

SILVERIO DE OLIVEIRA CAMPOS

HORMESE INDUZIDA POR Cry1Fa EM
Spodopterafrugiperda

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2015

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C198h Campos, Silverio de Oliveira, 1987-
2015 Hormese induzida por Cry1Fa em *Spodoptera frugiperda* /
Silverio de Oliveira Campos. – Viçosa, MG, 2015.
vi, 20f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eliseu José Guedes Pereira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.18-20.

1. Hormese. 2. *Spodoptera frugiperda*. 3. *Bacillus thurigiensis*. 4. Toxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

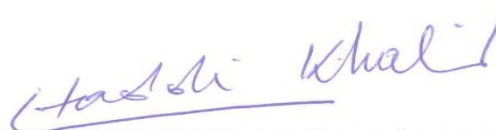
SILVERIO DE OLIVEIRA CAMPOS

**HORMESE INDUZIDA POR Cry1Fa EM
*Spodoptera frugiperda***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de julho de 2015.


Raul Narciso Carvalho Guedes


Haddi Khalid


Eugênio Eduardo de Oliveira
(Coorientador)


Eliseu José Guedes Pereira
(Orientador)

A meus pais Irani e Francisco, aos meus avós, que com o exemplo de vida me apresentaram à importância da honestidade e persistência. A minha namorada Verônica, por todo o incentivo, carinho e companheirismo.

A Deus por tudo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela formação acadêmica de graduação e pós-graduação, bem como ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Eliseu José Guedes Pereira pela oportunidade e pela orientação durante um ano na graduação e pelos dois anos de mestrado e ao Prof. Eugênio Eduardo de Oliveira pela co-orientação, bem como ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes pelas dicas na realização deste trabalho, principalmente na análise dos resultados.

Ao Prof. Marcelo Coutinho Picanço pela orientação durante quatro anos na graduação e pelos seus ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Interação Inseto-Planta: Afonso, André, Aniely, Clébson, Diogo, Fernanda, Jaciara, Nilson, Mauricélia e Marcelo pela amizade e colaboração durante estes dois anos de convivência, e principalmente ao Oscar, Isabella, Cleomar, João Victor pela grande e essencial contribuição nos experimentos deste e de outro trabalho.

A todos os meus amigos da Agronomia e da UFV pelos bons momentos vividos nestes oito anos.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	3
Origem e manutenção de populações	3
Toxina purificada.....	4
Bioensaios com toxina em dieta	4
Bioensaios com folhas de milho Bt e não-Bt	5
Tabela de vida.....	6
Análises estatísticas	6
RESULTADOS	7
Bioensaios com toxina em dieta	7
Bioensaios com folhas de plantas de milho Bt e não-Bt.....	8
DISCUSSÃO	9
CONSIDERAÇÕES FINAIS	12
FIGURAS E TABELAS	13
REFERÊNCIAS	18

RESUMO

CAMPOS, Silverio de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2015. **Hormese Induzida por Cry1Fa em *Spodoptera frugiperda***. Orientador: Eliseu José Guedes Pereira. Coorientador: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Respostas subletais a toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) são frequentemente negligenciadas em estudos de toxicidade a Bt, muito embora efeitos estimulantes associados a baixas doses de compostos tóxicos que são inseticidas em doses mais elevadas já foram reconhecidas como um fenômeno toxicológico geral. A evidência para uma relação dose-resposta bifásica, ou hormese, foi reconhecida como uma das possíveis causas subjacentes ao ressurgimento de pragas e erupção de pragas secundárias. Hormese tem também implicações potencialmente importantes para manejo de populações de insetos-pragas resistentes a plantas Bt, mas faltam evidências de sua ocorrência em tal contexto. Neste estudo, é relatado efeito estimulante de doses subletais da toxina Cry1Fa em uma linhagem de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistente a esta toxina. Bioensaios foram realizados em laboratório usando recipientes com dieta artificial tratada superficialmente com Cry1Fa. Larvas neonatas foram expostas a dieta por dez dias e os níveis de mortalidade e inibição de crescimento foram avaliados. Parâmetros de desempenho demográfico foram estimados a partir de tabelas de fertilidade para insetos expostos a toxina em dieta artificial e em folhas de milho Bt. Observou-se um pico na taxa reprodutiva líquida em 729 ng/cm² de Cry1Fa, resultando em um pico na taxa intrínseca de crescimento populacional nesta dose. Também ocorreu aumento crescente no desempenho populacional em baixas doses de Cry1Fa na dieta e estes foram correlacionados com a biomassa pupal dos pais. Na tabelas de vida usando folhas de milho Bt Cry1F e não-Bt, os insetos expostos ao milho Bt tiveram redução no tempo de geração (*T*) em relação aos insetos não-expostos. Esses resultados são consistentes com hormese induzida pela toxina Bt Cry1Fa em *S. frugiperda*. Algumas implicações potenciais desse fenômeno são discutidas nesta dissertação de mestrado.

ABSTRACT

CAMPOS, Silverio de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2015. **Cry1Fa-Induced Hormesis in *Spodopterafrugiperda***. Advisor: Eliseu José Guedes Pereira. Co-advisor: Eugênio Eduardo de Oliveira.

Sublethal responses to *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxins are often overlooked in studies of toxicity to Bt, even though stimulatory effects associated with low doses of toxic compounds that at higher doses have already been recognized as a general toxicological phenomenon. The evidence for a biphasic dose-response relationship, hormesis, was recognized as one of the possible underlying causes of pest resurgence and secondary pest outbreaks. Hormesis also has potentially important implications for pest management of insect populations resistant to Bt plants, but evidence for this has yet to be shown. In study, stimulatory effects of sublethal concentrations of Cry1Fa are reported in a strain of *Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant to this toxin. Bioassays were performed in the using artificial diet superficially treated with Cry1Fa. Neonates were exposed for ten days, when larval mortality and growth inhibition were assessed. Demographic performance parameters were estimated using fertility life tables for insects exposed to the toxin on artificial diet or in leaves of Bt maize. An elevation in the net reproductive rate was observed at the concentration of 729 ng/cm² Cry1Fa, thus resulting in elevated intrinsic rate of population increase at this toxin concentration. Also, elevated population performance occurred under low Cry1Fa diet concentrations and these were correlated with the parental pupal biomass. For life table constructed for armyworms on maize leaves, the insects exposed to Bt Cry1F maize foliage had reduced generation time (*T*) compared to those feeding on non-Bt isoline maize. These results are consistent with hormesis induced by the Bt Cry1Fa toxin in *S. frugiperda*. Some potential implications of this phenomenon are discussed in this master thesis.

