009) avaliaram a atividade toxina individual das toxinas Cry1Aa e Cry1Ab para outras espécies de *Spodoptera*. Estas toxinas presentes nos bioinseticidas Dipel SC e Xentari são tóxicas para os noctuídeos *S. frugiperda*, *Spodoptera cosmíoides* e *Spodoptera eridania*. Porém os autores não avaliaram a atividade tóxica da toxina Cry1C para estes insetos praga. Pereira et al. (2009) constataram a eficiência dos bioinseticidas Xentari e Dipel SC no controle de lagartas *S. eridania* de primeiro e terceiro instares.

As diferenças na suscetibilidade acima elencadas podem ter como principal causa a presença e ausência de receptores específicos para as toxinas Cry nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio (GÓMEZ et al., 2007; VALAITIS & PODGWAITE, 2013).

Para que a toxina Cry seja letal para artrópodes praga são necessárias várias etapas sequenciais e complexas iniciando pela dissolução do cristal após a ingestão (FAST & MILNE, 1979) em pH adequado (GRINGORTEN et al., 1992), ativação das pro-toxinas (MOHAN & GUJAR, 2003), ligação a receptores específicos nas microvilosidades apicais das células colunares do intestino médio (GÓMEZ et al., 2007; BENFARHAT-TOUZRI et al., 2013; VALAITIS & PODGWAITE, 2013) e a formação de poros nestas células, rompendo as estruturas do intestino médio

(GROCHULSKI et al., 1995). Por fim, a germinação dos esporos ingeridos pelo inseto junto com o(s) cristal(is) desencadeia o processo de septicemia (WILSON & BENOIT, 1993) causando a morte do organismo alvo. Qualquer interferência com esta cascata de eventos associados ao modo de ação do *Bt* auxilia na sobrevivência do inseto e, portanto no desenvolvimento da resistência (TABASHNIK, 1994).

É muito comum em trabalhos que visam estimar a  $CL_{50}$  a utilização de proteínas purificadas de *Bt* para assegurar que o resultado expresse a atividade somente de determinadas toxinas Cry, evitando a influência de outras toxinas, como as VIP's e exotoxinas (ARANDA et al., 1996; BOHOROVA et al., 1997). No processo de centrifugação seqüencial adotado neste trabalho considera-se que a eliminação das toxinas indesejáveis, foi feita com o descarte do meio, após a centrifugação. Testes com proteínas purificadas também são utilizados para estudar a eficiência de uma determinada toxina em relação ao inseto-alvo, porém esse não foi o objetivo deste trabalho que foi conduzido utilizando-se a suspensão, provavelmente, contendo mais de uma toxina.

Outro aspecto a ser levado em consideração na análise dos dados é a comparação entre resultados. Por exemplo, a falta de padronização dos bioensaios, até 1970, dificultou muito a comparação entre estimativas de  $CL_{50}$ , sendo sugerida a utilização de cepas “padrões”, para comparações de eficiência. As primeiras foram adotadas somente a partir de 1970. A primeira cepa, denominada *Bt thuringiensis* E-61, foi preparada na França, porém posteriormente foi trocada pela *Bt kurstaki* HD-1, que se mostrou bem mais efetiva que a anterior. Esta padronização permitiu comparações do seu efeito sobre diferentes espécies-alvo, espécies não-alvo, formulações e condições climáticas. Do mesmo modo, a falta de padronização dos bioensaios de seleção é um importante obstáculo para a abordagem do assunto, uma vez que comparações de eficiência podem levar a conclusões pouco confiáveis (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Alguns esforços têm sido feitos no sentido de minimizar estes problemas como, por exemplo, a formação de grupos interinstitucionais de pesquisa, que utilizam os mesmos métodos de execução e de avaliação de bioensaios, facilitando assim a interpretação dos resultados.

O uso de aditivos e/ou adjuvantes na formulação de bioinseticidas é importante para evitar a perda por evaporação e também para que o produto cubra

toda superfície foliar com um grau satisfatório de aderência, melhorando a sua dispersão e aumentando o período residual. Uma grande variedade de ingredientes tem sido utilizados com esta finalidade: umidificantes, aderentes, dispersantes, coadjuvantes e agentes protetores (ROSAS-GARCÍA, 2009).