INTRODUÇÃO

Resistência a compostos tóxicos é importante não somente como modelo de estudo de microevolução, mas também como uma estratégia de monitoramento ambiental *in situ* e como uma preocupação econômica devido ao potencial comprometimento do controle da praga-alvo (Brattsten et al., 1986; Knight e Norton, 1989; Hemingway et al., 2002; Guedes et al., 2010). A resistência é um problema contínuo de atenção, que historicamente tem se baseado fortemente em efeitos letais de compostos tóxicos. Embora a importância desses efeitos seja inegável, estimativas do efeito letal necessariamente requerem doses relativamente altas destes compostos em bioensaios o que limitam a compreensão do impacto potencial de doses baixas (sub-letais) destes compostos.

Dentre os compostos tóxicos a artrópodes, destacam as toxinas ativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que são atualmente expressas em plantas transgênicas. A rápida adoção desta tecnologia e seu uso extensivo tem aumentado o risco de seleção de populações de insetos-praga-alvo adaptadas a essas toxinas (Tabashnik et al., 2013). O alto risco ocorre devido à presença contínua da proteína inseticida ao longo do desenvolvimento fenológico das plantas Bt, o que exerce uma elevada pressão de seleção de genótipos resistentes (Gould, 1998). Além disso, os poucos estudos sobre a produção destas toxinas Bt nas plantas relatam que essas são produzidas heterogeneamente nas diferentes fases fenológicas e estruturas da planta transgênica (Nguyen e Jehle, 2007; Székács et al., 2010), o que pode provocar efeitos diversos no inseto-alvo além de potencialmente comprometer o critério de alta dose.

Efeitos estimulantes associados a baixas doses de compostos que são tóxicos em doses mais elevadas, tais como pesticidas, têm sido amplamente relatados e mais recentemente estão se tornando reconhecidos como um fenômeno toxicológico geral (Calabrese e Baldwin, 2003; Calabrese, 2004; 2008; Guedes e Cutler, 2014). A evidência de tal relação dose-resposta bifásica de toxina Bt ainda é escassa em insetos alvos, mas poderia estar como uma das causas potenciais subjacentes ao ressurgimento de pragas e surtos de pragas secundárias, pois estes já são reconhecidos em inseticidas (Hardin et al., 1995; Zanuncio et al., 2003; Cohen, 2006; Cutler et al., 2009; Guedes et al., 2009; Guedes et al., 2010). Além disso, a evidência

de hormese em parâmetros de desempenho biológico de inseto praga e as suas implicações têm sido escassos, apesar da sua importância para uma compreensão abrangente dos efeitos das toxinas em populações de pragas (Forbes e Calow, 1999; Stark e Banks, 2003; Guedes et al., 2009).

Entretanto, dos seis casos de resistência reportados no mundo em plantas que produzem toxinas Bt em condições de campo, dois se referem à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) em milho Cry1F (evento TC1507). Estes dois casos aconteceram em Porto Rico e Brasil com apenas quatro anos de comercialização (Storer et al., 2010; Farias et al., 2014). O caso de Porto Rico foi o primeiro de resistência que levou à retirada de uma cultura Bt do mercado (Tabashnik et al., 2013).

Entre as possíveis causas que levaram a resistência destas linhagens de *S. frugiperda* ao milho Cry1F, tem se mencionado que o evento TC1507, que expressa esta toxina, não é de alta dose (Santos-Amaya, 2014; Farias et al. 2015). Além disto, condições de estresses nas plantas, por exemplo, por falta de irrigação adequada, podem causar baixa produção de toxina pelas plantas. Estas duas condições de baixa produção de toxina poderiam causar em insetos efeitos subletais ou estimulantes de hormese, o que precisa ser estudado porque poderiam ter implicações no emprego e manejo de resistência de insetos em culturas transgênicas Bt.

O termo hormese para o fenômeno estimulatório de compostos tóxicos originou-se do grego e significa “para excitar”. Por conseguinte, hormese pode ser definida como uma relação de dose-resposta caracterizada por uma inversão na resposta entre baixas e altas doses de um estressor (por exemplo, um inseticida), caracterizando assim uma relação bifásica. As doses que causam resposta hormética são limitadas a faixas tipicamente abaixo da concentração sem efeitos observáveis, embora este não é sempre o caso para artrópodes em resposta a pesticidas (Guedes et al, 2014).

Assim, este trabalho de dissertação propõe estudar se a toxina de BtCry1Fa pode induzir o efeito de hormese em uma linhagem resistente de *S. frugiperda*. Os resultados deste trabalho mostram que em doses intermediárias de Cry1Fa ocorre aumento na taxa reprodutiva líquida (R_0), e mais relevante ainda, na taxa intrínseca

de crescimento populacional (r_m) da linhagem resistente a Cry1Fa; em doses superiores foi observado redução nas estimativas destes dois parâmetros de desempenho demográfico, o que confirma o efeito de hormese produzido por Cry1Fa nesta linhagem de *S. frugiperda*. Estes resultados têm implicações importantes para o uso de plantas transgênicas para o controle de *S. frugiperda* no Brasil e para o manejo da resistência de plantas transgênicas expressando Cry1Fa.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem e manutenção de populações

A população de *S. frugiperda* é altamente resistente a toxina Cry1Fa, tendo uma razão de resistência superior a 183 vezes em relação a população suscetível (Santos-Amaya, 2014). Esta população resistente foi originada a partir de insetos provenientes de quatro estados produtores de milho (Paraná, Mato Grosso, Distrito Federal e Goiás). A seleção foi realizada a partir de folhas de milho Cry1Fa do evento TC1507 expostas por 11 gerações. Esta linhagem é resistente a toxina Cry1Fa e não apresentam custo adaptativo associadas à resistência a toxina. O principal mecanismo de resistência presente é o nível reduzido de alcalino fosfatase ligadas à membrana do intestino médio (mALP) (Santos-Amaya, 2014).

Os insetos foram mantidos usando métodos adaptados de Kasten Jr. et al. (1978). As mariposas foram colocadas em gaiolas de PVC de 40 cm de altura x 30 cm Ø com papel sulfite nas paredes internas para oviposição e com solução a base de 10% açúcar e 5% ácido ascórbico embebida em algodão para alimentação. Os ovos foram coletados a cada dois dias, durante quatro dias, e armazenados em sacolas plásticas até eclosão. Grupos de neonatas foram transferidos para dieta artificial (Kasten Jr. et al., 1978) em copos plásticos de 500 ml até o 2º ínstar e depois individualizadas em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) até pupa. As criações foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 15\%$ e fotoperíodo de 14L: 10E.

Toxina purificada

A toxina Cry1Fa utilizada nos bioensaios foi obtida do laboratório da Dra. Marianne P. Carey, (Case Western Reserve University, OH). A proteína foi ativada com tripsina e purificada em HPLC, sendo fornecida na forma liofilizada. A toxicidade da Cry1Fa do estoque utilizado nos bioensaios para *S. frugiperda* é semelhante àquela obtida em outros laboratórios tais como da University of Nebraska-Lincoln (Santos-Amaya, 2014).

Bioensaios com toxina em dieta

Bioensaios foram conduzidos usando a técnica descrita por Marçon et al., (1999) com pequenas modificações. Foram utilizadas bandejas de 128 células (CD International Inc., Pitman, NJ). Um mililitro de dieta artificial foi colocado em cada célula, deixando-se solidificar. Utilizaram-se seis concentrações da toxina purificada mais o controle sem toxina. As diluições foram feitas em detergente não iônico Triton-X-100 a 0,1% para obter espalhamento uniforme na superfície da dieta. Cada célula foi tratada superficialmente com 30 μ L da concentração indicada. O controle consistiu em células tratadas somente com o diluente.

As células tratadas foram deixadas secar ao ar, e posteriormente, uma lagarta neonata (< 24 horas) foi transferida para cada célula usando um pincel fino. As células foram cobertas com tampas de plástico autoadesivas (CD International Inc., Pitman, NJ), que permitem a troca gasosa com o ambiente externo. Após 7 dias as lagartas foram transferidas para novas bandejas tratadas com as respectivas doses e sendo expostas até o 10 dias e mantidas em escotofase, $27 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura e $70 \pm 15 \%$ de umidade relativa. A partir do 10º dias as lagartas foram transferidas para bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil, Diadema, SP) até o estágio de pupa. O peso das larvas aos 10 dias e de pupas foram registrado para verificar se ocorreu mudanças em relação ao crescimento das larvas tratadas com a toxina às larvas do controle. As bandejas foram mantidas em temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 15 \%$ e fotoperíodo de 14L: 10E. Para cada

concentrações foram realizadas 8 repetições, usando 16 larvas em cada repetição (total de 128 neonatas por concentração).

Com machos e fêmeas virgens obtidos de cada concentração, foram formados vinte casais para cada tratamento. Cada casal foi disposto em uma gaiola de PVC (10 cm altura x 10 cm Ø) com papel sulfite nas paredes internas para oviposição e com solução a base de 10% açúcar e 5% ácido ascórbico embebida em algodão para alimentação. As massas de ovos de cada casal foram retiradas diariamente e acondicionadas em potes plásticos de 150 mL para a eclosão das lagartas, assim foi realizado até o final da oviposição e registrado também a longevidade das fêmeas e machos. A fertilidade foi determinada contando diariamente o número de neonatas eclodidas de cada massa de ovos. Foi padronizada a retirada de 10 neonatas da terceira postura de cada gaiola e mantidas em dieta sem toxina até pupa. Estes indivíduos foram usados para avaliar o número de sobreviventes, peso de pupas e a razão sexual das doses que foram aplicadas sendo estes parâmetros utilizados para elaboração da tabela de vida (Santos-Aamaya, 2014, Pereira et al., 2009; Crespo et al., 2010; Velez et al., 2013).

Bioensaios com folhas de milho Bt e não-Bt

Os parâmetros avaliados em dieta foram também utilizados em plantas Bt usando folhas de milho no estágio V4-V9, dos híbridos P30F35 Bt(Cry1F) e não-Bt (DuPont Pioneer, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil). Os milhos foram semeados no campo experimental da UFV, realizando a correção do pH do solo e efetuando-se adubação de base com 50 g de NPK 08-28-16 por metro linear. As plantas foram irrigadas diariamente e adubadas aos 10 e 35 dias com 40 g de NPK 20-05-20 por metro linear. Os demais tratamentos culturais foram realizados de acordo com as recomendações para o cultivo de milho (Cruz, 2010), sem aplicação de pesticidas, sendo o controle de plantas daninhas realizado manualmente.

Para realização do experimento em folhas de milho Bt e não-Bt, foram usadas 160 lagartas (<24 horas) para cada híbrido de milho. Neonatas da linhagem resistente de *S. frugiperda* foram selecionadas ao acaso e colocadas individualmente sobre folhas de milho dispostas em bandejas de PVC de 16 células (Advento do Brasil,

Diadema, SP). Os fragmentos de folha de milho foram trocados a cada dois dias até que as lagartas em pupar.

Como nos bioensaios com toxina em dieta, também foram utilizados machos e fêmeas virgens obtidos em ambos os híbridos de milho Bt e não-Bt para formar vinte casais mariposas. Foram utilizadas as mesmas condições de acondicionamento, alimentação e parâmetros avaliados para elaboração da tabela de vida.

Tabela de vida

Os parâmetros da tabela de vida foram calculados usando o método descrito por Maia et al. (2000), conforme Southwood & Henderson (2000). Os parâmetros usados para confecção das tabelas foram a sobrevivência até adulto (proporção), tempo de desenvolvimento imaturo, razão sexual, e fertilidade diária por casal até morte dos indivíduos. Foram estimados pela tabela de vida os seguintes parâmetros demográficos: taxa líquida reprodutiva (produção de fêmeas por fêmea parental, R_0), tempo médio de uma geração (T) taxa intrínseca de crescimento populacional (produção diária de fêmeas por fêmea parental, r_m) e tempo médio para que a população dobre o tamanho (Dt). Estes foram determinados como descrito por Birch (1948) e Carey (1993), usando o método e protocolo do SAS desenvolvido por Maia et al. (2000).

Análises estatísticas

Os dados da sobrevivência de fêmeas parentais foram submetidos à análise de sobrevivência e usados nos testes de qui-quadrado (log-rank) para verificar a igualdade das curvas de sobrevivência entre as concentrações de toxina (PROC LIFETEST; SAS Institute, 2002).