Outro fator importante que causa variabilidade nos resultados é a origem das toxinas. Pequenas diferenças na sequência dos aminoácidos de uma mesma toxina produzida por diferentes cepas de *Bt* podem influenciar a atividade inseticida para um determinado inseto alvo (CRICKMORE et al., 1998).

Durante o processo de produção o *Bt* é bastante exigente em termos nutricionais sendo necessárias quantidades adequadas de carbono, nitrogênio e sais minerais incluindo cálcio, manganês, zinco, ferro, cobre, magnésio e sódio (VALICENTE et al., 2010).

Neste sentido Hossain et al. (1997) identificaram alguns nutrientes que influenciam o crescimento do *Bt*, especialmente o cálcio e cobre. Os autores enfatizaram que a presença de cobre possivelmente contribui para a formação de esporos mais resistentes ao estresse ambiental ou inibe o desenvolvimento de microrganismos competidores. Já o cálcio é necessário para a termoestabilidade dos esporos de *Bt* (DULMAGE & RHODES, 1973) e para o crescimento celular e produção das  $\delta$  endotoxinas (SIKDAR et al., 1991).

Estudo detalhado sobre a influência do zinco no desenvolvimento do *Bt* foi realizado por Yao et al. (2002a). Os autores verificaram que em baixas concentrações (até 0,5 mg/dm<sup>3</sup>), este elemento auxilia na síntese do DNA e RNA celular. De 0,5 a 50 mg/dm<sup>3</sup> ocorre a destruição das proteínas, impedindo o desenvolvimento celular normal, e quando na concentração de 60 mg/dm<sup>3</sup>, o desenvolvimento da bactéria é inviabilizado completamente.

Em outro trabalho, Yao et al. (2002b) estudaram o efeito do manganês sobre o crescimento *Bt*. Foi observado pelos autores que em altas concentrações (80 a 160 mg/dm<sup>3</sup>) este elemento é importante para o micro-organismo, enquanto que em baixas concentrações (inferiores a 80 mg/dm<sup>3</sup>) foi verificado efeito contrário. Efeito semelhante foi observado por Polanczyk (2004), onde foi verificado interação negativa entre o manganês e o crescimento de *Bt*, com todas as amostras com valores inferiores a 80 mg/dm<sup>3</sup>. De acordo com Dulmage & Rhodes (1973), em

concentrações adequadas este elemento é essencial para que o *Bt* inicie o processo de esporulação.

Apesar de Dulmage & Rhodes (1973) mencionarem que os sais inorgânicos (potássio, magnésio, fósforo, enxofre e menores quantidades de cálcio, zinco, ferro, cobalto, cobre, molibdênio e manganês) são essenciais para o crescimento dos micro-organismos, para *Bt* alguns deles, em determinadas concentrações ou na presença de outros elementos, podem influenciar negativamente o crescimento da bactéria, conforme verificado para o manganês e magnésio por Polanczyk (2004). Porém, de um modo geral, a presença de alguns elementos é tão importante que existem processos fermentativos submersos para a produção de *Bt*, no qual se utiliza pequenas quantidades de cálcio, zinco, manganês e magnésio, como ingredientes essenciais.

De acordo com os resultados obtidos por Polanczyk (2004) e Yao et al. (2002a e b), parece haver um limite quantitativo para cada elemento, podendo os sais inorgânicos, dependendo de sua concentração, inibir ou favorecer o crescimento do *Bt*.

Os dados do presente estudo enfatizam a possibilidade de uso de bioinseticidas à base de *Bt* no manejo de *S. albula*. O uso destes bioinseticidas está de acordo com as premissas do manejo integrado de pragas e podem inclusive serem utilizados com insetos parasitoides ou predadores de forma aditiva ou sinérgica (SANAHUJA et al., 2011). Os bioinseticidas tem a importante vantagem de não deixar resíduos nos alimentos, fato frequentemente constatado com inseticidas convencionais (ANVISA, 2013) e também o efeito sobre o meio ambiente é praticamente nulo, ao contrário dos inseticidas convencionais (PALMA, 2011a; PALMA, 2011b).

#### **4.2 Efeitos subletais**

Os efeitos subletais foram avaliados neste trabalho acompanhando-se a biologia das lagartas sobreviventes aos tratamentos até o final e em seguida foram pesadas as pré-pupas e pupas (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3.** Peso de pré-pupas de *Spodoptera albula* sobreviventes à diferentes concentrações dos isolados de *Bacillus thuringiensis* ( $26 \pm 1^\circ$  C, U.R.  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h).