Para ambos os bioensaios com toxina purificada em dieta e com folhas de planta, as variâncias associadas com as estimativas dos parâmetros de crescimento populacionais foram determinadas pelo método de jackknife (Efron, 1982; Meyer et al., 1986), utilizando o protocolo do SAS desenvolvido por Maia et al., (2000). Este

permite o cálculo dos intervalos de confiança para todos os parâmetros estimados e fornece testes *t* para realizar comparação pareada ou múltipla entre grupos usando seus respectivos valores de *P*.

Para o bioensaios com toxina em dieta, a taxa líquida reprodutiva (R_0), tempo de geração (T) e taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) e biomassa das fêmeas e machos (mg) foram submetidos à análise de regressão utilizando concentração da toxina Cry1Fa como variável independente (TableCurve 2D; SPSS, 2000). Antes de realização destas análises, foi empregada a análise de resíduo para verificar se os pressupostos de homogeneidade de variância e normalidade foram atendidos (PROC MIXED, PROC UNIVARIATE, PROC GPLOT; SAS Institute, 2011), não sendo necessária transformação dos dados. Modelos de regressão, desde aqueles mais simples (linear e quadrática) até modelos alternativos de crescente complexidade (modelos de pico não-lineares), foram testados e a seleção do modelo foi baseado na simplicidade, alto valor de F (e quadrados médios) e aumento acentuado de ajustado- R^2 (adj.- R^2) com a complexidade do modelo.

Por fim, também foi realizado análise de correlação entre a taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) e o tempo médio por geração (T), taxa líquida de reprodução (R_0) e taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) (PROC CORR; SAS 2002) para o experimento de doses subletais.

RESULTADOS

Bioensaios com toxina em dieta

Sobrevivência parental

Não houve diferença significativa na sobrevivência diária de fêmeas resistentes a toxina Cry1Fa (Long-Rank $\chi^2=4.3467$; g.l = 6; $P = 0.63$, Figura 1) nas dose da toxinas Cry1Fae no tempo de vida médio (Figura 2).

Biomassa parental e da progênie

Não houve diferença significativa na biomassa de lagartas aos 10 dias (76.67 ± 21.62 mg; $F_{(1, 54)} = 2.14$; $P = 0.15$). No entanto, houve efeito significativo na exposição da toxina Cry1Fa em relação as biomassas depupasde fêmeas ($P = 0.008$)e machos parentais ($P=0.03$)na dose 2187 ng/cm^2 de Cry1Fa (Figura 3A e 3B), já as demais doses não diferiram da testemunha.Com relação a prole não foi verificada diferença nas biomassas pupas de fêmeas (254.29 ± 1.8 mg; $F_{(1,312)} = 1.06$; $P = 0.30$)e dos machos da progênie (257.25 ± 1.08 mg; $F_{(1,351)}= 3.84$; $P > 0.05$).

Desempenhodos insetos

A toxina Cry1Fa não afetou de forma significativa o tempo médio de sobrevivência fêmeas parentais para a linhagem resistente de *S. frugiperdaa* toxina Cry1Fa (8.6 ± 0.50 dias; $F_{(1,5)} = 1.21$; $P=0.32$). Em contraste, a taxa líquida de reprodução foi afetada pela exposição a doses sub-letais da toxinas Cry1Fa ($P = 0.01$). A taxa líquida de reprodutivavariou de 305.58 ± 37.54 a 118.2 ± 14.92 de prole feminina produzidos por fêmea parental (729 e 6561 ng/cm^2 de toxina Cry1Fa)e exibiu um pico a 729 ng/cm^2 de Cry1Fa (Figura 4A).

A taxa intrínseca de crescimento da população (r_m) foi significativamente correlacionada com a taxa líquida de reprodução ($n = 7$; $r = 0.94$; $P = 0.0018$) e mostrou tendência semelhante a este parâmetro (Figura 4B.), Sem contribuição significativa de tempo de geração para tal variação ($n = 7$; $r = 0.05$; $P = 0.92$).

Bioensaios com folhasde plantas de milho Bt e não-Bt

Experimentos de tabela de vida

Houve diferença significativa entre os indivíduos resistentes expostos aos dois híbridos de milho Bt e não-Bt para o tempo médio por geração (T), já para a taxa

liquida reprodutiva (R_0), a taxa intrínseca de crescimento populacional (r_m) e tempo para que a população dobre o tamanho (Dt) não houve diferença significativa. Curiosamente todos os parâmetros da tabela de vida demonstram um favorecimento aos indivíduos resistentes quando expostos a milho Bt, chamando a atenção para o número de fêmeas produzidas por fêmea parental (R_0) foi maior no indivíduos que foram expostos ao híbrido de milho Bt (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Hormese é caracterizada por uma estimulação de baixa dose, e uma inibição de dose elevada por um determinado composto (Calabrese e Baldwin, 2003; Calabrese 2008). Duas condições experimentais são necessários para reconhecer hormesis: várias doses subletais de um composto tóxico e parâmetros de avaliação capaz de exibir as respostas tanto estimuladoras e inibidoras (Calabrese e Baldwin, 2003). A resposta inibitória da *Spodoptera frugiperda* a uma concentração alta dose da toxina Cry1Fa é demonstrada no nosso estudo na taxa de crescimento da população onde foi reduzida (e fertilidade) obtidos com uma linhagem resistente a toxina Cry1Fa. Tais taxas negativas de crescimento populacional indicam uma redução da população de insetos com o tempo. A resposta estimuladora da linhagem resistente da lagarta do cartucho foi também observado em nosso estudo pelo pico na taxa de crescimento da população (e fertilidade) observada em 729 ng/cm² de Cry1Fa, sem comprometimento da qualidade do sexo feminino (indicado pela ausência de efeito sobre o corpo massa da prole feminina). Além disso, verificou-se um aumento da biomassa pupal dos parentais. Tais condições satisfazem os critérios de hormesis, que se tornou evidente a 729 ng/cm² de Cry1Fa. Evidência de uma resposta bifásica à exposição a baixos níveis de Bt foi verificada em uma linhagem de *Tricloplusiani* (Lepidoptera: Noctuidae) selecionada para resistência a inseticida biológico Bt, esta resposta foi relatada no aumento da biomassa (Janmaat et al., 2014).

Quando as lagartas foram expostas a folha de milho Bt tiveram um tempo médio de geração (T) menor do que as larvas expostas a folha de milho não-Bt. Esta resposta também foi registrada em outro estudo com uma população resistente de

Plutellaxylostella (Lepidoptera: Plutellidae) a toxinas Bt. Neste caso se demonstrou que cresceram mais rapidamente e produziram maiores pupas quando alimentadas com discos de folhas tratadas com um nível subletal de Bt comparadas as larvas alimentadas com folhas não tratadas (Sayyed et al., 2003).