Isolados	Concentrações					
	Controle	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$
Bt29	0,267±0,005 a	0,302±0,060 a	0,237±0,029 a	0,216±0,037 a	0,231±0,037 a	0,241±0,078 a
Bt27	0,267±0,005 a	0,196±0,038 a	0,221±0,026 a	0,229±0,030 a	0,297±0,030 a	0,207±0,014 a
Bt20	0,267±0,005 ab	0,256±0,028 ab	0,277±0,024 a	0,265±0,016 ab	0,195±0,011 b	0,224±0,015 ab
Bt05	0,267±0,005 a	0,215±0,012 ab	0,234±0,027 ab	0,198±0,021 ab	0,178±0,012 b	0,193±0,023 ab
Bt04	0,267±0,005 ab	0,248±0,015 ab	0,219±0,016 ab	0,215±0,010 b	0,283±0,026 a	0,279±0,011 ab

Médias ( $\pm$  EP) seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

**Tabela 4.** Peso de pupas de *Spodoptera albula* sobreviventes à diferentes concentrações dos isolados de *Bacillus thuringiensis* ( $26 \pm 1^\circ$  C, U.R.  $65 \pm 5\%$  e fotofase de 14h).

Isolados	Tratamentos					
	Controle	$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$
Bt29	0,222±0,006 a	0,249±0,053 a	0,193±0,029 a	0,173±0,029 a	0,193±0,032 a	0,203±0,066 a
Bt27	0,222±0,006 a	0,155±0,040 a	0,183±0,026 a	0,187±0,031 a	0,245±0,034 a	0,166±0,014 a
Bt20	0,222±0,006 a	0,213±0,028 a	0,230±0,024 a	0,216±0,013 a	0,157±0,012 a	0,178±0,015 a
Bt05	0,222±0,006 a	0,177±0,012 ab	0,185±0,026 ab	0,159±0,019 ab	0,141±0,010 b	0,156±0,024 ab
Bt04	0,222±0,006 ab	0,207±0,015 ab	0,180±0,014 b	0,171±0,010 b	0,258±0,022 a	0,230±0,012 ab

Médias ( $\pm$  EP) seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5%.

Somente o isolado Bt05 na concentração de  $10^5$  esporos/mL afetou o peso de pré-pupa e pupa (Tabelas 3 e 4), com uma redução de peso de 44% e 35%, respectivamente. Cerca de 90% das pupas não se transformaram em adultos o que tornou impossível avaliar o efeito do *Bt* sobre a longevidade dos adultos e viabilidade dos ovos. Polanczyk & Alves (2005) constataram efeitos subletais de isolados de *Bt* no peso de larvas e pupas de *S. frugiperda* e, em alguns casos estes efeitos passaram para a fase adulta afetando a oviposição e viabilidade dos adultos. Artigo publicado por Paula et al. (2014) corroboram com estes dados, pois os autores

demonstraram que em condições de laboratório que a toxina Cry1Ac de *Bt* passa para a F1 de *Chlosine lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae).

Apesar do principal foco da maioria dos estudos toxicológicos ser a sobrevivência e mortalidade dos insetos, há uma consciência crescente sobre a importância de efeitos tóxicos não letais. Os indivíduos que sobrevivem a exposição de um determinado produto tóxico podem ainda causar danos significativos ou, ao contrário, os indivíduos sobreviventes não podem mais causar danos e deveriam ser contados como “mortos”. Os efeitos subletais, de uma forma geral, podem se manifestar como reduções no tempo de vida, das taxas de desenvolvimento, da fertilidade, e da fecundidade, mudanças na razão sexual, e as mudanças de comportamento, tais como a alimentação, a procura, e postura. Assim, substâncias tóxicas podem exercer efeitos sutis, bem como aqueles evidentes que devem ser considerado na análise do seu impacto. Para *Bt* os efeitos subletais, dependendo da dose ingerida, mais comumente observados são inibição da alimentação, redução do peso pupal, prolongamento do ciclo e aumento da incidência de polimorfismo no desenvolvimento (STARK & BANKS, 2003).

Salama & Sharaby (1988) observaram que *Bt galleriae* afetou a produção e a fecundidade dos ovos. De modo semelhante, Pedersen et al. (1997) e Salama et al. (1981) relataram a redução na oviposição e fertilidade dos ovos para várias espécies de insetos. Porém, diferente dos resultados obtidos neste trabalho, Ramachadran et al. (1993) não observaram efeito prejudicial de Cry1Aa no peso de pupas de *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae) e *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae), sugerindo que esse efeito pode variar de acordo com a toxina testada. Ao contrário, Moreau & Bauce (2003) observaram um aumento do tempo de desenvolvimento larval em 14% e redução significativa do peso de pupas de *C. fumiferana*.

Fast & Reginere (1984) estudaram a capacidade desta espécie de recuperar da infecção por *Bt* após um período de tempo, em todas as concentrações cumulativas a mortalidade aumentou até cerca de 10 dias depois do início do ensaio. A extensão do período de exposição de 1 dia a contínua (equivalente a uma exposição de 6 dias), resultou em redução de 500 vezes da CL<sub>50</sub> e uma redução equivalente no TL<sub>50</sub>. Algumas lagartas se recuperaram se for permitido se alimentar de

dieta sem *Bt*, mesmo após exposição durante 4 dias em uma concentração muito elevada de *Bt*. A taxa de crescimento de larvas recuperadas é normal, mas o tempo necessário para o crescimento normal de currículo varia de acordo com a dose e duração da exposição.

Lira et al. (2013) avaliaram o efeito da toxina Cry1Bh1 em *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae), *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) e *S. frugiperda*. Além do efeito letal, os autores descreveram uma redução superior a 80% do crescimento larval em indivíduos sobreviventes aos tratamentos. No trabalho que caracterizou a resistência de *S. frugiperda* para o milho *Bt* em Porto Rico, Storer et al. (2010) verificaram taxas de inibição do crescimento larval superior a 100 vezes em populações resistentes.

Ghassemi-Kahrizeha & Aramidehb (2015) estudam o efeito de *Bt* sobre o besouro da batata (*Leptinotarsa decemlineata*) e enfatizaram que apenas 15% dos indivíduos sobreviventes tornaram-se adultos, ou seja, completam o desenvolvimento. A mortalidade pupal das lagartas sobreviventes ficou em torno de 50%. Os autores constataram que larvas grandes do besouro da batata permanecem em plantas após a aplicação de *Bt* causando danos significativos. Mas estas larvas grandes são incapazes de se alimentar e até mesmo se elas se alimentam, para estes sobreviventes, houve alta mortalidade durante a fase de pupa e houve um atraso no desenvolvimento para a fase de adulto e se eles se tornam insetos adultos, eles não vão ter desenvolvimento e fisiologia normais e, conseqüentemente, o dano que eles causam não será considerável. Apenas contando com a taxa de mortalidade das larvas em um curto período de tempo não pode fornecer uma boa estimativa do o nível de proteção das culturas obtidas através da aplicação de *Bt*; por conseguinte, a mortalidade causada pela aplicação de inseticidas à base de *Bt* será mais elevados do que os valores estimados.

Stark & Banks (2003) sugerem estudos demográficos como um meio mais adequado para avaliar o efeito total de substâncias tóxicas em insetos, simplesmente porque estes estudos são capazes de demonstrar todos os efeitos que uma substância tóxica pode ter em uma população. Além disso, estudos demográficos são geralmente conduzidos durante todo o período de vida de um organismo e, assim, proporcionam um retrato completo da toxicidade. Estudos

demográficos toxicológicos ou experimentos de resposta das tabelas de vida proporcionam uma medida do efeito tóxico de substâncias na taxa de crescimento da população.

As tabelas de vida são instrumentos muito úteis para esta finalidade, pois expõe grupos de indivíduos a doses ou concentrações crescentes de uma substância tóxica ao longo do tempo de vida do inseto. Existem importantes vantagens inerentes à utilização das tabelas de vida em relação as estimativas de concentração letais tradicionais. Além de expressarem a medida global de efeito tóxico obtido, outras interações que não são perceptíveis a curto prazo podem ser avaliadas nas tabelas de vida. Por exemplo, os resultados de vários estudos indicaram que os efeitos subletais podem ser muito sutis e afetam populações em concentrações mais baixas do que a curva de resposta à concentração letal. Stark & Banks (2003) enfatizaram que alguns agentes tóxicos podem afetar parâmetros demográficos bem abaixo da curva de concentração-resposta, resultando em diminuição da população ou mesmo sua extinção em concentrações que pela análise normal dos dados (mortalidade) não teriam nenhum efeitos sobre os indivíduos.