Uma possível causa fisiológica para aumento do crescimento da população de *S. frugiperda* pode estar correlacionado ao aumento na biomassa pupal dos parentais neste estudo. Há duas hipóteses para isto, a primeira é que alimento de baixa qualidade nutricional (com a toxina Bt) leva a um aumento na taxa de consumo de larvas demonstrado no estudo de Janmaat et al., 2014 com linhagem de *Tricoplusiani* resistente a Bt e a segunda é que pode haver melhor assimilação ou digestibilidade aproximando assim da quantidade de alimento ingerido que é digerido pelas larvas (Campero et al., 2007) e este estímulo leva ao aumento do crescimento da população. Já demonstrado em estudos anteriores que a fecundidade de *Spodoptera* spp. está relacionada com reservas de nutrientes adquiridos durante os estágios larvais (Jakka et al., 2014).

Apesar da evidência de hormese induzida por uma toxina em uma linhagem resistente à toxina Cry1Fa de *S. frugiperda*, ainda não se sabe como em geral é a ocorrência de hormese nesta linhagem, uma vez que apenas uma única linhagem foi utilizada neste estudo. A expansão desta investigação para linhagens resistentes e suscetíveis a toxinas Bt e com diferentes composição genética permitirá o reconhecimento da generalidade do fenômeno. Deve-se ressaltar que não há estudos sobre rigorosos sobre os efeitos subletais que toxinas Bt podem causar a organismos-alvos e principalmente considerando a variação na produção destas toxinas em plantas. Esse esforço também vai permitir uma melhor avaliação do seu impacto potencial em programas de manejo da resistência.

A identificação de hormese nesta população de *S. frugiperda* resistente à toxina Cry1Fa deve ser reconhecida como um potencial desafio ao manejo de populações de insetos-praga resistentes a toxinas Bt. Isso é especialmente importante em países como Brasil, onde a resistência a plantas Bt a campo já foi documentada e a frequência de alelos de resistência é alta (Santos-Aamaya, 2014, Farias et al., 2014). Isto porque, como demonstrado neste estudo, toxinas produzidas pelas plantas Bt podem aumentar o crescimento populacional do inseto-alvo e favorecer o aumento da

frequência de alelos de resistência. Este fenômeno pode contribuir no aumento nos danos causados pelo inseto às plantas e também na perda de eficácia de outros cultivares Bt por diminuir a suscetibilidade a estes. Além disso, hormese pode favorecer ocorrência de surtos de pragas secundárias menos suscetíveis a Bt, o que poderia também levar a mudança no status de praga e isso precisa ser mais investigado.

Em resumo, foi demonstrado aqui o fenômeno de hormese induzida pela toxina Cry1Fa em uma população de *S. frugiperda* resistente à toxina Cry1Fa de *B. thuringiensis*. Este fenômeno é potencialmente importante para o manejo da praga a campo e pode favorecer a evolução da resistência a toxinas Bt. Desta forma, é importante realizar mais estudos para identificar potenciais efeitos estimulatórios desencadeados por baixas concentrações de toxina produzidas por plantas sobre as pragas-alvos no campo. Estas informações devem ser consideradas no delineamento de estratégias de controle e em programas de manejo da resistência de insetos a plantas Bt. Hormese pode ainda ser um dos fatores que contribuiu para a rápida evolução de resistência ao milho Bt Cry1Fa em populações de campo de *S. frugiperda*, ideia que aqui foi demonstrado ser plausível.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A toxina Cry1Fa induziu elevado desempenho demográfico de uma população resistente de *S. frugiperda*, apresentado um pico estimulatório de crescimento populacional na concentração de 729 ng/cm², evidenciado em experimentos de tabela de fertilidade. Também foi verificado incremento no ganho da biomassa dos indivíduos expostos a baixas concentrações mais da toxina. Assim, fica documentado nesta dissertação, pela primeira vez, a ocorrência de hormese induzida por toxina de *B. thuringiensis* em uma população resistente de *S. frugiperda*.

FIGURAS E TABELAS

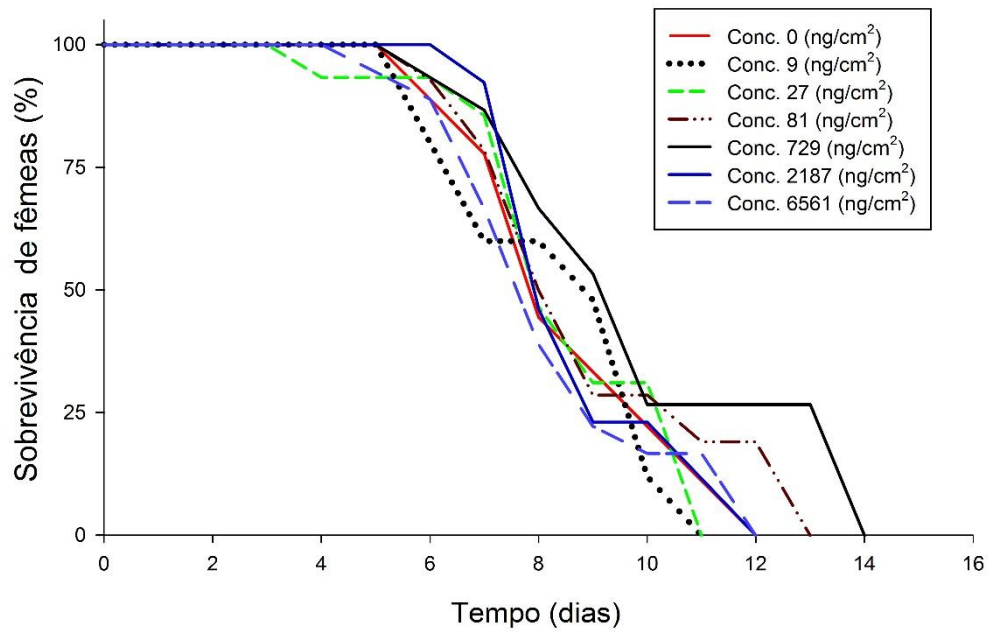


Figura 1. Sobrevivência de fêmeas parentais de uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa expostas a doses subletais da toxina.

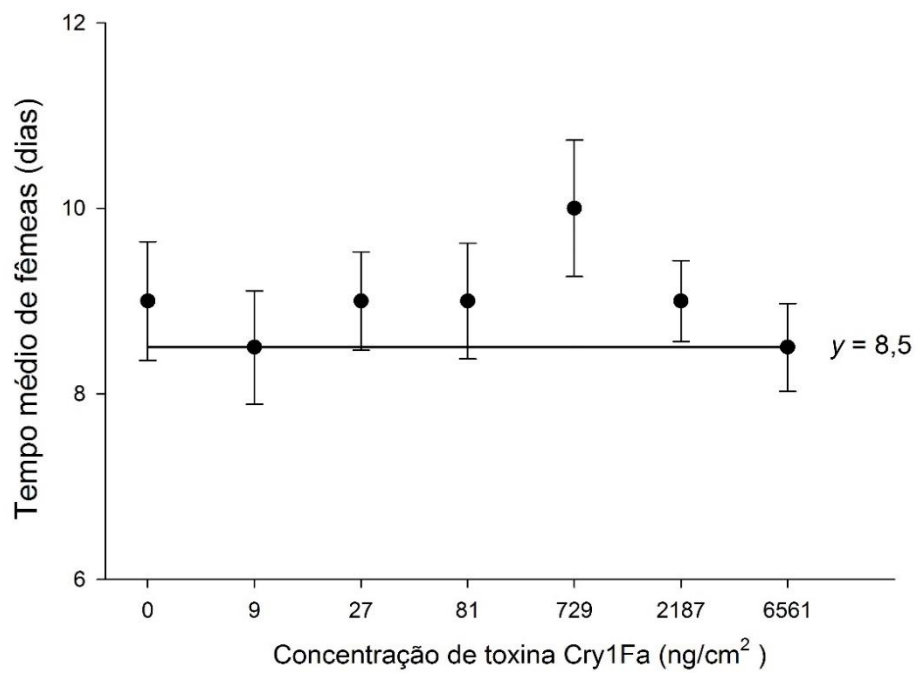


Figura 2. Tempo médio de sobrevivência (\pm EP) de fêmeas parentais de uma linhagem de *S. frugiperda* resistente a Cry1Fa expostas a doses subletais da toxina.

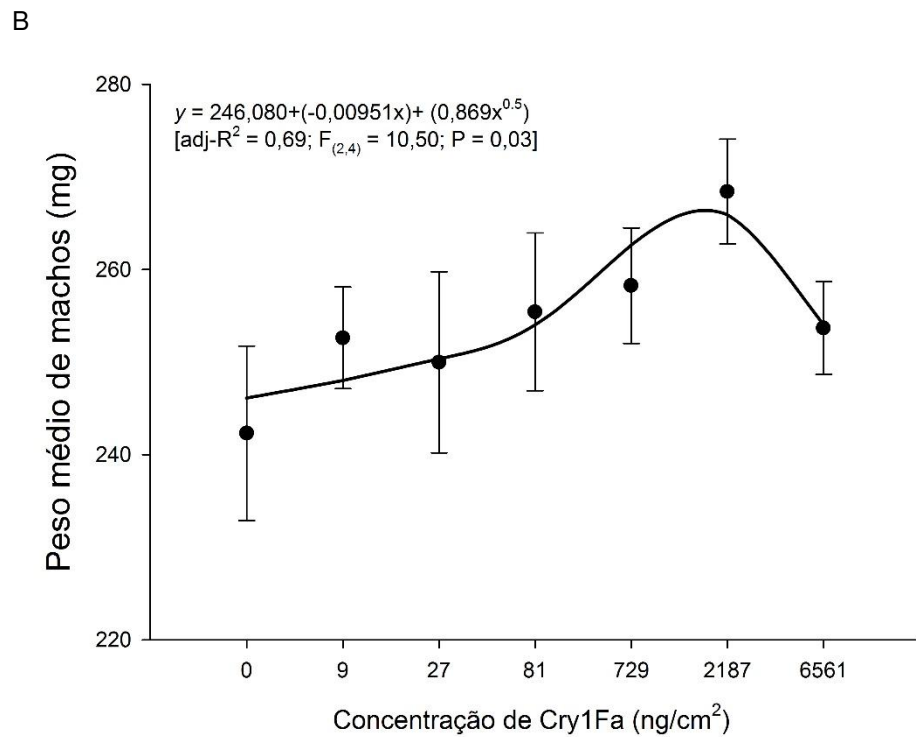
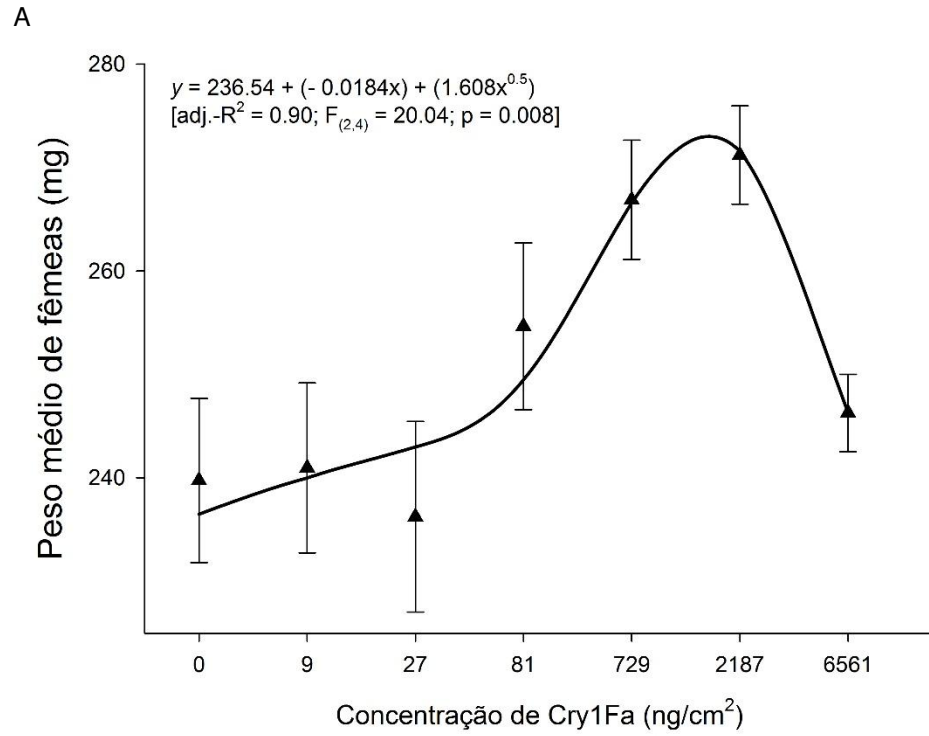


Figura 3. Biomassapupal (média \pm EP) dos parentais de fêmeas (A) e dos machos (B) a partir de uma linhagem resistente toxina Bt de *Spodopterafrugiperda* expostas a doses subletais da toxina Cry1Fa.