Outro fenômeno que pode ocorrer em populações estressadas é aumentar a reprodução. A compensação da população é o processo pelo qual o potencial reprodutivo de sobreviver dos indivíduos numa população aumenta, porque há menos competição por recursos com a redução do número de indivíduos. A remoção dos indivíduos de uma população, seja através da ação de substâncias tóxicas, resulta em sobreviventes que têm mais recursos disponíveis, e, assim, eles podem reproduzir a uma taxa maior. Os descendentes também são normalmente mais saudáveis e pesam mais.

A principal desvantagem da utilização da toxicologia demográfica é que o desenvolvimento da tabela de vida pode ser complexa e demorada. Além disso, existem limitações para espécies que têm longos ciclos de vida e maturação sexual demorada, períodos de pre-oviposição prolongados e baixo número de descendentes. Além disso, taxas de crescimento populacional obtidas em condições de laboratório não refletem as condições do inseto na natureza: a dependência da densidade, a concorrência, imigração, emigração, predação e / ou parasitismo não



são avaliados em tabela de vida. Outro problema com muitas respostas à tabela de vida é que os organismos estão expostos a concentrações tóxicas constantes quando, na verdade, muitas substâncias tóxicas degradam no ambiente ao longo do tempo (STARK & BANKS, 2003).

Sedaratian et al. (2013) avaliaram os efeitos subletais de *Bt* em *H. armigera* utilizando esta metodologia e constataram que a duração dos instares larvais de *H. armigera* foi significativamente afetada pelo *Bt*. Além disso, a fecundidade foi também afetada negativamente em mariposas fêmeas obtidas a partir de recém-nascidos tratados com *Bt kurstaki*, com a taxa de eclosão de ovos quase zero. Os autores também apresentam dados que suportam que o efeito de concentrações subletais de *Bt kurstaki* pode passar para a próxima geração.

Concentrações subletais de *Bt kurstaki* reduziram a taxa líquida de reprodução, e também foram relatadas diferenças significativas entre os valores deste parâmetro em todos os tratamentos testados quando comparados com a testemunha. As taxas intrínseca e finita de aumento foram significativamente menores nos insetos tratados com *Bt kurstaki* em comparação com a testemunha. Conseqüentemente houve redução da taxa de desenvolvimento para *H. armigera* tratadas com *Bt kurstaki*, o tempo médio entre gerações e tempo de duplicação foram significativamente superiores em insetos expostos a qualquer concentração de *Bt kurstaki* em comparação com a testemunha.

## 5. CONCLUSÕES

O bioinseticida Agree foi o mais virulento para *S. albula*.

O isolado Bt05 afetou o peso pré-pupas e pupas de *S. albula* sobreviventes.

## 6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos**. Brasília: ANVISA. 2013. 26p.

AGROFIT **Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em:[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 28 mar. 2015.

AGUIAR, R.W.S.; MARTINS, E.S.; FERNANDEZ, R.S.; MELATTI, V.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT R.; RIBEIRO, B.M. Avaliação da toxicidade da proteína recombinante inseticida Cry2Ab de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* contra larvas de *S. frugiperda*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília, v. 139, 38p. 2006.

AMEEN, A. O.; FUXA, J.R.; RICHTER, A.R. Antagonism between formulations of different *Bacillus thuringiensis* subspecies in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, Tifton, v.33, p.129-134, 1998.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas guia prático de produtos fitossanitários para o uso agrícola**. 9. ed. São Paulo: Organização Andrei, 2013. 1618 p.

ANGULO, A.O.; OLIVARES, T.S.; WEIGERT, G.T.H. **Estados inmaduros de lepidópteros nóctuidos de importância agrícola y forestal en Chile y claves para su identificación (Lepidoptera: Noctuidae)**. Concepción: Universidad de Concepción, 2008. 154 p.

ARANDA, E.; SÁNCHEZ, J.; PEFEROEN, N.; GUERECA, L.; BRAVO, A. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.68, n.3, p.203-212, 1996.

BEEGLE, C. B.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v.124, n.3, p.587-616, 1992.