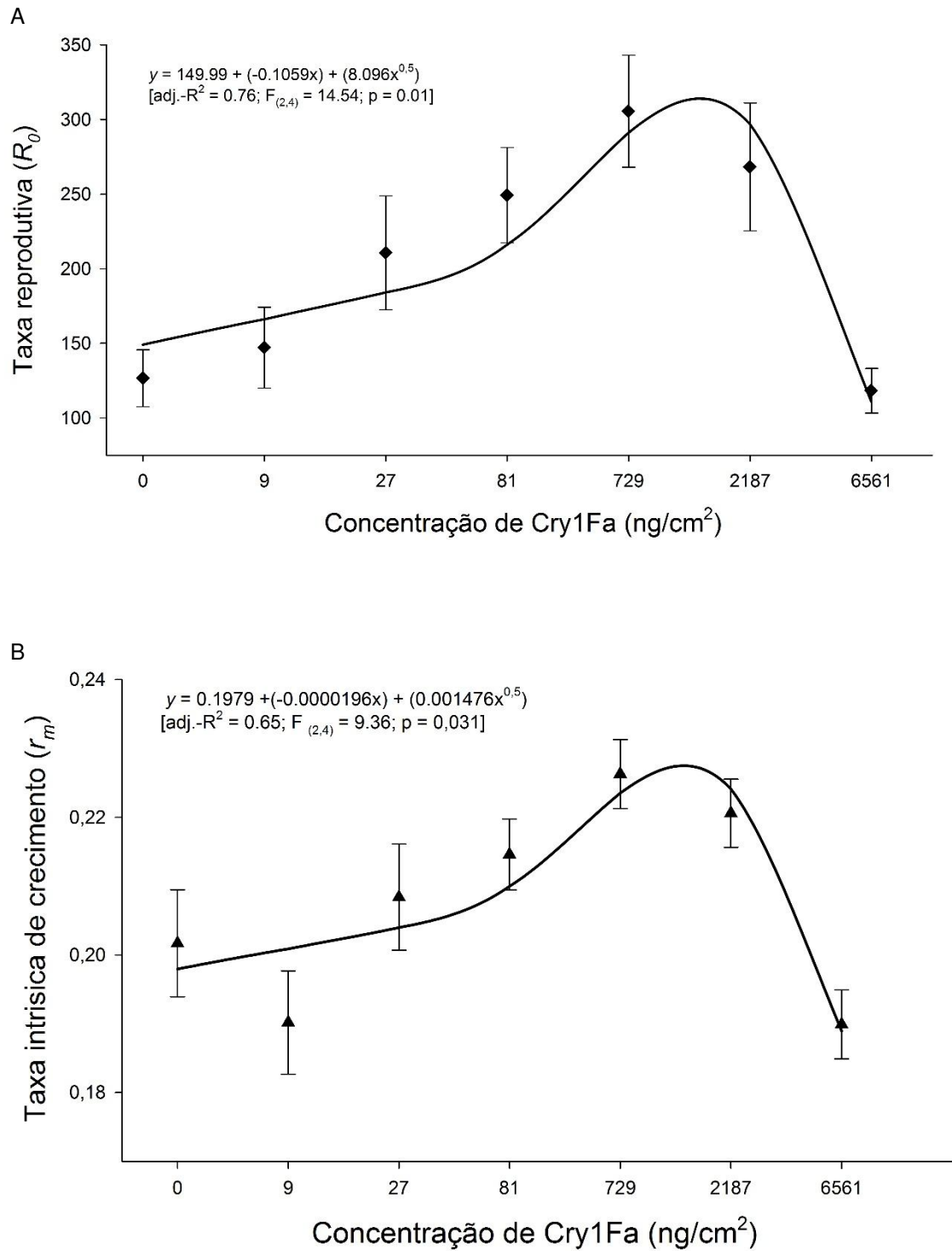


Figura 4. Taxa reprodutiva (a) e taxa intrínseca de crescimento populacional (b) de uma linhagem de *Spodoptera frugiperda* resistente a toxina Bt expostos a doses subletais da toxina Cry1Fa. Valores são média \pm EP.

Tabela 1. Comparação de parâmetros de crescimento da população resistente a Cry1Fa de *S. frugiperda* (média e intervalo de confiança 95%) alimentadas em dois híbridos de milho.

Híbrido de milho	Parâmetro de crescimento populacional			
	R_o	r_m	T	Dt
Bt	226.89 a (141.7 - 312.1)	0.20 a (0.18- 0.21)	27.7 a (26.7 - 28.6)	3.52 a (3.25 - 3.80)
Não-Bt	183.72 a (132.9- 234.6)	0.18 a (0.17 - 0.19)	28.7 b (27.8 - 29.5)	3.80 a (3.56 - 4.04)

R_o , taxa reprodutiva líquida (fêmeas/fêmea/geração); r_m , taxa intrínseca de incremento populacional (por dia); T , tempo médio por geração (dias); Dt , tempo para que a população dobre o tamanho. Para cada parâmetro, valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si significativamente ($P > 0.05$) pelo método de jackknife usando o programa estatístico SAS (SAS Institute, 2011) (Maia et al., 2001).