BENFARHAT-TOUZRI, D.; SAADAOU, M.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; SAADAOU, I.; HICHEM AZZOUZ, H.; TOUNSI, S. Histopathological effects and determination of the putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Da toxin in *Spodoptera littoralis* midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.112, p.142-145, 2013.

BERGAMASCO, V.B.; MENDES, D.R.P.; FERNANDES, O.A.; DESIDÉRIO, J.A.; LEMOS, M.V.F. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.112, p. 152-158, 2013.

BOHOROVA, N.; CABRERA, M.; ABARCA, C.; QUINTERO, R.; MACIEL, A.M.; BRITO, R.M.; HOISINGTON, D. BRAVO. A. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal proteins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, n.2, p.412-415, 1997.

CAB INTERNATIONAL CENTRE. **The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary**. Wallingford: CAB International Centre, 2010. 40p.

CARROLL, J.; ELLAR, D.J. An analysis of *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin action on insect midgut membrane permeability using a light-scattering assay. **European Journal of Biochemistry**, London, v.214, p.771–778, 1993.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v.62, p.807-813, 1998.

DULMAGE, H.T.; RHODES, R.A. Production of pathogens in artificial media. In: BURGESS, H.D.; HUSSEY, N.W. (Ed.). **Microbial control of insects and mites**. London: Academic Press, 1973. cap. 24, p.507-540.

FAST, P.G.; REGINERE, J. Effect of exposure time to *Bacillus thuringiensis* on mortality and recovery of the spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Canadian Entomologist**, Ottawa, v.116, p. 123-130, 1984.

FAST, P.G.; MILNE, R. *Bacillus thuringiensis* parasporal toxin: dissolution of crystals with retention of toxicity. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, n.34, p.319, 1997.

GARBUTT, J.; MICHAEL, B.B.; WRIGHT, D.J.; RAYMOND, B. Antagonistic competition moderates virulence in *Bacillus thuringiensis*. **Ecological Letters**, Malden, 2011. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2011.01638.x

GHASSEMI-KAHRIZEHA, A.; ARAMIDEHB. S. Sub-lethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner on larvae of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, Quebec, v.48, 259-267, 2015.

GLARE, T.R.; O'CALLAGHAM, M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester, John Wiley & Sons, 350p, 2000.

GÓMEZ, I.; PARDO-LÓPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; FERNANDEZ, L.E.; PÉREZ, C.; SÁNCHEZ, J.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, New York, v.28, p. 169 - 173, 2007.

GONZÁLEZ, J.B. Aspectos importantes sobre la evolución y combate de las plagas del algodón en Colombia. **Revista Peruana de Entomología**, Lima, v.9, p.145-155, 1966.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.69, n.4, p.488-497, 1976.

GRINGORTEN, J.L.; MILNE, R.E.; FAST, P.G.; SOHI, S.S.; van FRANKENHUYZEN, K. Suppression of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$  endotoxin activity by low alkaline pH. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.60, p. 47-52, 1992.

GROCHULSKI, P.; MASSON, L.; BORISOVA, S.; PUSZTAI-CAREY, M.; SCHWARTZ, J-L., BROUSSEAU, R.; CYGLER, M. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. **Journal of Molecular Biology**, London, v.254, p.447–464, 1995.

HADDAD, M.L. **Utilização do Polo-PC para análise de Probit**. In: ALVES, S.B. (Ed.) *Controle microbiano de insetos*. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 34. p.999-1014.

HALLMAN G. Importancia de algunas relaciones naturales plantas-artrópodos en la agricultura de la zona cálida del Tolima Central. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogota, v.5, p.19-26, 1979.

HOSSAIN, M.A.; AHMED, S.; HOQUE, S. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.70, n.3, p.221-225, 1997.

IBRAHIM, N. A. G. A. Z.; ABDALLAH S. O.; SALAMA, M. S.; MADKOUR, M. A. Construction of a potent strain of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. **Agriculture and Forestry Research**, Quebec, v.58, p.111-123, 2008.

KIROUAC, M.; VACHON, V.; NOËL, J.-F.; GIRARD, F.; SCHWARTZ, J.L.; LAPRADE, R. Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. **Biochemistry and Biophysics Acta**, Amsterdan, v.1561, p.171-179, 2002.

LIRA, J.; BERINGER, J.; BURTON, S.; GRIFFIN S.; SHEETS, J.; TAN, S.Y.; WOOSLEY, A.; WORDEN, S.; NARVA, K.E. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Bh1 against *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) and other lepidopteran pests. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.79, p. 7590–7597, 2013.

MOHAN, M.; GUJAR, J.T. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains and commercial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L). **Crop Protection**, Guildford, v. 30, p.306-311, 2001.

MONTEIRO, L.B.; SOUZA, A. Controle de tortricídeos em macieira com duas formulações de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* em Fraiburgo – SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, p.423-428, 2010.

MONTEZANO, D. G. **Padronização de metodologia de criação de *Spodoptera eridania* (Stoll) e *Spodoptera albula* (Walker) visando detalhar parâmetros biológicos**. 2012, 146 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

MONTEZANO, D. G.; SPECHT, A.; BORTOLIN, T. M.; FRONZA, E.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; ROQUE-SPECHT, V. F.; PEZZI, P.; LUZ, PRISCILA C.; BARROS, N. M. Immature stages of *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae): Developmental parameters and host plants. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 85, p. 271-284, 2013.

MOREAU, G.; BAUCE, E. Developmental polymorphism: a major factor for understanding sublethal effects of *Bacillus thuringiensis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.98, p.133–140, 2001.

NOVO PADRINO, J.M.; MARTINEZ, R.; HERNÁNDEZ, F. F. Determinación del consumo de alimento por instares larvales en *Spodoptera sunia* (Guene) sobre plantas de tabaco. **Centro Agrícola**, v.12, p. 9-14, 1985.

PALMA, D. C. de A. Agrotóxicos em água e alimentos: risco à saúde humana. **Revista Uniara**, v.14, n.2, p. 7-21, 2011.

PALMA, D. C. de A. **Agrotóxicos em leite humano de mães residentes em Lucas do Rio Verde – MT**. 2011. 104p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá.

PANIZZI, A.R.; BUENO, A.F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. (Org.). **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. 1ed.Brasília: Embrapa, 2012, p. 335-420.

PAULA, D.P.; ANDOW D.A.; TIMBÓ R.V.; SUJII E.R.; PIRES C.S.S.; FONTES E.M.G. Uptake and transfer of a *Bt* toxin by a Lepidoptera to its eggs and effects on its offspring. **PLoS ONE**, Cambridge, v.9, n.2, e95422, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0095422

PEDERSEN, A.; DEDES, J.; GAUTHIER, D.; Van FRANKENHUYZEN, K. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* on the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.83, n.3, p.253-262, 1997.

PEREIRA, J.M.; SEII, A.H.; OLIVEIRA, M.F.; BRUSTOLIN, C.; FERNANDES, P.M. Mortalidade de lagartas de *Spodoptera eridania* (Cramer) pela utilização de *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, p.140-143, 2009.

PIOTTO, B. K. ; SOSA-GOMEZ, DANIEL R. Flutuação populacional de Noctuídeos determinada pela captura com armadilhas luminosas na região norte de Londrina, Paraná. In: Jornada Acadêmica da Embrapa Soja, 8, 2013. Londrina. **Resumos expandidos**. Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 49-52.

POGUE, G.M A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, New York, v.43, p. 1-202, 2002.

POLANCZYK, R. A. **Estudos de *Bacillus thuringiensis* Berliner visando ao controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith)**. 2004. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

POLANCZYK, R. A.; ALVES, S. B. Biological parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) assayed with *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n.5, p. 464-468, 2005.

POLANCZYK, R. A. ; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. Screening of *Bacillus thuringiensis* against three brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biopesticides International**, Nova Deli, v. 1, n.1/2, p. 114-124, 2005.

POLANCZYK, R. A.; DE BORTOLI, S. A.; DE BORTOLI, C. P. *Bacillus thuringiensis* - based biopesticides against agricultural pests in Latin America. In: LARRAMENDY, M.L.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics**. Rijeka: Intech, 2012, p. 445-462.

POLANCZYK, R.A. **Interação entre *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) visando ao controle de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Erebidae), *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2015, 97 f. Tese de Livre-Docência – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RAMACHADRAN, R.; RAFFA, K.F.; MILLER, M.J.; ELLIS, D.D.; McCOWN, B.H. Behavioral responses and sublethal effects of spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) and fall webworm (Lepidoptera: Arctiidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin in diet. **Environmental Entomology**, Lanham, v.22, n.1, p.197-211, 1993.