REFERÊNCIAS

- Birch, L.C. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. **Journal of Animal Ecology**, v. 17, p. 15-26, 1948.
- Brattsten LB, Holyoke CW, Leeper JR, Raffa KF, Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research. **Science**, v. 231, 1255–1260, 1986.
- Calabrese EJ. Hormese: why it is important to toxicology and toxicologists. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, 1451–1474, 2008.
- Calabrese EJ. Hormese: from marginalization to mainstream – a case for hormese as the default dose–response model in risk assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.197, 125–136, 2004.
- Calabrese. E.J; Baldwin L.A. Hormese: the dose-response revolution. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.43, 175–197, 2003.
- Campero, M.; Slos, S.; Ollevier, F.; Stoks, R. Sublethal pesticide concentrations and predation jointly shape life history: behavioural and physiological mechanisms. **Journal of Applied Entomology**. 17, 2111–2122, 2007
- Capinera, J.-Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*-(J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **The University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences**. (UF/IFAS), 2000.
- Carey, J. R. Applied demography for biologists with special emphasis on insects. **New York: Oxford University Press**, 1993.
- Cohen, E. Pesticide-mediated homeostatic modulation in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, 21–27, 2006.
- Crespo, A.L.B.; Spencer, T.A.; Tan, S.Y.; Siegfried, B.D. Fitness cost of Cry1Ab resistance in a field-derived strain of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Economic Entomology**, v. 103, p.1386-1393, 2010.
- Cruz, J.C. (Ed.). Cultivo do Milho. 6.ed. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**. 2010. (Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de produção, 1). Disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm. Acessado em 16/07/2015.
- Cutler, G.C.; Ramanaidu, K.; Astatkie, T.; Isman, M.B. Green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), reproduction during exposure to sublethal concentrations of imidacloprid and azadirachtin. **Pest Management Science**, v. 65, n. 2, p. 205-209, 2009.
- Efron B, 1982. The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, 1982.
- Faria, J.R.; Andow, D.A.; Horikoshi, R.J.; Sorgatto, R.J.; Fresia, P.; Dos Santos, A.C.; Omoto, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by

- Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p.150-158, 2014.
- Farias, J. R., Andow, D. A., Horikoshi, R. J., Sorgatto, R. J., Santos, A. C. D., & Omoto, C. Dominance of a Cry1F resistance in *Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, 2015.
- Forbes, V.E; Calow, P. Is the per capita rate of increase a good measure of population-level effects in ecotoxicology? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, 1544–1556, 1999.
- Gould, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annul Review Entomology**, v. 43, p. 701-726, 1998.
- Guedes, R.N.C.; Cutler, G. C. Insecticide-induced hormese and arthropod pest management. **Pest Management Science**, v. 70, n. 5, p. 690-697, 2014.
- Guedes, N. M. P; Tolledo, J. ;Corrêa, A. S.; Guedes, R. N. C. Insecticide-induced hormese in an insecticide-resistant strain of the maize weevil, *Sitophiluszeamais*. **Journal of Applied Entomology**, v. 134, n. 2, p. 142-148, 2010.
- Guedes, R.N.C; Magalhaes, L.C.; Cosme, L.V. Stimulatory sublethal response of a generalist predator to permethrin: hormese, hormoligosis, or homeostatic regulation?**Journal Economic Entomology**, v.102, 170–176. 2009.
- Jakka, S.R.K.; Knight, V.R.; Jurat-Fuentes, J.L. Fitness Costs Associated with Field-Evolved Resistance to Bt Maize in *Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Economic Entomology**, v. 107(1), p. 342-351, 2014.
- Janmaat, A.F.; Bergmann, L.; Ericsson, J. Effect of low levels of *Bacillus thuringiensis* exposure on the growth, food consumption and digestion efficiencies of *Trichoplusiani* resistant and susceptible to Bt. **Journal of invertebrate pathology**, v. 119, p. 32-39, 2014.
- Hardin, M.R.; Benrey B.; Coll, M.; Lamp W.O.; Roderick, G.K.; Barbosa, P. Arthropod pest resurgence: an overview of potential mechanisms. **Crop Protection**, v.14, 3–18, 1995.
- Hemingway J, Field L, Vontas J. An overview of insecticide resistance. **Science**, v. 298, 96–97, 2002.
- Kasten-Junior, P.; Precetti, A.A.C.M.; Parra, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodopterafrugiperda*(J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v.53, (2), p. 68-78, 1978
- Knight, A.L.; Norton G.W.; 1989. Economics of agricultural pesticide resistance in arthropods. **Annul Review Entomology**, v. 34, 293–313.
- Maia, A.H.N; Luiz, A.J.B; Campanhola, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal Economic Entomology**, v.93, 511–518, 2000.

- Marçon, P.C.R.G.; Young, L.J.; Steffey, K.L.; Siegfried, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 279-285, 1999.
- Meyers, J.S.; Ingersoll, C.G.; McDonald, L.L.; Boyce, M.S. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. **Ecology**, v. 67, p. 1156–1166, 1986.
- Nguyen, H.; Jehle, J. Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 114, n. 2, p. 82-87, 2007.
- Pereira, E.J.G.; Storer, N.P.; Siegfried, B.D. Fitness cost of Cry1Fa resistance in laboratory-selected European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal Applied Entomology**, v. 135, p. 17-24, 2009.
- SAS Institute. 2011. SAS user's manual, version 9.0. SAS Institute, Cary NC.
- Santos-Amaya, O. F. Caracterização da resistência a Cry1Fa em populações brasileiras de *Spodopterafrugiperda*. **Universidade Federal de Viçosa, Tese**, p. 87, 2014.
- Sayyed, A.H.; Cerda, H.; Wright, D. Could Bt transgenic crops have nutritionally favourable effects on resistant insects? **Ecology Letters**, v.6, 167–169, 2003.
- Southwood, T.R.E; Henderson, P.A. Ecological methods with particular reference to the study of insect populations. **Chapman & Hall**, London, 2000.
- SPSS, 2000. Tablecurve 2D: user's guide. SPSS, Chicago.
- Stark, J.D.; Banks, J.E. Population-level effects of pesticides and other toxicants on arthropods. **Annual Review Entomology**, v. 48, 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: *Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031-8,2010.
- Székács, A.; Lauber, É.; Juracsek, J.; Darvas, B. Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 182-190, 2010.
- Tabashnik, B.E.; Brévault, T.; Carrière, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510-521, 2013.
- Velez, A.M.; Spencer, T.A.; Alves, A.P.; Crespo, A.L.B.; Siegfried, B.D. Fitness of Cry1Fa resistance in fall armyworm, *Spodopterafrugiperda*. **Journal of Applied Entomology**, doi: 10.1111/jen.12092, 2013.
- Zanuncio, T.V; Serraão, J.E.; Zanuncio JC, Guedes RNC., Permethrin-induced hormese on the predator *Supputiuscincticeps* (stal, 1860) (Heteroptera: Pentatomidae). **Crop Protection**, v. 22, 941–947, 2003.

Wolfenbarger, L.L.; Phifer, P.R. Biotechnology and ecology – The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. **Science**, v. 290, p. 2088-2093, 2000.