ROSAS-GARCIA, N.M. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: An environmentally friendly alternative. **Recent Patents on Biotechnology**, Beijing, v.3, p.28-36, 2009.

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v.9, p.283–300, 2011.

SALAMA, H.S.; FODA, M.S.; EL SHARABI, A.; MATTER, M.; KHALAFALLAH, M. Development of some lepidopterous cotton pests affected by exposure to sublethal levels of endotoxins of *Bacillus thuringiensis* for different periods. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.38, n.3, p.220-229, 1981.

SALAMA, H.S.; SHARABY, A.F. Effects of exposure to sublethal doses of *Bacillus thuringiensis* (Berl.) on the development of the greasy cutworm *Agrotis ypsilon* (Hufn.). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.106, n.4, p.503-511, 1988.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v.31, p.217-231, 2011.

SANTOS, K.; NEVES, P.; SANTOS, W. J.; VILAS BOAS, G.; DUMAS, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C.; QUEIROZ, P.; MONNERAT, R. G. Selection and characterization of the *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 157-163, 2009.

SEDARATIAN, A.; FATHIPOUR, Y.; TALAEI-HASSANLOUI, R.; JURAT-FUENTES, J.L. Fitness costs of sublethal exposure to *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*: a carryover study on offspring. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v.137, p.540–549, 2013.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, p.775-806, 1998.

SIKDAR, D.P.; MAJUMDAR, M.K.; MAJUMDAR, S.K. Effect of minerals on the production of the delta endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Israelensis*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v.13, n.7, p.511-514, 1991.

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

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

TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.39, p.47–79, 1994.

TAKELAR N.S.; SHELTON A.M. Biology, ecology and management of the diamondback moth. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.38, p.275- 301, 1993.

TEIXEIRA, E. P.; NOVO, J.P.S.; STEIN, C. P.; GODOY, I. J. Primeiro registro da ocorrência de *Spodoptera albula* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) atacando amendoim (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.30, n.4, p. 723-724, 2001.

THOMAZONI, D.; SORIA, M.F.; PEREIRA, E.J.G.; DEGRANDE, P.E. ***Helicoverpa armigera*: perigo eminente aos cultivos de algodão, soja e milho no estado do Mato Grosso**. Dourados: Instituto Matogrossense do Algodão, 2013. 12p. (Circular Técnica, 5).

VALAITIS, A.P.; PODGWAITE, J.D. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-binding glycoconjugates present on the brush border membrane and in the peritrophic membrane of the Douglas-fir tussock moth are peritrophins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.112, p. 1-8, 2013.

VALICENTE, F. H.; VIEIRA, C. M.; LEITE, M. I. S. Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide using commercial lab medium and agricultural by-products as nutrient sources. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 9, p. 1-11, 2010.

van FRANKENHUYZEN, K. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.101, n.1, p.1-16, 2009.

ZENKER, M.M.; BOTTON, M.; TESTON, J.A.; SPECHT, A. Noctuidae moths occurring in grape orchards in Serra Gaúcha, Brazil and their relation to fruit-piercing. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v.54, p. 288-297, 2010.

YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.; ZOU, X.; QU, S.S.; YU, Z.N. Microcalorimetric study on the biological effects of Zn<sup>2+</sup> on *Bacillus thuringiensis* growth. **Chinese Journal of Chemistry**, Beijing, v.20. n.4, p.746-752, 2002.

YAO, J.; LIU, Y.; GAO, Z.T.; LIU, P.; SUN, M.; QU, S. S.; YU, Z. N. A microcalorimetric study of the biologic effect of Mn(II) on *Bacillus thuringiensis* growth. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v.70, n.2, p.415-421, 2002.

XUE, J.L.; CAI, Q.X.; ZHENG, D.S.; YUAN, Z.M. The synergistic activity between Cry1Aa e Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa armigera*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.40, p.460-465, 2005.



WEI, J.; GUO, Y; LIANG, G.; WU, K.; ZGANG, J.; TABASNIK, B.E.; LI, X. Cross-resistance and interactions between *Bt* toxins Cry1Ac and Cry2Ab against the cotton bollworm. **Scientific Reports**, Tokyo, v.5, 7714, 2015.

WILSON, G.R.; BENOIT, T.G. Alkaline pH activates *Bacillus thuringiensis* spores. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v.62, p. 87-89, 1993.